

Primer reporte de *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz avena, triticale y alfalfa

Jazmín Janet Velázquez-Guerrero¹

Ernesto Cerna Chávez¹

Juan Carlos Delgado Ortiz²

Anselmo Hernández Pérez³

Teóduo Quezada Tristán⁴

Yisa María Ochoa Fuentes^{1§}

¹Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. Tel. 449 1389427. (jazzguerrero@hotmail.com; jabaly1@yahoo.com).

²CONACYT-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (moe-788@hotmail.com). ³Campo Experimental Uruapan-INIFAP.

Av. Latinoamericana 1101, Uruapan, Michoacán CP. 60150. México. Tel. 452 5237392. (hernandez.anselmo@inifap.gob.mx). ⁴Centro de Ciencias Agropecuarias-Universidad Autónoma de Aguascalientes. Jesús María, Aguascalientes, México. (tquezada@correo.uaa.mx).

§Autora para correspondencia: yisa8a@yahoo.com.

Resumen

Monascus purpureus es utilizado en la industria alimentaria como un pigmento natural, principalmente por los países asiáticos; sin embargo, este hongo produce una micotoxina llamada citrinina, que causa enfermedades como hepatotoxicidad, teratogenicidad, tumores y mutaciones, en mamíferos. Este hongo fue encontrado en Serbia en ensilaje de maíz y alfalfa. El objetivo de este trabajo fue identificar la presencia del hongo *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa, el muestreo se realizó en los periodos de noviembre-diciembre de 2017 y abril-mayo de 2018, en los estados de Jalisco, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato de la República Mexicana, se realizaron aislamientos de los ensilajes en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), fueron identificados morfológicamente y molecularmente. Se obtuvieron 63 cepas diferentes, siete fueron *Monascus purpureus*, una en alfalfa, dos en maíz, dos en avena y dos en triticale. Esta investigación reporta por primera vez, la presencia de hongos *Monascus purpureus* en los ensilajes de maíz, avena, triticale y alfalfa.

Palabras clave: hongos, inocuidad, identificación.

Recibido: noviembre de 2019

Aceptado: diciembre de 2019

En la década de 1960 la utilización del ensilaje en la industria ganadera incrementó considerablemente y se volvió el método de preservación de forraje que más se utiliza para la alimentación del ganado (Cheli *et al.*, 2013), este representa entre 45-60% de las dietas en los sistemas de producción de ganado lechero en todo el mundo, así como en la producción del ganado productor de carne en América y Europa (Adesogan, 2009; Millen *et al.*, 2009; Tangni *et al.*, 2013; Alpizar, 2015), el ensilaje puede ser de diferentes cultivos o forrajes como alfalfa, avena, maíz, mezcla de mazorcas o pulpa de remolacha (Tangni *et al.*, 2013), el objetivo de este es maximizar la preservación de nutrientes originales del cultivo forrajero, con una pérdida mínima en su calidad nutricional (Alonso *et al.*, 2013). Uno de los problemas que presenta el ensilaje es la contaminación por bacterias y hongos, que provocan la pérdida de materia seca y nutrientes (Garon *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2013), ocasionando que el ganado disminuya el consumo del mismo, afectando la producción de leche, rendimiento en ganancia diaria de peso (GDP) y la salud de los animales (Alpizar, 2015).

Carrillo (2003) indica que la contaminación por hongos en los alimentos puede ser antes, durante y después de la cosecha, en el transporte y almacenamiento, ya que los alimentos se encuentran permanentemente en contacto directo con esporas de los hongos toxicogénicos. Reyes-Velázquez *et al.* (2008); Keller *et al.* (2012); Alpizar (2015) reportan que la contaminación del ensilaje de maíz en México, Argentina, Brasil, Lituania, Suiza, Holanda, Irlanda y Dinamarca es provocada por hongos principalmente de los géneros: *Mucor* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp. y *Geotrichum* spp.

Mientras que otros estudios realizados en Lituania y Brasil, han reportado la presencia de hongos de los generos: *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. y *Penicillium* spp., en ensilajes de trébol, ryegrass, sorgo, triticale, avena y mezcla de pastos (Baliukoniene *et al.*, 2012; Keller *et al.*, 2012). Algo muy similar ha sido reportado en ensilajes de maíz y alfalfa, donde los hongos contaminantes fueron: *Penicillium* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Geotrichum candidum*, *Paecilomyces variotii*, *Monascus ruber* y *Monascus purpureus* (Bočarov-Stančić *et al.*, 2014).

Monascus purpureus es utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria como un colorante natural en la cultura oriental y en países asiáticos. Este hongo crece a una temperatura de 25 a 37 °C, con un máximo de 45 °C, puede crecer en un amplio intervalo de pH, desde 2.5 a 8 (Pineda-Insuasti *et al.*, 2016). Es capaz de producir citrinina, una micotoxina que afecta al riñón, pero también se han notificado otros órganos diana, como el hígado y la médula ósea, esta micotoxina es nefrotóxica, embriocida, fetotóxica, teratogénica y genotóxica causando daño a humanos y animales (Flajs y Peraica. 2009; Bensassi *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017).

Los posibles mecanismos toxicológicos de la citrinina son ubicados en la mitocondria renal y hepática, causando atrofia en la interferencia del proceso del transporte de electrones, además de la alteración de la homeostasis del Ca²⁺ y la generación de estrés oxidativo (Chia-Ding *et al.*, 2014). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó a la citrinina en el grupo 3 de los carcinógenos, debido a la evidencia limitada de su carcinogenicidad en animales y no hay evidencia para humanos (Flajs y Peraica, 2009). Por otro lado, Bočarov-Stančić *et al.* (2014), realizaron estudios en ensilaje de maíz y alfalfa en Serbia encontrando hongos del género *Monascus* en sus muestras. El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia del hongo *Monascus purpureus* en ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa.

En los periodos de noviembre-diciembre de 2017 y abril-mayo de 2018, se utilizó la técnica 'W' para la toma de las muestras (Bautista y Santos, 2004), se obtuvieron un total de 16 muestras de ensilaje de maíz, avena, triticale y alfalfa, de cuatro localidades por cada entidad, Aguascalientes, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco. Con el uso de la técnica antes mencionada, se tomó un kilogramo de cinco puntos del ensilaje, los cuales se homogenizaron obteniendo un total de cinco kilogramos y se extrajo una submuestra de 5 g, se les realizaron cortes de aproximadamente 5 mm, obteniendo 12 submuestras por muestra, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto, se enjuagaron en tres ocasiones con agua destilada estéril, se dejaron secar, se inocularon en placas petri 20 mL con medio PDA acidificado (200 µL de ácido láctico al 85% por cada litro), se incubaron a 28 ± 2 °C por siete días.

Posteriormente, se observó el crecimiento micelial de las muestras de silo inoculado; se realizó la purificación de cada hongo, en medio PDA acidificado e incubando a 27 °C, durante 8 días en que se desarrollan las estructuras reproductivas necesarias para la identificación del hongo. Se tomaron porciones de micelio con esporas, se realizaron las tinciones, se colocaron en un portaobjetos donde ya se tenía una gota del colorante azul de algodón y se colocaba en el cubreobjetos, después se observaron al microscopio y se identificaron en base a las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

Mediante la técnica PCR-ITS, se realizó la identificación molecular, a las cepas aisladas se les extrajo el ADN mediante el método de Doyle y Doyle modificado (1990). El producto de la extracción se corrió en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. Posteriormente se desarrolló el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) las regiones internas transcritas ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), utilizando Taq&GO Maternix (1.5 mM MgCl₂, 200 µM DNTP's) siguiendo recomendaciones del fabricante (MP®); 0.5 µL de ITS1 a 20 µM; 0.5 µL de ITS4 a 20 µM; 1 µL de DNA problema ajustado a 100 ng y agua bidestilada estéril para aforar a 15 µL.

Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, 30 ciclos de alineamiento a 57 °C por 30 s, 30 ciclos de extensión a 72 °C por 2 min y 1 ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. La amplificación se visualizó en un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis. El producto de PCR se mandó secuenciar al laboratorio MacroGen en Maryland, Estados Unidos de América.

A las muestras de ensilaje de alfalfa, maíz, avena y triticale se les realizó una evaluación macroscópica para identificar posibles anomalías en su apariencia, observándose que los ensilajes eran compactos y presentaban una consistencia dura que hacía difícil al corte, en la evaluación se observó tonos de color rojo intenso como se aprecia en las Figuras 1 y 2, las cuales muestran tonalidades semejantes a las reportadas para *Fusarium* spp.

De las 16 muestras obtenidas de los ensilajes, se logró aislar 63 cepas diferentes de hongos de las cuales 11.1% (7/63) correspondieron al hongo *Monascus purpureus*. Se lograron obtener siete cepas de hongos *Monascus purpureus*, dos en ensilaje de maíz, uno en alfalfa, dos en triticale y dos en avena que representan 3.17, 1.58, 3.17 y 3.17% respectivamente.



Figura 1. Muestra de ensilaje de maíz donde se aprecia la tonalidad del hongo y apelmazamiento del ensilaje.



Figura 2. Muestra de ensilaje de maíz donde se observa el apelmazamiento del ensilaje.

Asimismo, en los cultivos que se realizaron de cada una de las muestras, se pudo observar una gama de colores que fueron desde el blanco, crema, anaranjado, rojo intenso hasta un color tinto en el micelio como se observa en el anverso de las cajas de Petri (Figura 3), mientras que en el reverso las coloraciones fueron de un color anaranjado a rojas como se observa en la Figura 4.

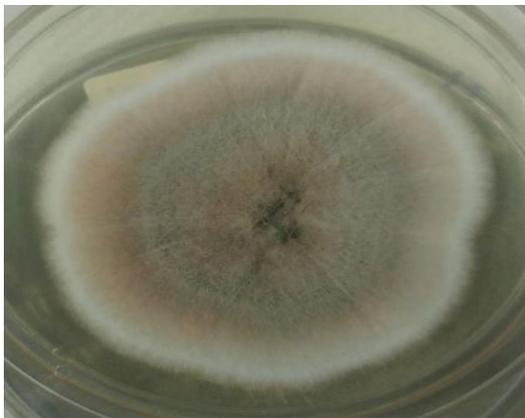


Figura 3. En el micelio se observan las diferentes tonalidades del hongo.

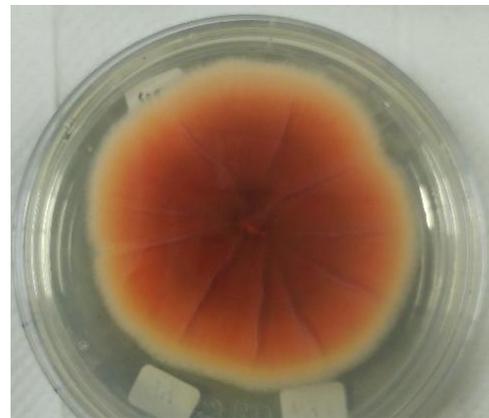


Figura 4. Se observa el rojo intenso que caracteriza el hongo *Monascus*.

Microscópicamente se lograron observar ascocarpos de paredes delgadas y cadenas de conidios redondos (Figura 5), paralelamente también se logró observar ascosporas en el interior del ascocarpo (Figura 6).

Pineda-Insuasti *et al.* (2016), indican que el hongo *Monascus* crece fácilmente en residuos agroindustriales como es el capacho u hoja de maíz y raquis de palma de aceite, aunado a las condiciones de crecimiento: temperatura, pH, humedad y concentración de nutrientes (nitrógeno, zinc, manganeso y hierro) provocan que el hongo se desarrolle y propague en campo, lo que conlleva a uno de los principales problemas de contaminación del ensilaje (Kim *et al.*, 2002).

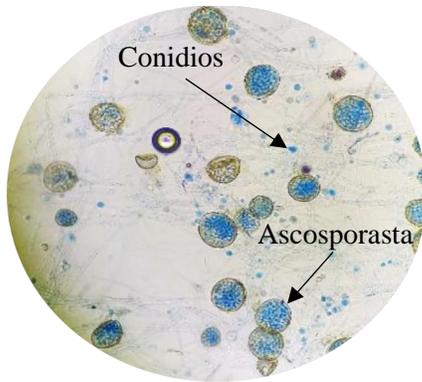


Figura 5. Vista microscópica del hongo *Monascus* spp., se observan las estructuras ascosporas y los conidios característicos de este hongo (objetivo de 40x).

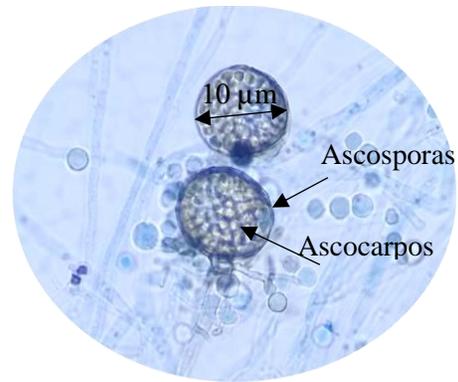


Figura 6. Vista microscópica del hongo *Monascus* spp., se observa una mejor definición de las estructuras ascosporas, ascocarpos y tamaño características de este hongo (objetivo de 100x).

Bočarov-Stančić *et al.* (2014), realizaron estudios en ensilaje de maíz y alfalfa en Serbia encontrando hongos del género *Monascus* en sus muestras. Garon *et al.* (2006), reportan la presencia de *Monascus* en ensilaje de maíz en Francia, ellos realizaron las tomas de muestras del ensilaje de maíz en los meses de noviembre, diciembre y febrero, datos que coinciden con nuestras tomas de muestras de los diferentes tipos de ensilaje y la presencia del hongo *Monascus* en los ensilajes de maíz, alfalfa, triticale y avena.

Las secuencias obtenidas del análisis molecular fueron comparadas con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information NCBI de EE.UU (www.ncbi.nlm.nih.gov/), mediante el uso del programa BLAST, donde se obtuvo como resultado que 95.58% de las muestras aisladas mostraron similitud al hongo *Monascus purpureus* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA, presente en los ensilajes de alfalfa, maíz, avena y triticale.

Aislado	Especie	Número de acceso	IS (%)
1	<i>Monascus purpureus</i>	KY828906.1	95.58
2	<i>Monascus purpureus</i>	MK087167.1	95.58
3	<i>Monascus purpureus</i>	MK087147.1	95.58
4	<i>Monascus purpureus</i>	GQ503882.1	95.58
5	<i>Monascus purpureus</i>	MK621210.1	95.06
6	<i>Monascus purpureus</i>	MK087172.1	95.06
7	<i>Monascus purpureus</i>	MG576116.1	95.58

1= ensilaje de alfalfa; 2, 3= ensilaje de maíz; 4, 5= ensilaje de avena; 6, 7= ensilaje de triticale.

Conclusiones

Esta investigación reporta la presencia del *Monascus purpureus* en ensilajes de maíz, avena, triticale y alfalfa de los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Jalisco y Zacatecas.

Literatura citada

- Adesogan, A. T. 2009. Challenges of tropical silage production. Proc. 15th international silage conference, Madison, Wisconsin. 139-156 p.
- Alonso, V. A.; Pereyra, C. M.; Keller, L. A. M.; Dalcero, A. M.; Rosa, C. A. R.; Chiacchiera S. M. and Cavaglieri, L. R. 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115(3):637-643.
- Alpizar, S. C. 2015. Presencia de hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Rev. Cienc. Veterin.* 33(1):7-31.
- Baliukoniene, V.; Bakutis B.; Vaivadaite T.; Bartkienė E. and Jovaišienė, J. 2012. Prevalence of fungi and mycotoxins in silage and milk in Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika* 59(81):3-9.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. APS Press, Saint Paul, Minnesota. 157-158 pp.
- Bautista, A. y Santos, S. 2004. Manual de técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales. 351-355 pp.
- Bensassi, F.; Bouslimi A.; El Golli-Bennour, E.; Gargouri S.; Hajlaoui, M. R. and Bacha H. 2011. Comparative cytotoxicity of the possibly occurring mycotoxins in wheat on the basis of a mycological analysis. *J. Mycol.* 32(3):295-306.
- Bočarov-Stančić, A.; Stanković, S.; Lević, J.; Janković, S.; Adamović, M.; Novaković, Ž. and Kuzevski, J. 2014. Presence of mycobiota and mycotoxins in silage. Feed technology. *In: XVI International Symposium Novi Sad, Serbia, octubre 28-30.* 1-6 p.
- Carrillo, L. 2003. Mohos y micotoxinas. *In: Universidad Nacional de Salta. (Ed.). Los hongos de los alimentos y Forrajes.* Salta, Argentina. 1-24 pp.
- Cheli, F.; Campagnoli, A. and Dell'Orto, V. 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *J. Animal Feed Sci. Technol.* 183(1-2):1-16. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.01.013.
- Chia-Ding, L.; Ying-Chun, C.; Hsu-Yang, L.; Lih-Ching, C. and Yang-Chih, S. D. 2014. Incidence of citrinin in red yeast rice and various comercial *Monascus* products in Taiwan from 2009 to 2012. *J. Food Control.* 38:178-183.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12(1):13-15.
- Flajs, D. and Peraica, M. 2009. Toxicological properties of citrinin. Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia. 60(4):457-464.
- Garon, D.; Richard, E.; Sage, L.; Bouchart, V.; Pottier D. and Lebailly, P. 2006. Mycoflora and multimycotoxin Detection in corn silage: experimental study. *J. Agric. Food Chem.* 54(9):3479-3484.
- Keller, L. A.; Keller K. M.; Monge, M. P.; Pereyra, C. M.; Alonso, V. A.; Cavaglieri, L. R.; Chiacchiera, S. M. and Rosa, C. A. 2012. Gliotoxin contamination in pre- and postfermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Río de Janeiro State, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 112(5):865-873.
- Kim, H. J.; Kim, J. H.; Oh, H. J. and Shin, C. S. 2002. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. *Process Biochem.* 38(5):649-655.
- Millen, D. D.; Pacheco, R. D. L.; Arrigoni, M. D. B.; Galyean, M. L. and Vasconcelos, J. T. 2009. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. *J. Animal Sci.* 87(10):3427-3439.

- Pineda-Insuasti¹, J. A.; Duarte-Trujillo, A. S.; Ayala-Pastaz, K. B.; Soto-Arroyave, C. P. y Pineda-Soto, C. A. 2016. Producción de metabolitos por *Monascus* spp. una revisión. Rev. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar. 50(2):43-52.
- Reyes-Velázquez, W. P.; Espinoza, V. H. I.; Rojo, F.; Jiménez, C.; Palacios, E. D.; Hernández, J. and Ramírez, A. 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. Rev. Iberoam. Micol. 25(3):182-185.
- Tangni, E. K.; Pussemier, L. and Van Hove, F. 2013. Mycotoxin contaminating maize and grass silages for dairy cattle feeding: current state and challenges. J. Animal Sci. Adv. 10(3):492-511.
- Wang, H.; Zhang, S.; Lin, T.; Zheng, D. 2017. Introduction and safety evaluation of citrinin in foods. J. Food Nutr. Sci. 5(5):179-183. Doi: 10.11648/j.jfns.20170505.13.