

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL MICOTOXIGÉNICO EN HARINAS DE PESCADO DESTINADAS PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS CONCENTRADOS

Identification of Fungi with Potential Micotoxigenic in Fish Meals Used for Preparation of Concentrated Food

Crucita Graü de Marín^{1*}, Daniel Muñoz^{1,2}, Eugenia Márquez¹, Gabriela Figueroa¹ y Jorge Maza¹

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA Sucre - Nueva Esparta). ²Liceo Bolivariano "José Silverio González"
*cgrau@inia.gov.ve

RESUMEN

La utilización de la harina de pescado para la formulación de alimentos ha sido cuestionada por las autoridades sanitarias de muchos países, vinculándola como agente causal de diversas patologías en animales. Considerando que los hongos tienen la capacidad de invadir diferentes sustratos y de producir micotoxinas se realizó este estudio para identificar hongos con potencial micotoxigénico en harinas de pescado con el objetivo de evaluar su calidad e inocuidad. Se analizaron 240 muestras de tres empresas procesadoras (A, B, C) de la región nor-oriental de Venezuela. El porcentaje de humedad se determinó mediante el método adoptado por la AOAC, mientras que para el recuento e identificación de hongos se utilizó la metodología de Samson y col. Como medio de cultivo se utilizó el agar MEA al 2%, con adición de 100 ppm de cloranfenicol y 50 ppm de estreptomycin. La identificación se efectuó a partir de cultivos puros, utilizándose los agares Czapeck, CREA y G25N. Los resultados revelaron variaciones considerables en el contenido de humedad. Los recuentos totales de hongos oscilaron entre $3,5 \times 10^6$ UFC/g a $4,9 \times 10^6$ UFC/g en las muestras correspondientes a las empresas B y A, predominando en ambas las especies *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. versicolor*. En las muestras de la empresa B, los hongos aislados fueron identificados como *A. penicillioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. citrinum* y *Alternaria alternata*. Se concluye que por el tipo de micoflora aislada y su potencial micotoxigénico, ésta representa un factor de riesgo importante para el desarrollo de patologías en los animales.

Palabras clave: Hongos micotoxigénicos, harina de pescado, piensos, calidad, inocuidad, nororiental Venezuela.

ABSTRACT

The use of fish meal for the formulation of animal feeds has been questioned by sanitary authorities of many countries, linking it as causal agent of diverse animal pathologies. Considering that fungi have the capacity to invade different substrates and produce micotoxins, this study was made in order to detect, isolate and identify filaments fungi in fish meals with the purpose to evaluate their quality and innocuousness. Two hundred and forty samples of fish meal from three fish processing plants (A, B and C) located at the Northeastern Region of Venezuela were evaluated. Percent humidity was determined by the method adopted by AOAC, while for the detection, recount and identification of fungi the methodology followed that recommended by Samson *et al.*, using as culture media MEA agar at 2% with addition of 100 ppm of chloranphenicol and 50 ppm of streptomycin. Fungi identification was made from pure cultures, using agars Czapeck, CREA and G25N. Results showed considerable variation in the humidity content of the fish meals. The total recount of fungi varied between 3.5×10^6 CFU/g to 4.9×10^6 CFU/g in samples from processing plants B and A, for which most fungi species were *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *A. flavus* y *A. versicolor*. In samples from processing plant B, the isolated fungi were identified as *A. penicillioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. citrinum* and *Alternaria alternata*. It is concluded that by the type of isolated micoflora and its toxigenic potential, fish meal represents an important risk factor for the development of animal pathologies.

Key words: Filaments fungi, fish meal, concentrated food, quality, innocuousness, northeastern Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La harina de pescado ha sido utilizada como materia prima principal para la elaboración de alimentos concentrados destinados al consumo animal, debido a que proporciona una fuente concentrada de proteínas de alta calidad y de escasa antigenicidad, por lo que resulta muy adecuada en la formulación de dietas para animales jóvenes. Se considera una excelente fuente de aminoácidos esenciales altamente digestibles, tales como: la lisina, cisteína, treonina, metionina y triptófano. Sin embargo su composición final varía de acuerdo al tipo de materia prima destinada para su elaboración [21, 42].

El proceso de fabricación de la harina tiene un efecto importante en su composición proximal y sobre su valor nutritivo. Algunas harinas se elaboran a partir de la reducción de subproductos de industrias procesadoras del pescado, en su mayoría fabricantes de conservas utilizándose para su elaboración restos de cabezas, colas y vísceras. Otras harinas de excelente calidad son elaboradas a partir de pescados enteros provenientes de la pesca industrial [18].

En Venezuela, las harinas de pescado son producidas casi exclusivamente en la región nor-oriental. Actualmente existen 14 plantas de conservas productoras de harina ubicadas en los estados Sucre, Nueva Esparta y Miranda, siendo el estado Sucre el primer productor nacional de harina de pescado con un aporte equivalente al 82% del total producido en el país [28]. Esto representa en la región el primer método de aprovechamiento de los desperdicios de las plantas conserveras de sardinas (*Sardinella aurita*), atunes (*Thunnus albacares*, *Thunnus alalunga*, *Katsuwonus pelamis*) y de fileteados, pero éstos son almacenados en condiciones no apropiadas afectándose la calidad del producto.

Recientemente, la utilización de la harina de animales, en especial la de pescado para la formulación de piensos compuestos ha sido cuestionada por las autoridades sanitarias de muchos países importadores de alimentos concentrados. Para prevenir cualquier riesgo adicional, los países integrantes de la Comunidad Económica Europea, principalmente Francia y Alemania, prohibieron el uso de harinas de animales en la elaboración de piensos, medida que actualmente ha sido derogada en Francia pero que las autoridades alemanas aún la mantienen vigente. Estas restricciones del comercio internacional han dado origen a suspicacias y malentendidos con respecto a las características de la harina de pescado producida en el Perú juzgándola como probable fuente de agentes causales de encefalopatías, o de estar contaminada con dioxinas, micotoxinas y albúmina [17, 18].

La contaminación con hongos puede dar origen a la presencia de micotoxinas [20]. Las harinas con un elevado contenido de humedad, producto de un deficiente secado o un inadecuado almacenamiento se convierten en un sustrato potenciador del crecimiento de distintas especies de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Mucor*. En este sentido,

para la producción de micotoxinas se requiere un valor de actividad de agua (a_w) elevado en el producto, por lo que el contenido de humedad en harinas de alta calidad no debe superar el 10% [16, 18].

Las micotoxinas comprenden un conjunto de sustancias químicamente complejas y poco correlacionadas, sintetizadas como metabolitos secundarios por algunos hongos y son responsables de graves problemas en la salud humana y animal, tales como lesiones y síntomas en diversos órganos: fibrosis hepática, cáncer hepático, hemorragia intestinal, afectación del sistema nervioso central, atrofia de la médula ósea, degeneración miocárdica, efecto inmunosupresor sobre el timo, aumento de la fragilidad vascular con hemorragias y efectos nefrotóxicos [5, 18, 19].

Frecuentemente, las micotoxinas han sido asociadas a patologías en animales de crianza, constituyendo un grave problema para la avicultura y la cría de peces. Enormes perjuicios económicos han ocasionado la utilización de piensos contaminados por estas sustancias tóxicas [1, 7].

Es importante mencionar que durante muchos años se ha venido investigando la presencia de micotoxinas en harina de pescado. Estudios realizados en el Perú no reportan su presencia en el producto [17]. Sin embargo, numerosas investigaciones reportan la contaminación de piensos destinados para aves y bovinos (*Bos taurus-indicus*). Al respecto, Ranjan y Sinha [37] reportan el aislamiento de cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus flavus* en piensos peletizados para animales. Coelho [10] sostiene que los piensos son excelentes sustratos para el crecimiento de microorganismos y cualquier incremento en el contenido de humedad de los mismos produce una multiplicación exponencial de hongos y bacterias.

En Venezuela, las investigaciones en su mayoría han sido dirigidas a la detección y aislamiento de hongos micotoxigénicos en materias primas vegetales (cereales, leguminosas y oleaginosas) destinadas al consumo humano y animal [26, 27], sin embargo es muy poca la información disponible sobre investigaciones en harinas de pescados destinadas para la formulación de piensos compuestos, ya que los criterios de "calidad" exigidos para este tipo de producto se fundamentan principalmente en el contenido de proteína bruta, humedad, ceniza, grasa, sal y la detección de *Salmonella* spp. [11], por ello se planteó con este estudio identificar hongos con potencial micotoxigénico en harinas de pescados destinadas a la elaboración de alimentos concentrados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Las muestras de harina de pescado fueron proporcionadas por tres empresas procesadoras de conservas ubicadas en la región nor-oriental de Venezuela, durante el periodo febrero 2004 a marzo 2005. Se analizaron un total de 240 mues-

tras, clasificándose de la siguiente forma: 80 muestras procedentes de la empresa A, 80 muestras de la empresa B y 80 muestras de la empresa C. La toma de las muestras primarias del producto en sacos se realizó de acuerdo a la metodología recomendada por la norma COVENIN-1567-80 [12]. Las muestras se transportaron bajo estrictas condiciones de asepsia, empleándose cavas de anime y bolsas plásticas (capacidad 1 kg) de lámina gruesa y cierre hermético. Después de su recepción fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología de Productos Pesqueros del Centro de Investigaciones Agrícolas del estado Sucre (CIAE-Sucre)-Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Los análisis se realizaron por triplicado.

Determinación del porcentaje de humedad

Se realizó mediante el método adoptado por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [4], utilizando una Termobalanza (OHAUS N. 6010, Scala Corp. Unión New Jersey, EUA) hasta peso constante.

Detección, recuento y aislamiento de la micobiota

La determinación cuantitativa se realizó de acuerdo a la norma COVENIN 1337-78 [13] y la metodología de Samson y col. [40]. Se procedió a preparar un homogenizado a partir de 25 g de la muestra de harina de pescado, adicionándole 225 mL de agua peptonada alcalina (APW, Merck, Darmstadt, Alemania) para obtener una dilución 10^{-1} , a partir de esta dilución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Posteriormente se sembró por duplicado y por inclusión, un mililitro de cada dilución en placas de Petri estériles contentivas de 15 mL de agar extracto de malta al 2% (MEA, Merck) a las cuales se le adicionó 100ppm de cloranfenicol y 50ppm de estreptomycin. Las placas se incubaron (Incubadora Felisa, Mod. FE-147 I, México) por 5 a 7 días a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Al transcurrir el período de incubación se efectuó el recuento en aquellas placas que presentaron entre 10 a 150 colonias, expresándose los resultados en Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra (UFC/g).

Los aislamientos se realizaron a partir de las colonias de hongos desarrolladas en las placas de MEA, se tomaron en consideración las características macroscópicas de cada una de ellas.

Identificación de los hongos

Se efectuó a partir de cultivos puros, utilizándose como medios Agar Czapek, Agar DG 18 (Dichloran 18% Glicerol Agar, para especies xerofilicas), PDA (Potato Dextrosa Agar, Merck) y agar nitrato 25% de glicerol (G25N, Difco). Las placas inoculadas se incubaron a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por 5 a 7 días. Transcurrido el período de incubación se examinaron visualmente las colonias desarrolladas tomando en consideración la consistencia de la superficie, el plegamiento, el borde, coloración en anverso y reverso de las colonias desarrolladas, la

presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo y la presencia de gotas de exudado. Mediante el examen microscópico directo se pudo determinar el patrón de crecimiento micelial, número y disposición de ramas, longitud y textura del estipe y las características morfológicas de los elementos de fructificación [32, 34, 40]. Las medidas de cada estructura fueron obtenidas colocándole un micrómetro ocular al microscopio óptico.

Preparación de microcultivos

Para la identificación definitiva de los hongos se realizaron montajes semipermanentes mediante el método de microcultivo [39] efectuándose el siguiente procedimiento: Se procedió a preparar una cámara de humedad, completamente estéril utilizando para ello una placa de Petri, colocándole un disco confeccionado con papel de filtro (Whatman N° 1) en el fondo de la misma. En la parte superior del papel de filtro se dispusieron dos aplicadores de madera cortados aproximadamente a un tamaño de 6 cm de longitud. Estos aplicadores sirvieron de soportes para la colocación de una laminilla porta objeto. Posteriormente, en la superficie del portaobjeto se colocaron dos bloques de agar Papa dextrosa (PDA, Merck). Los bloques del medio de cultivo PDA se obtuvieron mediante la aplicación de un tubo de ensayo (13×100 mm), estéril a modo de saca bocado sobre una placa del medio de cultivo sin sembrar. Los bloques de PDA se sembraron con las cepas mediante la ayuda de un aguja de platino, manteniéndose el inóculo en la disposición de cuatro cuadrantes en el bloque de agar, subsiguientemente se cubrieron con un porta objeto estéril. El disco de papel de filtro dispuesto en el fondo de la placa se humedeció con agua destilada estéril, manteniéndose la humedad del mismo durante todo el período de incubación a la temperatura de $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. La incubación se prolongó durante 7 a 14 días hasta completar el desarrollo de una colonia madura con suficiente crecimiento. Transcurrido el período de incubación, se procedió a retirar el cubre objeto y se colocó sobre una laminilla porta objeto, a la cual previamente se le había adicionado una gota de alcohol (Metanol 95%) para dispersar las conidias y una gota de lactofenol o azul algodón para la observación microscópica de la cepa en estudio. En la identificación se emplearon las descripciones de Fassatióva [15], Koneman y Roberta [23], Pitt [32], Piit y Samson [33], Pitt y col. [34], Samson y col. [40].

Para la identificación de *Penicillium* se complementó el estudio morfológico de las cepas aisladas mediante los criterios sugeridos por Pitt y Hocking [34] con la valoración de su crecimiento a los 7 días de incubación a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ en los medios de cultivos sólidos agar Creatina Sacarosa (CREA), Creatina Sacarosa Neutro(CSN) y agar Czapek Extracto de Levadura (CYA, Merck) y en el medio líquido Urea, efectuándose además la prueba de producción de indol, empleándose un disco de papel de filtro impregnado con el reactivo de Ehrlich. La presencia de la enzima Triptofanasa y la formación de ácidos (quetoglobicina, ciclopiazónico) como metabolitos del indol se evidenciaron al producirse el viraje del color rosa del reactivo al color violeta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la TABLA I y II se presentan el contenido de humedad y los recuentos de hongos de las muestras de harinas de pescado. Los resultados revelaron variaciones considerables en cuanto al contenido de humedad exigido para este tipo de producto, mostrando valores por encima de los parámetros establecidos en la Norma Venezolana COVENIN 1482-79 [11], la cual establece un contenido máximo de un 10% de humedad en las harinas de pescado y ausencia de crecimiento de hongos patógenos. Los resultados de los recuentos promedios de hongos fue de $4,9 \times 10^6$ UFC/g (planta A), $3,5 \times 10^6$ UFC/g (planta B) y $3,8 \times 10^5$ UFC/g (planta C); cabe destacar que el recuen-

to fúngico constituye un buen indicador de la calidad de los piensos y por ende de las materias primas utilizadas para su elaboración, al respecto Chelkowski [8] sostiene que éste no debe superar $1,0 \times 10^5$ UFC/g.

La TABLA II resume la presencia y porcentaje de muestras afectadas por la contaminación fúngica en el total de 240 muestras analizadas. De las 240 muestras procedentes de las plantas procesadora (A, B y C), cincuenta y cinco (22,92%) mostraron crecimientos de hongos filamentosos.

En la TABLA III se aprecia la frecuencia de las distintas especies fúngicas aisladas en el total de 55 muestras de harina de pescado. Del total de cincuenta y cinco muestras de ha-

TABLA I
VALORES PROMEDIOS DEL CONTENIDO DE HUMEDAD Y UFC/G DE HONGOS CONTAMINANTES DE HARINAS DE PESCADOS PROCEDENTES DE TRES PLANTAS PROCESADORAS LOCALIZADAS EN LA REGIÓN NOR-ORIENTAL DE VENEZUELA

Procedencia	% Humedad	UFC Hongos /G
Planta A	14	$4,9 \times 10^6$
Planta B	13	$3,5 \times 10^6$
Planta C	11	$3,8 \times 10^5$

UFC/g: Unidades Formadoras de Colonias/gramo.

TABLA II
PORCENTAJE DE HONGOS CONTAMINANTES EN EL TOTAL DE 240 MUESTRAS DE HARINAS DE PESCADO ANALIZADAS EN EL PERÍODO DE FEBRERO 2004 A MARZO 2005

Procedencia	N° Muestras analizadas	Presencia	%	Ausencia	%
Planta A	80	20	25,0	60	75,0
Planta B	80	17	21,3	63	78,7
Planta C	80	18	22,5	62	77,5
Total	240 (100%)	55 (22,92%)		185 (77,08%)	

TABLA III
PREVALENCIA DE LAS ESPECIES FÚNGICAS CONTAMINANTES EN TOTAL DE 55 MUESTRAS DE HARINA DE PESCADO PROCEDENTES DE TRES PLANTAS PROCESADORAS DE CONSERVAS UBICADAS DE LA REGIÓN NOR-ORIENTAL DE VENEZUELA

Especies fúngicas	Planta A N° (%)	Planta B N° (%)	Planta C N° (%)	Totales N° (%)
<i>Aspergillus niger</i>	10 (50)	6 (35)	9 (50)	25 (46)
<i>Aspergillus terreus</i>	5 (25)		6 (33)	11 (25)
<i>Aspergillus flavus</i>	2 (10)		3 (17)	5 (9)
<i>Aspergillus versicolor</i>	3 (15)			3 (5)
<i>Aspergillus penicillioides</i>		4 (24)		4 (7)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>		3 (17)		3 (5)
<i>Penicillium citrinum</i>		2 (12)		2 (4)
<i>Alternaria alternata</i>		2 (12)		2 (4)
Total	20 (100)	17 (100)	18 (100)	55 (100)

rinas que presentaron el crecimiento de hongos, 20 correspondieron a la empresa procesadora A, 17 empresa B y 18 empresa C (TABLAS II y III).

La presencia preponderante de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* concuerdan con las características propias del sustrato estudiado con un alto contenido de nutrientes en actividad acuosa, reflejada por el elevado porcentaje de humedad. En condiciones de humedad y temperatura adecuadas, el crecimiento de los hongos y la posible producción de metabolitos tóxicos puede tener lugar, incidiendo favorablemente el polvo acumulado diariamente en las áreas de producción u otros sitios de almacenamiento en la acción dispersadora de las esporas, dando lugar a un proceso de contaminación crónico, el cual afecta la calidad de las materias primas y del producto terminado que transitan diariamente por estos focos contaminados, repercutiendo todo ello en la calidad final de los pienso compuestos destinados al consumo animal [18].

Los hongos contaminantes, especialmente los mohos filamentosos deterioran los alimentos causando alteraciones en los parámetros organolépticos [30]. Su presencia representa una amenaza y un riesgo importante en la seguridad alimentaria. La capacidad de difusión y contaminación fúngica así como los efectos que aunque en mínimas dosis puedan causar las micotoxinas, los hace presentarse como un enemigo silencioso [38].

En cuanto a la frecuencia de las distintas especies fúngicas es importante hacer referencia que *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *A. terreus* fueron aislados en las muestras procedentes de las plantas procesadoras A y C, *A. penicillioides*, *Penicillium aurantiogriseum*, *P. citrinum* y *Alternaria alternata* se reportan en las muestras de harinas provenientes de la empresa B.

Aspergillus niger mostró la mayor frecuencia en todas las muestras, representada por el 46% del total de los aisla-

mientos, seguida de *A. terreus* (25%) y *A. flavus* (9%) solo para las harinas de pescados de las plantas A y C (TABLA III). *A. niger* mostró capacidad de crecer en alimentos de baja actividad de agua [40]. Las colonias desarrolladas mostraron un crecimiento óptimo a la temperatura de $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$, con micelio aéreo de color negro y de aspecto apimientado y en el reverso la coloración crema. Al microscopio se observaron los conidióforos largos y de paredes lisas, vesícula esférica dando origen a métulas y fiálides, conidias negras y rugosas que midieron entre 3,8 a 5,4 μm de diámetro (FIG. 1, A y B).

Las colonias de *Aspergillus terreus* y *A. flavus* desarrolladas en los medios Papa Dextrosa (PDA), MEA y agar Czapek produjeron una profusa producción de esporas, con formación de pliegues radiales a los 5 días de crecimiento a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$. *A. terreus* (FIG. 2 C y D) presentó una coloración inicialmente canela-beige, transformándose a marrón oscuro a medida que avanzó la maduración. *A. flavus* presentó al inicio de su crecimiento una coloración amarilla, tornándose después con la madurez al color verde con tonalidades amarilla. Microscópicamente se caracterizó por presentar un conidióforo hialino, vesícula globulosa aproximadamente de 20 μm de diámetro, métulas y fiálides (Biseriado), con las conidias de 3-5 μm de diámetro dispuestas alrededor de la superficie de la vesícula [40].

Aspergillus versicolor fue aislado en el 5% de las muestras de harina provenientes de la planta A. En el agar Papa Dextrosa las colonias se caracterizaron por presentar a los cuatro días de crecimiento una coloración gris-beige que al envejecer se tornó rosada en el anverso y blanca en el reverso. Al microscopio se observaron los detalles estructurales de un conidióforo hialino liso, cabeza conidial biseriada y radiada, vesícula pequeña de 9-16 μm diámetro y conidias con ornamentación equinulada.

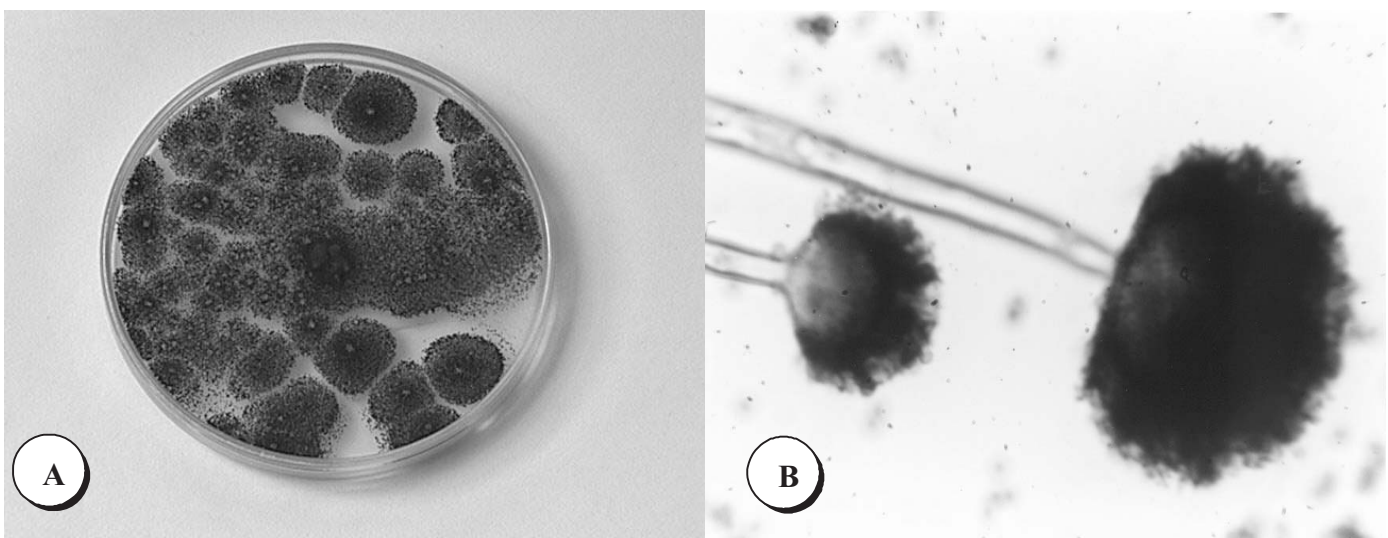


FIGURA 1. *Aspergillus niger*. A: COLONIAS DESPUÉS DE UNA SEMANA DE CRECIMIENTO EN AGAR CZAPEK, MICELIO AÉREO DE ASPECTO APIMIANTADO. B: CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS. SE DETALLA VESÍCULA ESFÉRICA DANDO ORIGEN A MÉTULAS Y FIÁLIDES. 1000X.

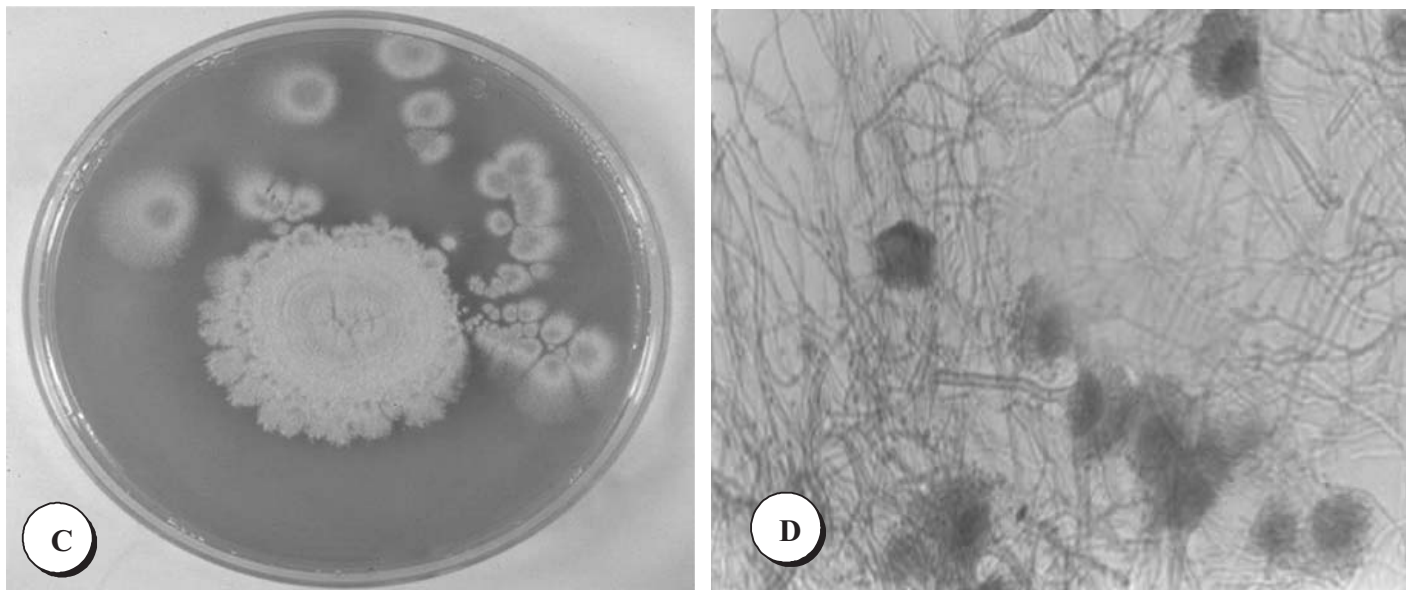


FIGURA 2. *Aspergillus terreus*. B: COLONIAS DESPUÉS DE UNA SEMANA DE CRECIMIENTO EN AGAR CZAPEK. C: CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS. SE DETALLA CABEZA CONIDIAL COMPACTA, COLUMNAR Y BISERIADO. CONIDIA GLOBOSA A ELIPSOIDAL. 450X.

Aspergillus penicillioides fue aislado en cuatro muestras de la Planta B, representando el 24% de los aislamientos en dicha planta, y *Alternaria alternata* solamente en dos (12%) de las 17 que resultaron positivas al crecimiento de hongos. Del género *Penicillium*, la especie con mayor frecuencia de aislamiento fue *P. aurantiogriseum* (17%), seguida de *P. citrinium* con un 12% (TABLA III, FIG. 3 E y F). Este tipo de microbiota es característica de cereales en almacenamiento [25]. Sin embargo, algunos autores [1, 7] reportan en piensos destinados para aves de corral, conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y cerdos (*Sus scrofa*) una mayor frecuencia de las especies, *P. aurantiogriseum* (45,2%) y *P. chrysogenum* (16,7%).

Es importante hacer mención que la mayoría de los hongos aislados en el estudio pertenecen al género *Aspergillus* y han sido relacionadas como mohos de almacenamiento, de crecimiento rápido [29, 40]. Su amplia distribución se atribuye a la elevada esporulación y facilidad de dispersión de las conidias [15, 40]. Se debe hacer referencia que, en menor frecuencia se reporta el aislamiento de especies pertenecientes al género *Penicillium*, las cuales presentaron un crecimiento moderado, coincidiendo con lo reportado por algunos autores [8, 33, 35] quienes los reportan como hongos de crecimiento lento, difíciles de aislar e identificar, tal es el caso de la especie terverticilada *P. aurantiogriseum* [24, 33].

Penicillium aurantiogriseum se caracterizó por presentar en el medio MEA a los 7 días/25 ± 0,1°C colonias de 20-24mm de diámetro, de color gris verdosa, conidias subglobosa de 3,0-3,5 mm de diámetro, respuesta positiva a la producción de indol a los 14 días y crecimiento moderado con formación de metabolitos ácido en los medios CREA y CSN, coincidiendo con las descripciones de Lund y Frisvad [24] y Samsom y col. [40], las cuales permitieron su diferenciación de las especies

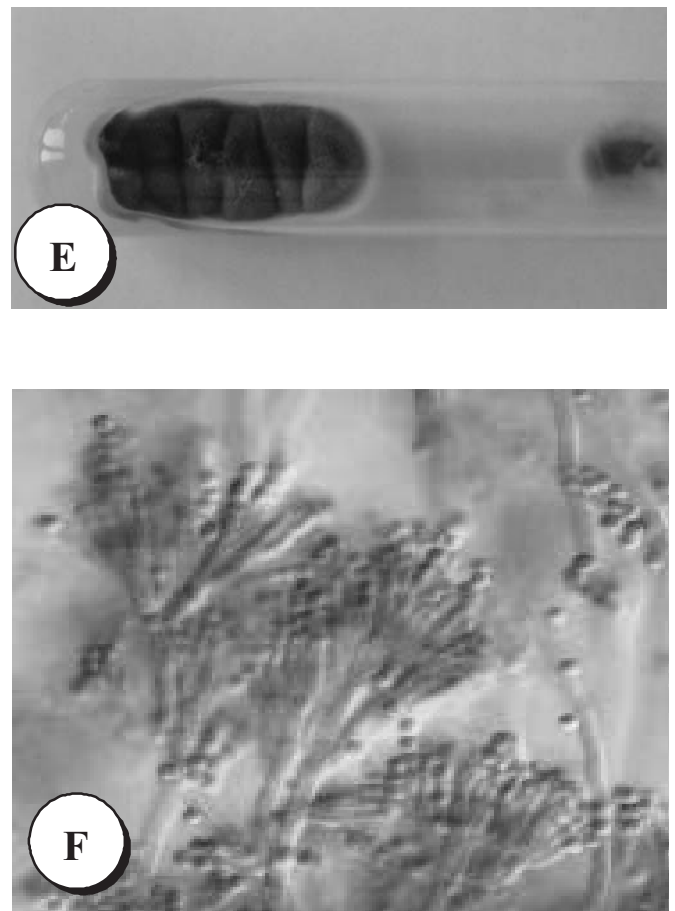


FIGURA 3. *Penicillium aurantiogriseum*. D: COLONIAS DESPUÉS DE UNA SEMANA DE CRECIMIENTO EN MEA. E: CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS. FIÁLIDES AGRUPADAS EN VERTICILLOS COMPACTOS, CONIDIOS ESFÉRICOS DE PAREDES LISAS. 950X.

del denominado complejo *P. aurantiogriseum*, término empleado en la actualidad para agrupar las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* que presentan entre sí mayores similitudes morfológicas, identificadas como: *P. aurantiovirens*, *P. polonicum*, *P. cyclopium*, *P. melanoconidium*, *P. freii*, *P. neoehinulatum* y *P. verrucosum*.

Un aspecto a considerar es la capacidad micotoxigénica de las distintas especies fúngicas aisladas en el estudio. Siendo un riesgo importante desde el punto de vista sanitario la contaminación de los piensos con hongos miceliares. La potencialidad demostrada en numerosas investigaciones [1, 9, 10, 14, 26] de un gran número de las cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* para producir metabolitos secundarios representa un elevado riesgo de micotoxicosis. Los problemas de micotoxicosis como consecuencia de su ingesta han sido ampliamente reseñados [6, 14, 19, 20, 31].

El riesgo de la ocurrencia natural de las micotoxinas en el alimento está relacionado a la presencia simultánea de dos o más metabolitos tóxicos de hongos biológicamente activos. Este hecho responde básicamente a la necesidad de conocer y entender el efecto individual de la misma y a la complejidad que implica el estudio de dos ó más micotoxinas donde sus acciones combinadas pueden interaccionar para producir efectos de aditividad, sinergismo ó antagonismo [22].

Es importante señalar que, la producción de micotoxinas se relaciona también con la utilización de materias primas de dudosa calidad y con la interacción de otros factores denominados abióticos, entre ellos: tipo de sustrato, a_w , temperatura de almacenamiento, pH, atmósfera. El sustrato ejerce un factor determinante en la formación de las micotoxinas y su producción va a depender del tipo de cepas que se desarrollen en él, ejerciendo éste a su vez un efecto mayor sobre la cantidad de toxina producida por el hongo que por la cantidad de micelio desarrollada en el medio [29, 40]. Durante el ciclo de vida de los hongos, las toxinas se forman relativamente temprano. La formación de esporas ocurre más tarde en el ciclo, cuando los hongos entran en su fase reproductiva. Por lo tanto, la producción en cantidad de esporas no tiene absolutamente relación a la presencia de toxinas [29].

Por otra parte, *A. flavus* ha sido reportado como una especie productora de aflatoxinas [3, 20, 40]. Los efectos agudos y crónicos de la exposición a las aflatoxinas han sido bien estudiados. Al respecto, soportes estadísticos de los estudios epidemiológicos realizados en poblaciones rurales durante los años 70 confirman la asociación del carcinoma hepatocelular con el consumo de alimentos contaminados [16]. Es importante destacar la capacidad productora de ocratoxina A (OA) por parte de *A. niger*, potente nefrotoxina de aves, peces, mamíferos y humanos [2, 31]. La ocratoxina A puede pasar a los alimentos a través de la materia prima, pero según las evaluaciones realizadas hasta ahora, sobre el riesgo de exposición indican que los alimentos de origen animal contribuyen en escasa medida a la exposición alimentaria humana [22].

Debe hacerse especial referencia al efecto sinérgico de la aflatoxina y ocratoxina A producidas por *A. flavus* y *A. niger*, ambas especies han sido reportadas en las muestras de harina de pescado. Investigaciones realizadas por Huff y Doerr [22] en pollos (*Gallus gallus*) de engorde afectados por consumo de piensos contaminados con ambas micotoxinas corroboraron la presencia de nefropatías más severas que aquellas ocasionadas por la presencia individual de ocratoxina ó de otros compuestos nefrotóxicos.

Otras especies toxigénicas aisladas en el estudio identificadas como *A. terreus* y *P. citrinum* son productoras de Citrinina (CIT), tóxico renal para animales monogástricos y de efectos parasimpático-miméticos en roedores. Su ingestión provoca diarrea y una pérdida gradual del peso corporal debido a la degeneración renal. La CIT ha sido aislada en cereales y en otros sustratos vegetales utilizados como materia prima para la elaboración de piensos [14].

Diversos trabajos [24, 36] documentan la especie *P. aurantiogriseum* como productora del ácido penicílico (AP), sustancia de actividad antibiótica, con efectos hepatotóxicos y carcinogénicos en animales domésticos alimentados con maíz. Este hongo es capaz de producir otros compuestos nefrotóxicos como la xantomegnina y la viornelleina.

En el estudio la mayoría de las especies aisladas han sido relacionadas con mohos de almacenamiento, sin embargo, es posible que en la contaminación intervengan también especies que habitan en el suelo, como es el caso de *Alternaria alternata*, moho dematiáceo aislado en el 12% de las muestras de harinas analizadas (TABLA III), este hongo es considerado como un patógeno principalmente de las plantas pero también se ubica dentro de la categoría de patógenos oportunista del hombre [23, 41].

En resumen, la elevada frecuencia de hongos potencialmente micotoxigénicos en su mayoría procedentes del ambiente permitió valorar la calidad e inocuidad de las harinas de pescado destinada para la elaboración de alimentos concentrados o piensos, representando éstas un riesgo para la salud animal y por ende la salud de los consumidores. Cabe destacar que la inocuidad de los piensos exige el establecimiento de eficaces controles que abarquen todas las fases de la producción, manipulación y almacenamiento.

CONCLUSIONES

El elevado contenido de humedad reportada en las muestras de harina de pescado se atribuye posiblemente a las condiciones inadecuadas de almacenamiento, las cuales acondicionaron el producto al crecimiento de hongos.

La mayoría de las especies aisladas en el estudio son relacionadas como mohos de almacenamiento pertenecientes al género *Aspergillus*.

La posible capacidad micotoxigénica de las distintas especies fúngicas aisladas representa un factor de riesgo potencial de afectación a la salud animal y del hombre.

El estudio corrobora la necesidad de establecer un programa sanitario más eficiente para controlar la calidad del producto, fundamentado en las buenas prácticas de manufactura y en la implementación de los programas HACCP y de control de riesgo asociado a la formación de micotoxinas.

AGRADECIMIENTO

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-MCT) por haber financiado esta investigación a través del Proyecto: NT-ARA- ID-SUC-05-00303.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. **J. Food Protect.** 57:256-258. 1994.
- [2] ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R.; CASTELLÁ, G.; ACENSI, F.; CABAÑES, J. Hongos productores de micotoxinas emergentes. **Rev. Iberoam. Micol.** 17:63-68. 2000.
- [3] ABRAMSON, D.; MILLS, J.T.; BOYCOTT, B.R. Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada. **Can. J. Comp. Med.** 47:23-26.1983.
- [4] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis. 15th Ed. Washington, D.C. 1205 pp. 1990.
- [5] BASTARDO, H.; SCORZA, C.; SOFIA, S. Histopatología hepática de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, alimentada con dietas diferentes. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 5: 267-270. 1997.
- [6] BOLET, A.M.; SOCARRAZ, S.M. Micotoxinas y cáncer. **Rev. Cub. Invest. Bioméd.** 24 (1): 54-59. 2005.
- [7] BRAGULAT, M.R.; ABARCA, M.L.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F.J. A mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. **J. Sci. Food Agr.** 67:215-220. 1995.
- [8] CHELKOWSKI, J. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: **Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.** Ed. Chelkowski, J. Elsevier, Amsterdam. 217-227 pp. 1991.
- [9] CURTUI, V.; USLEBER, E.; DIETRICH, R; LEPSCHY, J.; MÄRTLBAUER, E. A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. **Mycopathol.** 143: 97-103.1998.
- [10] COELHO, C.S.P.; BADIALE-FURLOG, E. Avaliacao da incidencia de Micotoxina em Arroz Parbolizado. En: **Segundo Simposio Internacional de la Sección de América Latina y el Caribe de la AOAC internacional.** Buenos Aires 22 al 25 Junio, Argentina.70 pp. 1999.
- [11] COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1482-79. **Alimentos para animales. Harina de pescado.** Ministerio de Fomento. Caracas. 8 pp. 1979.
- [12] COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1567-80. **Alimentos para animales. Método de muestreo.** Ministerio de Fomento. Caracas. 17 pp. 1980.
- [13] COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1337-78. **Métodos para recuento de mohos y levaduras.** Ministerio de Fomento. Caracas. 6 pp. 1990.
- [14] DE LANGE, C.; NYACHOTI, C.; VERSTEGEN, M. The significance of antinutritional factors in feedstuffs for monogastric animal. In: **Feed evaluation Principles and Practice.** Moughan, P.; Vestergen, M y Visser-Reyneveld, M. (Eds). Amstelveen, Holanda. Wageningen Pers: 169-188 pp. 2000.
- [15] FASSATIOVA, O. Mould filamentous fungi in "Technical microbiology". **Progress in industrial microbiology.** Elsevier 22. New York. 233 pp.1986.
- [16] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Alimentación y Nutrición. **Manual para el control de calidad de los alimentos.** Capacitación en análisis de Micotoxinas. 144 pp. 1991.
- [17] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Comité de pesca. **Informe de la octava reunión del subcomité sobre comercio pesquero.** Bremen, Alemania, 12-16 de febrero. 103 pp. 2002.
- [18] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Alimentación y Nutrición. **Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas.** Centro de capacitación y Referencia FAO/OIEA para el Control de los Alimentos y los Plaguicidas. Roma. 130 pp. 2003.
- [19] GAGGIOTTI, M.; ROMERO, L.; BASÍLICO, J.C. ¿Conoce las micotoxinas? **Infortambo.** 145: 60. 2001.
- [20] GIMENO, A.; MARTINS, M.L. **Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos.** Special Nutrients, Inc. USA (Ed). Talleres gráficos del SRL. Buenos Aires, Argentina. 1-160 pp. 2003.
- [21] GONZALEZ, D.; CORDOBA, J.; INDORF, F.; BUITRAGO, E. Estudios preliminares en la formulación de dietas para camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*) utilizando ensilado de pescado. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVII (2):166-172. 2007.

- [22] HUFF, W.E.; DOERR, J.A.; WABECK, C.J.; CHALOUKKA, G.W.; MAY, J.D.; MERKLEY, J.W. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. **Poult. Sci.** 63 (21): 53-2161. 1984.
- [23] KONEMAN, E.W.; ROBERTA, D.G. Micología. En: **Diagnóstico Microbiológico**. 3era Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 220 pp. 1992.
- [24] LUND, F.; FRISVAD, J.C. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. **Mycol. Res.** 98:481-492. 1994.
- [25] LUND, F. Direct identification of the common cheese contaminant *Penicillium commune* in factory air samples as an aid to factory hygiene. **Lett. Appl. Microbiol.** 22:339-341. 1996.
- [26] MARTÍNEZ, A. Contribución al estudio de la flora fúngica y su toxigenicidad e incidencia de aflatoxinas en cereales y oleaginosa cultivada en Venezuela. Universidad Central de Venezuela, Trabajo de Ascenso. 290 pp.1991.
- [27] MAZZANI, C.; BORGES, O.; LUZON, O.; BARRIENTOS, V.; QUIJADA, P. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, Aflatoxinas y funomisinas en ensayos híbridos de maíz en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. **Fitopatol. Venez.** 12 (1): 9-13.1999.
- [28] MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRIA. Servicio Autónomo de los Recursos Pesqueros y Acuícolas (SAR-PA). **La actividad pesquera- acuícola en Venezuela**. S.A.R.P.A. 105 pp.1996.
- [29] NORTHOLT, M.D.; FRISVAD, J.C.; SAMSOM, R.A. Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. In: **Introduction to food-borne fungi**. 5th Ed. Samsom R.A., Hoeskstra E.S, Frisvad J.C, Filtenborg, O. C.B.S. (Eds.) Baarn, Holanda. 243-250 pp.1996.
- [30] ORELLANA, A.; MUCHAYPIÑA, J. J.; GUILLERMO, J.J. Prevalencia de hongos en harina de *Lepidium peruvianum* "Maca" en mercados de Andahuaylas, Ica y Cañete-Perú. **Rev. Peru Biol.** 12 (3): 445-448. 2005.
- [31] PETKOVA, B.T.; CASTEGNARO, M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria. In: **Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours**. Castegnaro. M., Plestina. R., Dirheimer. G., Cheroizemsky, I.N. y Bartsch H. (Eds.) IARC Scientific Publications No. 115. 135-137 pp. 1991.
- [32] PITT, J.I. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. **Mycol.** 65: 1135-1157. 1973.
- [33] PITT J.I.; SAMSON, R.A. Systematics of *Penicillium* and *Aspergillus*- past, present and future. In: **Moder concept in Penicillium and Aspergillus classification**. Samson R. A.; Pitt, J. I. Plenum Press (Eds.) Londres. 3-13 pp. 1990.
- [34] PITT J.I.; HOCKING, A.D.; SAMSON, R.A; KING, A.D. Recommended methods for mycological examination of foods. In: **Modern methods in food mycology**. Samson R. A.; Pitt, J. I.; King, A. D. (Eds.) Elseiver, Amsterdam: 365-368 pp.1992.
- [35] PITT J.I.; HOCKING, A.D. *Penicillium* and related genera. In: **Fungi and food spoilage**. 2th Ed. Blakie Academic and Professional, London. 170-263 pp. 1997.
- [36] RAMIREZ, C. Revision of recently describe *Penicillium* taxa. In: **Advances in Penicillium and Aspergillus systematics**. Samson R.A.; Pitt, J.I. Plenum Press (Eds.) Londres. 135-142 pp. 1985.
- [37] RANJAN, K.S.; SINHA, A. K.Occurence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. **J. Scie. Food. Agric.** 56:39-47. 1991.
- [38] REQUENA, F.; SAUME, E.; LEÓN, A. Micotoxinas: Riesgos y prevención. **Zoot. Trop.** 23 (4): 393-410. 2005.
- [39] RIDDEL R.W. Permanents stained micological preparations obtained by slide cultura. **Micol.** 43: 265-270. 1950.
- [40] SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4th Ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, DELFT. The Netherlands. 322 pp. 1995.
- [41] VIJAY, HM.; KURUP, V.P. Fungal allergens. **J. Clin. Allergy Immunol.** 18: 223-249. 2004.
- [42] ZALDIVAR, F. J. Las harinas y aceites de pescado en la alimentación acuícola. En: Cruz- Suárez, I.E.; Ricque-Maried, D.; Tapia- Salazar, M.; Gaxiola-Cortez, M.G.; Simoes, N. (Eds). **Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola**. Cancún, 3-6 de Septiembre. Quinta Roo. México. 516-526 pp. 2002.