



016723
29
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS Y SUS
MICOTOXINAS A PARTIR DE SORGO CON ALTO
GRADO DE HUMEDAD Y SUS EFECTOS EN
ANIMALES EXPERIMENTALES**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCION
DEL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS. PATOLOGIA ANIMAL.

ANTE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DE LA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DE LA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POR

VICTORIA MARTHA CHAVEZ NIÑO

ASESORES: MVZ Ph D. René Rosiles Martínez.

MVZ Ph D. Roberto A. Cervantes Olivares.

MEXICO, D. F. 1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	19
RESULTADOS.....	27
CUADROS.....	34
FIGURAS.....	44
DISCUSION.....	48
LITERATURA CITADA.....	58

RESUMEN

CHAVEZ NIÑO VICTORIA MARTHA. Aislamiento e identificación de hongos y sus micotoxinas a partir de sorgo con alto grado de humedad y sus efectos en animales experimentales (Bajo la dirección de los M.V.Z. René Rosiles Martínez y Roberto A. Cervantes Olivares).

A partir de cuatro muestras de sorgo del Estado de Tamaulipas, se aislaron e identificaron los siguientes hongos productores de micotoxinas al inocularse en sorgo y arroz. Aspergillus chevalieri positivo en sorgo, a una banda fluorescente con Rf de 0.9; Aspergillus nidulans positivo a zearalenona en sorgo y arroz, así como ochratoxina A y una banda fluorescente con Rf de 1.5 en arroz. Helycomices sp. positivo en sorgo a aflatoxina B1 y a una banda fluorescente con Rf de 0.9. Cephalosporium positivo a Ochratoxina A en sorgo. Aspergillus flavus positivo a aflatoxina B1 (40 ppm en sorgo y 4 ppm en arroz). Para la prueba biológica se utilizaron ratones machos en crecimiento. Los animales fueron alimentados por 21 días y pesados cada 7 días. Luego, se procedió al sacrificio, necropsia y pesaje del hígado, bazo y riñones. Dichos órganos se recolectaron para su estudio histopatológico. Se encontró, una baja de peso estadísticamente significativa en los animales alimentados con arroz inoculado con Aspergillus nidulans. La

conversión alimenticia fué menor en los grupos con dietas inoculadas con Aspergillus chevalieri y arroz con Aspergillus nidulans. El peso de los órganos varió para cada hongo probado mostrando en algunos casos aumento y en otros disminución. Macroscopicamente no se encontraron lesiones. Microscopicamente, se observó necrosis hepática multifocal y congestión renal en los animales alimentados con arroz inoculado con Aspergillus nidulans. Se concluye que es significativo el hallazgo de varios hongos micotoxigénicos obtenidos del sorgo, que no son descritos en la literatura .

INTRODUCCION.

Los alimentos contaminados con micotoxinas constituyen un problema importante para las explotaciones pecuarias debido al empobrecimiento nutricional de los alimentos y al efecto tóxico de estos compuestos en los organismos animales.

En general, los factores que más influyen para que un producto se contamine son:

1) La presencia de la cepa toxigénica.- Los materiales destinados al consumo humano y animal, están expuestos continuamente a hongos y sus esporas (1).

La capacidad de síntesis de micotoxinas se presenta en cepas de algunos generos de hongos y de acuerdo con su capacidad toxigénica se han agrupado en buenas productoras, de mediana producción y de baja producción. Así, por ejemplo, se ha visto que de 169 cepas del género Aspergillus, sólo el 33% de las especies de A. flavus resultaron toxigénicas (25).

2) El sustrato.- Los hongos pueden crecer en una amplia gama de sustancias como forrajes, cebos (grasa animal), alimentos balanceados, oleaginosas y granos de cereales como el maíz, arroz, cebada, avena, trigo, centeno y sorgo entre otros, los que son un buen medio para la producción de metabolitos tóxicos (25,39,72).

3) Condiciones ambientales.- En este grupo se incluyen principalmente los cambios climáticos que prevalecen en el campo antes de la cosecha y las variaciones ambientales que se

presentan en el almacén (15,38,63).

Los estudios realizados a nivel mundial sobre las causas que provocan la presencia de los hongos y sus micotoxinas en los granos, mencionan como un punto importante, las características del almacenamiento (16). La humedad y temperatura óptimas, la aereación deficiente y el tiempo que pasa el grano en las bodegas propician la proliferación de los hongos. Sin embargo, se ha sugerido a la temperatura y a la humedad como los factores que más influyen (28,31,37,79).

La temperatura para el desarrollo de los hongos puede ir desde la congelación hasta los 60°C, aunque su crecimiento mayor se da entre los 20° y 30°C. Además se ha observado que los cambios de temperatura también influyen en la cantidad y el tipo de toxina formada (32,39,79).

Con base en sus necesidades de humedad, a los hongos se les agrupa en tres amplias categorías: de campo, de almacenamiento y de descomposición avanzada.

La mayoría de los hongos de campo comprenden a los géneros Alternaria, Helminthosporium, Fusarium, Cladosporium, Claviceps: éstos invaden semillas en desarrollo mientras están en la planta y requieren de 22 a 25% de humedad.

Para el crecimiento de los hongos de descomposición avanzada, la humedad necesaria es similar a la requerida por los hongos de campo y su crecimiento se establece primordialmente después de la cosecha; en éste grupo el género Fusarium es el de mayor trascendencia.

Los hongos de almacenamiento se presentan cuando las condiciones de humedad en los graneros oscilan entre el 13 y 18% y corresponden principalmente a las cepas de Aspergillus y Penicillium (26,55).

Cuando el proceso de deshidratación de los granos es rápido, existe poca oportunidad para la invasión por hongos. La interrupción y retraso en el ciclo de secado por acción de las lluvias o por un tiempo excesivamente húmedo ocasiona la proliferación de los mohos en los granos intactos, con la subsiguiente formación de toxinas. Por lo tanto, se ha demostrado que en las regiones cálidas húmedas, la contaminación por micotoxinas representa un problema severo (38).

Hasta ahora se han identificado en forma experimental cerca de 90 micotoxinas, pero afortunadamente las que contaminan alimentos en condiciones naturales son sólo algunas, entre las que se mencionan: aflatoxinas, citrinina, ochratoxina A, vomitoxina, sterigmatocistina, zearalenona, tricoteceno, ácido penicílico, esporidesmina y patulina (25).

Las micotoxinas presentes en los granos de cereales, son producidos por diversos hongos que requieren temperatura y humedad variables. Así mismo, el tipo de sustrato constituye un factor importante para determinar cuál metabolito se producirá. Además, los efectos biológicos que provocan también pueden variar de acuerdo a la especie afectada y a la dosis administrada (63).

Las amplias investigaciones realizadas en otros países demuestran que varias micotoxinas como la zearalenona, ochratoxina A, aflatoxinas, tricotecenos y otras sustancias no identificadas se han detectado en el grano de sorgo y se ha comprobado que producen potentes efectos dañinos tanto en los humanos como en los animales domésticos (32,38,63).

A continuación se describen brevemente las principales micotoxinas de mayor significancia y sus efectos en los animales domésticos:

TRICOTECENOS:

Los tricotecenos son un grupo de metabolitos de hongos, entre los que se mencionan a la toxina T2, el diacetoxiscirpenol, el deoxinivalenol y el nivalenol (30,39).

Las especies productoras de tricotecenos comprenden al Fusarium tricinctum, aislado de maíz (29), F. roseum, F. semitectum var. majus identificado en sorgo, F. solani en frijol de soya, F. nivale en trigo y F. poae en varios cereales.

El crecimiento de Fusarium sobre los granos requiere de un alto contenido de humedad (20 - 22 %) y por otra parte, la temperatura es crítica y puede determinar cuál tricoteceno tóxico se producirá (39,79), por ejemplo, el F. poae elabora la toxina T2 a temperaturas bajas (8° C), en contraste con el F. graminearum que necesita temperaturas altas (25° a 27°C) para

elaborar deoxinivalenol (79).

La actividad biológica tóxica de los tricotecenos muestra un patrón similar (39). La toxina T2 y el diacetoxiscirpenol (DAS) están estrechamente relacionadas en su estructura química y en sus efectos biológicos. Su acción incluye epitelionecrosis de piel y membranas mucosas en todas las especies animales, así como depresión hematopoyética y hemorragias en algunas especies. La dosis letal oral 50 (DL 50) en ratas es de 3.8 mg/kg para la toxina T2 y 7.3 mg/kg para DAS. Ambos son inhibidores de la síntesis de proteínas. Se ha observado que después de la administración de toxina T2 a ratas y pavos, éstos presentan una necrosis extensa en timo, bazo, y nódulos linfáticos, lo que implica un papel potencial en la interferencia con la respuesta inmunológica (63,74). Además se menciona que la toxina T2 produce necrosis de las células parenquimatosas de la corteza adrenal en ratones hembras (74). En el ganado bovino se han encontrado alteraciones hemorrágicas que van desde epistaxis hasta diarrea hemorrágica, después de la ingestión de maíz contaminado con la toxina T2 (23,29), mientras que en ovinos se ha detectado leucopenia, linfopenia y depleción linfoide (21).

En el caso del deoxinivalenol o vomitoxina, las pérdidas económicas mayores se relacionan con el rechazo del alimento por los cerdos (20), lo que se ha asociado con niveles de deoxinivalenol de 10 ppm en el maíz (39). En dosis mínimas es un potente agente emético para dicha especie, mientras que en

los pollos la administración de dosis letales (140 mg/kg de peso) propicia la aparición de abundantes hemorragias equimóticas en la canal, depósitos diseminados de uratos, alteraciones del sistema nervioso e irritación del tracto gastrointestinal superior (33). Sin embargo, la potencialidad tóxica de la vomitoxina en las aves ha sido cuestionada ya que resultados experimentales indican que los pollos jóvenes y pavipollos no se ven afectados por la ingestión de la micotoxina en dosis bajas. En cuanto a las gallinas de postura, pueden tolerar niveles de vomitoxina hasta de 4.9 mg/kg por 24 semanas sin efectos significativos en la producción de huevo, conversión de alimento o desarrollo de lesiones orgánicas, excepto por degeneración grasa del hígado, cambios inconsistentes en el peso del huevo y en el grosor y peso relativo del cascarón (40,47,58,59). En este caso, probablemente la razón principal de la baja toxicidad de la vomitoxina se debe a que esta sustancia se absorbe poco (50).

ZEARALENONA:

La zearalenona y un derivado de ésta, el zearalenol, son metabolitos secundarios estrogénicos de algunas especies de Fusarium, especialmente el F. roseum "Graminearum" (F. graminearum) y F. roseum "Gibbosum" (F. equiseti) (26,29,56), también se consideran al F. tricinctum y F. oxysporium (40). Dicha toxina se ha detectado en un amplio rango de productos

naturales que incluyen alimentos de consumo humano como la cerveza de maíz, cereales y ensilados (39).

La producción de zearalenona está asociada a las condiciones climáticas ambientales. Las temperaturas bajas o bien, las alternadas bajas y altas, favorecen la elaboración de la toxina, lo que se ha podido comprobar en varias especies de Fusarium. Un ejemplo claro se observó en un aislamiento de F. roseum cultivado en sorgo el cual produjo más zearalenona a los 25°C que a los 10°C (39). Además se ha reportado que la humedad requerida para su elaboración es de 23% o mayor (63).

En general, a las toxicosis con zearalenona se les ha involucrado con múltiples alteraciones reproductivas. En los cerdos y bovinos, causan infertilidad, estros constantes e hiperestrogenismo (7,12,56,57,82). Los efectos estrogénicos de la zearalenona también se han demostrado en ratas, ratones, cuyes y pavos. En éstos últimos ocurre prolapsos cloacal (39,82), mientras que en los bovinos se ha asociado a abortos (40).

MONILIFORMINA Y FUMONISINA:

La toxina moniliformina se ha aislado de sustratos naturalmente infectados con cultivos de F. moniliforme, F. fusarioides, F. avenaceum, F. oxysporum, F. acuminatum, F. concolor, F. equiseti y F. semitectum (39,49).

Las especies de Fusarium productoras de moniliformina se

han encontrado en maíz, cacahuate, sorgo, mijo, pescado seco y tierra. En el laboratorio esta micotoxina se ha obtenido de maíz a 25°C y de grano quebrado a 28°C. Así mismo, la más alta producción de moniliformina por F. fusarioides se obtuvo a 31°C después de siete días de incubación (39). La humedad requerida para su producción es de 20% o mayor.

La moniliformina es extremadamente tóxica para ratas, pavos, ratones y pollos (39,73). En ratas y pavos causa debilidad, problemas respiratorios, cianosis y ocasionalmente la muerte. Las lesiones encontradas en las ratas corresponden a zonas de necrosis en hígado, riñón, páncreas, glándula adrenal, glándulas de la mucosa gástrica, criptas del intestino y degeneración del miocardio (39); además se ha probado que es un agente hepatotóxico y hepatocarcinogénico (73). Por otra parte, en un trabajo realizado por Kommedahl y colaboradores, se encontró que todos los aislamientos toxigénicos de Fusarium oxysporum y Fusarium moniliforme causaron hematuria ó hemorragias del estómago, timo o intestino en ratas alimentadas con dietas experimentales que contenían arroz contaminado con estos hongos (42).

En el caso de los burros, mulas y caballos, se ha sugerido a la moniliformina como la responsable de la leucoencefalomalacia que se presenta después del consumo de alimento enmohecido (4,5,8,17,41,46,81). Sin embargo, esto no ha podido reproducirse experimentalmente (60).

En estudios recientes se ha determinado que la micotoxina

fumonisina B₁ producida por el Fusarium moniliforme causa la leucoencefalomalacia en equinos y además ha sido implicada en el síndrome de edema pulmonar en cerdos. En los Estados Unidos se han notificado brotes diseminados, debido al uso del maíz producido en 1989, por lo que científicos de los laboratorios de Servicios Nacionales Veterinarios en EUA han desarrollado un método analítico para determinar la presencia de la micotoxina fumonisina B₁ en alimento para cerdos y equinos (11).

AFLATOXINAS:

Las aflatoxinas son un grupo de micotoxinas elaboradas por cerca del 10% de las cepas de Aspergillus flavus, A. parasiticum y Penicillium puberulum (37,63).

Se conocen cerca de 18 compuestos en la familia de las aflatoxinas, algunos de los cuales ocurren en el alimento contaminado, mientras que otros son metabolitos formados en el organismo animal después de la ingestión del alimento contaminado (63). Existen cuatro aflatoxinas mayores: B₁, B₂, G₁ y G₂. La toxina B₁ produce metabolitos en el organismo pocas horas después de la ingestión de alimentos contaminados y aparecen en la orina, leche y carne. La aflatoxina M₁ es un metabolito importante debido a que es biologicamente activo y carcinogénico (19,63). La esterigmatocistina es un precursor biogénico de la aflatoxina B₁, producido por hongos del género Aspergillus, habiéndosele aislado de las especies nidulans,

versicolor, lustus, y chevalieri (50). El aflatoxicol es otro metabolito que también presenta actividad biológica considerable y parece estar relacionado a carcinogenicidad (63).

La producción máxima de aflatoxinas se presenta durante la incubación a 24°6 25°C con niveles de humedad del 18.5% en cereales y con un 8 ó 9 % en semillas de cacahuete (23,33).

Muchos de los efectos de las aflatoxinas están asociados a su acción sobre las proteínas nucleares celulares, interfiriendo con la formación de proteínas y la integridad celular (61). La lesión principal debida a las aflatoxinas se observa en el hígado (39,65,77) ya que es el sitio primario del metabolismo de las micotoxinas (70,76).

Los efectos biológicos de las aflatoxinas pueden agruparse en cuatro categorías: daño hepático agudo o crónico, reducción en la tasa de crecimiento, deterioro de los mecanismos de defensa innatos e inmunológicos y efectos carcinogénicos y teratogénicos (13,14,18,63).

En las aves expuestas a dietas contaminadas con aflatoxina, se ha observado baja en el peso corporal y en el consumo de agua y alimento (36,62). Además, en esta especie, las aflatoxinas inducen un aumento significativo en el peso relativo del proventrículo, molleja, bazo y riñón. En el hígado la atrofia se ha indicado en los estadios tempranos, haciéndose aparente la hepatomegalia conforme progresa la aflatoxicosis, debido a la acumulación de lípidos en el hígado

(10,36).

Las intoxicaciones agudas y subagudas con aflatoxinas tienen efectos similares en la mayoría de las especies animales, sin embargo los animales jóvenes son notablemente más susceptibles a la aflatoxicosis (9,55,61,63).

Por su parte, la esterigmatocistina afecta al hígado y riñón y sus efectos son variables de acuerdo con la dosis. La intoxicación aguda en pollos de cinco días de edad con una dosis de 0.3 a 0.6 mg por vía intraperitoneal, produjo que a las ocho horas los pollos mostraran plumas erizadas, apatía y heces amarillo verdosas notándose más los efectos en las aves que recibieron las dosis más altas. En otro experimento en pollos de 11 a 19 días de edad, la administración de 0.5 y 0.7 mg/kg redujo el crecimiento de las aves y provocó el aumento relativo del tamaño del buche, proventrículo, molleja, intestino grueso, riñón y páncreas, así como disminución de la bolsa de Fabricio, no obstante, el hígado, corazón y bazo no se afectaron (50).

OCHRATOXINA A:

La ochratoxina A es un metabolito secundario de varias especies incluidas en el género de hongos Aspergillus y Penicillium (43), principalmente por Aspergillus ochraceus (51).

La temperatura óptima para la producción de ochratoxina es

de 28°C, habiéndose encontrado en forma natural en trigo, avena, cebada, cacahuates, frijoles y mezcla de granos (29).

La ochratoxina es una nefrotoxina potente que exhibe su toxicidad primaria a través de un daño en túbulos proximales (43,63), habiéndose asociado con nefropatías en los cerdos y pollos (34,63), caracterizándose además, por aumento de la micción y consumo de agua (51). En los perros, cerdos y bovinos tiene un efecto notable sobre el intestino donde causa enteritis. En las aves causa supresión sobre la fagocitosis de los neutrófilos y coagulopatías. En los borregos se ha encontrado que la ochratoxina cruza la barrera placentaria y deja residuos en la sangre fetal (43).

ACIDO COYICO:

Es un producto metabólico de numerosas especies del genero Aspergillus y Penicillium. Aunque el ácido cóyico tiene una acción antimicrobiana para varias bacterias y en principio se consideró un antibiótico prometedor, mas tarde se demostró que era neurotóxico en animales experimentales (2).

Esta toxina se ha notificado recientemente tanto en países de Europa Oriental como en Ucrania donde entre 1979 y 1985 se observaron brotes atribuibles a toxinas , en particular ácido cóyico, formado por Aspergillus flavus aislado de salvado y soya rolada. Una preparación purificada de ácido cóyico resultó sumamente tóxica con dosis letal 50% de 5-7 mg para

embriones de pollo, 9 mg/kg para pollos y 8 mg/kg para pavipollos (50).

Por lo anteriormente expuesto, es obvio que las micotoxinas deterioran la calidad de los alimentos y provocan grandes pérdidas económicas en el mundo.

En México, varios estados presentan características climáticas que pueden propiciar la presencia y crecimiento de hongos. Un ejemplo es el estado de Tamaulipas cuya producción agrícola es básicamente granífera, ya que en promedio, se considera que su superficie cultivable corresponde a un 33% y además es uno de los principales productores nacionales de sorgo (71).

En dicho Estado, existen dos épocas de siembra para el sorgo, claramente diferenciadas:

- la de primavera-verano, que se realiza en un 80% en áreas de temporal y alrededor de un 20% en áreas de bajo riego. Las siembras de temporal se inician con las lluvias de mayo a julio y las de riego se efectúan desde mediados de abril hasta agosto. Por su parte la cosecha abarca los meses de agosto a diciembre.

- la de otoño-invierno, efectuada en un 50% en condiciones de riego, abarcando el periodo de siembra los meses de diciembre a marzo y el de cosecha los meses de abril a agosto (52).

Por lo tanto, se puede apreciar que generalmente la cosecha coincide con la entrada de temporal lluvioso, lo que a su vez ha traído consigo grandes dificultades para almacenar los

granos con humedades del 20 al 24% (67) y la necesidad de contar con un equipo especial para el secado, antes de que el grano se almacene o embarque a los centros de acopio y consumo.

En relación a los parámetros de especificaciones generales dentro de nuestro país, la humedad e impurezas del sorgo deben de estar entre el 12 y 14% y entre 1.04 y 1.5% respectivamente (52).

Sin embargo, la información recabada a partir de los programas de compras, indican que la producción de maíz y sorgo en la zona norte de Tamaulipas se cosecha con humedades que ameritan secado con aire precalentado, de tal manera que a la fecha se han incrementado las técnicas de secado mediante secadoras de flujo continuo.

No obstante los amplios esfuerzos realizados, la gran cosecha presenta anualmente serios problemas de almacenamiento y distribución. El embarque de granos por ferrocarril es lento e insuficiente y la falta de bodegas y silos adecuados obstaculizan el mejor aprovechamiento de la recolección. Cabe señalar que las cosechas de granos se destinan a diversas partes del país debido a que la actividad agrícola de Tamaulipas rebasa ampliamente sus necesidades internas de consumo (53).

De lo anterior se puede deducir que las condiciones requeridas para la proliferación de agentes micóticos y sus metabolitos, pueden presentarse en las áreas de almacenamiento nacional.

Por otro lado, es importante señalar que el sorgo es utilizado como forraje y como materia prima en la elaboración de alimentos balanceados y al igual que los granos de cereales está considerado como fuente de carbohidratos para la nutrición animal, ya que éstos proporcionan la mejor fuente de energía para la engorda de ganado bovino, porcino, aves y producción de leche y huevo (52).

Antecedentes de campo en México, como el rechazo y el bajo consumo de alimento, conversión alimenticia deficiente así como alta morbilidad y mortalidad en los animales, sugieren la presencia de hongos micotoxigénicos en el sorgo almacenado con alto grado de humedad; sin embargo, en este país existen pocas investigaciones al respecto, por lo que el presente trabajo tiene la finalidad de conocer los hongos y micotoxinas que pueden presentarse en el sorgo nacional bajo condiciones de almacenamiento, así como sus efectos en los animales que consumen el alimento contaminado.

OBJETIVOS:

- 1.- Aislar e identificar las especies de hongos y sus micotoxinas presentes en el sorgo nacional con alto grado de humedad.
- 2.- Inocular los hongos aislados en sorgo y arroz e identificar el tipo de micotoxina que producen.
- 3.- Determinar en animales experimentales, los efectos de la alimentación con dietas a base de sorgo y arroz, contaminados con hongos micotogénicos, en cuanto a ganancia de peso vivo, conversión alimenticia y presencia e intensidad de cambios macroscópicos y microscópicos en el hígado, bazo y riñón; como un modelo que permita conocer los cambios que pueden presentarse en los animales domésticos alimentados con sorgo contaminado.

MATERIAL Y METODOS**1.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS:**

Para el presente estudio se recolectaron muestras de sorgo, de cuatro bodegas escogidas al azar, de las empresas ANDSA y BUROCONSA, ubicadas en el estado de Tamaulipas. El muestreo se llevó a cabo en el mes de septiembre de 1987.

- Muestra 1: Cosecha primavera-verano 1986, Ciudad Victoria
Tamaulipas.
- Muestra 2: Cosecha primavera-verano 1987, Ciudad Victoria
Tamaulipas.
- Muestra 3: Cosecha primavera-verano 1987, San Fernando
Tamaulipas.
- Muestra 4: Cosecha primavera-verano 1987, Ciudad Burgos
Tamaulipas.

En cada bodega, se registró la temperatura ambiente así como la humedad relativa del sorgo. Se tomaron muestras de un kilogramo a partir de la superficie y a un metro de profundidad del grano almacenado, en cinco puntos separados por distancias similares. Todas las muestras se mezclaron para obtener una de un kilogramo.

La conservación y transporte al laboratorio se hizo en bolsas de papel a temperatura ambiente.

2.- CULTIVO E IDENTIFICACION DE LOS HONGOS:

Cada muestra fue molida en una licuadora comercial hasta pulverizarse para posteriormente realizar diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , utilizando como solvente solución salina estéril. Las tres últimas diluciones se sembraron en placas de agar Sabouraud dextrosa e incubaron en estufa bacteriológica a 30°C hasta la observación de crecimiento micótico. Luego se procedió a separar y resembrar las diversas colonias micóticas y afectar la técnica de microcultivo (80). En aquellos casos en los que no hubo crecimiento después de un mes, las placas fueron desechadas. Para su identificación se tomaron en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas como color de la colonia, tipo de crecimiento, tipos de hifas, esporas y estructuras estromáticas (3,5,6,64,80).

El hongo identificado se cultivó en tubos inclinados con agar Sabouraud a 30°C por diez días.

3.- PREPARACION DE LOS SUSTRATOS:

Para el crecimiento micótico se utilizaron dos sustratos: arroz y sorgo, los cuales fueron previamente analizados mediante la prueba de cromatografía en capa fina, con el fin de descartar la presencia de micotoxinas.

La inoculación de los sustratos se realizó en frascos de vidrio con capacidad de 750 ml y tapa de aluminio a la que se

le hizo un agujero de aproximadamente dos centímetros de diámetro, se tapó con una pequeña torunda y se le puso un gorro de papel.

En cada frasco se colocaron 200 gramos de arroz o de sorgo y 100 ml de agua destilada, luego se agitó la mezcla para homogeneizarla y se dejó remojar por 24 horas a temperatura ambiente. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión y 121°C de temperatura y se dejó enfriar. En los recipientes con arroz el grano se removió con una varilla previamente esterilizada, para evitar la formación de masas compactas.

Por otra parte, en cada tubo con crecimiento micótico se colocaron seis mililitros de solución Tween al 0.1%, removiendo y agitando el contenido con una asa de platino para así obtener una suspensión uniforme de esporas.

A cada frasco con el sustrato previamente esterilizado se le añadió el contenido (suspensión con esporas) de siete tubos (42 ml. por cada 200 gramos), se tapó y agitó manualmente con el fin de que el inóculo se dispersara uniformemente entre el grano.

Los frascos fueron incubados horizontalmente de forma estática, en estufa bacteriológica a 30°C por diez días. Posteriormente se procedió a su esterilización en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión y 121°C. Una vez esterilizado, el sustrato fue colocado en charolas de papel aluminio y secado en horno a 70°C por dos días, después de lo

cual fue molido en licuadora hasta pulverizarse y guardado en bolsas de papel estraza a temperatura de congelación (-4°C) hasta su utilización.

4.- DETERMINACION DE MICOTOXINAS:

El método de referencia utilizado en el presente estudio para el análisis de los alimentos fermentados fue el de cromatografía en capa fina para la detección de micotoxinas (69). El cromatograma se desarrolló utilizando como fase estacionaria sílica gel y como fase móvil una mezcla de acetona, etil acetato y tolueno. La lectura se efectuó con lámpara de luz ultravioleta comparando la fluorescencia emitida con los estándares respectivos.

Es importante señalar que cuando no se contó con un patrón de referencia para la identificación de la micotoxina presente, el Rf (medida de resistencia al flujo) fue comparado con el de las aflatoxinas al que se le dió el valor de uno.

Cuando el alimento resultó positivo a alguna micotoxina, se procedió a administrarlo a los animales. En aquellos casos en los que no se detectó alguna banda fluorescente y/o carbonizada, no se continuó con el proceso.

5.- PREPARACION DE ALIMENTO PARA ANIMALES EXPERIMENTALES:

Para la elaboración de la dieta de los animales se tomaron en cuenta las necesidades nutricionales marcadas por Saiz y colaboradores (66) para ratones en crecimiento:

	NRC, 1962	Bauer and Berg	Niveles medios
Proteína bruta	16.0 %	---	17.3 %
Energía.	---	---	650 Kcal/Kg.
Grasa bruta.	---	---	5.0 %
Fibra bruta.	---	---	6.0 %

Aminoácidos (en tanto por ciento de la proteína):

Arginina	---	1.9	---
Histidina	---	3.4	---
Lisina	---	9.0	---
Tirosina	---	4.8	---
Triptofano	---	1.9	---
Fenilalanina	---	14.0	---
Metionina y Cistina	---	8.0 (3.0)	5.5
Treonina	---	6.8	---
Leucina	---	12.0	---
Isoleucina	---	8.7	---
Valina	---	9.7	---

Necesidades en vitaminas y minerales para ratón en crecimiento:

Vitaminas (por Kg/ración)	Niveles medios
Vit. A	1.700 U. I.
Vit. D	483 U. I.
Vit. E (Ó-tocoferol)	48.0 mg.
Vit. B ₁	3,21 mg.
Riboflavina	4,4 mg.
Carbonato cálcico	----
Vit. B ₁₂	14.0 mcrg
Ac. nicotínico	16.7 mg
Piridoxina	3.6 mg
Colina	1,1 g

Con base en lo anterior y dado que los sustratos que se utilizaron fueron sorgo y arroz, las raciones se prepararon de la siguiente siguiente manera:

DIETA 1	DIETA 2
- Sorgo 80%	Arroz 80%
- Soya 15%	Soya 12%
- Harina de carne 4%	Harina de carne 7%
- Harina de hueso 0.5%	Harina de hueso 0.5%
- Vitafort A en agua	Vitafort A en agua.

Las dietas experimentales fueron preparadas con el sustrato inoculado, mientras que en las dietas testigo se utilizó sorgo y arroz sin inóculo, respectivamente.

A los ingredientes de cada dieta se les añadieron 1.250 litros de agua destilada, mezclando perfectamente hasta formar una pasta. Para que el alimento adquiriera una forma cuadrada, se colocó la masa en una charola y se cortó con una espátula en pequeños cuadros para luego dejarse secar en el horno a 70°C por dos días. El alimento se almacenó en bolsas de papel estraza a temperatura ambiente hasta su utilización.

5.- ESTUDIO DE TOXICIDAD EN RATONES ALIMENTADOS:

Para probar cada uno de los hongos productores de micotoxinas, se utilizaron 40 ratones, en crecimiento, machos, entre 30 y 45 días de edad, clínicamente sanos, cepa N.I.H.

(National Institute of Health), de la quinta generación, donados por el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico de Salud Animal (CENASA), Tecamac Edo. de México. Se dividieron al azar en cuatro lotes de diez animales cada uno (4 tratamientos), los que se colocaron en cajas de acrílico y mantuvieron en un cuarto con luz y temperatura conveniente. Con la finalidad de que se adaptaran al nuevo ambiente, dos lotes fueron alimentados con la dieta uno y otros tantos con la dieta dos testigo, durante cinco días. El agua se les administró a libertad.

Cada uno de los animales fue pesado el día uno del experimento.

Los lotes fueron mantenidos con sus dietas respectivas (sorgo testigo, sorgo con hongo, arroz testigo y arroz con hongo) por veintiún días, observados una vez al día y pesados una vez a la semana. En cada lote, el consumo de alimento se consideró como un todo al final del experimento, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Total de alimento consumido}}{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}} = \text{conversión alimenticia}$$

6.- ESTUDIOS MORFOPATOLOGICOS:

Los cuarenta animales de los diferentes tratamientos, se sacrificaron en el día 21 del estudio, mediante una cámara cerrada y la utilización de hielo seco (monóxido de carbono) al que se le añadió agua para su mayor evaporación.

Se procedió entonces a la realización de la necropsia de cada ratón con la finalidad de observar cambios macroscópicos en los diversos órganos, luego se removi6 el hígado, riñ6n y bazo para ser pesados y colocados en formalina al 10% (no menos de 24 horas). Después, estos tejidos fueron incluidos en parafina, cortados a 6 μ de grosor y coloreadas con hematoxilina y eosina (48) para su posterior observaci6n al microscopio de luz visible.

Las lesiones microsc6picas se evaluaron tomando en cuenta cambios circulatorios, degenerativos, necr6ticos, inflamatorios y neoplásicos, dándoles un grado de severidad de leve, moderado o severo. Posteriormente se realiz6 una comparaci6n entre todos los casos para determinar los distintos grados de reacci6n tisular.

7.- ANALISIS ESTADISTICO:

Todos los datos, excepto los de conversi6n alimenticia, fueron analizados estadísticamente mediante un análisis factorial de varianza 4 X 4 de acuerdo al procedimiento de modelos lineales generales para análisis de varianza por la prueba múltiple de Duncan (Instituto SAS). Los valores de significancia están basados en el 0.05 de probabilidad.

El modelo estadístico utilizado es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \gamma_j + \epsilon_k$$

RESULTADOS.

En el Cuadro 1, se listan la temperatura y humedad registradas en las muestra obtenidas de las cuatro bodegas.

Los hongos identificados en cada una de las muestras fueron:

- Muestra 1: Cladosporium spp., Penicillium spp., Helycomyces spp. y Cephalosporium spp.
- Muestra 2: Aspergillus spp., Cladosporium spp. y Penicillium spp.
- Muestra 3: Aspergillus chevalieri var. intermedius y Aspergillus nidulans.
- Muestra 4: Aspergillus flavus, Penicillium spp., Gliocladium spp. y Cladosporium spp.

De los hongos anteriormente mencionados, sólo cinco produjeron micotoxinas en los sustratos inoculados, obteniéndose los siguientes resultados:

Aspergillus chevalieri var. intermedius .-

- * Sorgo inoculado: negativo a B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenona, ochratoxina A y T2. Se observaron dos bandas fluorescentes con un Rf de 1.1 y 1.3 con respecto al estándar de aflatoxina B₁.
- * Arroz inoculado: negativo a aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenona, ochratoxina A y T2.

- Aspergillus nidulans .-

- * Sorgo inoculado: negativo a aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, ochratoxina A y T2; positivo a zearalenona.
- * Arroz inoculado: negativo a aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂ y T2, positivo a zearalenona y ochratoxina A; además se observó una banda fluorescente con un Rf de 1.5 con respecto al estándar de aflatoxina B₁.

- Helycomices sp.-

- * Sorgo inoculado: negativo a aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenona, ochratoxina A y T2.
- * Arroz inoculado: negativo a aflatoxina B₂, G₁, G₂, zearalenona, ochratoxina A y T₂. Positivo a aflatoxina B₁, con 20 ppb. Se observó una banda fluorescente con un Rf de 0.9 al compararse con el estándar de aflatoxina B₁.

- Cephalosporium sp.-

- * Sorgo inoculado: Negativo a aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenona y T2. Positivo a ochratoxina A.
- * Arroz inoculado: Negativo a aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, zearalenona, T2 y ochratoxina A.

- Aspergillus flavus.-

- * Sorgo inoculado: Negativo a aflatoxina B₂, G₁, G₂, zearalenona, ochratoxina A y T2. Positivo a aflatoxina B₁ con 40 ppm.
- * Arroz inoculado: Negativo a aflatoxina B₂, G₁, G₂, zearalenona, ochratoxina A y T2. Positivo a aflatoxina B₁ con 4 ppm.

La prueba biológica para los sustratos inoculados con Aspergillus flavus no se llevó a cabo debido a que la aflatoxina B₁ se caracterizó plenamente a partir de su determinación bioquímica y toxicológica. Además se sabe que ésta es una micotoxina ampliamente probada en sus efectos micotoxigénicos.

En cuanto al efecto tóxico de las diferentes micotoxinas obtenidas, se apreciaron cambios tanto en el peso como en la conversión alimenticia de los animales. A continuación se describen los resultados correspondientes de acuerdo a cada uno

de los grupos formados.

Grupo 1 (Aspergillus chevalieri var intermedius).-

En este grupo no se encontró diferencia estadística significativa con relación al peso de los animales de los cuatro tratamientos (Cuadro 2 y Figura 1).

El peso relativo promedio del bazo en el tratamiento arroz hongo fue significativamente menor ($P < 0.05$) al compararse con los otros tratamientos. Los pesos relativos del hígado y riñón no presentaron cambios (Cuadro 6).

La conversión alimenticia fue deficiente en los animales que consumieron dietas inoculadas con el hongo, observándose valores negativos promedio de 34.39 y 45.45 en sorgo y arroz respectivamente (Cuadro 10).

Macroscópica y microscópicamente no se observaron lesiones.

Grupo 2 (Aspergillus nidulans).-

El peso fue estadísticamente menor en los animales con tratamiento arroz-hongo. Por otra parte al comparar entre sí los pesos de los tratamientos testigo (arroz y sorgo) en los días ocho y 16 éstos mostraron diferencia, la que desapareció para el día 21 (Cuadro 3 y Figura 2).

Los pesos relativos del hígado y riñón no mostraron cambios

significativos, mientras que el peso del bazo fue estadísticamente mayor en el tratamiento arroz con hongo al compararse con su respectivo testigo (Cuadro 7).

La conversión alimenticia fue deficiente para los animales con el tratamiento arroz hongo (Cuadro 10).

Macroscópicamente no se observaron cambios.

Al exámen microscópico, el 95% de los hígados de los animales con el tratamiento arroz hongo presentaron abundantes focos de necrosis, mientras que en el riñón se apreciaron hemorragias leves en la zona medular. Cabe mencionar que las hemorragias medulares del riñón también se presentaron en todo el lote de animales alimentados con sorgo inoculado.

Grupo 3 (Helycomices spp.).

No hubo diferencia significativa en los pesos de los animales, excepto en el día 16 donde se notó un peso menor en el tratamiento sorgo hongo al compararse con su testigo. Sin embargo hay que resaltar que el peso final no mostró diferencia estadística significativa entre los cuatro tratamientos (Cuadro 4 y Figura 3).

El peso del hígado, bazo y riñón fue estadísticamente menor en los animales con tratamiento arroz hongo. De igual forma el peso del bazo en el tratamiento sorgo hongo se vió afectado significativamente (Cuadro 8).

No hubo cambios adversos en la conversión alimenticia de

los cuatro tratamientos (Cuadro 10).

A la inspección macroscópica y microscópica de los órganos no se encontraron cambios aparentes.

Grupo 4 (Cephalosporium spp.)

El peso inicial de los animales no mostró diferencia estadística significativa, con excepción del lote con el tratamiento arroz hongo en el que hubo un peso menor, sin embargo no hubo diferencia con relación a su testigo.

A los 16 y 21 días el peso disminuyó en los tratamientos con hongo. Al comparar entre sí a los controles (arroz y sorgo), el peso fue menor con arroz. Por su parte, ambos tratamientos con hongo, no mostraron diferencia significativa entre sí (Cuadro 5 y Figura 4).

Se observó un mayor peso del hígado en los animales con tratamiento arroz hongo y sorgo hongo con respecto a los testigos. El peso del bazo fue significativamente mayor para el tratamiento arroz hongo con respecto a su testigo y el peso del riñón fue mayor para el tratamiento sorgo hongo (Cuadro 9).

La conversión alimenticia presentó variaciones muy marcadas entre los distintos tratamientos, no obstante, los tratamientos con hongo mostraron una conversión mayor (Cuadro 10).

Dos animales murieron al tercer día de iniciada la dieta sorgo hongo, mientras que un tercero se encontró muerto al

cuarto día. A la necropsia se observó congestión intestinal moderada así como una disminución marcada del estómago.

Microscópicamente no se presentaron cambios.

Cuadro 1: Humedad y temperatura del sorgo muestreado en cuatro bodegas del Estado de Tamaulipas.

Muestra	Temperatura °C		Humedad %	
			Relativa	
	S*	P*	S*	P*
1	38	39	10.23	11.54
2	35	36	12.32	13.62
3	35	36	12.57	13.23
4	38	39	9.37	10.92

* S= Superficial

* P= Profunda

Cuadro 2. Ganancia promedio de peso vivo y desviación estándar en ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo con y sin inóculo de Aspergillus chevalieri.

	SH*	ST*	AH*	AT*
dia 1	25.72a ±1.7	24.4a ±1.9	25.71a ±2.1	25.85a ±3.3
dia 8	24.05a ±2.1	24.94a ±1.7	24.17a ±2.0	26.95a ±4.5
dia 16	23.02a ±2.1	23.25a ±1.5	24.50a ±2.1	25.47a ±5.2
dia 21	23.83a ±1.6	26.06a ±2.0	24.48a ±2.1	27.31a ±6.8

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 3. Ganancia promedio de peso vivo y desviación estándar en ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo con y sin inóculo de Aspergillus nidulans.

	SH*	ST*	AH*	AT*
dia 1	19.14a ±2.0	18.61a ±1.3	18.53a ±1.1	19.18a ±1.9
dia 8	23.09ab ±2.5	22.03b ±1.2	18.72c ±1.2	25.25a ±2.0
dia 16	26.2b ±1.9	26.51b ±1.2	20.11c ±1.4	29.94a ±2.0
dia 21	26.35b ±1.7	28.16ab ±1.3	22.50c ±1.6	29.57a ±2.1

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 4. Ganancia promedio de peso vivo y desviación estándar en ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo con y sin inóculo de Helvcomices spp.

	SH*	ST*	AH*	AT*
dia 1	15.03a ±1.1	15.58a ±1.0	14.93a ±0.9	15.48a ±1.0
dia 8	17.31a ±1.5	18.85a ±2.1	19.17a ±1.1	18.82a ±2.2
dia 16	20.0b ±1.7	22.25a ±1.8	23.71a ±1.0	22.2a ±2.0
dia 21	23.63a ±1.0	23.08a ±1.5	24.16a ±0.8	23.2a ±1.4

SH* = Sorgo hongo

SC* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AC* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 5. Ganancia promedio de peso vivo y desviación estándar vivo en ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo con y sin inóculo de Cephalosporium spp.

	SH*	ST*	AH*	AT*
dia 1	22.87ab ±1.4	24.41a ±0.3	21.16c ±0.9	21.94ac ±1.9
dia 8	18.79b ±2.2	24.05a ±0.5	17.34b ±1.5	22.03a ±1.7
dia 16	17.01b ±3.1	23.90a ±0.6	15.57b ±1.7	22.75a ±1.3
dia 21	16.12c ±1.61	23.83a ±0.8	16.74c ±0.9	19.15b ±1.3

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

{P<0.05} Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 6. Peso promedio relativo y desviación estándar de los órganos de los ratones alimentados con sorgo y arroz con y sin inóculo de Aspergillus chevalieri.

	SH*	ST*	AH*	AT*
Hígado	6.154a ±0.2956	6.227a ±0.8544	6.759a ±0.7222	7.049a ±1.7759
Bazo	0.4396ab ±0.1764	0.5491ab ±0.1332	0.4034b ±0.1127	0.5940a ±0.1504
Riñones	1.142a ±0.2073	1.111a ±0.2038	1.107a ±0.1564	1.194a ±0.2844

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 7. Peso promedio relativo y desviación estándar de los órganos de los ratones alimentados con sorgo y arroz con y sin inóculo de Aspergillus nidulans.

	SH*	ST*	AH*	AT*
Hígado	7.731a	6.811a	7.522a	7.702a
	±1.6522	±0.2970	±0.4832	±0.3786
Bazo	0.3269b	0.4541b	1.4872a	0.3169b
	±0.0640	±0.1853	±0.2220	±0.0534
Riñones	1.4125a	1.5990a	1.5284a	1.5790a
	±0.1544	±0.1584	±0.1841	±0.1883

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 8. Peso promedio relativo y desviación estándar de los órganos de los ratones alimentados con sorgo y arroz con y sin inóculo de Helycomices spp.

	SH*	ST*	AH*	AT*
Higado	6.992ab ±0.1942	7.448a ±0.2786	2.948c ±0.7734	6.992b ±0.4262
Bazo	0.3928a ±0.0440	0.3923a ±0.0471	0.2042b ±0.1324	0.4704a ±0.0817
Riñones	1.4298b ±0.074	1.7103a ±0.1507	0.8433c ±0.1403	1.549ab ±0.1861

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 9. Peso promedio relativo y desviación estándar de los órganos de los ratones alimentados con sorgo y arroz con y sin inóculo de Cephalosporium spp.

	SH*	ST*	AH*	AT*
Higado	8.120n ±1.2903	5.266c ±1.1888	7.026b ±0.2726	5.289c ±0.1591
Razo	0.3549ab ±0.1731	0.3499ab ±0.0656	0.4434a ±0.1702	0.2278b ±0.0438
Riñones	1.588a ±0.2057	1.146b ±0.0968	1.323ab ±0.4071	1.145b ±0.934

SH* = Sorgo hongo

ST* = Sorgo testigo

AH* = Arroz hongo

AT* = Arroz testigo

(P<0.05) Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 10. Conversión alimenticia de ratones expuestos a dietas testigo y contaminadas con cuatro hongos diferentes.

	Sorgo		Arroz	
	testigo	hongo	testigo	hongo
<u>A. chevalieri.</u>	41.6	-34.39	45.45	-45.45
<u>A. nidulans.</u>	6.28	6.32	5.77	12.22
<u>Helycomices</u> spp.	6.65	6.29	7.12	5.68
<u>Cephalosporium</u> spp.	-96.49	-7.13	-19.57	-11.22

- Se refiere a pérdida de peso.

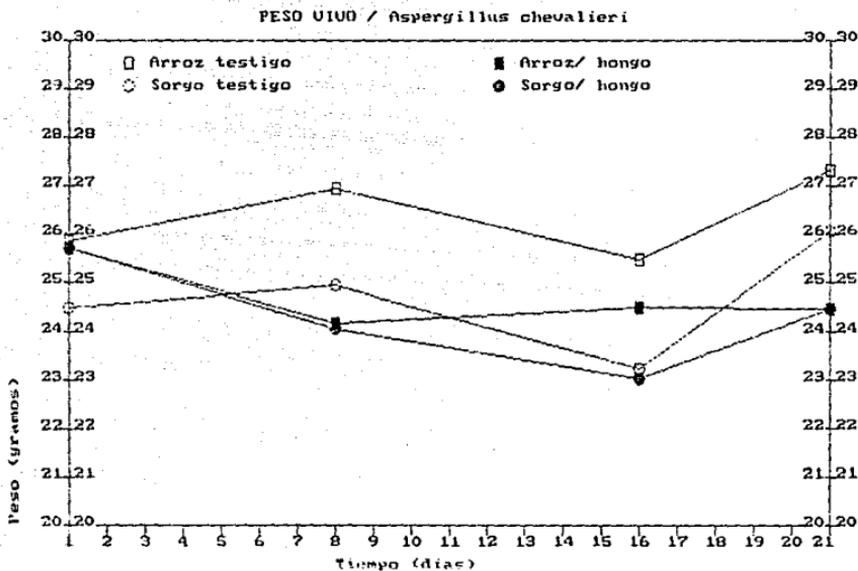


Figura 1. Ganancia del peso vivo en los ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo, con y sin inóculo de *Aspergillus Chevalieri*.

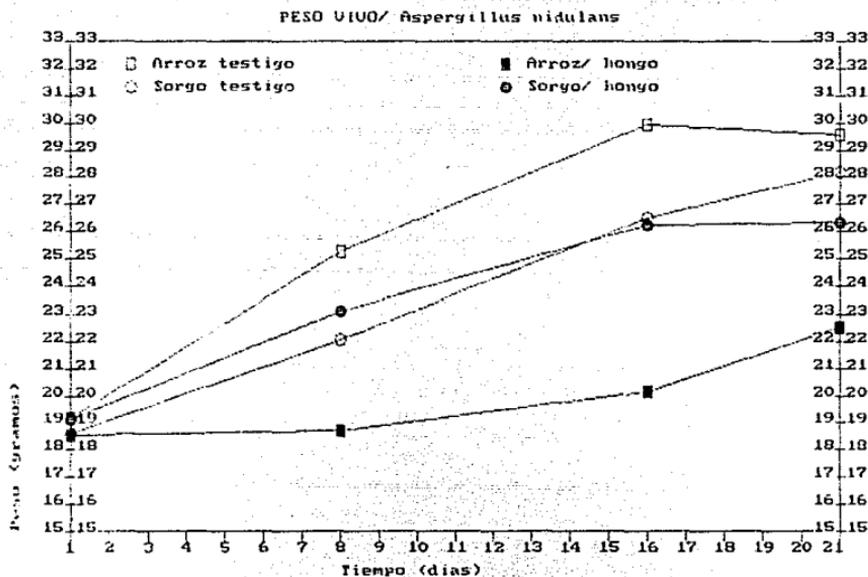


Figura 2. Ganancia del peso vivo en los ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo, con y sin inóculo de *Aspergillus nidulans*.

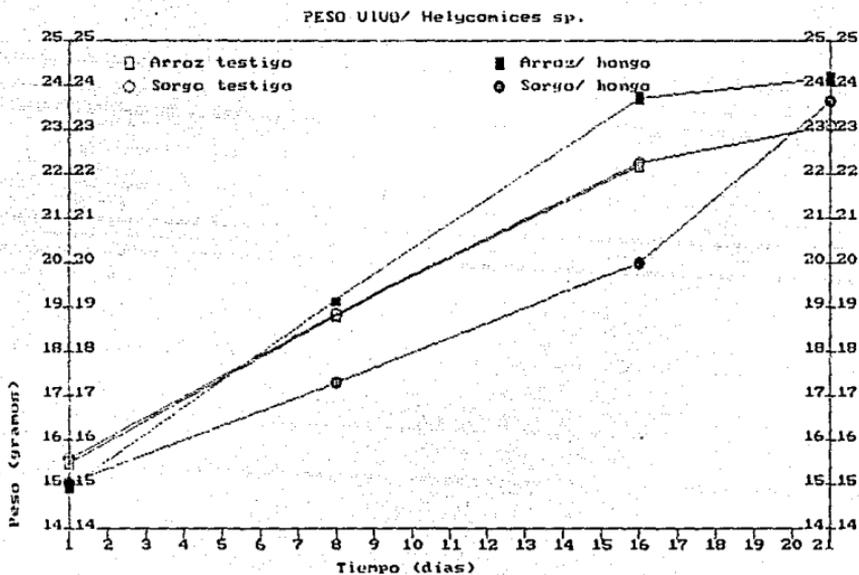


Figura 3. Ganancia del peso vivo en los ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo, con y sin inóculo de *Helyconices* sp.

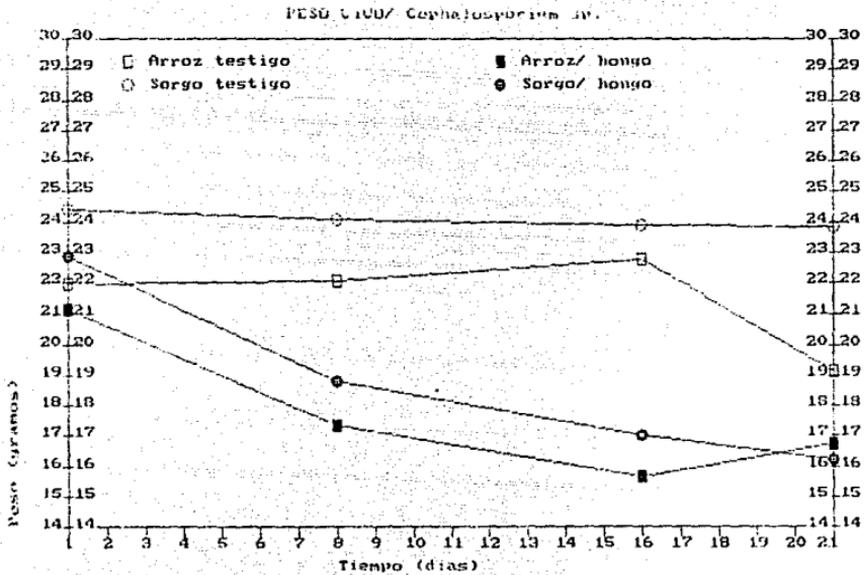


Figura 4. Ganancia del peso vivo en los ratones (10 por dieta) alimentados con arroz y sorgo, con y sin inóculo de *Cephalosporium* sp.

DISCUSION.

En el presente trabajo, la temperatura registrada en el grano almacenado varió entre 35° y 39° C, mientras que la humedad relativa se encontró desde un 9.32% hasta un 13.62%, lo que confirma la presencia de dos de los factores más importantes para el crecimiento micótico y la producción de sus toxinas (28,31,37,79). Sin embargo el contenido de humedad encontrado en este caso, es considerado bajo por algunos autores, ya que generalmente se ha observado que el crecimiento micótico no se presenta en humedades menores del 13% (32,63). A pesar de esto, nuestros hallazgos concuerdan con un estudio realizado en alimento para aves de diferentes compañías, en el que se demostró que los niveles de humedad que permitían una actividad de los hongos, eran menores (11.5 a 13%) a los presentados en otras investigaciones (28,63,68).

A pesar de que la humedad registrada en el presente estudio no se considera por algunos autores dentro de los límites óptimos (63,68), se aislaron e identificaron hongos capaces de producir micotoxinas. Esto sugiere que dichos hongos en algún momento encontraron las condiciones idóneas de temperatura y humedad para su desarrollo y proliferación. Lo anterior se refuerza, si se considera que las muestras se obtuvieron del Estado de Tamaulipas, donde la cosecha coincide con la entrada del temporal lluvioso (52,53,67) y en el que anualmente se presentan serios problemas en la distribución

provocando que el grano permanezca almacenado por algún tiempo en las bodegas.

Así mismo, se sabe que después del almacenamiento, el crecimiento micótico y la producción de micotoxinas pueden continuar si el grano no es secado inmediatamente ó almacenado en forma adecuada (75).

De los hongos identificados en las cuatro muestras, los del género Aspergillus (Muestra 2, 3 y 4), Penicillium spp. y Cladosporium spp. (Muestra 1, 2 y 4) se encontraron en tres de ellas, el Helycomices spp. y Cephalosporium spp. crecieron en la muestra uno y el del género Gliocladium spp. sólo se identificó en la muestra cuatro. Estos resultados concuerdan con Neumannova y colaboradores (51) quienes señalan que en muestras de alimento para pollos de engorda, las especies de los géneros Aspergillus y Penicillium se presentan con mayor frecuencia (cada uno en 97% de las muestras), seguidos por el Mucor (93%), Cladosporium (79%), Rhizopus (52%) y Fusarium (41%).

Por otro lado, en la muestra uno, se identificaron a los hongos Helicomyces spp. y Cephalosporium spp. como productores de micotoxinas; el primero sólo produjo aflatoxina B₁ y una banda azul fluorescente con un R_f (valor de resistencia de flujo) de 0.9 con respecto a la aflatoxina B₁ en el arroz inoculado, mientras que la producción del Cephalosporium spp. fue Ochratoxina A en el sorgo inoculado.

De la muestra cuatro se aisló el hongo Aspergillus flavus

que produjo 40 ppm de aflatoxina B₁ en el sorgo, mientras que en el arroz sólo se detectaron 4 ppm. Este hallazgo es de gran relevancia, ya que indica que el tipo de sustrato juega un papel importante en la cantidad de micotoxina producida. Al respecto, Hamilton menciona que a pesar de que las aflatoxinas se presenten en bajas cantidades en el alimento, causan graves pérdidas económicas, debido a la baja conversión alimenticia, a la inhibición del crecimiento y muertes en los animales domésticos (27).

En la muestra tres se identificó al hongo Aspergillus nidulans, que en el arroz produjo Zearalenona, Ochratoxina A y un compuesto no identificado (banda azul fluorescente con un Rf de 1.5 al compararse con el estándar de la aflatoxina B₁) a diferencia del sorgo en el que únicamente se detectó Zearalenona.

Es de interés mencionar que la producción de micotoxinas en cuanto al tipo y cantidad, varió en ambos sustratos utilizados y en ninguno de los casos fue similar. Se sabe que varios hongos pueden producir una sola micotoxina, mientras que otros producen dos o más (42,63).

Lo anterior demuestra que el tipo de sustrato constituye un factor importante para determinar cuál metabolito se producirá y además que los hongos son capaces de producir una o varias toxinas (75). Esto es de gran significancia cuando varios granos que contienen diferentes micotoxinas contaminantes se mezclan para administrarse como alimento a los

animales (21).

Por otra parte también se pudo comprobar que las micotoxinas encontradas fueron termoestables y persistieron en el alimento después de haberse sometido a temperaturas de esterilización y secado, lo que concuerda con lo mencionado por Pier en 1981 (63), y demuestra que a pesar de que algunos alimentos se someten a altas temperaturas en su proceso de elaboración, las micotoxinas pueden persistir.

Entre los hallazgos importantes de esta investigación se encuentran el tipo de hongo aislado y su relación con las micotoxinas producidas.

El hongo Aspergillus nidulans produjo Zearalenona tanto en el sorgo como en el arroz, y sólo produjo Ochratoxina A y una banda azul fluorescente con un Rf de 1.5 en el arroz.

En general en la literatura se menciona que los agentes productores de zearalenona corresponden a hongos del género Fusarium, como el F. tricinatum y F. oxysporium (40), pero especialmente el F. roseum "Graminearum" (F. graminearum) y F. roseum "Gibbosum" (F. equiseti) (26,29,56), lo que difiere con lo encontrado en este trabajo.

Por su parte el hongo Helycomices spp., solo en el arroz inoculado produjo Aflatoxina B₁ y una banda azul fluorescente con un Rf de 0.9 con respecto al estándar de aflatoxina B₁. El género de Helycomices se estableció en 1809 por Link, y se considera el más viejo de los géneros de Helicosporus, Hyphomicetos. A la fecha se han reconocido diversas especies en

este género, no obstante, aún se realizan investigaciones para su establecimiento (24). En cuanto a la producción de micotoxinas y sus metabolitos no existen estudios al respecto, por lo que es importante subrayar este hallazgo en el presente estudio, sin embargo se requiere de una mayor investigación al respecto.

Por otro lado, la producción de aflatoxinas se ha atribuido casi exclusivamente a hongos del género Aspergillus flavus y A. parasiticus, no obstante, se ha encontrado que otros géneros de hongos como Penicillium (78) y Rhizopus (45) son capaces de producir estas micotoxinas. En la presente investigación se encontró que el hongo Helycomices spp. y el Aspergillus flavus fueron capaces de producir aflatoxina B1. Nuevamente es de interés señalar que el hongo Helycomices no se considera en la literatura como productor de aflatoxinas (24).

El hongo Cephalosporium spp. produjo Ochratoxina A en sorgo.

La producción de Ochratoxina A se ha asociado a hongos del género Penicillium verrucosum quimiotipo I y II, hongo común en cereales, carne y pescado, en regiones templadas (22). Además se incluye al Aspergillus ochraceus (51). Aparentemente éste es uno de los primeros estudios en el que se notifica al Cephalosporium spp. como productor de Ochratoxina A.

A continuación la discusión se hará de acuerdo con cada uno de los grupos experimentales.

Grupo No. 1 (Aspergillus chevalieri).-

Los datos del análisis estadístico con respecto al peso promedio de los animales en los cuatro tratamientos muestran que la ganancia de peso no se afectó en forma adversa en ninguno de los intervalos medidos. Sin embargo se observaron pesos numéricamente menores (Figura 1) y una conversión alimenticia negativa en los animales con tratamientos sorgo hongo y arroz hongo.

En los sustratos inoculados con Aspergillus chevalieri no se encontraron ninguna de las micotoxinas probadas y solo en el sorgo inoculado se apreciaron dos bandas fluorescentes con un Rf de 1.1 y 1.3 con respecto a la aflatoxina B1. La presencia de tales compuestos azul fluorescentes fueron detectados por Rosiles y Pérez en muestras de alimento de origen comercial para aves, bovinos y cerdos y no se han podido caracterizar (65). Sin embargo, cabe la posibilidad de que dichos compuestos y la presencia del hongo provocaran un efecto negativo en la conversión alimenticia y en la ganancia de peso de esta especie.

Grupo No. 2 (Aspergillus nidulans).-

El efecto sobre pérdida de ganancia de peso fue mayor en los animales con el tratamiento arroz hongo.

Es importante señalar que en dicho sustrato se detectaron micotoxinas como la zearalenona y ochratoxina A, así como una banda azul fluorescente con un Rf. de 1.5 con respecto a la

aflatoxina B₁, a diferencia del sorgo inoculado en el que sólo se detectó zearalenona.

Cabe señalar que en general, las toxicosis con zearalenona se han involucrado con múltiples alteraciones reproductivas en diversas especies (7,12,39,53,56,57,82), mientras que la Ochratoxina A provoca efectos muy variados.

Kanazas y colaboradores (40) confirmaron la presencia de trazas de Zearalenona y Ochratoxina A en muestras de sorgo contaminadas naturalmente y demostraron ganancias de peso y consumo de alimento menores en ratas alimentadas por 28 días. En pollos de engorda también se ha encontrado un efecto negativo sobre el peso de la canal y el tamaño de los animales (34). Investigaciones recientes señalan que la Ochratoxina A y la Zearalenona tienen efectos aditivos (51).

También se ha observado que en cerdos que ingirieron una dieta con Ochratoxina durante 141 días, no mostraron residuos tanto en suero como en riñones, apareciendo estos últimos microscópicamente normales (51). En contraparte otros autores (34,43,63) mencionan que la Ochratoxina A es una nefrotoxina potente, causante además de enteritis y coagulopatías. En el presente trabajo no se apreciaron cambios macroscópicos y microscópicos importantes en el riñón a excepción de hemorragias leves en la zona medular de los animales que ingirieron el alimento inoculado con el hongo. Cabe la posibilidad de que los cambios renales no se hayan presentado debido a la baja concentración de la Ochratoxina en la dieta.

Grupo 3 (Helycomices spp).

A pesar de que el arroz inoculado resultó positivo a aflatoxina B₁ (20 ppb) y a una banda fluorescente con un Rf de 0.9, estadísticamente no ocurrieron cambios significativos en la ganancia de peso de los animales, aunque la conversión alimenticia fue numéricamente mejor en los tratamientos con hongo al compararse con los testigos.

Existen numerosos informes de aflatoxicosis en los animales, asociados al consumo de alimentos contaminados (5,46,47,62). Sin embargo, los efectos tóxicos de las aflatoxinas sobre el animal dependen estrechamente del tiempo de exposición, la dosis, la edad y la especie animal (34,55,63). Se ha comprobado que con una dosis letal oral 50 (DL 50, en unidades de miligramos por kilogramo de peso corporal) la especie más sensible son los patos (con 0.36), continuando con el gato (0.55), cerdo (0.62), perro (1.0), pavo (1.36), borrego (2.0), pollo (6.5) y rata (5.5 - 17.9) (55).

Por otro lado, investigaciones recientes en pollos de engorda han demostrado que con niveles de aflatoxina de 2.5 miligramos por gramo de alimento (ppm) durante tres semanas el peso corporal de los animales disminuyó significativamente (34,35), así como también la conversión alimenticia (14). No obstante, en otro trabajo realizado por Merkley, J. W. en 1987 (54) en la misma especie, se observó que en dietas que contenían 0.625 y 1.25 ppm de aflatoxinas se presentaban pocos cambios en el peso corporal de los animales (54). Por lo

tanto, es posible que en el presente estudio los cambios en el peso corporal y la conversión alimenticia no se hayan presentado debido a los niveles reducidos de aflatoxina B₁ en el alimento.

En lo que respecta a los órganos, el peso del hígado, bazo y riñón fue significativamente menor en los animales alimentados con dietas inoculadas con el hongo (arroz y sorgo). Tales hallazgos difieren con lo encontrado por diversos autores quienes mencionan que el peso del hígado, riñón y bazo incrementa con las aflatoxinas (14,35,63). No obstante, la atrofia del hígado se ha indicado en los estadios tempranos (10,36). Estos resultados posiblemente se deban también a los niveles reducidos de aflatoxinas en el alimento.

Grupo 4 (Cephalosporium spp).

A pesar de que sólo en el sorgo con hongo se detectó Ocratoxina A, la conversión alimenticia y el peso de los animales alimentados con ambos tratamientos inoculados con hongo fueron significativamente menores al compararse con sus respectivos testigos.

Diversos estudios demuestran que la ingestión de Ochratoxina puede provocar disminución de peso en los animales (32,44). Sin embargo en éste caso la sola presencia del hongo provocó este cambio.

Es de interés señalar que cada hongo y sus micotoxinas fué

probado por separado, y que en general los parámetros medidos no se afectaron en forma significativa, sin embargo cabe la posibilidad de que la combinación de varios hongos micotoxigénicos provoque efectos más adversos. .

Con este trabajo se concluye que existen varios hongos micotoxigénicos en el sorgo nacional con alto grado de humedad, que no han sido descrito en la literatura, y que son capaces de provocar efectos deteriorantes en los animales.

Estos datos enfatizan la necesidad de realizar investigaciones adicionales sobre las cepas toxigénicas, la interacción de micotoxinas, el tipo de sustrato presente y otros factores ambientales importantes.

LITERATURA CITADA:

- 1.- Abbas, H. K., Mirocha, C. J. and Shier, W. T.: Mycotoxins produced from fungi isolated from foodstuffs and soil: comparison of toxicity in fibroblasts and rat feeding tests. Appl. Environ. Microbiol. 48: 654-661 (1984).
- 2.- Abdalla, A.E. and Grant, D.W.: An immunoanalysis for kojic acid. Sabouradia 18:191-196 (1980).
- 3.- Ajello, L., Georg, L. K., Kaplan, W. and Kaufman, L.: Laboratory Manual for Medical Mycology. U. S. Department of Health, Education and Welfare Public Health Service. Atlanta, Georgia. 1979.
- 4.- Badiali, L., Abou-Youssef, M. H., Radwan, A. I., Hamdy, F. M. and Hildebrant, P. K.: Moldy corn poisoning as the major cause of an encephalomalacia syndrome in egyptian equidae. Am. J. Vet. Res.: 29: 2029-2035 (1968).
- 5.- Baker, D. C. and Green, R. A.: Coagulation defects of aflatoxin intoxicated rabbits. Vet Pathol. 24:62-70 (1987).
- 6.- Barnett, H. L. and Hunter, B. B.: Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd. Ed. Burges Publishing Company. Burges, 1972.
- 7.- Bennet, G. A., Lagoda, A. A., Shotwell, O. L. and Hesseltine, C. W.: Utilization of zearalenone-contaminated corn for ethanol production. J.A.O.C.S. 56:974-976 (1981).
- 8.- Beownie, C. F. and Cullen, J.: Characterization of experimentally induced equine leucoencephalomalacia (ELEM) in ponies (*Equus caballus*): preliminary report. Vet. Hum. Toxicol.: 29: 34-38 (1987).
- 9.- Castillo, A., Sánchez, J. I. y Rosiles: Características físicas y niveles de aflatoxina B1 en gallinaza y pollinaza de granjas de Texcoco, Estado de México. Vet. Méx. No.14:151-156 (1983).
- 10.- Clarke, J.A., Doerr, J.A. and Ottinger, M.A.: Relative importance of dietary aflatoxin and feed restriction on reproductive changes associated with aflatoxicosis in the maturing white leghorn male. Poult. Sci. 65:2239-2245 (1986).

- 11.- Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa y otras enfermedades exóticas de los animales: Prueba diagnóstica para micotoxinas. Boletín. 3(1):35 (1990).
- 12.- Chang, K., Kurtz, H. J. and Mirocha, C. J.: Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. Am. J. Vet. Res.: 40: 1260-1267 (1979).
- 13.- Chauhan, H. V. S., Jha, G. J., Singh, P. N. and Singh, K. K.: Hepatocelular carcinoma associated with aflatoxicosis in pigs. Indian Vet. J. 61: 1009-1014 (1984).
- 14.- Chen, C., Pearson, A. M., Coleman, T. H., Gray, J. L. and Wolzak, A. M.: Broiler aflatoxicosis with recovery after replacement of the contaminated diet. Br. Poult. Sci. 25: 65-71 (1985).
- 15.- Davis, N. D., Dickens, J. W., Freie, R. L., Hamilton, P. B., Shotwell, O. L. and Wyllie, T. D.: Mycotoxins. J. Assoc. Anal. Chem. 63: 5-102 (1980).
- 16.- Dixon, R. C. and Hamilton, P. B.: Environment and health. Evaluation of some organic acids as mold inhibitors by measuring CO₂ production from feed and ingredients. Poult. Sci. 60:2182-2188 (1981).
- 17.- Domenech, J., Boccas, B., Pellegrin, F., Laurent, A., Kohler, F., Magnol, J. and Lambert, C.: Equine leucoencephalomalacia in New Caledonia. Aus. Vet. J. 62:422 (1985).
- 18.- Fernández, J. C., Rosiles, R. y González, A.: Cuantificación de taninos en muestras de sorgo (Sorghum vulgare) procedentes de cinco Estados de la República Mexicana. Vet. Mex. No.16:231-234 (1985).
- 19.- Figueroa, A.: Evaluación de tres métodos para la determinación de aflatoxinas en alimentos para animales. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zool. México D. F. (1980).
- 20.- Foster, B. C., Trenholm, H. L., Friend, D. W., Thompson, B. K. and Hartin, K. E.: Evaluation of different sources of deoxynivalenol (vomitoxin) fed to swine. Can. J. Anim. Sci. 66:1149-1154 (1986).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 21.- Friend, S. C., Hancock, D. S., Schiefer, H. B. and Babiuk, L. A.: Experimental T2 toxicosis in sheep. Can. J. Comp. Med. 47:291-297 (1983).
- 22.- Frisvad, J. C. and Filtenborg, O.: Terverticillate penicillia: Chemotaxonomy and mycotoxin production. Mycologia. 81(6):837-861 (1989).
- 23.- Gentry, P. A. and Cooper, M. L.: Effect on intravenous administration of T2 toxin in blood coagulation in calves. Am. J. Vet. Res. 44: 741-746 (1983).
- 24.- Goos, R. D.: A review of the anamorph genus Helicomyces. Mycologia. 77(4):606-618 (1985).
- 25.- Guzmán De Peña, D.: Micotoxinas en el Bajío guanajuatense. Avance y perspectiva. 8(40):15-20 (1989).
- 26.- Hagler, W. M. and Mirocha, C. J.: Biosynthesis of (14C) zearalenone from (1-14C) acetate by Fusarium roseum "Gibbosum". Appl. Environ. Microbiol. 39:668-670 (1980).
- 27.- Hamilton, P. and Raleigh, N. C.: Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. Feedstuffs. April 1990.
- 28.- Hamilton, P.: Efectos y control de las micotoxinas. Departamento de Ciencia Avícola, Universidad del Estado de Carolina, U.S. 1979
- 29.- Harby, T.P.: Hongos y micotoxinas (1a. parte de una serie de dos). Un problema del hombre y los animales. Progreso en Nutrición. No.297:1160-1164 (1977).
- 30.- Harrach, B., Mirocha, CH. J., Pathre, S. V. and Palyusik, M.: Macrocyclic trichotecene toxins produced by strains of Stachybotrys atra from Hungary. Appl. Environ. Microbiol. 41:1428-1432 (1981).
- 31.- Hawton, J., Bache, D. and McKenzie, B.: High-moisture grains for swine. Pork. Industry Handbook. No.73:1-6 (1981).
- 32.- Hayward, D.: Investigación bibliográfica sobre micotoxosis en medicina veterinaria: fuentes, incidencia, patogenia, toxicidad, signos clínicos, diagnóstico, métodos analíticos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. México D. F., 1986.

- 33.- Huff, W. E., Doerr, J. A., Hamilton, P. B. and Vesonder, R. F.: Acute toxicity of vomitoxin (Deoxynivacids) as mold inhibitors by measuring CO₂ production from feed ingredients. Poult. Sci. 60:2182-2188 (1981).
- 34.- Huff, W.E., Doerr, J.A., Wabeck, C.J., Chaloupka, G.W., Way, J.D. and Merkley, J.W.: The individuals and combined effects of aflatoxin and achratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. Poult. Sci. 63:2153-2161 (1984).
- 35.- Huff, W.E., Doerr, J.A., Wabeck, C.J., Chaloupka, G.W., Way, J.D. and Merkley, J.W.: Individual and combined effects of aflatoxin and deoxynivalenol (DON, Vomitoxin) in broiler chickens. Poult. Sci. 65:1291-1298 (1986).
- 36.- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B., Corrier, D.E. and Mollenhauer.: Progression of aflatoxicosis in broiler chickens. Poult. Science. 65:1891-1899 (1986).
- 37.- Hutchins, J.E. and Hagler, W.M.: Rapid liquid chromatographic determination of aflatoxins in heavily contaminated corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66:1458-1465 (1983).
- 38.- Jimeno, M., Ruíz, N. y Peña, N.E.: Niveles de aflatoxina B₁ en sorgo recolectado en dos zonas del país. Primera cosecha 1979. Rev. ICA Bogotá (Colombia). 15:129-134 (1980).
- 39.- Joffe, Z.A.: Fusarium species: Their biology and toxicology. Wiley-Interscience, New York. 1986.
- 40.- Kanazas N., Ely L. W., Fields M. L. and Erdman, J.W.: Toxic effects of fermented and unfermented sorghum meal diets naturally contaminated with mycotoxins. Applied Environmental Microbiology. 47(5):1118-1125 (1984).
- 41.- Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Pienaar, J.G. and Navde, T.W.: Fusarium moniliforme sheldon. A preliminary communication. Onderstepoort. J. Vet. Res. 39:205-208 (1972).
- 42.- Kommedahl, T., Abbas, H. K., Burnes, P. M. and Mirocha C. J.: Prevalence and toxigenicity of Fusarium species from soils of Norway near the Arctic Circle. Mycologia. 80:790-794 (1988).

- 43.- Krough, P., Hald, B., Englund, P., Routquist, L. and Owahn, O.: Contamination of swedish cereals with ochratoxin A. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B. 82:301-302 (1974).
- 44.- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D. and Fletcher, O.J.: Influence of ochratoxin A and vanadium on various parameters in growing chicks. Poult. Sci. 65:1671-1678 (1986).
- 45.- Kulik, M. M. and Holaday, C. E.: Aflatoxin. A metabolic product of several fungi. Mycopathol. Mycol. Appl. 30:137-140 (1967).
- 46.- Ley, W.B.: Mycotoxins in stored corn linked to fatal equine disease. Feedstuffs. 7 (1985).
- 47.- Lun, A.K., Young, L.G., Moran, E.T., Hunter, D.B. and Rodriguez, J.P.: Effects of feeding hens a high level of vomitoxin-contaminated corn on performance and tissue residues. Poult. Sci. 65:1095-1099 (1986).
- 48.- Luna, L.: Manual of histologic staining methods. Armed Forces Institute of Pathology. Mcgraw-Hill, Inc. New York, 1968.
- 49.- Marasas, W. F. O., Nelson P. E. and Toussoun, T. A.: Reclassification of two important moniliformin-producing strains of Fusarium, NRRL 6022 and NRLL 6322. Mycologia. 80:407-403 (1988).
- 50.- Martínez, A.A.: Micotoxicosis en aves. Avances en Medicina Veterinaria. 5:54-64 (1988).
- 51.- Martínez, A.A.: Micotoxicosis en cerdos. Avances en Medicina Veterinaria. 5:78-89 (1988).
- 52.- Martínez Lecuona, A.: Producción y comercialización del sorgo en México. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. U.N.A.M. 1988.
- 53.- Martínez, M.E.: Tamaulipas. La tierra de Bernal. Publicado por el gobierno del Estado de Tamaulipas. México 1986.
- 54.- Merkley, J. W., Maxwell, R. J., Phillips, J. G. and Huff, W. E.: Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. Poult. Sci. 66:59-67 (1987).

- 55.- Miller, C.M., Crowel, W.A. and Stuart, B. P.: Acute aflatoxicosis in swine: Clinical pathology, histopathology and electron microscopy. Am. J. Vet. Res. **43**:273-277 (1982).
- 56.- Mirocha, C.J. and Pathre, S.V.: Mycotoxins. Their biosynthesis in fungi: zearalenone biosynthesis. J. Food Protection. **42**:821-824 (1979).
- 57.- Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Robinson, T.S.: Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. Food Cosmet. Toxicol. **19**:25-30 (1981).
- 58.- Moran, E.T., Ferkt, P.R. and Lun, A.K.: Impact of high dietary vomitoxin on yolk yield and embryonic mortality. Poult. Sci. **66**:977-982 (1987).
- 59.- Neumannova, V., Fassatiová, O., Vaselá, D. and Vesely, D.: Microscopic fungi in broiler feeds: toxigenesis and toxicity to the chick embryo. Veterinárni medicina. **31**:687-694 (1986).
- 60.- Nyack, B. and Padmore, C.L.: Suspected equine leukoencephalomalacia. A case report. Equine Practice. **5**:33-36 (1983).
- 61.- Osuna, O., Edds, G.T. and Simpson, C. F.: Toxicology of aflatoxin B₁, warfarin and cadmium in young pigs: Metal residues and pathology. Am. J. Vet. Res. **43**:1395-1400 (1982).
- 62.- Pegram, R.A., Wyatt, R.D. and Marks H.L.: Acute aflatoxicosis in genetically resistant and nonselected Japanese quail. Poult. Sci. **65**:1146-1152 (1986).
- 63.- Pier, A. C.: Mycotoxins and animal health. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. **25**: 185-243 (1981).
- 64.- Pijoan, C. y Cervantes, R.: Manual de micología veterinaria. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. 1975.
- 65.- Rosiles, R. y Pérez, A.: Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimentos para animales domésticos durante los años 1977 a 1980. Vet. Mex. No.23:229-232 (1981).

- 66.- Saiz, M. L., García de Osma, J.L. y Compaire, F. C.: Animales de Laboratorio (Producción, manejo y control sanitario). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. I.N.I.A. Madrid, 1983.
- 67.- Secretaría de Agricultura y Ganadería. INIA.: Guía para la asistencia técnica agrícola. Área de influencia del campo agrícola experimental "Las Huastecas". Centro de Investigaciones Agrícolas de Tamaulipas. México 1976.
- 68.- Sharby F. T.: Hongos y micotoxinas (1a. parte de una serie de dos). Un problema del hombre y los animales. Progreso en Nutrición. Suplemento Dawe's. No.297:1160-1164 (1977).
- 69.- Stoloff, L., Neshein, S., Yin, L., Rodricks, J.W. Stack, M. and Campbell, A. D.: A multimycotoxin detection method for aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Ass. Offic. Agric. Chem. 54:91-97 (1971).
- 70.- Stoloff, L. and Trucksess, M. W.: Distribution of Aflatoxin B₁ and M₁ in contaminated calf and pig livers. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62:1361-1362 (1979).
- 71.- Subsecretaría de Planeación. Dir. Gral. de Estudios e Información y Estadística Sectorial de S.A.R.H.: Datos al último día de marzo de 1987 sobre producción de sorgo. Ciclo primavera-verano 86-86, ciclo otoño-invierno 85-86. México.
- 72.- Tabib, Z., Jones, F.T. and Hamilton, P.B.: Microbiological quality of poultry feed and ingredients. Poult. Sci. 60:1392-1397 (1981).
- 73.- Thiel, P.G., Gelderblom, C.A., Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Wilson, T.M.: Natural occurrence of moniliformin and fusarin C in corn screenings known to be hepatocarcinogenic in rats. J. Agric. Food Chem. 34: 773-775 (1986).
- 74.- Thurman, J.D., Creasia, D.A., Quance, J.L. and Johnson, A.J.: Adrenal cortical necrosis caused by T-2 mycotoxicosis in female, but not male, mice. Am. J. Vet. Res. 47(5):1122-1124 (1986).
- 75.- Trenholm, H. L., Prelusky, D. B., Young, J. C. and Miller, J. D.: Reducing mycotoxins in animal feeds. Agriculture Canada Publication 1827/E, Ottawa, 1988.

- 76.- Trucksess, M.W. and Stoloff, L.: Extraction, cleanup and quantitative determination of aflatoxins B₁ and M₁ in beef liver. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62:1080-1082 (1979).
- 77.- Trucksess, M.V. and Stoloff, L.: Distribution of aflatoxins B₁ and M₁ in contaminated calf and pig livers. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62:1361-1362 (1979).
- 78.- Van Walbeek, W., Scott, P. M. and Thatcher, F. S.: Mycotoxins from food-borne fungi. Can. J. Microbiol. 14:131-137 (1968).
- 79.- Vesonder, R. F. Ciegler, A and Jensen, A.H.: Production of refusal factors by Fusarium strains on grains. Appl. Environ. Microbiol. 34:105-106 (1977).
- 80.- Von Arx, J. A.: The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer. Hamburg, 1974.
- 81.- Wilson, B.J. and Maronpot, R. R.: Causative fungus agent of leucoencephalomalacia en equine animals. Vet. Rec. 88:484-486 (1971).
- 82.- Yoshizawa, T., Mirocha, C. J. Behrens, J.C. and Swanson, S. P.: Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. Food Cosmet. Toxicol. 19:31-39 (1981).