ITEA (2003), Vol. Extra N.º 24. Tomo II. 750-752

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE MONENSINA SÓDICA EN PIENSO

N. Prieto, L.J. Castro, M.J. Mora, P. Lavín, A.R. Mantecón
Estación Agrícola Experimental. CSIC. Apdo. 788. 24080. León

INTRODUCCIÓN

El empleo de sustancias de acción farmacológica en alimentación animal puede dar lugar a la aparición de las mismas o de sus residuos en los alimentos, con el consiguiente riesgo para la Salud Pública.

La monensina es un compuesto farmacológicamente activo, catalogado como antibiótico ionóforo, tratándose en concreto de un poliéter monocarboxílico (Richardson et al. 1976) que se comercializa en forma de sal sódica. Se obtiene a partir de la fermentación de una cepa de *Streptomyces cinnamonensis*, bacteria que se encuentra comúnmente en muestras de suelos, siendo aislada por primera vez en 1967 por Haney y Hoehn. Tanto su función coccidiostática en pollos, como su actividad promotora de crecimiento, han extendido su uso en las producciones pecuarias, si bien, el empleo de monensina es sólo temporal ya que la Comisión de la Unión Europea propuso su prohibición a partir de enero de 2006. No obstante, la utilización de monensina está restringida, actualmente, en varios proyectos de producción de carne de calidad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la sensibilidad de diferentes microorganismos a la acción de la monensina, con el fin de desarrollar un método eficaz, basado en la inhibición del crecimiento microbiano, para la detección de monensina en piensos y en premezclas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de esta prueba experimental se siguió el método microbiológico de difusión en placa y se testaron cuatro microorganismos: *Escherichia coli* CECT 434, *Bacillus subtilis* BGA CECT 482, *Bacillus stearothermophilus* CECT 47 *y Bacillus cereus* CECT 5051. Para ello, se prepararon placas de cada microorganismo, empleando como medio de cultivo Agar Mueller-Hinton (Merck 05437). En el caso de *Bacillus subtilis* BGA, se prepararon también placas utilizando Agar de ensayo pH 6.0 (Merck 10663) y Agar de ensayo pH 8.0 (Merck 10664).

En una primera etapa, se estudió el efecto de distintas concentraciones (100; 50; 10; 1; 0,5; 0,1; 0,05 y 0,01 μg/ml) de monensina sódica (Sigma M 5273) sobre el crecimiento de los distintos microorganismos anteriormente señalados. En cada placa de cultivo, se colocaron los siguientes discos de papel de filtro (Whatman 1; 6 mm de diámetro): tres discos impregnados con 20 μl de una de las concentraciones problema, tres discos impregnados con una concentración fija de 50 μg/ml, que se utilizó de referencia, y un disco que sirvió como control negativo. Para cada una de las concentraciones estudiadas se emplearon 3 placas, de manera que se prepararon un total de 24 placas por microorganismo y medio de cultivo utilizado.

Las placas se incubaron en estufa durante diferentes horas y temperaturas según el microorganismo a ensayar (ver tabla 1) y realizado el período de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento que aparecieron alrededor de los discos, cuantificando éste a partir de 0,5 mm de distancia del

extremo exterior del disco. Posteriormente, se procedió a la corrección de los valores obtenidos para cada concentración, en base a los valores obtenidos de la concentración de referencia, obteniendo así, unas rectas de calibrado.

En una segunda etapa se realizó la validación del método más sensible, según los resultados obtenidos en la etapa 1. Para tal fin, se elaboraron cuatro piensos con concentraciones variables de monensina sódica (300; 100; 50 y 25 μg/g). Una vez obtenidos los piensos problema, se procedió a la extracción del ionóforo según el procedimiento oficial descrito por el Analytical Methods Committee (1981). Los extractos obtenidos se emplearon para realizar el estudio, de manera que en cada placa de cultivo se colocaron los siguientes discos: tres discos impregnados con 20 μl de uno de los extractos obtenidos, tres discos impregnados con una concentración fija de 1 μg/ml, que se utilizó de referencia, y un disco que sirvió como control negativo. Para cada extracto de pienso se prepararon tres placas, de manera que se estudiaron un total de 12 placas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la tabla 1, existen diferencias cuantitativamente importantes entre los diferentes microorganismos testados. Así, *Escherichia coli* fue el microorganismo menos sensible experimentalmente, siendo el coeficiente de determinación entre la concentración de monensina y el diámetro del halo de inhibición de 0,69. En el lado opuesto, se situó el microorganismo *Bacillus stearothermophilus,* con un coeficiente de determinación de 0,94 y una concentración mínima inhibitoria de 0,0206 μg/ml.

Resultados similares fueron encontrados por Kožárová y Máté (2000), aunque el rango de concentraciones de monensina en el cual observaron los halos de inhibición, en el caso de *Bacillus stearothermophilus,* fue de 1 a 1000 μg/ml, claramente superior al empleado en el presente estudio.

Tabla 1: Coeficiente de determinación (r^2) de las ecuaciones de predicción (concentración monensina = a + b . halo inhibición) y concentración mínima inhibitoria teórica (CMI) para los diferentes microorganismos.

Microorganismo	ufc/ml	Medio de cultivo sólido	pH	T° (°C)	Horas	Concentración (μg/ml)	r^2	a	b	CMI (μg/ml)
Escherichia coli CECT	10^6	Mueller-Hinton (Merck 05437)	7,4	37±1,0	18	0,1-100	0,6897	22,1	2,3228	0,.0029
Bacillus cereus CECT 5051	10^5	Mueller-Hinton (Merck 05437)	7,4	37±1,0	18	0,1-100	0,9091	-3,0	0,2474	0,2924
Bacillus subtilis BGA CECT 482	10^4	Agar de ensayo (Merck 10633)	6	30±1,0	18	0,1-100	0,9145	-3,4	0,3195	0,2986
		Mueller-Hinton (Merck 05437)	7,4	30±1,0	18	0,1-100	0,9594	-2,7	0,1879	0,2563
		Agar de ensayo (Merck 10664)	8	30±1,0	18	0,1-100	0,8168	-3,0	0,2394	0,2660
Bacillus stearothermophilus CECT 47	10^5	Mueller-Hinton (Merck 05437)	7,4	63±2,0	8	0,01-10	0,9383	-5,6	0,2536	0,0206

Cuando se llevó a cabo la validación, en la prueba inicialmente realizada con los extractos obtenidos, de acuerdo con el procedimiento descrito, no se pudieron estudiar las placas, ya que se produjo una inhibición total. Por ello se procedió a realizar la repetición del ensayo con una dilución (1/10) de las extracciones

originales, obteniendo los resultados reflejados en la tabla 2. Como puede observarse, el halo de inhibición experimental fue claramente inferior al halo teórico, lo cuál probablemente se debe a que el procedimiento de extracción no fue totalmente eficaz, si bien fue relativamente proporcional a las diferentes concentraciones de los piensos experimentales, como sugiere la gradación observada en el diámetro de los halos experimentales. Además, la relación entre el diámetro de los halos teórico y experimental fue relativamente constante (63,8±1,35). En cualquier caso, el método de extracción y el de detección fueron suficientemente sensibles para detectar la presencia de monensina sódica.

Tabla 2: Concentración de monensina en los extractos obtenidos de los piensos experimentales con diferentes contenidos de monensina y valores medios de los diámetros del halo teórico y experimental obtenidos a partir de dichos extractos .

Concentración [1]	Halo inhibición Teórico (mm)	Halo inhibición Experimental (mm)
6,0 µg/ml	29,2 ± 3,27	19,0 ± 6,89
2,0 µg/ml	25,0 ± 3,53	16,7 ± 3,02
1,0 µg/ml	23,0 ± 4,01	14,4 ± 1,99
0,5 µg/ml	20,3 ± 4,04	12,3 ± 1,05

[1] Concentración de monensina en el extracto obtenido del pienso experimental

De estos resultados, podemos concluir que *Bacillus stearothermophilus* es el microorganismo más sensible de los testados para la detección de monensina sódica en pienso, lo que permite detectar bajas concentraciones de este aditivo. Una ventaja adicional de este microoorganismo es su rápido crecimiento, que permite obtener resultados relativamente rápidos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado como parte del contrato de investigación entre el CSIC y la empresa "Núcleo de Explotaciones Agropecuarias de León, NEAL, S.A.". N. Prieto disfrutó de una beca predoctoral del CSIC - UNIDADES ASOCIADAS UNIVERSIDADES.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE (1981). Microbiological assay of low levels of monensin in animal feeds. *Analyst*, **106**, 788-789.

HANEY, M.E. and HOEHN, M.M. (1967). Monensin, a new biologically active compound. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1**, 349-352.

KOŽÁROVÁ, I. and MÁTÉ, D. (2000). Evaluation of the sensitivity of individual test organisms to residual concentrations of selected types of anticoccidial drugs. *Bulletin Veterinary Institute Pulawy,* **44**, 187-192.

RICHARDSON, L.F.; RAUN, A.P.; POTTER, E.L.; COOLEY, C.O. and RATHMACHER, R.P. (1976). Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. *Journal of Animal Science,* **43**, 657-663.