

Hongos productores de Micotoxinas

Detección y control

Covadonga Vázquez, M^a Teresa González-Jaén, Jéssica Gil-Serna, María Arias, Alejandra Cruz, Rocío García-Rubio y Belén Patiño

Departamentos de Microbiología III y Genética. Universidad Complutense de Madrid

covi@ucm.es



Foto grupo. De izquierda a derecha: Jéssica Gil Serna, Covadonga Vázquez Estévez, Rocío García Rubio, Belén Patiño Álvarez, María Teresa González Jaén, María Arias Martín, Alejandra Cruz Varona.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos que habitualmente se encuentran contaminando gran variedad de productos alimentarios. Cuando las condiciones son favorables para su proliferación, los hongos se desarrollan en los alimentos y producen estos compuestos lo que supone un grave riesgo para la seguridad alimentaria. En los países desarrollados no suelen producirse intoxicaciones agudas derivadas del consumo de materias primas con altos niveles de micotoxinas. Sin embargo es frecuente su ingestión a niveles muy bajos durante periodos de tiempo prolongado lo que lleva a la aparición de efectos crónicos que se manifiestan principalmente por su acción a nivel de sistema inmunitario y el desarrollo de distintos tipos de cáncer (esófago, hígado y riñón, entre otros). La Unión Europea ha desarrollado una regulación estricta al respecto, estableciendo niveles máximos de las micotoxinas más importantes permitidos en

una gran variedad de productos para el consumo humano incluyendo cereales y derivados, uvas y derivados, café, frutos secos, especias, con especial atención a los productos infantiles (Reglamentos 1881/2006, 1126/2007, 105/2010, 165/2010).

La contaminación de los productos con micotoxinas supone, en consecuencia, elevadas pérdidas económicas cada año tanto para el sector agrícola como ganadero. Hasta el momento, no se dispone de métodos efectivos para la descontaminación de los alimentos y los lotes detectados que superan los límites marcados por la normativa tienen que ser descartados. En algunos casos, los productos se destinan a alimentación animal lo que produce enfermedad en el ganado disminuyendo su producción tanto para carne como para leche, afectando además a la reproducción animal.

El grupo de Micotoxinas de la Universidad Complutense de Madrid lleva más de quince años centrado en el estudio



Figura 1. Crecimiento de *Aspergillus parasiticus* tras 6 días de incubación en presencia de distintas concentraciones de extractos vegetales. De izquierda a derecha: Control, 10 ppm, 100 ppm, 500 ppm, 1000 ppm.

de la biología y la genética de los hongos productores de micotoxinas y desarrollando métodos para la detección y el control de estos compuestos en los alimentos. El equipo está compuesto por investigadoras de los departamentos de Microbiología III y Genética de la Facultad de Biología y dirigido por las Dras Covadonga Vázquez, María Teresa González-Jaén y Belén Patiño. Este grupo ha contado siempre con financiación (2 proyectos Europeos, 7 nacionales, 7 de la Comunidad de Madrid, 4 de la Universidad Complutense), y varios contratos con empresas (Norel, S.A., Ministerio de Defensa, estación la Marañosa). El grupo tiene numerosas colaboraciones con los principales grupos de micotoxinas y hongos toxígenos españoles y extranjeros de Universidades y Centros de investigación. Asimismo, la vertiente aplicada de varios de nuestros estudios ha propiciado la colaboración con instituciones, centros y empresas (MAGRAMA, ITACYL, IFAPA, IRTA etc). En nuestro grupo se han dirigido 8 Tesis Doctorales en este campo, las más recientes con mención europea y todos los Doctores que se han formado en nuestro grupo continúan realizando tareas de investigación contratados en diferentes organismos: Edinburgh Infectious Diseases, University of Edinburgh, University of Bern, UCM, USDA (USA), Centro de Astrobiología de Madrid, Universidad Politécnica de Madrid y Museo de Ciencias Naturales de Madrid, entre otros.

Las líneas de investigación que desarrollamos se centran en varios aspectos:

- 1. Desarrollo de métodos rápidos para la detección y cuantificación de hongos toxígenos.** La detección temprana de especies productoras de micotoxinas es imprescindible para evitar la contaminación de los alimentos con micotoxinas. La presencia de determinadas especies en las materias primas puede llevarnos a proponer medidas de control más restrictivas para impedir que éstos sean capaces de producir micotoxinas durante el procesado y el almacenamiento de los productos. En el grupo de Micotoxinas de la UCM hemos puesto a punto técnicas sensibles de detección molecular basadas en PCR para la detección e identificación de las principales especies productoras de aflatoxinas (*Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*), ocratoxina A (OTA) (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii* y

A. ochraceus), fumonisinas (*Fusarium proliferatum* y *F. verticillioides*) y tricotecenos (*F. graminearum*, *F. culmorum* y *F. equiseti*). Además, hemos desarrollado ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real que permitan no solo detectar las especies sino también cuantificar los niveles de contaminación directamente en las matrices alimentarias.

- 2. Identificación de los genes relacionados con la biosíntesis de toxinas y de factores ambientales implicados en su regulación.** El control genético de la síntesis de las micotoxinas se ha empezado a conocer recientemente en algunas especies. En este aspecto nuestro grupo ha colaborado activamente y ha desarrollado ensayos de detección y cuantificación de su expresión, se ha comprobado que la regulación de la biosíntesis de varias de las toxinas se realiza básicamente a nivel transcripcional y se han identificado factores ecofisiológicos implicados en la regulación de su síntesis.
- 3. Efecto del cambio climático sobre la capacidad toxígena de las principales especies productoras de micotoxinas.** Los cambios en los patrones climáticos están siendo muy evidentes en los últimos años. El aumento de la temperatura y la humedad afecta de manera muy significativa al crecimiento y la capacidad de producir micotoxinas de los hongos por lo que es muy importante conocer el comportamiento de las distintas especies a estos cambios para poder predecir cuál será el riesgo de contaminación en los años veni-



Figura 2. Lesión producida por *Aspergillus westerdijkiae* en uvas contaminadas sólo con hongo (izquierda) o con hongo y el agente de biocontrol *Debaryomyces hansenii* CYC 1244 (derecha).



Figura 3. Proliferación de *Aspergillus carbonarius* en uvas contaminadas artificialmente. En la foto se muestran uvas control inoculadas sólo con hongo (derecha) o con hongo y 300 ppm de extracto vegetal (izquierda).

deros. El conocimiento de factores ecofisiológicos que determinan el margen donde se producen las micotoxinas, nos permite predecir el comportamiento de cepas en relación con el cambio climático y conocer el reemplazamiento de determinadas especies. En nuestro laboratorio hemos estudiado las condiciones marginales de crecimiento y producción de micotoxinas de *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* entre otros.

4. Desarrollo de métodos de control alternativos

Evitar el desarrollo de los hongos en los productos se ha considerado siempre el método más eficaz para evitar la contaminación por micotoxinas. Tradicionalmente, para este propósito se han utilizado productos químicos fungicidas tanto en el campo como durante el almacenamiento de los alimentos. Sin embargo, en los últimos años, se ha limitado mucho el uso de estos compuestos ya que se ha visto que ocasionan graves problemas para el medio ambiente y la salud humana y se ha establecido una normativa muy estricta con respecto a su uso (Reglamentos 396/2005 y 299/2008). Por tanto, el desarrollo de métodos alternativos a estos fungicidas es muy necesario y en nuestro grupo nos hemos centrado en dos aspectos principales.

- Compuestos naturales como antifúngicos.

Hemos evaluado distintos compuestos antioxidantes y extractos naturales de plantas sobre la capacidad de crecer y producir micotoxinas en distintas especies productoras de OTA y aflatoxinas. Los resultados obtenidos han descartado la utilización de antioxidantes como aditivos alimentarios ya que únicamente son efectivos a unas concentraciones muy altas no permitidas por la normativa. Sin embargo, los extractos han mostrado una interesante capacidad antifúngica y antimicotoxígena frente a las especies.

- Control biológico.

Desde hace décadas, el uso de microorganismos antagonistas ha demostrado ser

muy efectivo para el control de hongos toxígenos. La investigación desarrollada en nuestro grupo se ha centrado en la selección de levaduras inocuas como posibles agentes de control biológico para reducir el crecimiento y la producción de micotoxinas en hongos aflatoxígenos y ocratoxígenos. En este contexto, se han seleccionado dos cepas de levaduras de las especies *Debaryomyces hansenii* y *Wickerhamomyces anomalus* que han demostrado ser efectivas ya que pueden afectar al crecimiento del hongo y reducen la concentración de OTA presente en el medio de cultivo.

PUBLICACIONES

- Gil-Serna J, Vázquez C, García Sandino F, Márquez A, González-Jaén MT y Patiño B. (2014). Evaluation of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus steynii* and *Aspergillus westerdijkiae* in green-coffee based medium under different environmental conditions. Food Res Int (en prensa).
- Mirete S, Patiño B, Jurado M, Vázquez C, y González-Jaén MT. (2013). Structural variation and dynamics of the nuclear ribosomal intergenic spacer region in key members of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Genome 56:205-213.
- Marín P, de Ory A, Cruz A, Magan N y González-Jaén MT (2013) Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. Int J Food Microbiol 165:251-258.
- Cruz A, Marín P, González-Jaén MT, Aguilar KGI y Cumagun CJR. (2013). Phylogenetic analysis, fumonisin production and pathogenicity of *Fusarium fujikuroi* strains isolated from rice in the Philippines. J Sci Food Agric 93: 3032-3039.
- Gil-Serna J, Mateo E, González-Jaén MT, Jiménez M, Vázquez C y Patiño B. (2013) Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. Food Addit Contam 30:372-380.
- Marín P, Moretti A, Ritieni A, Jurado M, Vázquez C y González-Jaén MT. (2012). Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. Food Microbiol 31: 229-237.
- Gil-Serna J, Patiño B, Cortés L, González-Jaén MT y Vázquez C. (2011) Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. Int J Food Microbiol 151:113-118.
- Mateo E, Gil-Serna J, Patiño B y Jiménez M. (2011) Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. In J Food Microbiol 149:118-126.
- Sardiñas N, Gil-Serna J, Santos L, Ramos A, González-Jaén MT, Patiño B y Vázquez C. (2011) Detection of potentially mycotoxigenic *Aspergillus* species in capsicum powder by a highly sensitive assay. Food Cont 22:1363-1366.
- Sardiñas N, Vázquez C, Gil-Serna J, González-Jaén MT y Patiño B. (2011) Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. Int J Food Microbiol 145:121-125.
- Gil-Serna J, Vázquez C, Sardiñas N, González-Jaén MT y Patiño B. (2011) Revision of ochratoxin A production capacity by the main species of *Aspergillus* section Circumdati. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. Food Cont 22:343-345.