

Estudio de la actividad hemolítica "in vitro" de extractos de hongos productores de citrinina

González, Ana María*; Lurá, María Cristina*; Latorre, María Gabriela*; Rico, Marina*; Carrera, Elena Fernández de**; Lound, Fabián **

* Cátedra de Microbiología General

** Dpto. de Matemática.

F. de Bqca. y Cs. Biológicas. U.N.L. Paraje "El Pozo". CC 530. (3000) Santa Fe. Argentina

Domicilio postal: M.C.Lurá.- Domingo Silva 1980.- (3000) Santa Fe. Tel.: (042) 537227 - e-mail: mclura@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Numerosos autores han descrito las propiedades hemolíticas de toxinas bacterianas, siendo escasa la bibliografía respecto de esta propiedad por parte de las toxinas fúngicas.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad hemolítica de extractos de *Penicillium* y *Aspergillus* aislados a partir de alimentos y buenos productores de citrinina.

Los hongos fueron cultivados sobre medios ecológicos y los extractos se obtuvieron con una solución de acetona - agua (80:20). Se aplicó el test de la hemólisis a cada uno de los extractos obtenidos y a la toxina pura. La producción de citrinina se determinó por TLC (thin-layer chromatography).

El 84% de los extractos produjo efecto hemolítico. A pesar de que algunas cepas resultaron hemolíticas y produjeron citrinina simultáneamente, no pudo asociarse la hemólisis con esta micotoxina.

Se concluye que la hemólisis detectada en los extractos fúngicos estudiados podría deberse a la presencia de otro/s metabolito/s o bien a la acción sinérgica de alguno/s de ellos con la citrinina.

SUMMARY: The aim of this work was to study the haemolytic ability of citrinin-producing *Penicillium* and *Aspergillus* strains isolated from food. Fungi were cultured on ecological media and extracts were obtained using an acetone/water (80:20) mixture. The haemolysis test was applied to both each of the extracts obtained and the pure toxin. Citrinin production was assessed by means of TLC (thin-layer chromatography).

A high percentage (84 %) of the extracts produced a haemolytic effect. Even though some strains resulted to be haemolytic -simultaneously producing citrinin- no relationship could be established between haemolysis and the mycotoxin.

We conclude that the haemolysis produced by the extracts could be due to either other metabolites or the synergistic action of one (or some) of them with citrinin.

Introducción

Desde hace muchos años, en nuestro laboratorio se investigan hongos contaminantes de alimentos. Entre los estudios que se realizan se analiza el comportamiento de sus metabolitos frente a glóbulos rojos humanos y se determina si son cepas productoras de toxinas (1 - 3).

Numerosos autores han demostrado la existencia de diferentes tipos de toxinas bacterianas con propiedades hemolíticas y han determinado su relación con enfermedades toxi-infecciosas (4 - 8).

Si bien se ha descrito actividad hemolítica de diferentes soluciones de antibióticos de origen fúngico (9), son escasos los datos que aporta la bibliografía en relación a los efectos hemolíticos de otros metabolitos fúngicos y, particularmente, de las micotoxinas.

Por otra parte, *Aspergillus* y *Penicillium*, son dos de los géneros que habitualmente contaminan los alimentos y, por consiguiente, son frecuentemente aislados a partir de los mismos. Algunas de sus especies, han sido descritas como productoras de una micotoxina denominada citrinina. Esta toxina, de color amarillo, reportada como productora de necrosis tubular del riñón y nefropatía porcina (10), es una de las más importantes y frecuentemente detectada.

El objetivo del presente trabajo fue determinar, *in vitro*, la actividad hemolítica, de extractos de *Aspergillus* y *Penicillium* contaminantes de alimentos y buenos productores de citrinina.

Materiales y Métodos

Los hongos fueron identificados según lo propuesto por Booth (11), Ellis (12), Pitt (13,14) y Raper and Fenell (15).

Se aislaron 19 cepas (n= 19) de *Penicillium* y

Aspergillus, posibles productoras de citrinina (16), a partir de maíz, trigo y sus subproductos. Los extractos fueron obtenidos con una solución de acetona-agua (80:20 v/v), a partir de los hongos cultivados sobre medios ecológicos, según la metodología descrita en trabajos anteriores (1-3).

Se aplicó la técnica de Scott (17). Los cromatogramas (TLC) se realizaron utilizando placas de silicagel comerciales (Kieselgel 60). La siembra de los extractos y el testigo de citrinina (marca SIGMA, lote 76H404) se efectuó en banda, utilizando capilares de vidrio. Se ensayaron los dos sistemas de solventes propuestos por la técnica: TEF (tolueno-etilacetato-90% ácido fórmico; 6:3:1) y BMA (benzeno, metanol, ácido acético; 24:2:1). La observación de los cromatogramas se realizó a la luz visible y a la luz UV antes y después del spray con el reactivo revelador (0,5 ml de p-anisaldehído en 85 ml de metanol al que se le agregó previamente 10 ml de ácido acético glacial y 5 ml de ácido sulfúrico); el calentamiento de la placa se efectuó a 130°C durante 10 minutos.

En aquellos extractos que presentaron bandas con Rf y color compatible con citrinina, en coincidencia con el testigo, se confirmó su presencia tratando a la placa cromatográfica con vapores de amoníaco (18).

Se aplicó el test de la hemólisis, a los extractos de los hongos estudiados (3).

Se utilizaron policubetas descartables con pocillos de 300 µl de capacidad.

Para cada una de las muestras a estudiar, se realizaron diluciones sucesivas al medio. Para ello, se colocaron en cada pocillo 50 µl de solución fisiológica. Al primero de cada fila se le adicionaron 50 µl de la solución en acetona-agua del extracto y se efectuaron diluciones hasta el valor 1/256. Todos los pocillos recibieron 5 µl de una suspensión (al 10% en solución fisiológica) de hematíes humanos lavados.

Idéntica metodología se llevó a cabo con una solución de 20 µg/ µl de citrinina (marca SIGMA, lote 76H404).

Se trabajó con dos blancos: un extracto del medio de cultivo sin sembrar (en la solución de acetona-agua) y la solución de acetona-agua.

Cada una de las muestras, la toxina pura y los blancos, se procesaron por duplicado.

Luego de 5 hs. de incubación a 35 ± 2°C, se determinó la máxima dilución que presentaba actividad hemolítica.

Con el objeto de eliminar factores inespecíficos que pudieran interferir, se consideraron como resultados significativos las hemólisis obtenidas en las diluciones superiores al medio.

La medición de los pH de todas las soluciones ensayadas se llevó a cabo con un peachímetro, marca Checker, cuyo rango de medición es 0,00 - 14,00 con una resolución de 0,01 pH y una precisión de ± 0,2 pH, que admite trabajar dentro de un rango de temperatura comprendido entre 0-50°C y que, debido a sus pequeñas dimensiones (66 x 50 x 25 mm), permite la medición del pH en volúmenes de 1 ml.

Resultados y discusión

Entre los 19 hongos aislados se identificaron: *P. citrinum* (3 cepas), *P. notatum* (11 cepas), *P. viridicatum* (1 cepa), *P. steckii* (1 cepa) y *A. terreus* (3 cepas).

Respecto a *P. citrinum* y *P. steckii*, algunos autores los consideran sinónimos o no citrinina (14, 19). En este trabajo fueron considerados como especies diferentes, ambas posibles productoras de dicha micotoxina (16).

Los resultados de la actividad hemolítica y de la producción de citrinina, de los hongos estudiados, se observan en la tabla 1.

Tabla 1. Producción de citrinina y actividad hemolítica "in vitro" de los extractos fúngicos

| Hemólisis \ Citrinina | SI | NO | TOTAL |
|-----------------------|----|----|-------|
| | SI | 10 | 6 |
| NO | 3 | 0 | 3 |
| TOTAL | 13 | 6 | 19 |

El 84% de los hongos, resultó hemolítico y el 68,4% productor de citrinina. Entre las cepas hemolíticas, el 62,5% presentó niveles detectables de citrinina por TLC.

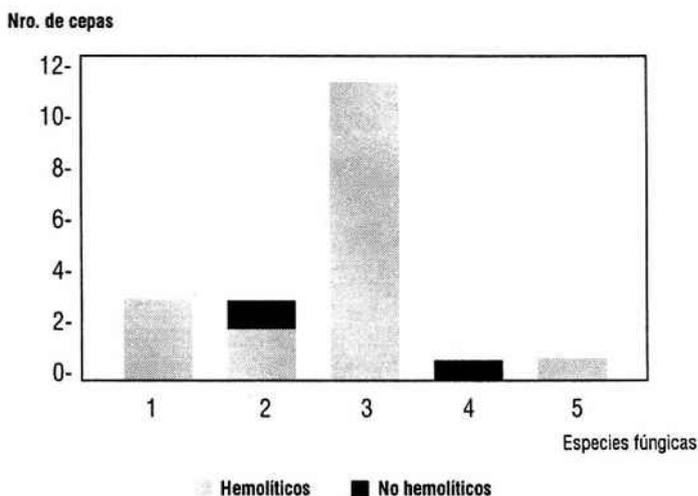
Aplicado el test exacto de Fisher (20,21) a los valores de la tabla 1 con una significancia del 5%, se obtuvo un $p=0,295$. Este valor, permite afirmar

que la presencia de citrinina es independiente de la hemólisis, con el nivel de significancia determinado.

El ensayo realizado con la solución de $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ de citrinina no produjo hemólisis, lo que corrobora la hipótesis de la independencia de las variables.

En el gráfico 1 puede observarse la actividad hemolítica para cada especie.

Gráfico 1. Especies fúngicas y su actividad hemolítica



Referencias: Especies fúngicas:

1.- *A. terreus*; 2.- *P. citrinum*, 3.- *P. notatum*, 4.- *P. steckii*; 5.- *P. viridicatum*

Entre las cepas productoras de hemólisis, no evidenciaron niveles detectables de citrinina por TLC dos *P. notatum*, un *P. viridicatum*, dos *A. terreus* y un *P. citrinum*.

P. notatum fue la especie más frecuentemente aislada; el 73 % de sus extractos fueron hemolíticos y se les detectó la toxina. Sólo una cepa produjo citrinina y no fue hemolítica. Las dos cepas restantes no produjeron citrinina pero sus extractos hemolizaron los glóbulos rojos.

P. steckii resultó productor de citrinina y no de hemólisis. Por el contrario, a *P. viridicatum* no se le detectó citrinina y sí efecto hemolítico.

En las condiciones de nuestro estudio, sólo un *A. terreus* y dos *P. citrinum* resultaron productores de citrinina.

Tal como se señala en la introducción, desde hace muchos años nuestro equipo de trabajo se ha abocado a la búsqueda de métodos *in vitro*, rápidos,

para detectar efectos tóxicos producidos por toxinas de los hongos contaminantes de alimentos. Una de las pruebas que frecuentemente resultó positiva en nuestros ensayos y sobre la que existen escasas referencias bibliográficas, es la de la hemólisis. Por otra parte, la citrinina es una de la micotoxinas más frecuentemente detectada, entre las producidas por algunas cepas de hongos en nuestras condiciones de trabajo.

Nuestro interés fue corroborar si existía alguna correlación entre la producción de esta toxina y esos efectos tan frecuentemente encontrados.

Según Remington (9), el fenómeno de la hemólisis no se produciría por un único mecanismo de acción, pudiendo estar involucrados factores tales como el pH que, en nuestro caso, quedaría descartado ya que el correspondiente a las soluciones estudiadas estuvo comprendido entre 6,04 y 7,5.

Conclusiones

Considerando los resultados obtenidos, puede concluirse que la lisis de los glóbulos rojos humanos es independiente de la presencia de citrinitina.

Debido a que el 77% de las cepas productoras de esta micotoxina manifestaron propiedades hemolíticas, surge como hipótesis la posibilidad de que exista algún otro metabolito como causa de hemólisis o que actúe sinérgicamente con la toxina detectada.

Referencias Bibliográficas

- 1- Lurá, M.C.; González, A.M.; Latorre, M.G.; Nepote, A.; Rico, M.; Carrera, E.- 1997.- "Efectos tóxicos de metabolitos fúngicos". Revista de la F. de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la U.N.L. (FABICYB)
- 2- Basílico, J.C.; Lurá, M.C.E.; Parada, J.L.- 1987.- "Actividad mutagénica de hongos aislados de sorgo y maíz". Boletín Micológico. Chile. 3 :111-115
- 3- González, A.M.; Basílico, J.C.- 1983. "Capacidad hemolítica de extractos fúngicos y algunas micotoxinas". Reunión de Comunicaciones sobre investigación en Microbiología de Alimentos. Org. por SECYT. (Santa Fe)
- 4- Huang, G.Q.; Villa, A.; Cheley, S; Shustak, C; Bayley, - H; Gouaux, J. E. "Crystallization of the [[alpha]]-hemolysin monomer". Department of Bioche.& Mol.Biol. University of Chicago (Chicago IL 60637).
- 5- Gouaux, J.E; Braha, O; Hobaugh, M.R; Song, L; Cheley, S; Shustak, C; and Bayley, H. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 91: 12828-12831
- 6- Mandell, G.L.; Douglas, R.G; Bennett, J.E.- 1991. "Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica". Ed. Médica Panamericana. 3º edic. (Buenos Aires)
- 7- Alouf J.E.- 1986.- "Streptococcal toxins (Streptolysin Ostreptolysin S, erythrogenic toxin)".- Pharmacology of Bacterial Toxins.- Domer F, Drew, J. eds. Pergamon Press (Oxford) Section 119: 635-692.
- 8- Tzschaschel, B.D; Guzmán, C.A; Timmis, K.N; de Lorenzo, V.- 1996. "An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: Export of Shiga-like toxin IIcB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA".- Division of Microbiology, GBF-National Research Centre for Biotechnology Nature biotechnology (Germany) 14, nº5 (June)
- 9- Remington. 1998. "Farmacia". Tomo 1. Edit. Médica Panamericana (Argentina)
- 10- Council for Agricultural Science and Technology. 1989. "Mycotoxins. Economic and health risks task force report". nº 116
- 11- Booth, C. .- 1977. "*Fusarium* Laboratory Guide to the identification of the major species". Mycological Institute (England)
- 12- Ellis, M.B.- 1971 "Dematiaceus *Hyphomycetes*". The Eastern Press.(England)
- 13- Pitt, J. I. ; Hocking, A.D.- 1985. "Fungi and food spoilage". Academic Press. (Australian).
- 14- Pitt, J. I.- 1979. "The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*". Academic Press. (London)
- 15- Raper, K and Fennell, D. - 1965.- The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co. (Baltimore).
- 16- Cole, R. and Cox,R .- 1981. "Handbook of toxic fungal metabolites". Academic Press. (New York)
- 17- Scott, P. M. and col.- 1970. "Detection of Mycotoxins by thin layer chromatography: Application to screening of fungal extracts". Applied Microbiology. 20 : 839-842
- 18- Natty Vega, V.- "Screening method for aflatoxins, zearalenone, ochratoxins and citrinin". Chemistry Laboratory, Ministry of Health. San José, Costa Rica. Presentado a la Conferencia Mixta FAO/OMS/PNUMA sobre Micotoxinas.
- 19- Raper, K. B.; Thom, C.; Fennell, D. Y. 1949. "A manual of the *Penicillia*". The Williams and Wilkins Co. (Baltimore)
- 20- Altman, D. 1997. "Practical Statistics for Medical Research". Chapman & Hall. (London) 253-257
- 21- Norman y Streiner. 1996. "Bioestadística". Mosby/ Doyma Libros División Iberoamericana. 153-155