

Influencia de Fumonisina B1 sobre la flora intestinal de ratas Wistar

Di Conza, José¹; Iacona, Valeria¹; Basílico, María Zapata²; Basílico, Juan Carlos².

¹ Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. U.N.L.

² Departamento de Biotecnología. Cátedra de Microbiología. Facultad de Ingeniería Química. U.N.L.

RESUMEN: Se estudió la influencia de una dosis subcrónica de Fumonisina B1 (300 ppm) sobre la flora intestinal de ratas hembras Wistar. Para ello, se determinó el incremento del peso corporal y la ingesta calórica de las ratas. En materia fecal se midió el pH y se efectuó el recuento de los siguientes grupos microbianos: Bacterias aerobias totales, Bacterias anaerobias totales, Enterobacterias, Enterococos, Bifidobacterias, Lactobacilos, Bacterias sulfito reductores (totales y esporuladas) y Mohos y Levaduras. Con la dosis ensayada se observó un menor incremento del peso corporal y una menor ingesta calórica respecto del lote de ratas control. No hubo cambios en el aspecto macroscópico de las heces y la variación del pH no fue significativa. De los microorganismos estudiados, no se observaron variaciones relevantes en los recuentos, excepto la disminución de Mohos y Levaduras. Se debe destacar que la flora probiótica (Bifidobacterias y Lactobacilos) no varió cuantitativamente, si bien el recuento de Bifidobacterias mostró una tendencia a disminuir.

SUMMARY: The influence of a subchronic dose of Fumonisin B1 (300 ppm) on the intestinal flora of female Wistar rats was studied by determining their body weight increase and caloric intake. Stool samples were used to carry out pH measurements and counts of the following microbial groups: Total Aerobic Bacteria, Total Anaerobic Bacteria, Enterobacteria, Enterococci, Bifidobacteria, Lactobacilli, Sulphite-reducing Bacteria (total and sporulated), Molds and Yeasts. The assayed dose produced a body weight increase and a caloric intake lower than those of the control group. No change was observed as regards the macroscopical aspect of stools and pH variations were not significant. No relevant variations were detected in counts of the microorganisms studied, except for Molds and Yeasts. It has to be noted that the probiotic flora (Bifidobacteria and Lactobacilli) did not vary quantitatively, although Bifidobacterium counts tend to diminish.

Introducción

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas producidas por el Género *Fusarium*, fundamentalmente por el *F. moniliforme*. La presencia de esta micotoxina en maíz es una contaminación que se ha encontrado en Argentina (1, 2).

La Fumonisina B1 (FB1) ejerce su acción tóxica interfiriendo en la síntesis de los esfingolípidos por inhibición competitiva sobre la enzima ceramida sintetasa, lo cual trae como consecuencia modificaciones a nivel de membrana (3).

El efecto toxicológico de la FB1 varía según la especie animal que la consume (4). En ratas ejerce fundamentalmente una acción nefrotóxica y hepatotóxica (5, 6).

Si bien la vía de intoxicación con esta micotoxina es por ingestión, al presente no se ha descrito la acción de la misma sobre el aparato digestivo.

Dada la importancia que se atribuye al mantenimiento del equilibrio de la flora intestinal para preservar la fisiología digestiva, el objetivo del pre-

sente trabajo fue estudiar la posible influencia de FB1 sobre esta microflora y en especial sobre los microorganismos probióticos.

Materiales y métodos

Animales y Dietas

Se utilizaron 12 ratas, cepa Wistar, de peso inicial $191,2 \pm 0,9$ g, mantenidas en un bioterio a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas y libre acceso a una dieta balanceada (Roedores 3, Nutrimiento S. A., Argentina) durante una semana para su aclimatación. La dieta presenta una composición porcentual de: Hidratos de carbono 61,5; Lípidos 3,5; Proteínas 20; Fibras 10; Vitaminas 1 y Minerales 4.

Los animales se dividieron al azar en 2 grupos iguales y recibieron la siguiente alimentación: *Lote 1: la dieta balanceada adicionada con 10% de maíz colorado molido (libre de Tricotecenos, Ocratoxinas, Aflatoxinas, Zearalenona y Fumonisinias), *Lote 2: idem al anterior donde el 10% de maíz colorado molido (con las mismas características) está mezclado con maíz contaminado con FB1 en proporción

adecuada para obtener una concentración final de 300 mg de FB1 / Kg de dieta.

Otención del maíz contaminado

La cepa de *Fusarium moniliforme* productora únicamente de FB1, se cultivó a 25°C durante 2 semanas en Agar Papa Dextrosa. Se sembraron 2-3 porciones de 1 cm de lado de este cultivo a erlenmeyers de 1 l que contenían cada uno aproximadamente 400 g de maíz colorado estéril y se incubó 4 semanas a 25°C. Posteriormente el maíz contaminado se secó a 60°C durante 48 horas.

La producción de FB1 se cuantificó por un Test ELISA (Kit Veratox para Fumonisinas), lográndose en el maíz una concentración original de 6000 ppm. En las condiciones de incubación utilizadas, esta cepa no produce otros metabolitos tóxicos conocidos. Esta cepa de *Fusarium moniliforme* fue gentilmente cedida por el Dr. A. Logiecco (ITEM 1015, Istituto Tossine e Micotossine, Bari, Italia).

Diseño experimental

Durante el transcurso del experimento (8 días) se controló diariamente el aspecto de los animales,

el peso corporal y la ingesta calórica de los mismos. Al finalizar la experiencia se anestesiaron los animales con éter y se recolectó en condiciones asépticas, el contenido fecal del recto para el análisis bacteriológico y del colon descendente para la medición del pH.

Medición del pH

El contenido fecal se diluyó 1:5 con agua destilada y se midió inmediatamente con un pHmetro previamente calibrado (Orion Research Digital analyzer/501).

Análisis microbiológico

La muestra rectal se transportó y diluyó 10 veces en buffer fosfato 0,1M, pH = 7,2 que contenía 0,05% de clorhidrato de cisteína y 0,1% de agar (7, 8). La misma se analizó dentro de los 30 minutos. Las sucesivas diluciones decimales para el recuento bacteriológico se realizaron en agua de peptona 0,1% con clorhidrato de cisteína 0,05%.

Los diferentes grupos microbianos contados, las condiciones de incubación y los medios de cultivos utilizados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivos y condiciones de crecimiento utilizados para contar los diferentes grupos microbianos.

Microorganismos estudiados	Medios de cultivo	Atmósfera	Tiempo y temperatura de incubación
Bacterias aerobias totales	AST	Aire	3 días - 37°C
Bacterias anaerobias totales	AST/ MRS	Anaerobiosis ^[1]	3 días - 37°C
Bifidobacterias	MRS-LP	Anaerobiosis ^[1]	3 días - 37°C
Lactobacilos	MRS-B	Aire	3 días - 37°C
Enterococos	KF	Aire	3 días - 37°C
Enterobacterias	VRBD	Aire	1 día - 37°C
Mohos y Levaduras	DRBC	Aire	3 días - 30°C
Bacterias sulfito reductores totales	ISA	Aire ^[3]	1 día - 37°C
Bacterias sulfito reductores esporuladas ^[2]	ISA	Aire ^[3]	1 día - 37°C

AST: agar soya tripticasa, MRS: agar según Man, Rogosa, Sharpe (10), MRS-LP: agar MRS + cloruro de litio + propionato de sodio (11), MRS-B: agar MRS + bilis (11), KF: agar KF para Enterococos (12), VRBD: agar violeta cristal - rojo neutro - bilis - glucosa (13), DRBC: agar dicloran - rosa de bengala - cloranfenicol (14), ISA: agar sulfito hierro.

[1] Anaerobiosis: En jarra Oxoid con generadores de anaerobiosis bioMérieux.

[2] Previo choque térmico a 80°C durante 10 minutos.

[3] Con tapón de agar.

La mayoría de los recuentos se realizaron en placa, excepto los de Bacterias anaerobias sulfito reductores totales y esporuladas que se realizaron en tubos.

Las siembras para los recuentos de Mohos y Levaduras se efectuaron en superficie, las demás se realizaron en profundidad. Para las Enterobacterias se empleó una doble capa de medio de cultivo.

Estudios estadísticos

Los datos de los distintos parámetros estudiados fueron procesados estadísticamente mediante el software SPSS VER: 6.1.3/95. Para cada lote de ratas se trabajó con un intervalo de confianza del 95%. Para analizar si existe diferencia significativa entre las medias poblacionales (para los distintos parámetros estudiados) se realizó un test de hipótesis paramétrico (test t para la igualdad de medias donde $H_0: \mu_{\text{control}} = \mu_{\text{tratado}}$ Vs $H_1: \mu_{\text{control}} \neq \mu_{\text{tratado}}$). Además, se realizó un test no paramétrico (test U Mann Whitney para muestras independientes), pues el tamaño de los lotes ($n = 6$) es

pequeño. Se trabajó en todos los casos con los valores exactos de p y al coincidir las conclusiones entre ambos test, se informaron las conclusiones paramétricas. Los resultados obtenidos fueron expresados como media aritmética \pm error estándar ($\bar{X} \pm \text{SEM}$) (9).

Resultados y Discusión

Todos los animales concluyeron la experiencia y no se observó comportamiento anormal en ninguno de los lotes. El consumo promedio de FB1 por las ratas tratadas fue de 24 mg. Kg rata⁻¹. día⁻¹.

En la Tabla 2 se observa que las ratas que ingirieron FB1 muestran una significativa reducción de la ingesta calórica lo que se refleja en el menor incremento del peso corporal de los animales. Otros autores no detectaron disminución de estos parámetros para ingestas menores a 15 mg FB1. Kg Rata⁻¹ (5,6). Sin embargo, nuestros resultados son coincidentes para el consumo de 35 mg FB1. Kg Rata⁻¹ encontrados por otros autores (6).

Tabla 2. Efecto de la ingesta de FB1 sobre el peso corporal y la ingesta calórica en ratas, expresado como $\bar{X} \pm \text{SEM}$, para lotes de seis animales cada uno.

Parámetros	Lotes		p-value ^(a)
	1 (Control)	2 (FB1 300 ppm)	
Peso inicial (g)	190,2 \pm 1,3	192,3 \pm 1,4	0,5330
Peso final (g)	204,7 \pm 1,7	197,3 \pm 1,6	0,0413*
Incremento del peso (g / día.rata)	1,95 \pm 0,19	0,62 \pm 0,14	0,0198*
Ingesta calórica (Kcal / día.rata)	83,8 \pm 10,3	58,6 \pm 1,4	0,0005*

* Significativo al 5% de confianza.

^(a) Valor exacto del p asociado al estadístico de prueba de un test t para diferencia de medias de lotes independientes.

En la Tabla 3 se observan los parámetros estudiados en materia fecal. De todos ellos sólo se destaca una disminución significativa en el recuento de Mohos y Levaduras. En ninguno de los casos hubo modificaciones importantes en el aspecto macroscópico de las heces. Dado que no se hallaron datos de otros investigadores que relacionen el

efecto de las Fumonisinás sobre la flora intestinal de mamíferos, sólo se la puede comparar con el estudio realizado con otras micotoxinas. Así el efecto de los tricotecenos (Fusarenona-x) a dosis menores y tiempo menos prolongado de exposición produce alteración de la flora intestinal (7).

Tabla 3. Efecto de la ingesta de FB1 sobre el pH y la flora microbiana de materia fecal en ratas, expresado como $\bar{X} \pm \text{SEM}$, para lotes de seis animales cada uno.

Parámetros	Lotes		p-value ^(a)
	1 (Control)	2 (FB1 300 ppm)	
pH	5,28 ± 0,19	5,77 ± 0,14	0,075
Microorganismo (log₁₀ UFC/gramo heces)			
Bact. Aerobias totales	8,09 ± 0,14	7,67 ± 0,32	0,287
Bact. Anaerobias totales ^(b)	8,47 ± 0,09	7,85 ± 0,33	0,128
Bact. Anaerobias totales ^(c)	8,44 ± 0,13	7,88 ± 0,31	0,155
Bifidobacterias	7,95 ± 0,19	7,25 ± 0,25	0,059
Lactobacilos	8,33 ± 0,08	7,73 ± 0,36	0,179
Enterococos	7,86 ± 0,16	7,54 ± 0,33	0,433
Enterobacterias	3,97 ± 0,15	3,75 ± 0,39	0,381
Mohos y Levaduras	7,16 ± 0,14	6,06 ± 0,23	0,0035*
Bact. Sulfito red. Totales	4,31 ± 0,39	5,34 ± 0,49	0,148
Bact. Sulfito red. Esporul.	2,75 ± 0,14	2,59 ± 0,51	0,789

* Significativo al 5% de confianza.

^(a) Valor exacto del p asociado al estadístico de prueba de un test t para diferencia de medias de lotes independientes.

^(b) Cultivado en AST.

^(c) Cultivado en MRS.

Conclusiones

En este trabajo se observa que la ingesta de FB1 en concentraciones de 300 ppm durante 8 días, produce un significativo rechazo del alimento. Este efecto y la reducción en la ganancia de peso, son los principales síntomas asociados con la ingesta del alimento contaminado con FB1 en las condiciones estudiadas.

Si bien no son relevantes las modificaciones de los parámetros estudiados en materia fecal, la tendencia del aumento del pH y de disminución del recuento de Bifidobacterias (con p-value próximos a 0,05) nos tendría que alertar sobre la acción que ejerce esta micotoxina en la disminución de la flora probiótica y su consecuente acción protectora. En función de estos resultados es importante continuar el trabajo ensayando mayores concentraciones de FB1 o tiempos más prolongados.

Agradecimientos

A Productos Químicos MAGIAR S. A. quien cedió gentilmente el kit ELISA para el dosaje de Fumonisin. A la Lic. VAIRA, Stella Maris (Departamento de Matemática. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. U.N.L.) por su colaboración en el estudio estadístico.

Bibliografía

- 1- Marasas, W. F. O. 1995. Fumonisin: Their implications for human and animal health. *Natural Toxins*, 3, 193-198.
- 2- Peralta Sanhueza, C. E. 1997. "Estrategias de control de la contaminación del maíz por micotoxinas de *Fusarium*. Situación actual en Argentina". – Tesis Doctoral de la UBA. – Facultad de Cs. Exactas y Naturales.
- 3- Merrill, A. H. Jr; Wang, E.; Gilchrist D. G.; Riley R. T. 1993. Fumonisin and other inhibitors of *De Novo* sphingolipid biosynthesis. In: "Advances in lipid research: Sphingolipids and their

metabolite". Ed: Bell, R. M.; Hannun, Y. A.; Merrill A. H. Jr. Academic Press. (San Diego, C. A. USA). 215-234.

4- Norred, W. P.; Voss, K. A.; Riley R. T.; Plattner, R. D. 1996. Fumonisin toxicity and metabolism studies at the USDA. Ed: Jackson, L. S., De Vries, J. W. and Bullerman, L. B. "Fumonisin in Food". Plenum Press. (N.Y., USA). 225-236.

5- Voss, K. A., Chamberlain, W. J., Bacon, C. W. and Norred, W. P. 1993. A preliminary investigation on renal and hepatic toxicity in rats fed purified Fumonisin B1. *Natural Toxins*, **1**, 222-228.

6- Bondy, G.; Barker, M.; Mueller, R.; Fernie, S.; Miller, J. D.; Armstrong, C.; Hierlihy, S. L.; Rowsell, P. and Suzuki, C. 1996. Fumonisin B1 toxicity in male Sprague-Dawley rats. Ed: Jackson, L. S., De Vries, J. W. and Bullerman, L. B. "Fumonisin in Food". Plenum Press. (N.Y., USA). 251-264.

7- Morishita, Y.; Nagasawa, K.; Nakano, N. and Shiromizu, K. 1989. Bacterial overgrowth in the jejunum of ICR mice and Wistar rats orally administered with a single lethal dose of fusarenon-X, a trichothecene mycotoxin. - *Journal of Bacteriology*, **66**, 263-270.

8- Morishita, Y. and Konishi, Y. 1994. Effects of high dietary cellulose on the large intestinal microflora and short-chain fatty acids in rats. - *Letters in Applied Microbiology*, **19**, 433-435.

9- Canavos, G. C. 1994. "Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y métodos". 1º edición en español. Mc Graw-Hill, (México). 303-350.

10- Man, J. D.; Rogosa, M.A.; Sharpe, M.E. 1960. A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. - *J. Appl. Bact.*, **23**, 130-135.

11- Vinderola, C. G.; Bailo, N. B. y Reinheimer J. A. 1997. "Propuesta Metodológica para el Control de Bacterias Probióticas (*Bifidobacterium spp.* y *Lactobacillus acidophilus*) en Productos Lácteos Fermentados tipo Yogur". II Encuentro Bromatológico Latinoamericano. Córdoba, 47.

12- Kenner, B. A.; Clark, H. F. and Kabler, P. W. 1961. *Faecal streptococci* I. Cultivation and enumeration of *Streptococci* in surface waters. - *Appl. Microbiol.*, **9**, 15-20.

13- Mossel, D. A. A. and Cornelissen, A. M. R. 1963. The examination of food for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adopted for the detection of *Salmonellae*. - *J. Appl. Bact.*, **26**, 444-452.

14- Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 1997. "Fungi and Food Spoilage". 2º edición. Blackie Academic and Professional. (Gran Bretaña). 510-511.