

# Capacidad productora "in vitro" de patulina de cepas de *Byssoschlamys nivea* procedentes de ensilados de alfalfa

Beltzer, María P.; Bär, Joel A.B.; Basílico, María Z.; Basílico, Juan C.

Cátedra de Microbiología – Dpto. Ingeniería en Alimentos – Facultad de Ingeniería Química – U.N.L. – Santiago del Estero 2829 – 3000 Santa Fe (Argentina) – Fax: 0342- 4571162 – e-mail: jcbasili@fiqus.unl.edu.ar

**RESUMEN:** De un total de 39 muestras de alfalfa ensilada se obtuvieron 8 cepas de *Byssoschlamys nivea*, aptas para contaminar forrajes conservados. Se evaluó la capacidad de los mismos para producir patulina en caldo Czapeck, enriquecido con 0.2% de extracto de levadura y 0.8% de glucosa. La incubación se realizó a 25°C en condiciones estáticas durante 14 días. La presencia de micotoxina se determinó por Cromatografía de Capa Delgada (TLC) y su cuantificación se efectuó por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC). Se utilizó, además, una técnica de Electroforesis Capilar (EC) para la confirmación de la identidad de la patulina.

Todos los aislados resultaron productores, con un valor máximo obtenido de 2234 ppm de patulina.

**Palabras claves:** alfalfa, patulina, *Byssoschlamys nivea*.

**SUMMARY:** In vitro Patulin producer capacity of *Byssoschlamys nivea* strains from ensiled alfalfa. Beltzer, M.P.; Bär, J.A.B.; Basílico, M.Z.; Basílico, J.C. From a total of 39 samples of ensiled alfalfa 8 strains of *Byssoschlamys nivea*, capable to contaminate conserved forages, were obtained. The capacity of the isolated to produce patulin in Czapeck broth, enriched with 0.2% of yeast extract and 0.8% of glucose, was evaluated. The incubation was carried out at 25°C under static conditions over a period of 14 days. The mycotoxin presence was determined by Thin Layer Chromatography (TLC) and its quantification was made by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). It was used, also, a technique of Capillary Electrophoresis (CE) for the confirmation of the identity of the patulin.

All the isolated were producers, with an obtained maximum valued of 2234 ppm of patulin

**Key words:** alfalfa, patulin, *Byssoschlamys nivea*

## Introducción

La región central de la Provincia de Santa Fe tiene en la producción lechera una de las principales actividades agropecuarias, haciendo de la misma la más importante cuenca lechera del país. En esta zona, la actividad tambera, con sus diferentes variantes productivas, ocupa el 35,5% de las empresas existentes y el 40% de las ganaderas (1).

La alfalfa es la base de la alimentación del ganado, empleándose como pastura directa o como forraje conservado (en forma de silaje o henolaje) de los excedentes de primavera. La conservación en este tipo de sistemas se debe a la acción combinada de dos factores: acidez (pH cercano a 4) y anaerobiosis (2,3).

La baja tensión de oxígeno resultante favorece la presencia de *Byssoschlamys nivea*, un moho microaerofílico y termorresistente, potencial productor de patulina (4,5,6,7), una micotoxina que exhibe propiedades antibióticas frente a bacterias gram (+) y gram (-) (6,8,9,10, 11). Su importancia en ensilados radica en que la misma sería capaz de producir una inhibición de la microflora del rumen (12). Esto lleva a pensar que la patulina afecta la función ruminal con alteración de los parámetros de fermentación así como también en la proporción de productos finales del metabolismo microbiano, tales como ácidos grasos volátiles y formación de proteínas microbianas (13).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de producción de patulina de aislados de B.

*nivea* obtenidos de alfalfa procedente de la región central de la Provincia de Santa Fe.

## Materiales y Métodos

### Muestreo

Se extrajeron al azar 19 muestras de silajes y 20 de henolajes de alfalfa de ensilados en campos ubicados en la zona de influencia de la ciudad de Rafaela, Provincia de Santa Fe. Las mismas fueron remitidas por la estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA.

Para su conservación se las mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

### Aislamiento de las cepas de *Byssoschlamys nivea*

#### a- Siembra por diluciones

Se pesaron 10 g de cada muestra y se transfirieron a frascos conteniendo 90 mL de agua de peptona estéril (0,1% p/v). Luego se colocaron 30 minutos en un agitador rotatorio, se sometieron a un choque térmico durante 15 minutos a  $80^{\circ}\text{C}$ , se realizaron diluciones decimales y se distribuyeron 0,1 mL de las mismas en placas conteniendo los medios Czapeck - Iprodiona - Dicloran Agar (CZID) y Dicloran - Rosa de Bengala - Cloranfenicol Agar (DRBC) (5).

#### b- Incubación

Las placas fueron incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 5 días. Las colonias presuntamente correspondientes a *B. nivea* se aislaron en tubos estria conteniendo los mismos medios de cultivo, a fin de obtener colonias puras para su identificación.

#### c- Identificación de los aislados

Se realizó por observación macroscópica y microscópica, siguiendo las pautas de Pitt y col. y Samson y col. (5,7).

### Producción in vitro de patulina

a- Obtención de una suspensión de esporos e inoculación en un medio líquido.

Los aislados de *B. nivea* fueron inoculados en tubos conteniendo Papa - Dextrosa - Agar (PDA) (5) e incubados durante 33 días a  $35^{\circ}\text{C}$  para favorecer su

esporulación (14). La suspensión de esporos se obtuvo por arrastre superficial con una solución estéril de Tween 80 al 0,005% (p/v). Cada suspensión fue sonicada (Ultrasonic Cleaner Cole Parmer 8892E-DTH, Illinois, USA) durante 1 minuto, filtrada en esterilidad y diluida a fin de obtener una concentración final de  $10^7$  esporos/mL. Posteriormente se sometieron a un choque térmico de 60 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  (14,15). Se adicionaron 0,5 mL de cada suspensión a frascos de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo Czapeck (5), adicionado con 0,2% de extracto de levadura y 0,8% de glucosa (14,16) por triplicado. La incubación se realizó durante 14 días a  $25^{\circ}\text{C}$  en condiciones estáticas.

#### b- Extracción de patulina

Los cultivos fueron filtrados para obtener caldos (con metabolitos secundarios) libres de micelio. Posteriormente los caldos se deshidrataron con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se procedió a la extracción de la micotoxina utilizando 3 porciones de 50 mL cada una de acetato de etilo (8). Los extractos se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio (Büchi RE 111, CH 9230, Flawl / Schweiz, Switzerland) a  $40^{\circ}\text{C}$  y se redisolviaron en 2 mL de solvente seleccionado para cada técnica (acetato de etilo para el análisis por TLC y metanol para EC y HPLC).

### Análisis de patulina

a- Análisis cualitativo por Cromatografía en Capa Delgada (TLC).

Las determinaciones se llevaron a cabo de acuerdo a Cole y Cox (17). Se utilizó un método con desarrollo unidireccional ascendente, empleando placas con Silicagel 60 (Cromatofolios 25 DC Aufolien 20x20 cm, Merck) como adsorbente. El sistema de solventes empleado fue tolueno:acetato de etilo: cloroformo 5:4:1 (v/v/v), con un  $R_f$  de 0,58

Las placas fueron desarrolladas y llevadas a sequedad a temperatura ambiente. Patulina fue visualizada como una mancha marrón luego de rociar la placa con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  etanólico al 25% (v/v) y calentar a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Para la confirmación de la identidad de las manchas, se utilizó un patrón de Patulina (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA).

b- Confirmación de la identidad del compuesto por Electroforesis Capilar (EC)

Se utilizó un equipo (TERMO SEPARATION PRODUCTS) compuesto por un módulo inyector y una fuente de alta tensión SpectraPHORESIS 100, detector UV/VIS variable Spectra 100 y un integrador modelo SP 4600.

El modo de operación empleado fue la Electroforesis Capilar Zonal (CZE) (18,19), empleando un capilar de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro. Las condiciones en las que se llevaron a cabo las determinaciones fueron las siguientes: longitud de onda de detección de 276 nm, empleando como buffer 35 mM de  $\text{B}_7\text{O}_4\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , pH: 9 y un tiempo de migración promedio de 6,5 minutos

c- Cuantificación de patulina por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC)

Se trabajó con un cromatógrafo líquido provisto de una bomba Perkin Elmer Series 200, un detector Perkin Elmer 785 A UV/VIS e interfase NCI 900 (PE Nelson). Se empleó una columna de C18, fase reversa, de 250 mm X 4,6 mm, 300A y 5 $\mu$  (Phenomenex-Jupiter).

La preparación de la solución tipo de patulina y de las soluciones de trabajo se realizó a partir del patrón, de acuerdo a las pautas establecidas por Babsky y Forbito (20).

Para la inyección, los extractos metanólicos se filtraron con membranas de teflón de 0,2  $\mu$ .

Se empleó como fase móvil una solución acuosa de acetronitrilo 10mL/100mL, en condiciones isocráticas, un flujo de 1mL/min y una sensibilidad de 0,01 a.u.f.s. La longitud de onda de detección fue de 276 nm.

Todos los reactivos empleados fueron de calidad ACS y los solventes de calidad HPLC.

## Resultados y Discusión

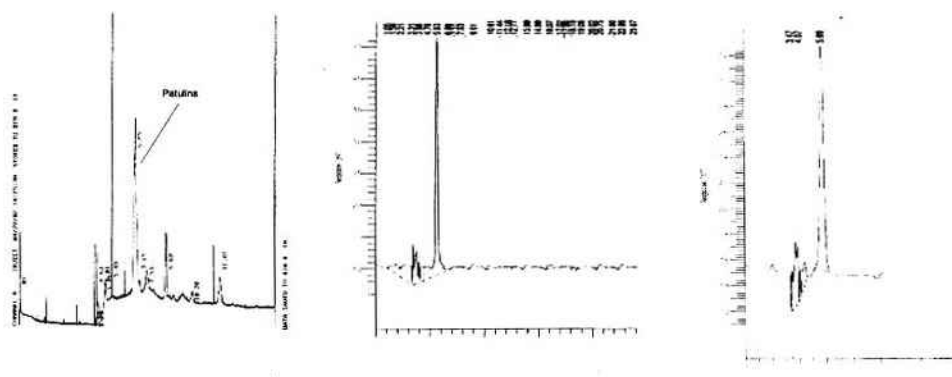
De las 39 muestras analizadas se obtuvieron 8 aislados identificados como *Byssoschlamys nivea*. La totalidad de los aislados fueron productores de patulina, siendo el valor máximo obtenido de 2234 ppm (Tabla 1). En la figura 1 puede observarse el cromatograma correspondiente a una cepa productora (aislado N° 2) comparado con el de la toxina pura. Asimismo, se muestra por electroforesis capilar el pico de patulina de dicho aislado.

**Tabla 1:** Capacidad productora de patulina «in vitro» de cepas de *Byssoschlamys nivea* procedentes de ensilados de alfalfa\*.

Aislado	Tipo de muestra	Análisis Cualitativo		Análisis Cuantitativo (HPLC) (ppm)
		TLC	EC	
1	silaje	+	+	636,3
2	silaje	+	+	1787,1
3	silaje	+	+	95,4
4	silaje	+	+	1381,6
5	silaje	+	+	530
6	henolaje	+	+	1002,6
7	henolaje	+	+	1354,7
8	henolaje	+	+	2234

\* estudio realizado en cultivos de esporos de *B. nivea*, por inoculación en caldo Czapeck enriquecido con 0,2% de extracto de levadura y 0,8% de glucosa e incubación a 25°C durante 14 días en condiciones estáticas.

**Figura 1:** Análisis cualitativo y cuantitativo de patulina en ensilados de alfalfa.



- 1- Cepa de *B. nivea* productora de patulina analizada por Electroforesis capilar.
- 2- Patulina SIGMA ensayada por HPLC.
- 3- Cepa de *B. nivea* productora de patulina examinada por HPLC.

Se efectuó el ensayo de patrón interno a los extractos para la confirmación de la identidad de la micotoxina.

El medio de cultivo empleado para el estudio de la producción de patulina fue seleccionado entre otros debido a que es ampliamente utilizado en la bibliografía (14,16,21) y permite obtener concentraciones elevadas de este metabolito secundario, del orden de las 816 ppm (15). Como se observa en la Tabla 1, la producción de la mayoría de los aislados fue sensiblemente superior.

Nuestros resultados fueron coincidentes con Escoula (21), quien constató que en la producción de patulina por parte de diferentes especies fúngicas aisladas de forrajes ensilados, sólo la especie *B. nivea* resulta productora en el 100% de los casos. Un estudio sobre la cinética de biosíntesis (16) reveló que el pico máximo de concentración de patulina precede al máximo crecimiento del moho y coincide con la formación de filamentosos.

Se considera que únicamente las cepas altamente productoras que invaden los forrajes son capaces de producir cantidades detectables de patulina (21). Los aislados de *B. nivea* presentes en alfalfa tienen una capacidad de producción referida a la

micotoxina en cuestión que supera ampliamente los valores estipulados en la bibliografía. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en presencia de una microflora compleja como lo es la de los forrajes conservados a campo (silajes o henalajes), la producción de la micotoxina es irregular (22) y en general, igual o menor a los valores obtenidos en el estudio de la producción *in vitro*, lo cual disminuiría el riesgo.

Por otra parte, en el presente trabajo se logró poner a punto la determinación cualitativa de patulina por EC. Sin embargo, sería conveniente profundizar en el desarrollo de esta técnica como práctica cuantitativa, debido a que es considerado un método complementario al HPLC, capaz de aumentar la información obtenida de los análisis (23).

## Conclusiones

Existe en las pasturas utilizadas para la alimentación del ganado vacuno de la zona centro de la

Provincia de Santa Fe un riesgo potencial de existencia de patulina, lo cual traería aparejado una baja absorción de nutrientes y una disminución de la calidad tanto de leche como de carne.

## Agradecimientos

A la Lic. Mónica Gagiotti y personal de la Estación Experimental INTA Rafaela, por su colaboración.

Al Laboratorio Modelo de Química "Ing. Juan O. Petunchi", Facultad de Ingeniería - UNL, por facilitar el uso del cromatógrafo líquido. Asimismo, al Laboratorio Modelo de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - UNL, por el préstamo del equipo de Electroforesis Capilar.

## Bibliografía

- 1- Fontanetto, H.; Keller, O. 1999. "La siembra directa de alfalfa sobre diferentes cultivos antecesores". Publicación miscelánea N° 89. Información técnica para Productores 1997-1998. INTA Rafaela, pág. 209.
- 2- Scudamore, K. A.; Livesey, C.T. 1998. Occurrence and significance of mycotoxin in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agric.* **77**: 1-17.
- 3- Mahanna, B. 1997. "Troubleshooting silage problems with Seed to Feed considerations". In: Proceedings from the Silage: Field to Feedbunk. North American Conference, Hershey, Pennsylvania, NRAES-99 (New York), 346- 378.
- 4- Tournas, V. 1994. Heat-resistance fungi of importance to the food and beverage industry. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**, 4: 243-263.
- 5- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. "Fungi and Food Spoilage". Blackie Academic & Professional, University Press. (London), 2ª edición, 1-593.
- 6- Torres I Grifo, M.; Sanchis Almenar, V.; Sala I Martí, N.; Canela I Garayoa, R. 1988. Producción de patulina y griseofulvina en diferentes sistemas de cultivo. *Revista Ibérica de Micología* **5**: 1-4.
- 7- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Van Oorschot, C.A.N. 1984. "Introduction to Food-Borne Fungi". CBS (Baarn) , 2ª edición, 1-248.
- 8- Viñas Almenar, I.; Vela Roca, E.; Sanchiz Almenar, V. 1993. Capacidad productora de patulina de cepas de *Penicillium expansum* procedentes de centrales hortofrutícolas de Lleida. *Revista Iberoamericana de Micología* **10**: 29-31.
- 9- Buckle, A.E. 1983. The occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs. *Vet. Res. Commun.* **7**: 171-186.
- 10- Dirheimer, G. 1998. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Revue Méd Vét.* **149**, 6: 605-616.
- 11- Chelkowski, J. 1991. "Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage". Developments in Food Science. Elsevier Science Publishers B. V. (Amsterdam) **26**: 381, 545-546.
- 12- Escoula, L. 1992. Patulin production by *Penicillium granulatum* and inhibition of rumial flora. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **11**, 2: 109-112
- 13- Tapia, M. O.; Murphy, M. J.; Koski, R. L.; Stern, M. D. 2000. Influence of Patulin Level Fermentation by Ruminal Microbes in Continuous Culture. University of MN, College of Veterinary Medicine, St. Paul, MN.
- 14- Rice, S.L.; Beuchat, L.R.; Worthington, R.E. 1977. Patulin production by *Byssochlamys spp* in fruit juices. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 6: 791-796.
- 15- Jesenska, Z.; Pieckona, E.; Bernat, D. 1993. Heat resistance of fungi from soil. *Int J. Food Microbiol.* **19**, 3: 187-192.
- 16- Escoula, L. 1975. Toxinogenic moulds in silage II - In vitro kinetics of patulin and byssochlamic acid biosynthesis by *Byssochlamys nivea* Westling in liquid medium. *Ann. Rech. Vet.* **6**, 2: 155-163.
- 17- Cole, R.J.; Cox, R.H. 1981. "Handbook of Toxic Fungal Metabolites". Academic Press (New York), 1-937.
- 18- Reference Manual, Thermo Separation™ Products Inc. 1974. San José, California, U.S.A.
- 19- Manual de Introducción a la Electroforesis Capilar. 1997. Beckman Instruments Inc., Esanco S.R.L., Buenos Aires, Argentina.
- 20- Babsky, N.E.; Forbito, P.R. 1995. "TOXINAS NATURALES EN ALIMENTOS - PATULINA- Método rápido para su determinación en jugos de manzana y sidra". Proyecto 1 de Norma IRAM 14808-2, pág. 12.
- 21- Escoula, L. 1975. Toxinogenic moulds in silage IV - Patulin production in liquid medium using fungus species isolated in silages. *Ann. Rech. Vet.* **6**, 3: 303-310.
- 22- Escoula, L. 1975. Toxinogenic moulds in silage III - Patulin and byssochlamic acid production by *Byssochlamys nivea* Westling on a laboratory silage model. *Ann. Rech. Vet.* **6**, 2: 219-226.
- 23- Li, S.F.I. 1996. "Capillary Electrophoresis. Principles, practice and applications". Journal of Chromatography Library, Elsevier Science B.V. (Amsterdam), **LII**, 1: 1-30.