

Acción microbiana en la cianogénesis de la torta del lino

Por los Dres. Luis Echenique, Libero Rossi Lema y Bach
Nenúfar Sosa de Caruso

INSTITUTO DE INDUSTRIA ANIMAL

INTRODUCCION

La torta y expeler de lino tienen como la semilla de donde proceden, un glucósido, la **linamarina**, que en determinadas condiciones puede hidrolizarse dando origen a acetona, glucosa y un cuerpo sumamente tóxico, el ácido cianhídrico, según la fórmula siguiente:



En nuestro medio, estos subproductos de la industrialización del lino encuentran una colocación importante en la preparación de raciones para los animales, pues su alto contenido en proteínas contribuye favorablemente a la elaboración de un alimento concentrado de bajo costo.

Este año especialmente, en virtud de la escasez general de forrajes porque atraviesa el país, se ha intensificado su empleo, sobre todo en el ganado lechero, mezclándolo con afrechillo, trigo, girasol, cebada, etc. y en raciones diarias en altos porcentajes que en algunos casos han significado hasta dos y más kilos por animal. Este hecho pone de manifiesto la importancia que cobra todo conocimiento sobre la evolución del glucósido en la ración y posteriormente en el curso del tránsito gastro intestinal animal.

En consideración a este planteamiento es que nosotros abordamos el estudio concretado en la presente nota.

Ogier (1) refiriéndose al glucósido **linamarina** dice que es igual a la **faseolunatina**, glucósido de los porotos (*Fascolus lunatus*) y que éstos

no pueden ser comercializados cuando el H C N llega a 200 miligramos por kilo y estima que como consecuencia del método de compresión para la obtención del aceite, el contenido en tóxico es superior al de las semillas.

Se refiere después a una conclusión de la Sociedad de Químicos Expertos del año 1920, en la que establecen el tenor de 200 miligramos como máximo para permitir la venta de tortas de lino con destino a la alimentación animal.

Fernández (2) estudiando "el ácido cianhídrico en las tortas de lino" da un cuadro con el resultado de la determinación cuantitativa en el que puede observarse los tenores en H C. N comprendidos entre 89,7 y 222,6 miligramos por kilo. Además da el resultado de una de las muestras anteriores comparándolo con el resultado obtenido después de introducir una modificación en la técnica analítica o sean 89,7 y 382,7 respectivamente. Estas muestras de torta son de las producidas en el país.

Rubino, Fernández y Barros (3) consignan un tenor de 461 miligramos en una torta que sirvió de alimento básico en una investigación en cerdos.

El Ing. Santoro (4) en un trabajo sobre "La toxicidad eventual de las tortas de lino" da los tenores comprendidos entre 200 y 250 mlg. por kilo de torta de fabricación nacional.

Saredo (5) analizando semillas de lino de producción uruguaya obtiene resultados comprendidos entre 15 y 28 miligramos por ciento o sean 150 y 280 mlg. por kilo.

Niemes (6) estudia la toxicidad de la planta de lino desde los cinco a los ochenta y ocho días y da el tenor en H C. N señalando el hecho de que bovinos morían al pastar en un predio sembrado con esta oleaginosa.

Como puede establecerse en el ligero examen anteriormente expuesto el contenido en H C N de las tortas está muy por encima de los aconsejables a los efectos de un buen aprovechamiento alimenticio, sin embargo no conocemos medidas técnicas conducentes al destaque de lo serio de este problema en relación con una posible reglamentación de su venta, etc. A pesar de ello este año ha habido un empleo extraordinario, sobre todo en vacas lecheras sin que se hubieran desencadenado fenómenos de intoxicación. Causas más complejas seguramente que la simple presencia de una cantidad químicamente determinada como tóxica, son los que en definitiva regulan los procesos de hidrólisis del glucósido y el futuro de la intoxicación.

El Ing. Santoro (4) menciona el hecho de que raciones conteniendo hasta 3 kilos de torta de lino, no han producido trastornos, cuando según Husemann, una dosis de 73 miligramos de ácido cianhídrico, que estarían contenidos en 666 gramos serían fatales para el animal.

Uno de nosotros, Echenique (7) estudiando la intoxicación cianhídrica en palomas, producida por la alimentación a base de *Vicia Sativa* que contiene un glucósido vecino de la amigdalina, manifiesta que según Marchadier y Gonjou, admiten generalmente como dosis tóxica de H C N, un miligramo por kilo de sujeto. Hace notar la variación en cuanto al contenido en H C N de los granos de vicia sativa y aporta el dato de que en la cosecha de verano el contenido es mayor.

El Dr. Angel M. Oyuela (8) ex-Director del Instituto de Bacteriología de nuestra Facultad de Veterinaria, estudiando la acción tóxica de los sorgos, que también uno de nosotros —Echenique— ha estudiado, dice que los americanos han demostrado que las dosis mortales de H C N son para el vacuno de 2 miligramos por kilo vivo para la oveja 2,3 miligramos y para el cerdo 2,4 miligramos.

Habla después sobre la reacción Guignard para la investigación del H C N y describe la reacción Guignard-Echenique (9) de acuerdo con una modificación introducida por este último autor en colaboración con el Dr. Julio Riet en la técnica original, haciéndola más sensible en el caso precisamente de los sorgos. Oyuela (8) encuentra también una mayor toxicidad de los sorgos a medida que el clima se hace más caliente y al referirse a la evolución de la toxicidad de acuerdo con la edad de la planta, pone de manifiesto la ausencia de reacción de H C N en ciertas muestras de semillas o muy débil reacción en otras. Cita entonces como hechos a tomarse en cuenta la defensa del organismo animal, transformando en sulfocianuros atóxicos los compuestos cianogonéticos y describe los casos de intoxicación cianica en los bovinos con estado paralizante de acuerdo con la constatación de Niemes (6).

J. Ogier (1) ya citado, dice: "bien que se ha dicho que el ácido cianhídrico no se acumula en el organismo, parece no obstante que su absorción continuada y cotidiana por el hombre a dosis de algunos miligramos, produce alteraciones digestivas y nerviosas, somnolencias y debilitamiento". Puede ser que dosis mayores de algunos centigramos tengan en el caballo el mismo efecto".

La intoxicación crónica de la paloma por el H C N de la *Vicia Sativa* según lo establecemos en el trabajo ya mencionado se hace presente con alteraciones digestivas como diarrea y musculares como el agotamiento del glicógeno. En los bovinos en lactación y en caballos la intoxicación se nota solo después de una alimentación prolongada durante veinte o más días y en algunos casos el estado tóxico ha aparecido después de muchos días de suprimida la vicia sativa de la alimentación.

Rubino, Fernández y Barros (3) en el trabajo ya citado comprueban que la torta de lino es tolerada por los cerdos sin producir cuadros clínicos de evidente intoxicación pero que el tóxico se elimina al estado de sulfocianuro por la orina. Constatan alteraciones en la grasa animal.

MATERIAL Y METODOS

Cuando se investiga la presencia del H C N en las tortas de lino lo hacemos como ya lo hemos realizado en el Sudan-Grass, sorgo de Halepo o Vicia Sativa, formando una papilla blanda con agua, dentro de un frasco que luego se tapa y de cuya tapa pende una cinta de papel picrosodado. La lectura se realiza 24 o 48 horas después, observando si el color amarillo claro del papel ha virado al rosado o rojo, rojo oscuro. En el caso de la torta de lino el desprendimiento del ácido cianhídrico se hace más fácilmente a una temperatura vecina de 40 a 50° C que es la más conveniente para el fermento, linaza-hidrolizante de la linamarina. Tomando esto en cuenta y además el hecho de que los tamberos que alimentan sus vacas con torta hacen una pasta blanda, mezclando torta, afrechillo y agua que dejan en maceración a temperatura ambiente durante doce horas, hemos trabajado a dos temperaturas, es decir a temperatura de laboratorio y a 37° C.

La temperatura de laboratorio ha sido alrededor de los 15 a 17°C. En estas condiciones muchas o casi todas las reacciones a temperatura de laboratorio son negativas mientras que son fuertemente positivas a 37° C en 48 hs. de observación.

Si se observan las dos muestras de papilla, vemos que son completamente diferentes. Mientras en la muestra a temperatura ambiente no hay modificación de estado físico ni hay cambio de pH, en la muestra a 37° C se nota aumento de volumen de la masa, con burbujas de gas y modificación del pH el cual baja alrededor de 5.0 más o menos. El pH como se sabe juega un rol importante en la hidrólisis del glucósido cianogénico como se establece en el desdoblamiento de la amigdalina de las almendras amargas por la emulsina. Este fermento en realidad estaría constituido por la amigdalasa que actúa a pH 6 y la prunasa y oxinitrilasa que actúa a pH 4.4. Considerando estos hechos parecería que la reacción a 37° C ha llenado las condiciones indispensables para un buen desprendimiento de H C N como efectivamente se constata por la fuerte coloración del papel picrosodado.

Simultáneamente una flora abundante ha crecido en el medio de cultivo constituido por la papilla en estudio, lo que es revelable por medio de un frotis.

Después de repetir muchas veces estas observaciones nos pareció que la morfología de las bacterias encontradas eran similares o casi similares, como si una flora particular tuviera predilección por la torta de lino.

No hemos encontrado bibliografía que haga alusión a este tema pero brevemente expondremos algunos puntos de estudio de otros investigadores que pudieran tener alguna conexión con él.

Holleman (12) dice que si la hidrólisis de la amigdalina se realiza con

la maltasa de la levadura de cerveza en lugar de la emulsasa, resulta una sola molécula de glucosa junto con el glucósido del nitrilo amigdalico $C_{11}H_{17}O_6N$. Riet, Echenique y Sanz (13) estudiando la intervención de la fisiología de los reservorios gástricos en el desdoblamiento del glucósido del Sudan-Grass, dicen que en condiciones normales los bovinos tienen asegurada su tolerancia respecto a la toxicidad del sudan-grass pero, que modificando las condiciones del medio del rumen puede producirse la intoxicación. Esta modificación puede ser producida entre otras causas por fermentaciones, timpanitis, etc.

Hahn (14) dice: "También es digna de mención la descomposición por determinadas levaduras de muchos glucósidos, como la salicina y la amigdalina para obtener azúcar asimilable".

La Revista Ciencias Veterinarias (15) estudiando la microbiología del rumen dice: "el trébol blanco contiene un glucósido, lotrustralin. Esta sustancia puede ser hidrolizada por los microorganismos del rumen con la producción de ácido hidrocianico, que puede atravesar al torrente circulatorio y entonces envenenar al animal. Este envenenamiento corrientemente es producido por las plantas y tréboles".

Esta afirmación se apoya en dos trabajos originales de Nueva Zelanda y Sud Africa, que no hemos podido conseguir.

El Ing. Santoro (4) en su trabajo ya mencionado sobre intoxicación de vacas por tortas de lino dice que en "principio impresiona de que el estado de conservación relativamente deficiente de la partida de lino de la fábrica ha sido la causa estimuladora de la cianogenesis. La torta tenía cierto grado de alteración revelada por un mayor contenido en ácidos grasos libres y también microscópicamente por la presencia de ácaros. No tenía olor a moho".

Como decíamos anteriormente las culturas a $37^{\circ}C$ de las papillas que sirven de base a la reacción de desprendimiento del H C N dan generalmente una morfología en cierto modo haciendo recordar las de muestras ya analizadas y también los frotis de siembras de tortas en medios de cultivos adecuados, conducen a la misma impresión. Tomando esto en cuenta aislamos de las siembras, varias bacterias que pudieran tener alguna relación con el desprendimiento de H C N y fueron sucesivamente probadas y observadas en su comportamiento. El aislamiento se realizó haciendo siembras de torta en el siguiente medio preparado por nosotros:

10 gramos de torta se ponen con 350 c.c. de agua corriente en un matraz de 500 c.c. Se hierva diez minutos, se decanta y aprovecha la parte líquida que se lleva a un volumen de 400 c.c. con agua. Una parte sirve para hacer medio gelosado al 2% y la otra sirve como medio de cultivo líquido. Se lleva a la autoclave 30 minutos a $120^{\circ}C$.

Nos llamó entonces la atención una cepa de un **estreptococo** que en forma de coco, diplo o corias cadenetras aparecía en los medios de

prueba, así como en la papilla original en una llamativa coincidencia morfológica. Sembrado el estreptococo en el medio líquido descripto desprende al cultivar H C N a expensas del glucósido linamarina. Este hecho se comprueba a 37°C en presencia del papel picrosódico Guignard y para probar la destrucción del fermento linaza por el calor del autoclave, ponemos un tubo testigo cuyo papel permanece inalterado en virtud de no haber sido sembrado con el estreptococo. Esta bacteria tiene las siguientes características:

Morfología

Forma: coco, diplococo.

Motilidad: Positiva en un cultivo de 24 hs. en caldo simple.

Tinción: Uniforme - Gram-positivo.

Cultivo en medio sólido: Gelosa simple: Colonias pequeñas de color blanquecino, redondeadas del tamaño de una cabeza de alfiler.

Cultivo en medio líquido: Enturbia el medio a las 24 hs. formando sedimento que se levanta al agitar.

Cultivo en agar-sangre: no hay hemólisis.

Reacciones bioquímicas

Fermentación de los azúcares:

Maltosa ácido pero no gas

Manitol negativo

Sorbitol negativo

Dulcita negativo

Lactosa ácido con ligero desprendimiento de gas

Glucosa ácido pero no gas

Sacarosa negativo

Leche con azul de metileno al 0,1%: 24 horas de observación, no hay reducción.

Leche con azul de metileno al 0,1%: 48 de observación, principio de reducción.

Leche con azul de metileno al 0,01%: 24 horas de observación, reducción total.

Amoníaco: positivo.

Caldo pH 9,6: positivo

Caldo con ClNa 6,5%: positivo

gelatina: no licúa

Cultivo a 45°C: escaso

Una vez comprobada la intervención del estreptoco en el desprendimiento de HCN de un medio donde el fermento linaza ha sido destruido por el calor, como pasa en el caldo-líquido descripto, nos pareció que

para obtener respuestas claras, deberíamos trabajar con medios esterilizados a los efectos de destruir fermentos y bacterias. Esterilizamos a 120° durante 30 minutos, muestras de torta de lino para utilizarlas en los ensayos con las bacterias.

5 gramos de torta estéril puestos en un frasco de 50 c.c. de capacidad con el agregado de 40 c.c. de un cultivo de 24 horas del estreptococo en caldo simple son llevados a la estufa a 37°C. Como testigo se ponen un frasco con 5 gramos de torta estéril y 40 c.c. de agua y otro frasco en las mismas condiciones pero con 40 c.c. de caldo siempre estéril. La lectura a las 24 horas da reacción positiva fuerte en el frasco sembrado con la bacteria y negativa en los otros frascos. La calificación de reacción fuerte se hace de acuerdo con la interpretación dada corrientemente o también de acuerdo con la escala de Fernández basadas en los colores que dan las cantidades de H C N contenidos en 0 c.c. 1/10, 0,2 0,5, 1,2 y 4 c.c. de una solución N/1.000.

Trabajando con torta estéril se obtienen reacciones claras y regulares con cantidades menores de un gramo. Generalmente empleamos 0gr.020 (cero gramo veinte miligramos) que colocamos en un tubo de ensayo pequeño, le agregamos 1 o 2 c.c. de un cultivo de 24 horas en caldo simple, ponemos el papel picrosódico y tapa de corcho. La lectura se realiza a las 24 o 48 horas de estadía en estufa a 37°C.

El empleo de este germen proporciona siempre una respuesta positiva aún con cantidades muy pequeñas de torta haciendo desaparecer las irregularidades en las respuestas de las reacciones que se efectúan con torta sin esterilizar y agua. Estas irregularidades podrían ser explicadas, tal vez satisfactoriamente por la intervención de otros gérmenes creando un medio inapropiado a la cianogenesis.

El estudio realizado con algunas tortas parece poner de manifiesto que si bien el desprendimiento de H C N es efectuado como decimos, con regularidad, la intensidad del color sería diferente como si la aptitud o condiciones de aquel desprendimiento por el ataque del germen ofreciera variaciones de una torta a otra. También hemos notado en experiencias con 5 grs. y 30 c.c. de cultivo que a 37°C. el desprendimiento continúa durante varios días atacando progresivamente un porcentaje de glucósido que ha resistido la hidrólisis durante 48 horas primeras de la reacción.

Temperaturas de la reacción. Como decimos anteriormente la temperatura adecuada del fermento linaza para que actúe sobre el glucósido linamarina está comprendida entre 40° y 50°. El estreptococo estudiado si bien cultiva a 45°C lo hace escasamente en manifiesto contraste con las culturas a 37°. Por esta causa nosotros hasta ese momento sólo hemos controlado los resultados obtenidos con temperaturas de 37 y 42°C.

En las condiciones de experiencia ya descritas y haciendo variar solamente el factor temperatura, las reacciones son más fuertes a 42° que a 37°, diferencia apreciable aún con cantidades de 10 y 20 miligramos de torta estéril.

CONCLUSION

La probada intervención de un germen en el desdoblamiento del glucósido de la torta de lino nos obliga a considerar la intoxicación cianhídrica originada por este alimento, bajo aspectos diferentes de los considerados hasta ahora.

Siendo un germen que acompaña al alimento posiblemente desde alguna de las manipulaciones de la industrialización del grano y que además cultiva en un medio exclusivo de lino como lo decimos anteriormente, las posibilidades de su multiplicación son muchas y en consecuencia muchas también las oportunidades de actuar sobre el glucósido desprendiendo HCN. Todo lo que tienda hacia el conocimiento mejor de la actividad microbiana de la torta podrá seguramente hacer más claras las perspectivas del recorrido en el tracto gastro-intestinal y por lo tanto orientar consejos más precisos y eficientes en cuanto al aprovechamiento de este alimento.

RESUMEN

- 1) En el presente trabajo se describe la intervención de una bacteria, **estreptoco**, cuyos caracteres se detallan, en la hidrólisis del glucósido linamarina de la torta de lino, produciendo H C N.
- 2) La temperatura de la reacción es más apropiada a 42° C que a 37°.
- 3) Las pruebas hechas con torta esterilizada 30 minutos a 120° y sembradas con cultivo de la bacteria son positivas regularmente, aún con cantidades tan pequeñas como 10 o 20 miligramos.
- 4) El conocimiento de la microbiología de la torta de lino se considera necesario para ordenar un eficiente control técnico de todos los aspectos que la presencia del glucósido cianogénico plantea en relación con la alimentación animal.

Nota: Agradecemos al Dr. Luis A. Barros la colaboración prestada.

BIBLIOGRAFIA

- OGIER, J. — Toxicologie. Año 1927.
- FERNANDEZ PORLEY, Carlos M. — El Acido cianhídrico en las tortas de lino. Boletín de la Dirección de Ganadería, 1942.
- RUBINO, Migue! C., FERNANDEZ, Carlos M., y BARROS, Luis A. — Consecuencias que resultan del uso inadecuado de las tortas de lino y girasol. Boletín de la Dirección de Ganadería N° 3. Año 1945.
- SANTORO, Ricardo, Ing. Agr. — La toxicidad eventual de las tortas de lino. Apartado de la Revista de la Facultad de Agronomía, N° 22. Noviembre de 1940.
- SAREDO, Juan F. — Dosificación del ácido cianhídrico en las semillas de lino. Tercer Congreso Sudamericano de Química. Río de Janeiro - San Pablo. Julio 15 de 1937.
- NIEMES, Bernardo. — Revista de Medicina Veterinaria. Julio-Agosto 1939. B. Aires.
- VAN LAER, Marc H. — La Chimie des Fermentations. Año 1935.
- SUSAETA, J. M. — Coloides y Fermentos. Año 1927.
- HOLLEMAN, A. J. Dr. — Tratado de Química Orgánica. Año 1930.
- RIET, Julio ECHENIQUE, Luis y SANZ, Daoiz L. — Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo. Año 1937.
- HAEHN, Hugo. — Bioquímica de las fermentaciones. — Madrid 1956, pág. 187.
- CIENCIAS VETERINARIAS. — Enero-Febrero 1960. México.
- Microbiología del rumen. 66) J. J. Van der Wath. — Onderstepoort. Journal of Veterinary Science and Animal Industry 19:79, 1944.
- 67) Coop I. E. and Blakely R. L. — New Zealand Journal of Science and Technology 30:277, 1949.