

C. N. E. N. Biblioteca	
ARCHIVO FUNDACIONES	
Nº 1	AÑO 1982

07.82.05

795

COMPARACION DE EFECTOS PROVOCADOS POR AGENTES FISICOS SOBRE
ASPERGILLUS PARASITICUS (CALOR E IRRADIACION)
KOTLIAR, NATALIO
NARVAIZ, PATRICIA

INTRODUCCION

Las aflatoxinas, metabolitos de origen fúngico, producidos por algunos hongos del género *Aspergillus*, son sustancias capaces de producir graves daños hepáticos y renales en humanos y animales, tales como hepatocarcinomas (5, 12).

Este tipo de microorganismo se encuentra naturalmente como contaminante de granos, en especial, de maíz, trigo, algodón, etc (4), provocando con su desarrollo el deterioro de los mismos.

En el presente trabajo se pretendió encontrar un método empleando radiaciones ionizantes de una fuente de ^{60}Co , que permitiera controlar el desarrollo fúngico y con ello, la producción de toxinas. Estas han demostrado ser resistentes a distintos agentes físicos (3,7) y químicos (10), aplicados en condiciones tales que no alteren las características de los alimentos.

MATERIALES Y METODOS

La cepa productora de aflatoxinas utilizada fue "*Aspergillus parasiticus*" NRRL 1999, conservada en agar papa-dextrosa (Oxoid).

Para obtener la curva de dosis/sobrevida se irradiaron alícuotas de suspensiones de conidios en buffer fosfato 0.14M, de pH 7, suplementadas con TWEEN 80, 2 ppm, en Gammacell 220, con velocidad de dosis de 158 krad/hora. Los recuentos de sobrevivientes se realizaron por dilución en placas de agar papa-dextrosa, empleándose TWEEN 20, 100 ppm, como líquido de dilución.

Los ensayos realizados en el laboratorio se efectuaron sobre cultivos de "*Aspergillus parasiticus*" en arroz de tipo comercial, esterilizado e hidratado. Para la obtención de dichos cultivos se emplearon porciones de 10 gramos de arroz, inoculadas con 1 ml de suspensión de aproximadamente 10^6 conidios en solución de TWEEN 20, 100 ppm. Estos conidios provenían de cultivos de 3 días de desarrollo.

Las irradiaciones de este material se realizaron en el irradiador móvil, con una velocidad de dosis de aproximadamente 150 krad/hora, aplicándose en todos los casos dosis de 150 krad. El desarrollo de los cultivos se llevó a cabo a una temperatura de $(25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C})$.

Para las fracciones que fueron calentadas, se empleó un baño de agua con agitación, New Brunswick Scientific, Modelo G 76.

El desarrollo fúngico se detuvo por autoclavado a 120°C durante 15 minutos, lo cual no altera la cantidad de toxinas presentes. Luego se verificó la eficacia de los tratamientos aplicados sobre estos cultivos por dosaje de las toxinas producidas. Este dosaje se realizó por extracción con cloroformo,

purificación con carbonato de cobre y carbón activado (9), y posterior cromatografía en placa delgada, sobre silicagel G (11). Los reactivos utilizados fueron de grado "para análisis"

La cuantificación se realizó por dilución a extinción de los extractos fluorescentes, y visualización bajo lámpara ultravioleta, a 366 nm, de la aflatoxina B₁.

Se realizaron distintas experiencias:

1) Se irradiaron cuatro cultivos, de 0,14,20 y 40 horas de crecimiento, dosándose las toxinas al cabo de 5 días de desarrollo. Paralelamente se reservó una muestra sin irradiar, como testigo.

2) Se irradiaron cultivos de 20 horas de crecimiento, tomándose como variable el tiempo de desarrollo, que fue de 6,7,8 y 9 días, respectivamente.

Paralelamente se reservó una muestra sin irradiar, como testigo, siendo su tiempo de desarrollo de 6 días.

3) Se prepararon 6 cultivos, la mitad de los cuales se calentaron en baño de agua a $(62 \pm 0.5)^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos inmediatamente antes de irradiar, lo cual se llevó a cabo a las 20 horas de la siembra. De cada grupo de tres, uno se reservó como testigo de irradiación, y los otros dos fueron cultivados durante 5 y 8 días, respectivamente, al cabo de los cuales se dosaron sus toxinas. El dosaje realizado en los testigos se efectuó a los 5 días de crecimiento.

4) De acuerdo con el esquema enunciado en 3), distintos cultivos recibieron los siguientes tratamientos:

a) Irradiación con 150 krads a las 20 horas de crecimiento (irradiado sin calor).

b) Calentamiento a 55°C durante 15 minutos, inmediatamente antes de irradiar como en a) (irradiado con calor).

c) Calentamiento a 55°C durante 15 minutos, a las 20 horas de crecimiento (testigo con calor).

d) Ninguno (testigo sin calor).

En todos los casos, se dosaron las toxinas a los 4,7 y 11 días de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en la curva de dosis/sobrevida se muestran en la figura 1. En ella se observan dos rectas cuyas pendientes representan la distinta sensibilidad de los elementos constitutivos del hongo en estudio. En la primera porción (correspondiente a micelio vegetativo) se observa una mayor sensibilidad, que se manifiesta en su valor de D_{10} , 25 krad.

En la segunda parte (correspondiente a conidios), el D_{10} es de 77 krads, y es ésta precisamente la fracción más resistente del hongo. En nuestro trabajo tomamos aproximadamente dos D_{10} , o sea, 150 krads; con el fin de asegurar la inactivación de los cultivos de *Aspergillus parasiticus* obtenidos en el laboratorio.

En la experiencia uno, en la cual se irradiaron cultivos de distintos tiempos de crecimiento, se observaron diferencias en la sensibilidad de las muestras frente a la radiación.

A través de dosajes semicuantitativos realizados al cabo de 5 días de desarrollo, se comprobó que, en los casos irradiados, la cantidad de toxina hallada era menor que la correspondiente al testigo. A la vez, se observaron diferencias en el efecto producido por radiación según el tiempo de crecimiento al cual las muestras fueron tratadas.

Los cultivos irradiados a las 14 y 20 horas a partir de la siembra produjeron menor cantidad de toxina que los de 0 y 40 horas, y en particular, la de 20 horas presentó los menores valores de concentración.

A partir de estos resultados, considerando las 20 horas de crecimiento como momento óptimo para la irradiación, en la segunda experiencia se irradiaron cultivos con este tiempo de crecimiento, dejándose desarrollar a los mismos por períodos de tiempo crecientes (6 a 9 días). Aquí se comprobó que las cantidades de toxinas producidas se incrementaban con el tiempo, acercándose a las del testigo.

En la tercera y cuarta experiencia se pretendió comprobar efectos de calor comparándolos con los de irradiación, así como los resultantes de su combinación. En la tercera experiencia se observó que la cantidad de toxinas producidas en las muestras tratadas sólo con calor era menor que la correspondiente a las que sólo se irradiaron, siendo ambas, como era de esperar, menores que las producidas por los testigos. En los casos en que se combinaron estos tratamientos, no se detectaron toxinas en las muestras, lo cual implica que la cantidad presente en éstas era menor de 2 ng.

La cuarta experiencia se realizó con el fin de obtener resultados semejantes a los de la anterior, pero haciendo menos enérgico el tratamiento térmico. En este caso, los resultados obtenidos se esquematizan en la figura 2. Aquí se observa la diferencia en la producción de toxinas en función del tiempo, de acuerdo con los distintos tratamientos aplicados. Las cantidades producidas por las muestras sólo calentadas resultó ser mayor que las tratadas sólo con radiación, siendo ambas menores que las de los testigos. En los casos sin irradiar, las curvas de producción de toxinas en función del tiempo presentaron un aspecto acorde con las encontradas en bibliografía, que muestran picos de máxima producción.

En cuanto a los resultados obtenidos a partir del tratamiento combinado, debemos remarcar la ausencia de toxina dosable por nuestros métodos.

DISCUSION

En el presente trabajo se pone de manifiesto la sensibilidad de los cultivos de "*Aspergillus parasiticus*" frente a las radiaciones ionizantes. De los resultados obtenidos podemos ver, en principio, una diferencia en la sensibilidad del cultivo frente a la irradiación. Esta diferencia observada en los distintos estadios de desarrollo puede ser atribuida a características propias del microorganismo.

Inicialmente se encuentran presentes en el cultivo las esporas provenientes del inóculo, que como ya mencionamos, son las que presentan mayor resistencia a la radiación. Con el correr del tiempo, dichas esporas, dadas las condiciones óptimas de desarrollo, germinan produciendo un micelio joven, que presenta mayor sensibilidad que la espора original. Posteriormente, el desarrollo continúa, dando lugar al envejecimiento del micelio, con la consecuente producción de esporas, y con ello el aumento de resistencia del microorganismo a la radiación.

En lo referente a las distintas temperaturas empleadas, se observó que con 62°C el efecto producido por calor superaba al de irradiación, en tanto que con 55°C esta situación se revertía. Como, en ambos casos, el tratamiento combinado fue igualmente efectivo en reducir la cantidad de toxina a menos de 2 ng, es más conveniente la aplicación de la menor temperatura, para reducir los posibles daños producidos al alimento por acción del calor.

Es importante resaltar los resultados obtenidos en las experiencias en las cuales se combinaron el calor y la irradiación. Dado que en estos casos no se detectaron toxinas, las concentraciones presentes deben ser menores de 20 ppb, lo cual está debajo de las máximas permitidas por organismos internacionales (30 ppb), por lo tanto, este método podría ser útil para impedir su producción en granos. Se debe tener en cuenta que la dosis de irradiación empleada en nuestras experiencias (150 krad), elegida a partir de la curva de dosis/sobrevivencia del microorganismo, es superior a la permitida para desinsectación de granos por el comité FAO-OMS 1979, que es de 100 krads. Así, se hacen necesarias nuevas experiencias para verificar la efectividad del tratamiento con dosis menores.

Se debe hacer la salvedad de que los resultados obtenidos responden a condiciones óptimas para el desarrollo del contaminante, como temperatura, humedad, sustrato, etc, que favorecen su crecimiento, lo cual refuerza la utilidad del método empleado. A pesar de esto, se debe tener en cuenta que las características del crecimiento fúngico limitan la aplicación del tratamiento combinado al lapso comprendido entre la aparición de micelio joven, y la producción de nuevas esporas. Este período es variable y depende precisamente, de las condiciones de crecimiento.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Arseculeratne, S.N., Bandunatha, C.H.-"Variation of Aflatoxin Content of Cultures of "Aspergillus flavus" with duration of incubation and its relation to studies on Aflatoxin Production" Department of Bacteriology, Faculty of Medicine, University of Ceylon, Paradeniya, Ceylon.- Journal of Applied Bacteriology. Vol. 35, N° 1, March 1972.
- 2) Behere, A.G., Arun Sharma, S.R. Padwalidesai, G. B. NadKarni "Production of aflatoxins during storage of gamma-irradiated wheat". Biochemistry and Food Technology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Bombay, India. Journal of Food Science Vol. 43, 1978.
- 3) Frank, H.K., Th. Grunewald. "Radiation Resistance of Aflatoxins" Federal Research Centre for Food Preservation, Karlsruhe, West Germany. Food Irradiation, Vol. 11, N° 1 y 2, 1970.
- 4) Leo Goldbatt.-"Aflatoxins". Academic Press, N.J. 1970.
- 5) Lillehoj, E.B. A. Ciegler, R.W. Detroy. "Essays in Toxicology" Vol. 2. Academic Press, London. 1970.
- 6) Marth, E.H., M.P. Doyle. "Update on molds: degradation of aflatoxin" Food Technology, Jan. 1970.
- 7) Miyaki K, K. Aibara, T. Miura. "Resistance of Aflatoxin to Chemical and Biological Changes by Gamma Irradiation". Department of Food Research, National Institute of Health, Shinagawaku, Tokio, Japan. Proceeding from a pannel, FAO-IAEA, 1966-.
- 8) Mohyuddin, Mirza, W.P. Skoropad. "Radiation-heat synergism for inactivation of conidia of "Aspergillus flavus". Department of Plant Sciences, University of Alberta, Edmonton, Canada. Radiation Botany, Vol. 15, 1975.
- 9) Shotwell et al. Applied Microbiology. 14: 425-428, 1966.
- 10) Trager, William, Stolaff. "Possible Reactions for Aflatoxin: Detoxification". Division of Food Chemistry, Food and Drug Administration, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington. Journal of Agricultural Food Chemistry. Vol. 15, N° 4. 1967.
- 11) Walking, E.A. Journal of the AOAC, 33:104-113, 1970.
- 12) Wogan, G. "Chemical Nature and Biological Effects of the Aflatoxins". Department of Nutrition and Food Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts. Bacteriological Reviews, June 1966. Vol. 30, N° 2.

Figura 1

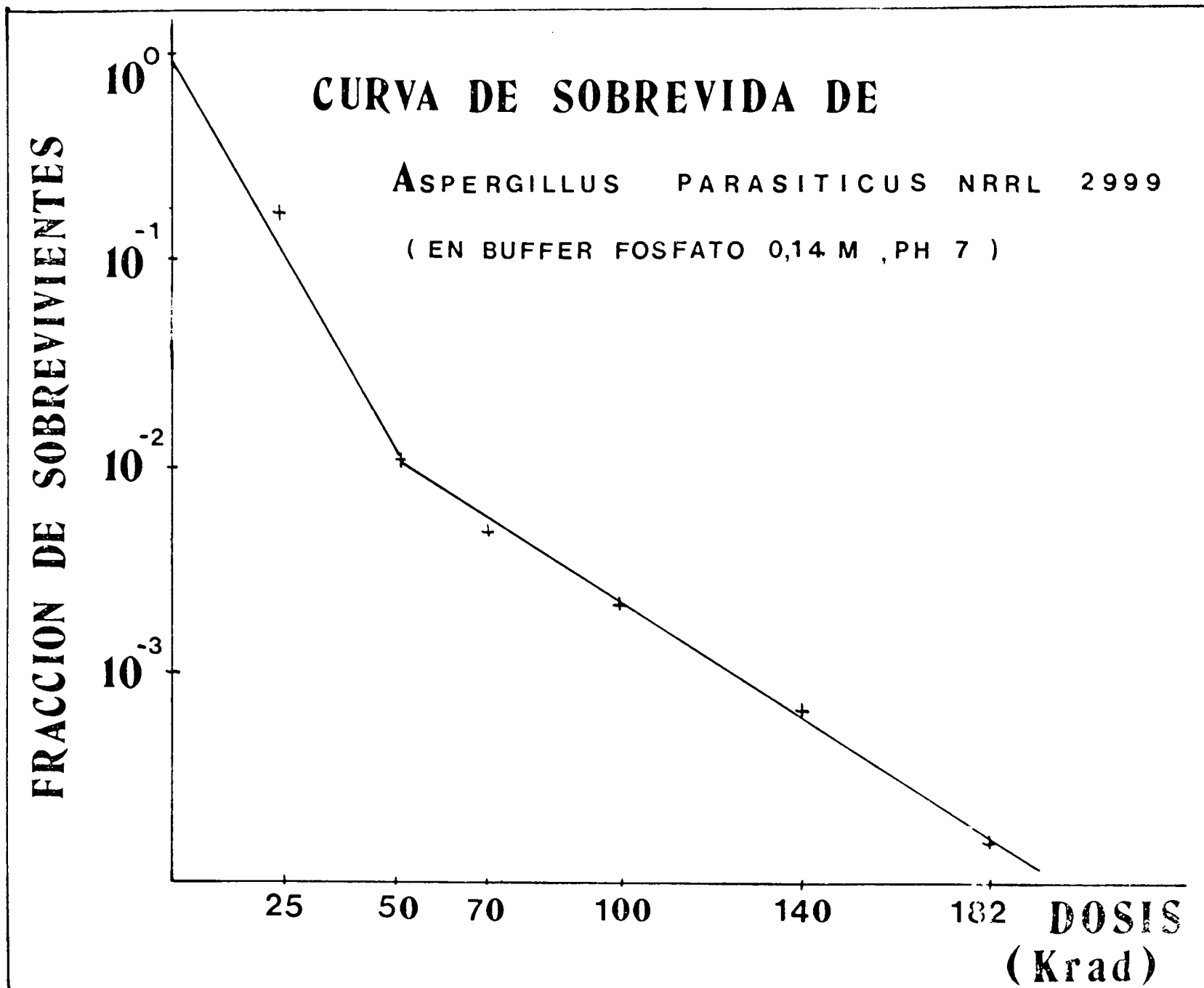
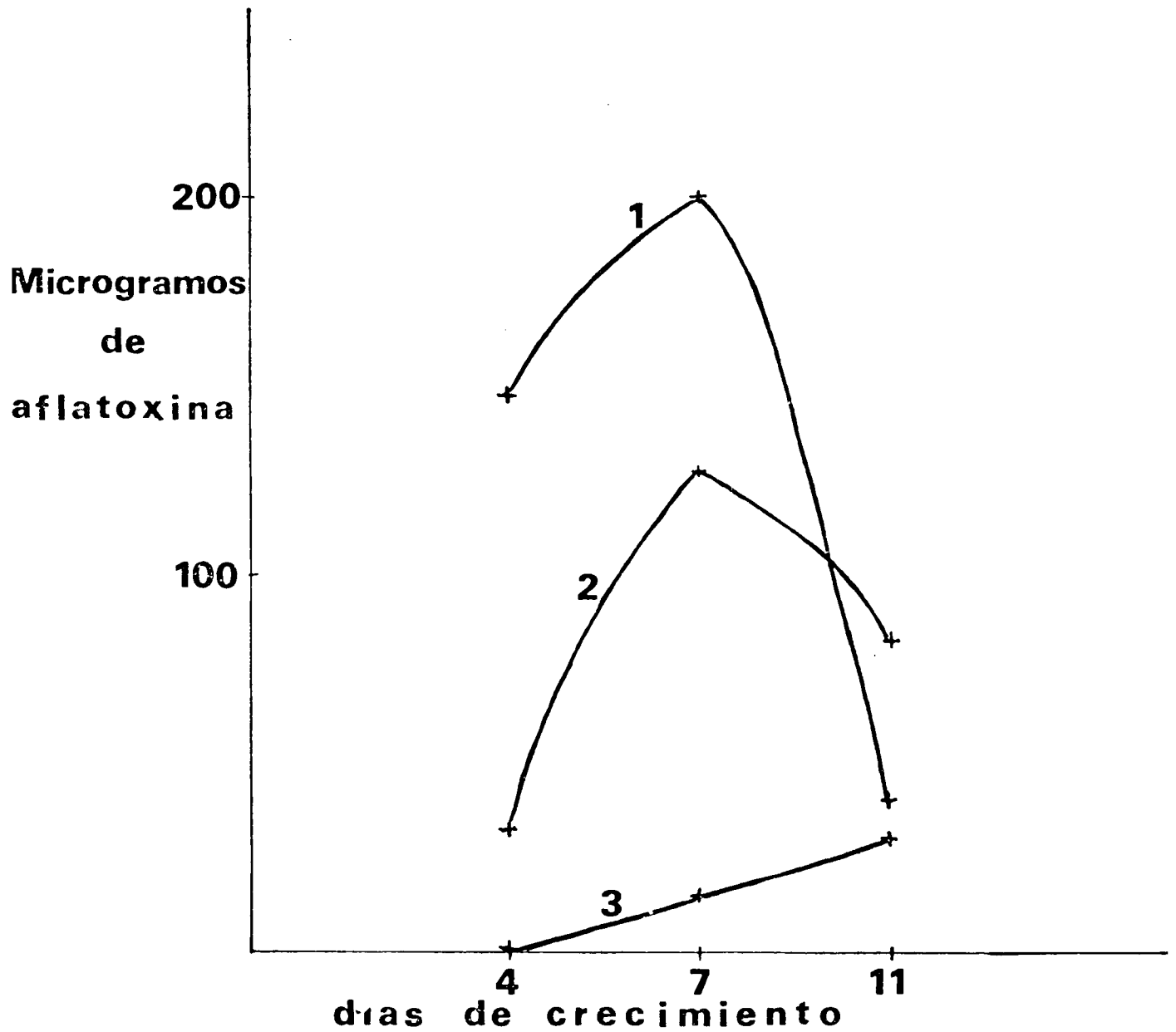


Figura 2



REFERENCIAS

- 1: Testigo sin calor
- 2: Testigo con calor
- 3: Irradiado sin calor