
Evaluación mediante HPLC-MS de la capacidad de producción de Aflatoxinas y Ocratoxina A por parte de 20 cepas de Aspergillus y Penicillium aisladas de compost

Anna Cuadrench-Tripiana, Montserrat Agut* y Lluís Comellas
IQS School of Engineering, Universitat Ramon Llull.

Evaluation by means of HPLC-MS of Aflatoxins and OTA production by 20 strains of Aspergillus and Penicillium isolated from compost

Avaluació mitjançant HPLC-MS de la capacitat de producció d'Aflatoxines i Ocratoxina A per part de 20 soques d'Aspergillus i Penicillium aïllades de compost

Rebut: 26 de novembre de 2013; revisat: 19 de febrer de 2014; acceptat: 20 de febrer de 2014

RESUMEN

Este artículo aporta los resultados obtenidos tras realizar el aislamiento e identificación de los mohos presentes en muestras obtenidas en los distintos estadios de la producción de compost en dos plantas de compostaje catalanas (Blanes y Manresa), así como de muestras de compost final de distintos orígenes.

Identificados los mohos, se evalúa la capacidad de producir aflatoxinas y ocratoxina A de las cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* utilizando cromatografía HPLC-MS. Se concluye que ninguna de las cepas aisladas es capaz de producirlas.

Palabras clave: Aflatoxinas, Compost, Cromatografía HPLC-MS, Mohos, Ocratoxina A.

SUMMARY

This article describes the results obtained after the isolation and identification of the moulds present in samples obtained at different stages of the compost production process from two Catalan composting plants (Blanes and Manresa) as well as compost samples taken from other origins.

Once the moulds were identified, the main goal of the present work was to determine by means of HPLC-MS chromatography if the *Aspergillus* and *Penicillium* strains isolated from the mentioned previous samples were capable to produce aflatoxins and ochratoxin A.

None of the isolated strains demonstrated to be mycotoxicogenic.

Key Words: Aflatoxins, Compost, HPLC-MS chromatography, Moulds, Ochratoxin A.

RESUM

Aquest article aporta els resultats obtinguts després de realitzar l'aïllament i identificació de les floridures presents en mostres obtingudes en els diferents estadis de la producció de compost en dues plantes de compostatge catalanes (Blanes i Manresa), així com de mostres de compost final de diferents orígens.

Un cop identificades les floridures, s'avalua la capacitat de produir aflatoxines i ocratoxina A de les soques pertanyents als gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* utilitzant cromatografia HPLC-MS.

Es conclou que cap de les soques aïllades és capaç de produir-les.

Paraules clau: Aflatoxines, Compost, Cromatografia HPLC-MS, Floridures, Ocratoxina A.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los contaminantes orgánicos de origen natural, a los que puede estar expuesto el hombre, se encuentran las micotoxinas. Las micotoxinas son producidas por algunas cepas de hongos y su grado de toxicidad varía ampliamente en función de su estructura química [1].

Las aflatoxinas son una familia de micotoxinas con una alta toxicidad. Químicamente, son derivados de difuranocumarinas producidas principalmente por cepas del género *Aspergillus*. Como contaminantes naturales se han descrito cuatro diferentes: B₁, B₂, G₁ y G₂ [2]. Su estructura química se muestra en la Figura 1. En concreto, la aflatoxina B₁ está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer en el Grupo 1, es decir, como carcinógena para el hombre [3].

La ocratoxina A (OTA) es producida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La molécula de OTA está formada por una isocumarina clorada unida a través de un grupo carboxílico a la L-fenilalanina mediante un enlace amido. Su estructura química se muestra en la Figura 2. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer clasificó la OTA en el grupo 2B como carcinógeno renal para animales y posiblemente para los humanos [3].

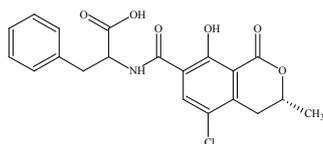


Figura 2. Estructura química de la ocratoxina A (OTA)

Tradicionalmente, la investigación de estas toxinas se ha centrado en alimentos [4] y piensos. No obstante, otros estudios indican que los alimentos pueden no ser la única fuente de exposición a estos tóxicos, contemplándose otras vías de intoxicación como puede ser la inhalación de esporas que vehiculan micotoxinas, hecho descrito en plantas de compostaje [5-7]. A raíz de estos datos, el objetivo de este trabajo es aislar e identificar los mohos presentes en diferentes muestras de compost o de muestras obtenidas durante el proceso de compostaje y, en el caso de aislar cepas pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, evaluar si éstas son capaces de producir aflatoxinas u OTA.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron un total de 18 muestras obtenidas en Cataluña: 7 muestras se tomaron en la planta de compostaje de Manresa, 6 en la planta de Blanes, 2 de compost casero en Pineda de Mar, obtenido a partir de residuos vegetales de una cocina familiar (CC final), 2 de compost procedente de residuo sólido urbano procesado en la planta CESPA de Can Barba de Terrassa (RSU final) y una de compost procedente de estiércol de caballo obtenido en un comercio especializado en productos de jardinería (CCB).

En el caso de las muestras obtenidas en la planta de Manresa, estas se tomaron en diferentes momentos del proceso de compostaje: inicio (M inicio), a mitad del túnel de compostaje (M mitad túnel), al final del túnel (M final túnel), tras 15 días de maduración (M 15 días), tras 1 mes de maduración (M 1 mes), tras dos meses de maduración (M 2 meses) y al final del proceso (M final).

En el caso de las muestras obtenidas en la planta de Blanes, se tomaron muestras equivalentes a las de Manresa, con excepción de la muestra a mitad del túnel, ya que el proceso de elaboración que siguen ambas plantas es diferente (B inicio, B final de túnel, B 15 días, B 1 mes, B 2 meses y B final).

Recuento e identificación de los mohos presentes en las muestras.

Se realizó un banco de diluciones decimales de cada muestra en solución salina estéril. A partir de cada dilución y por triplicado, se sembró por agotamiento en superficie 0,1 mL sobre placas de agar extracto de malta adicionadas con 30 ppm de clorhidrato de oxitetraciclina. Las placas se incubaron a 27°C durante una semana, se contaron las colonias y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra. Una vez desarrollados los mohos se procedió a obtener cultivos puros de cada uno de ellos en placas de agar extracto de malta y las cepas fueron identificadas a partir de las características macroscópicas de las colonias y de sus caracteres microscópicos. A continuación, se seleccionaron los pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* para evaluar su capacidad de producir aflatoxinas y ocratoxina A sobre arroz.

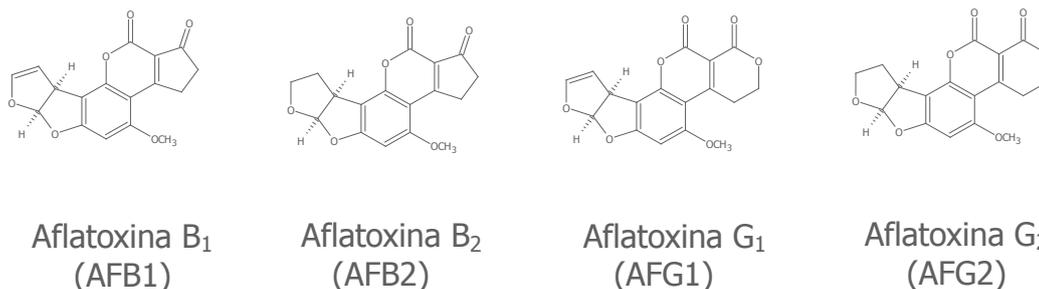


Figura 1. Estructura química de las aflatoxinas

Estudio de la capacidad micotoxigénica de las cepas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* aisladas a partir de las muestras

Inoculación y cultivo de las cepas en arroz

En un erlenmeyer de 100 mL se pesan 5 g de arroz, se le adicionan 5 mL de agua desionizada y se autoclava a 121°C durante 15 min. El arroz se inocula con 2 discos del cultivo de la cepa a evaluar obtenidos a partir de una colonia de 7 días desarrollada sobre agar extracto de malta al 2%. Este procedimiento se repite para cada hongo, según se describe en el método recomendado por la *Food and Drug Administration* (FDA) [8].

Una vez inoculados, los matraces se incuban a 27°C durante 7, 14 y 21 días. Una vez finalizado el período de incubación, se comprueba si la cepa ha producido alguna de las cinco micotoxinas de interés (aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ u OTA) mediante un método de análisis cromatográfico que permite identificarlas simultáneamente [9,10].

Como controles positivos se usan las cepas *Aspergillus parasiticus* CECT 2681 y *Aspergillus ochraceus* CECT 2948, de las cuales está descrita su capacidad de producir aflatoxinas y ocratoxina A, respectivamente, cuando crecen sobre arroz [9,11].

Reactivos y Patrones

Se dispone de patrones de las aflatoxinas B₁, G₁, B₂, G₂ y OTA (>98%). Estos productos han sido suministrados por Sigma-Aldrich, (Barcelona).

Los disolventes utilizados son metanol y acetonitrilo suministrados por VWR (West Chester, Pennsylvania).

Extracción de las micotoxinas

A partir de cada uno de los cultivos incubados de los hongos en arroz, controles y cepas a evaluar, se procede a extraer las posibles toxinas utilizando como solvente de extracción una mezcla de metanol:agua (90:10). Sobre el total de la muestra, se realizan dos extracciones sucesivas con 45 mL de solvente, se someten a agitación magnética durante 30 minutos y se filtran con papel de filtro Whatman número 3 por gravedad. Los filtrados se recogen en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con el diluyente de extracción.

Estudios realizados sobre muestras de arroz adicionadas a nivel de 2 mg/kg han demostrado que en todos los casos la recuperación de cada una de las toxinas es superior al 90%.

Preparación de muestra para inyección al cromatógrafo

Se toman 6,6 mL del extracto y se le añaden 5 mL de agua para tener un contenido del 40% en metanol. La dilución resultante se filtra a través de un filtro de nylon de 0.22 µm de tamaño de poro.

Separación cromatográfica

La separación cromatográfica de las toxinas se realiza mediante un cromatógrafo Waters Alliance 2690. La columna cromatográfica utilizada es una Waters XTerra MS C18 (2.1x100mm, 3.5 µm) a 30°C y flujo de 0,2 mL/min.

Como fase móvil se utiliza una mezcla de (A) metanol y (B) agua con un 0,1% de ácido fórmico, el cual facilita la ionización de las toxinas de interés en el espectrómetro de masas. El gradiente de elución es lineal, incrementándose del 40% A al 85% A en 6 minutos, manteniéndose isocrático

3 min y volviendo a la situación inicial en 1 min. El equilibrado de la columna, antes de una nueva inyección, es de 6 min. El tiempo total de análisis, incluyendo el acondicionamiento inicial de la columna es de 16 min. El volumen de inyección es de 10 µL.

Espectrometría de masas (ESI-MS)

La espectrometría de masas fue realizada en un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple con ionización por electrospray Waters ZMD. La inyección se realiza en modo SIR aplicando ESI positivo de 0 a 9,5 minutos donde se detectarán las aflatoxinas G₁, B₁, G₂, B₂ y ESI negativo de 9,5 a 14 minutos para la detección de la ocratoxina A. El voltaje de cono para el seguimiento del ión primario de las aflatoxinas B₁, G₁ y OTA fue de 20 V. Para el resto de los iones fue de 40 V.

Los iones primarios monitorizados fueron la molécula protonada en el caso de ESI positivo (*m/z* 313,1 para AFB₁, 329,1 para AFG₁, 315,1 para AFB₂, 331,0 para AFG₂) y desprotonada en el caso de ESI negativo (*m/z* 402,3 para OTA). Asimismo se monitorizó el aducto con sodio para las cuatro aflatoxinas (*m/z* 335,0 para AFB₁, 351,0 para AFG₁, 337,0 para AFB₂, 353,0 para AFG₂) y para la OTA, un ión secundario que corresponde a una fragmentación de la molécula (*m/z* 358,1).

Los tiempos de retención para las aflatoxinas fueron de 4,46 min para AFG₂, 5,54 min para AFG₁, 6,35 min para AFB₂, 7,09 min para AFB₁ y para la OTA 10,82 min.

Método de cuantificación

Para realizar la cuantificación de aflatoxinas y OTA en las muestras se ha realizado por el método del patrón externo. Se ha utilizado un patrón de una mezcla de las cuatro aflatoxinas y la OTA de 0,4mg/L de concentración en fase móvil, ya que se corresponde con el nivel de producción de las micotoxinas por parte de las cepas productoras control. El método es lineal entre 0,1mg/L y 0,5mg/L para las aflatoxinas G₂ y B₁ y entre 0,2mg/L y 1mg/L para las aflatoxinas G₁, B₂ y para la ocratoxina A entre 0,1 mg/L y 1mg/L.

Dada la preparación de muestra indicada, los límites de detección del método para cada una de las aflatoxinas calculado sobre muestra seca es de 0,04mg/kg para la G₂, 0,07 mg/kg para la G₁, 0,07mg/kg para la B₂, 0,04mg/kg para la B₁ y 0,06mg/kg para la OTA.

3. RESULTADOS

Resultados del recuento de hongos

Los resultados obtenidos tras realizar el recuento del número de unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g) se detallan en la Tabla 1. A partir de los datos obtenidos de las muestras recogidas durante el proceso de compostaje de las plantas de Blanes y Manresa, se observa que el número de mohos disminuye desde el inicio del proceso hasta llegar a la maduración, momento en el que su número aumenta hasta niveles alrededor de 10⁶ UFC/g. El compost procedente de heces de caballo es el que presenta valores de recuento más bajos, posiblemente debido a que el producto se obtuvo envasado, previniendo la recontaminación de origen ambiental. El compost case-ro es el que presentó unos valores más elevados, siendo intermedios los de los compost procedentes de residuos urbanos.

Tabla 1. Resultados del recuento de mohos en las muestras de compost.

(M: Muestras procedentes de la depuradora de Manresa; B: Muestras procedentes de la depuradora de Blanes; C C: compost casero; RSU: Muestras procedentes de la planta de compostaje de residuos sólidos urbanos; CCB: Compost de estiércol de caballo)

| Muestra | Media (Ufc / g) | Desviación estándar (%) |
|---------------|------------------------|-------------------------|
| M inicio | 1.1 x 10 ⁷ | 14,14 |
| M mitad túnel | 3.0 x 10 ⁵ | 10,6 |
| M final túnel | 5.1 x 10 ⁴ | 4,94 |
| M 15 días | 9.5 x 10 ³ | 0,7 |
| M 1 mes | 2.7 x 10 ⁴ | 3,53 |
| M 2 meses | 6.8 x 10 ⁵ | 2,82 |
| M final | 8.0 x 10 ⁵ | 12,02 |
| B inicio | 3.2 x 10 ⁵ | 9,19 |
| B final túnel | 2.4 x 10 ⁴ | 8,48 |
| B 15 días | 4.4 x 10 ⁵ | 7,77 |
| B 1 mes | 8.1 x 10 ⁵ | 11,31 |
| B 2 meses | 8.2 x 10 ⁵ | 10,6 |
| B final | 1.5 x 10 ⁶ | 7,77 |
| C C 1 | >10 ⁸ | --- |
| C C 2 | >10 ⁸ | --- |
| RSU 1 | 6,35 x 10 ³ | 4,94 |
| RSU 2 | 1,35 x 10 ⁴ | 9,19 |
| CCB | <10 | --- |

Resultados de la identificación de los hongos aislados de las muestras

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos tras la identificación de los mohos aislados. Para cada género, se aporta un dibujo de su aspecto microscópico y se detalla a partir de qué muestras fueron aislados. En total, se han aislado mohos de 12 géneros diferentes estando todos ellos ampliamente descritos como contaminantes ambientales. En concreto, del género *Aspergillus* se aislaron 15 cepas y 5 cepas del género *Penicillium*.

Resultados de la evaluación de la capacidad micotoxigénica de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* aisladas a partir de las muestras

Tras realizarse el estudio sobre la capacidad de producción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y de OTA, de acuerdo con el método y criterio establecido por la FDA [8] para considerar una cepa como productora de micotoxinas, se puede asegurar que ninguna de las cepas aisladas de las muestras de compost es aflatoxigénica o productora de OTA. En los ensayos control realizados con las cepas obtenidas a partir de la Colección Española de cultivos Tipo, *A. parasiticus* CECT 2681 y *A. ochraceus* CECT 2948, si se demostró la producción de los metabolitos en estudio, como era de esperar.

En la Figura 3, se aportan los cromatogramas obtenidos tras la inyección de un patrón de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y OTA de una concentración de 0,4 mg/l en disolución de cada una de las toxinas. Puede observarse que el método permite identificar las cinco micotoxinas de forma simultánea.

La Figuras 4 y 5, respectivamente, corresponden a los cromatogramas que demuestran la producción de aflatoxinas por la cepa *A. parasiticus* CECT 2681 y de OTA por *A. ochraceus* CECT 2948 después de ser incubadas 7, 14 y 21 días en arroz a 27°C

Una vez puesto a punto el método analítico y comprobado con él la producción de los analitos con las cepas

de los mohos control, se procedió a realizar por triplicado las incubaciones en arroz de cada una de las 20 cepas aisladas e identificadas dentro de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En ninguno de los experimentos se detectó la formación de las aflatoxinas y OTA por encima de 1mg/kg. Este resultado concuerda con el dato publicado por Navajas *et al.* [10]. En aquel trabajo, los autores afirman no detectar ni aflatoxinas ni OTA en muestras de compost analizadas mediante HPLC-MS; este resultado es coherente con el hecho de que como se ha demostrado en este trabajo, ni siquiera en las condiciones más favorables, como incubando los hongos sobre arroz, las cepas no han demostrado capacidad micotoxigénica.

Tabla 2. Géneros de mohos aislados.

(M: Muestras procedentes de la depuradora de Manresa; B: Muestras procedentes de la depuradora de Blanes; C C: compost casero; RSU: Muestras procedentes de la planta de compostaje de residuos sólidos urbanos; CCB: Compost de estiércol de caballo).

| Género | Muestras | Género | Muestras | Género | Muestras |
|---------------------|---|-------------------|-----------------------------------|---------------------|---|
| <i>Acromonium</i> | M 1 mes B final túnel B 15 días B 2 meses B final CC 1 C C 2 RSU 1 RSU 2 CCB | <i>Absidia</i> | M inicio M 2 meses B inicio | <i>Aspergillus</i> | M inicio M mitad túnel M final túnel M 2 meses M final B inicio B final túnel B final CC 1 C C 2 |
| <i>Cladosporium</i> | M 2 meses CC 1 | <i>Fusarium</i> | M inicio CC 1 | <i>Geotrichum</i> | M inicio B inicio |
| <i>Mucor</i> | M inicio M15 días M 2 meses B inicio B 2 meses B final RSU 1 RSU 2 C C 2 | <i>Nigrospora</i> | CC 1 | <i>Paecilomyces</i> | CC 1 |
| <i>Penicillium</i> | M inicio M 2 meses M final B inicio CC 1 | <i>Periconia</i> | M final | <i>Rhizopus</i> | M inicio M final túnel M15 días M final |

4. CONCLUSIONES

En el trabajo se han aislado mohos de muestras de compost final u obtenidas durante el proceso de compostaje pertenecientes a diferentes géneros contaminantes ambientales habituales. Después de aplicar el método y criterio establecido por la FDA [8] para identificar cepas micotoxigénicas, se puede afirmar que ninguna de las cepas identificadas dentro de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* es capaz de producir aflatoxinas u ocratoxina A.

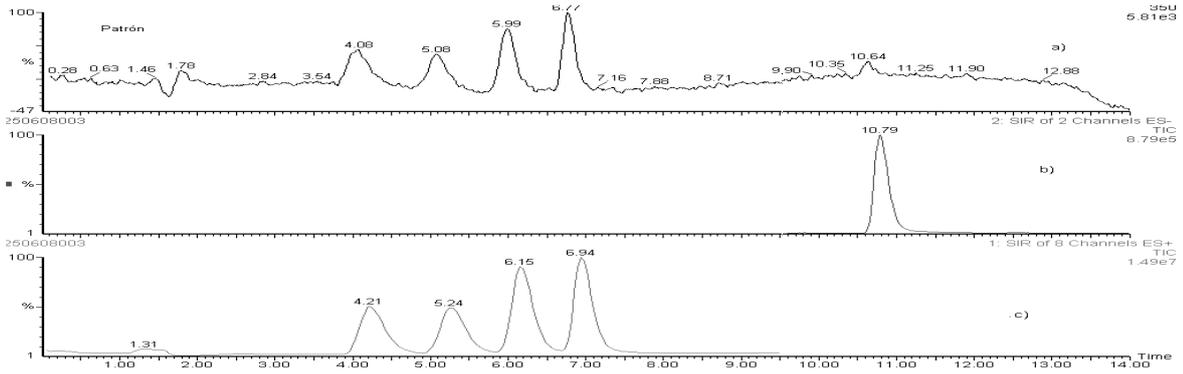


Figura 3. Cromatogramas del patrón de las toxinas. El orden de elución es aflatoxina G₂, G₁, B₂, B₁, y OTA. a) Cromatograma en modo SIR negativo; b) Cromatograma en modo SIR positivo.

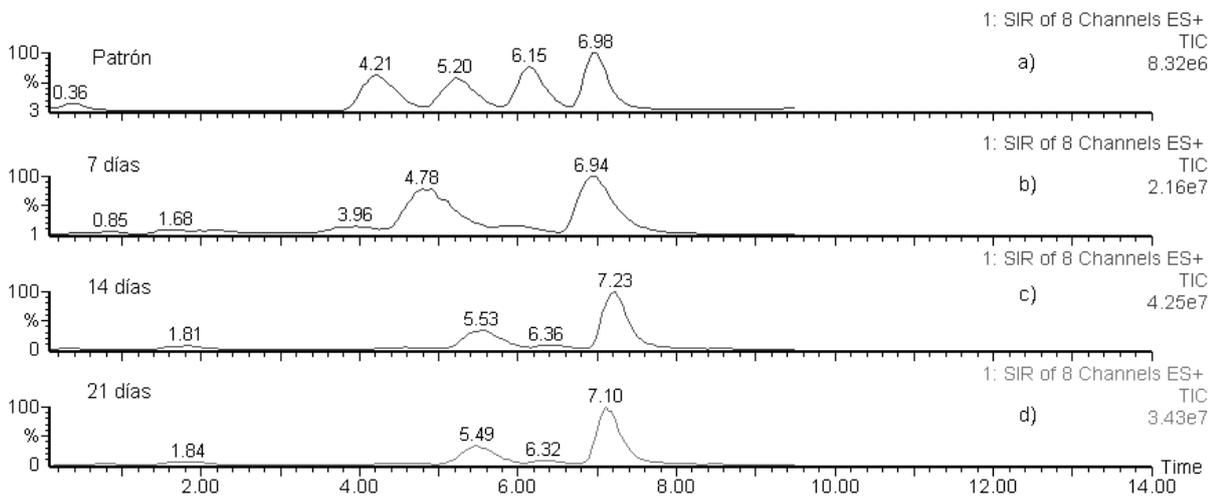


Figura 4. Cromatograma en modo SIR positivo de la evaluación de la cepa *A. parasiticus* CECT 2681 (a) Cromatograma del patrón de concentración 0,4mg/l. (b) (c) (d) Cromatogramas del extracto de cultivo de la cepa control tras 7, 14 y 21 días de incubación en arroz a 27°C.

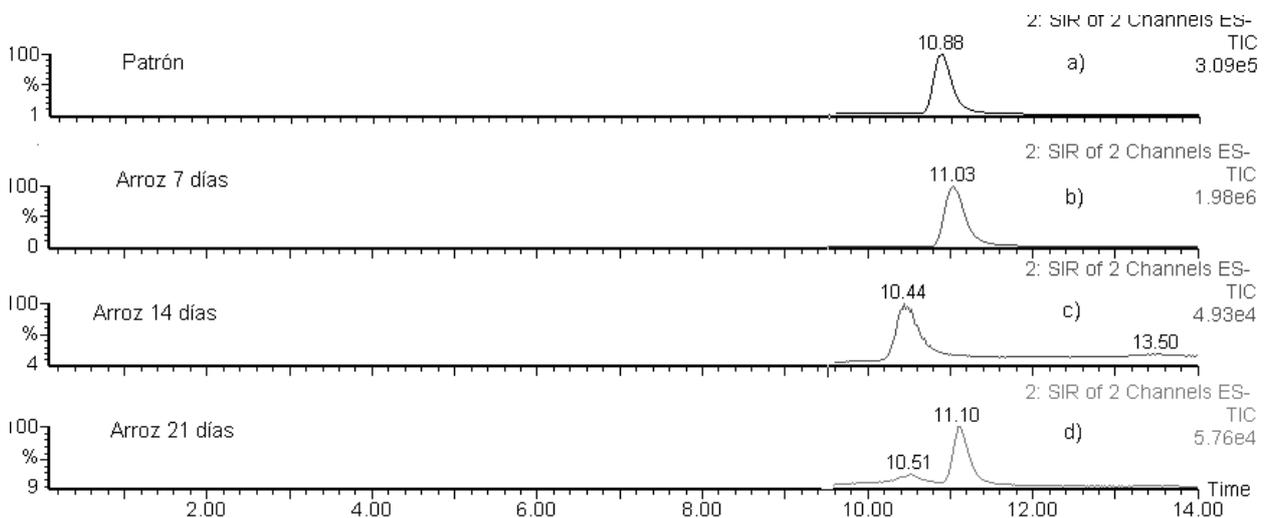


Figura 5. (a) Cromatograma en modo Sir- de un patrón de OTA A de concentración 0,4 mg/l, (b),(c),(d) Cromatogramas en modo Sir- del extracto de cultivo de la cepa control positivo *A. ochraceus* CECT 2948 incubada durante 7, 14 y 21 días en arroz a 27°C.

5. REFERENCIAS

1. M. Weidenbörner. Encyclopedia of Food Mycotoxins. Ed. Springer, Alemania, 2001.
2. Juan C, Zinedineb A, Montóia JC, Idrissib L, Mañesa J. *Food Control* (2007); **19**: 849.
3. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 56, Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993.
4. Alfaro C, Broto-Puig F, Agut M, Comellas L. *Afinidad* (2013); **563**: 171-174.
5. Déportes I, SKrivobok S, Seigle-Murandi F, Zmirou D. *Agric. Food Chem* (1997); **45**: 2788-2792.
6. Recer GM, Browne ML, Horn EG, Hill KM, Boehler WF. *Aerobiologia* (2001); **17**: 99-108.
7. Bloom E, Bal K, Nyman E, Must A, Larsson L. *Appl. Environ. Microb.* (2007); **73**: 4211-4217.
8. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual. USA, 1998.
9. Ventura M, Gómez A, Anaya I, Díaz J, Broto-Puig F, Agut M, Comellas L. *J. Chromat. A* (2004); **1048**: 25-29.
10. Navajas H, Broto-Puig F, Agut M, Comellas L. *Afinidad* (2010); **546**: 94-99
11. Agut M, Comellas L, Fernandez-Ruano L, Ventura M. *Afinidad* (2005); **62**: 363-372