

Figura 2. Colonias de *Aspergillus parasiticus* (izquierda) y *Aspergillus flavus* (derecha) en medio de cultivo (Fotografía de Themis J. Michailides)

Contaminación de aflatoxinas en frutos secos: un problema emergente

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos de suelo del género *Aspergillus*, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*. Por su alta toxicidad, están reguladas en numerosos alimentos para consumo humano y animal. Ambas especies crecen sobre restos de material vegetal produciendo un gran número de conidios aerovagantes que pueden colonizar y contaminar diferentes cultivos como maíz, cacahuete, algodón y frutos secos, entre otros. La contaminación por aflatoxinas en almendro y pistachero, sus causas y control, han sido intensamente estudiados en California en los últimos 25 años. En España, la situación es menos conocida y está siendo abordada en el marco de dos proyectos de investigación entre la Universidad de Córdoba y la Universidad de California, Davis. Aquí, revisamos la importancia actual, la etiología, biología, y control de esta problemática en los frutos secos españoles.

Palabras clave: Aflatoxinas, *Aspergillus* spp., frutos secos, biocontrol.

**M. Teresa García-López^{1,2},
Ramón Jaime²,
Boris Camiletti³,
Alejandro Ortega-
Beltrán⁴,
Themis J. Michailides^{2*} y
Juan Morall^{2**}**

¹ Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales.

² Kearney Agricultural Research and Extension Center, University of California-Davis.

³ Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba - CONICET, Argentina.

⁴ International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria.

* tjmichailides@ucanr.edu

** juanmorallmoral@yahoo.es

La especie *A. flavus* produce aflatoxinas B₁ y B₂, mientras que *A. parasiticus* puede producir, además, aflatoxinas G₁ y G₂. Debido a ello, en California (EE UU), el porcentaje de muestras de pistacho que sobrepasan el umbral de 15 µg/kg a causa de la infección por *A. parasiticus* son frecuentemente mayores que los causados por *A. flavus* (Figura 1). La aflatoxina B₁ es uno de los cancerígenos más potentes conocidos y está regulada en la Unión Europea independientemente del conjunto de éstas. En Europa, la European Food Safety Authority (EFSA) establece límites más restrictivos al respecto que otros mercados, que siguen con frecuencia la normativa norteamericana establecida por la Food and Drug Administration (FDA). En el caso de los frutos secos, mientras que en la Unión Europea los límites máximos son de 8 y 10 µg/kg para la aflatoxina B₁ y el conjunto de aflatoxinas, respectivamente, en los Estados Unidos solo está establecido el límite máximo de aflatoxinas totales en 20 µg/kg. Además, *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden causar infecciones en animales e insectos, comportándose como patógenos. En humanos, son predominantemente patógenos oportunistas de pacientes con el sistema inmune debilitado.

California, líder mundial en la producción de almendra y pistacho, exporta el 70% de la producción de estos frutos secos a mercados como el de Europa y Asia. En los últimos cinco años, la presencia de aflatoxinas con concentraciones superiores a los límites establecidos en la Unión Europea ha provocado el rechazo de 69 partidas de pistacho y 20 de almendra procedentes de Estados Unidos según el Rapid Alert System for Food and Feed Safety (RASFF, 2018). Dado el elevado impacto de la contaminación por aflatoxinas sobre el sector de los frutos secos en este Estado, a mediados de los noventa, el grupo del Profesor Themis J. Michailides (Kearney Agricultural Research and Extension Center/University of California-Davis) inició una línea de investigación sobre la epidemiología y control de aflatoxinas en frutos secos.

España es uno de los principales productores de frutos secos de Europa,

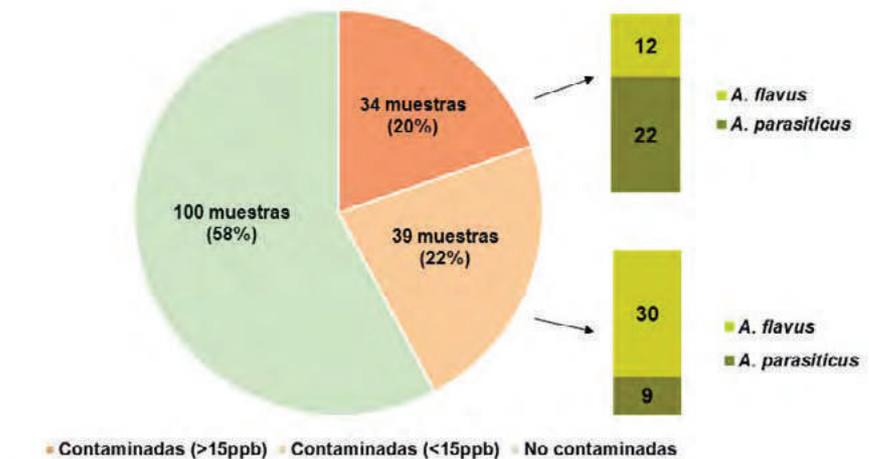


Figura 1. Distribución de contaminación con aflatoxinas de muestras comerciales de pistacho en California.

destacando los cultivos del almendro (633.562 ha), castaño (36.451 ha), avellano (20.415 ha) y pistachero (12.806 ha) (MAGRAMA, 2017). En los últimos cinco años, también se han producido rechazos de seis partidas de almendra y una de pistacho de origen español por traspasar los límites de concentración de aflatoxinas propuestos por la EFSA (RASFF, 2018). Tradicionalmente, el riesgo de contaminación de la almendra española por aflatoxinas se ha considerado bajo, principalmente por el predominio de los cultivares de cáscara dura y el tipo de recogida, durante la cual el fruto no entra en contacto directo con el suelo. Sin embargo, la elevada temperatura y la baja pluviometría característica de muchas zonas productoras de España favorecen la esporulación y dispersión de los hongos productores de aflatoxinas. Aun así, los estudios en nuestro país abordando este reto son todavía escasos. Aquí revisamos los conocimientos actuales sobre la contaminación de aflatoxinas en almendras y pistachos y su control.

Ecología y epidemiología

Las especies de *Aspergillus* se consideran cosmopolitas, aunque son más frecuentes en las regiones tropicales y subtropicales, particularmente en latitudes entre 26-35°. En campo, *A. flavus* y *A. parasiticus* comúnmente colonizan material vegetal en descomposición que queda en el suelo, como restos de hojas y

frutos o plantas adventicias, estando involucradas en el ciclo de los nutrientes en el suelo (Figura 2). En California, por ejemplo, más de un 30% de las inflorescencias masculinas de pistachero que caen al suelo son colonizadas por alguna de estas especies, donde *A. flavus* suele ser más común que *A. parasiticus*. Además, se ha detectado una tercera especie productora de aflatoxinas, *A. nominus*, pero con escasa ocurrencia (Michailides y col., 2016). La población de *A. flavus* muestra una elevada heterogeneidad y puede dividirse en función de la compatibilidad vegetativa, tipo de esclerocios y capacidad para producir toxinas, etcétera. Así, una población determinada de *A. flavus* puede estar formada por aislados productores de una o varias toxinas (ejemplo aflatoxinas y ácido ciclopiazónico) y aislados sin la capacidad de producir toxinas, denominados atóxicos (Camiletti y col., 2018). Defectos en uno o más de los genes necesarios para sintetizar aflatoxinas resultan en la incapacidad de producirlas (Donner, 2009). Además, aislados de *A. niger* (u otras especies pertenecientes a la sección Nigri) también pueden colonizar almendras o pistachos causando una podredumbre negra de aspecto pulverulento y, aunque no producen aflatoxinas, pueden contaminar los frutos con ocratoxinas (Figura 3).

Los aislados de *A. flavus* pueden producir esclerocios, estructura que permite al patógeno sobrevivir en el



Figura 3. *Aspergillus flavus* y *A. niger* colonizando el grano de una almendra (Fotografía de Themis J. Michailides).

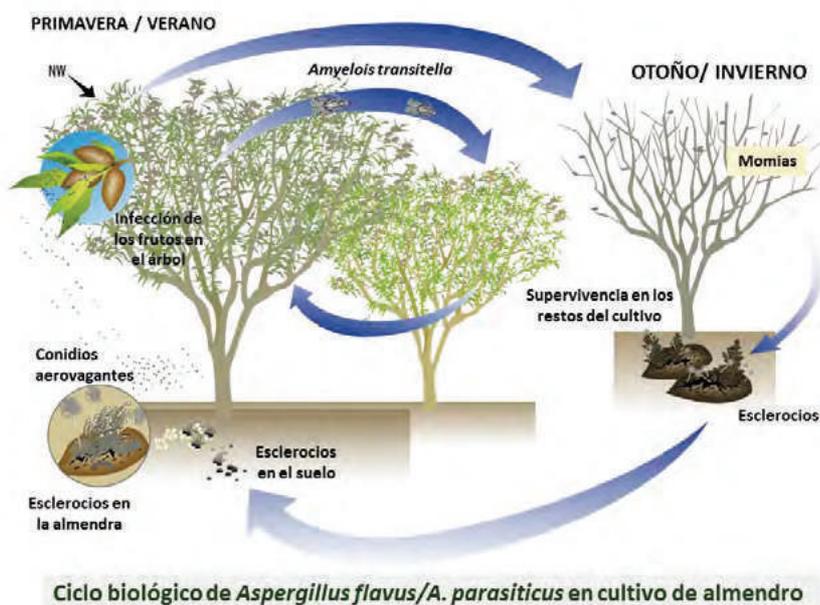


Figura 4. Ciclo biológico de las especies *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* afectando almendro en California (dibujos realizados por Gwen Conville basados en el ciclo biológico propuesto por Themis J. Michailides).

suelo en ausencia de restos vegetales que colonizar. Según su diámetro, los aislados se pueden clasificar en dos morfotipos, los que producen esclerocios grandes, tipo L (>400 µm, 'Large'), y los que los producen pequeños, tipo S (<400 µm, 'Small'). La mayor parte de los aislados del tipo S son tóxicos, mientras que la relación de aislados tóxicos/atóxicos del grupo L varía según las diferentes regiones agroecológicas (Perrone y col., 2014).

Sobre los restos colonizados, o sobre los esclerocios, *A. flavus* y *A. parasiticus* producen una gran cantidad de esporas unicelulares de colores claros sobre conidióforos, hifas especializadas, para su dispersión a través del aire (o insectos) hasta los tejidos a colonizar (Figura 4). En regiones con clima mediterráneo, las esporas de *Aspergillus* spp. en el aire pueden detectarse a lo largo de todo el año, produciéndose un pico máximo durante el verano, favorecido por las prácticas

culturales de manejo como el laboreo, que levantan partículas de polvo (Ortega-Beltrán y col., 2018).

En el caso de almendro y pistachero, el patógeno no tiene capacidad de alcanzar y colonizar la semilla de los frutos intactos ya que el mesocarpo (incluido el exocarpo) y el endocarpo (cáscara) suponen una barrera eficaz. Sin embargo, la rotura de estas barreras por motivos bióticos o abióticos expone la semilla a la colonización por el patógeno. Así, la contaminación de pistachos con aflatoxinas en California está altamente condicionada por la presencia de la polilla de la naranja navel (*Amyelois transitella*), un insecto lepidóptero cuyas larvas realizan galerías en las cubiertas del fruto, y por el porcentaje de frutos que muestran apertura prematura de la cáscara durante el verano (*Early Split*). En general, el porcentaje de pistachos prematuramente abiertos alcanza el 2%-5% dependiendo de la variedad y patrón utilizado. Ambos factores de riesgo suponen aproximadamente el 98% del total de frutos contaminados con aflatoxinas (Doster y Michailides, 1994). En California, como ocurre en pistachero, *Aspergillus* spp. alcanza la semilla de almendro aprovechando las galerías causadas por la polilla de la naranja, o bien, a través de las aperturas naturales de la cáscara, lo cual depende del tipo de cultivar (cáscara dura, semi-blanda, blanda-papel). La ausencia de esta importante plaga en la Cuenca Mediterránea disminuye el riesgo de contaminación de ambos frutos secos, aunque existen otros insectos nativos (*Ectomyelois ceratoniae* o *Palumbina guerinii*) que pueden participar en la contaminación por aflatoxinas. En California, el riesgo de contaminación con aflatoxinas de los pistachos suele ser mayor que el de las almendras, oscilando entre 1:5000 (contaminados:sanos) durante los años de descarga y 1:20000 para los años de carga en pistacho y entre 1:25000 y 1:35000 en el caso de la almendra (Mahoney y Rodríguez, 1996; Michailides y col., 2016). En Estados Unidos, las almendras se tiran mediante vibradores y se dejan secar directamente en el suelo para posteriormente ser recogidas por barrido. El proceso de secado en el suelo podría suponer

una práctica de riesgo. Sin embargo, no se ha identificado como tal, posiblemente debido al corto periodo de tiempo que están las almendras en el suelo, una semana, insuficiente para que se produzca contaminación de la semilla con aflatoxinas. Una vez recogido el fruto, la contaminación en poscosecha suele ser muy limitada si el fruto se mantiene seco.

Los aislados de *A. flavus* difieren en la cantidad de aflatoxinas que son capaces de producir, así como en las condiciones óptimas para su producción. Las colonias de *A. flavus* se desarrollan a temperaturas entre 19 °C y 35 °C, mientras que el óptimo para la producción de aflatoxinas oscila entre 24 y 28 °C (Northolt y col., 1977). La humedad del fruto ejerce un efecto muy marcado en el desarrollo fúngico y en la producción de aflatoxinas por *A. flavus*. Una actividad de agua reducida (<0.95) y una temperatura baja o moderada (<24 °C), salvando excepciones, inhiben la producción de aflatoxinas, aunque el hongo presente cierto desarrollo (Holmquist y col., 1983). El incremento de las temperaturas derivado del cambio climático aumenta el riesgo de contaminación de aflatoxinas en los productos agrícolas ya que las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus* son favorecidas por el clima seco y cálido. Además, el incremento de la temperatura muestra asociación con un incremento de las poblaciones de *A. flavus* del tipo S, más tóxicas que las del tipo L (Cotty y Jaime-García, 2007).

Control

El control de la contaminación por aflatoxinas debe basarse en minimizar el número de frutos susceptibles a la colonización por el patógeno, disminuyendo el daño por insectos y reduciendo el porcentaje de frutos con apertura prematura de la cáscara. En California, debido a la asociación entre la polilla de la naranja y la contaminación por aflatoxinas, el control de las poblaciones de esta plaga es esencial (Palumbo y col., 2014). Por ejemplo, una de las prácticas más efectivas consiste en adelantar la recolección a fin de evitar los daños causados por la tercera generación de la polilla de la naranja. En España, habrá que prestar especial

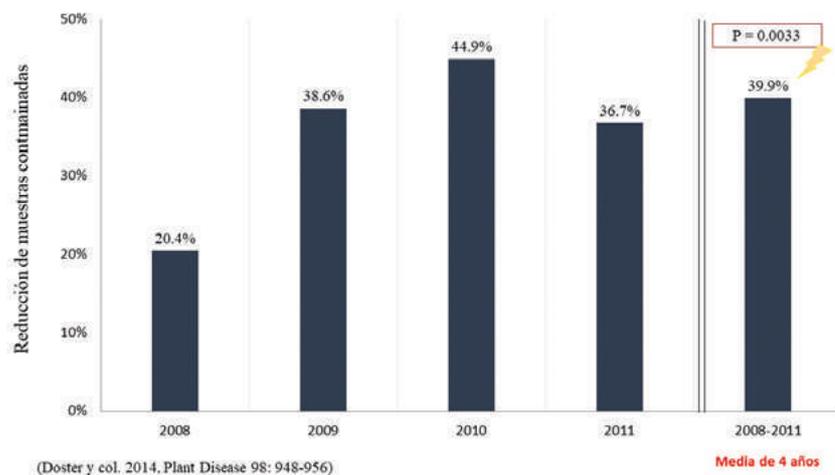


Figura 5. Porcentaje de reducción de contaminación de aflatoxinas en campos de pistachero tratados con el agente de biocontrol AF36 (Doster y col., 2014).

atención a aquellos lepidópteros capaces de realizar galerías en el fruto, facilitando la colonización por parte del patógeno. Por otro lado, para disminuir el porcentaje de pistachos prematuramente abiertos se debe evitar el estrés hídrico de la planta durante primavera. El tipo de patrón también influye, hemos observado que el cultivar Kerman produce mayor número de pistachos prematuramente abiertos cuando es injertado sobre *P. atlantica* que cuando lo es sobre UCB1 (Michailides y col., 2016). En el caso del almendro, por el momento, hemos detectado diferencias importantes entre cultivares cuyos granos fueron inoculados directamente con una suspensión de esporas del patógeno; sin embargo, el efecto del tipo de cáscara no parece claro. En poscosecha, deben descartarse los frutos que sean susceptibles de haber sido colonizados por el patógeno (prematuramente abiertos, con el mesocarpio adherido o arrugado, etc.). Finalmente, la industria ha usado distintos métodos para reducir la presencia de aflatoxinas en alimentos contaminados, por ejemplo, el tostado de pistachos en presencia de zumo de limón o ácido cítrico destruye el 90% de aflatoxina B₁ (Rastegar y col., 2016).

Mención especial merece el control biológico mediante cepas atóxicas de *A. flavus*. Este método es ampliamente usado en Estados Unidos, para la protección del maíz, algodón y cacahuate y, más recientemente,

pistachero, almendro e higuera (Doster y col., 2014); en diversos países de África, para la protección del maíz y cacahuate (Bandyopadhyay y col., 2016); y en Italia, para proteger maíz (Mauro y col. 2018). Dada la escasa eficacia del control químico frente a los aislados tóxicos de *Aspergillus*, en California, los esfuerzos se han centrado en el biocontrol mediante la utilización de cepas atóxicas de *A. flavus*. Este método consiste en la liberación de cepas atóxicas endémicas, cambiando la proporción esporas tóxicas/no tóxicas e incrementando la probabilidad de que los frutos susceptibles sean colonizados por esporas del agente de biocontrol (Doster y col., 2014). Aunque numerosas cepas atóxicas de *A. flavus* han sido descritas por su escasa producción de aflatoxinas, sólo la cepa AF36 se ha registrado para su uso en plantaciones de almendro y pistachero en California. La aplicación en campo se realiza mediante semillas de sorgo recubiertas por las esporas de AF36. En los experimentos realizados por el grupo del Profesor T. J. Michailides, la aplicación anual de la cepa de biocontrol AF36 (10 kg/ha de producto comercial 'Prevail') a principios de verano reduce a la mitad el número de muestras de pistachero en las que se detectaban aflatoxinas cuando se comparan campos tratados y no tratados, 20,4% y 44,9% respectivamente. Además, la aplicación del agente de biocontrol reduce la can-

tividad de aflatoxina entre un 20% y un 45%, dependiendo del año, con una reducción media del 40% para el conjunto de los años (2008-2011) estudiados (Figura 5). Actualmente, trabajamos para selección de nuevas cepas atóxicas que a medio plazo puedan usarse combinadas con la ya registrada AF36, buscando un efecto sinérgico de estas combinaciones.

En California, la viabilidad económica de ambos cultivos depende fuertemente de los niveles de aflatoxinas en los frutos comercializados. El registro de la cepa AF36 para su uso en frutos secos en California ha supuesto un enorme beneficio para enfrentar este reto. En España, son necesarios aún más trabajos para identificar los factores de riesgo asociados a la población de *Aspergillus* spp., la influencia del ambiente y los cultivares utilizados. Como en otros

países, la selección y registro de cepas nativas atóxicas de *A. flavus* puede suponer un gran beneficio para la industria nacional.

Abstract

Aflatoxins are mycotoxins produced by soil-borne fungi belonging to the *Aspergillus* genus, mainly *A. flavus* and *A. parasiticus*. The levels of these toxins are regulated on several marketable foods and feeds worldwide due to their high toxicity. Under field conditions, both species grow on decomposing plant matter and produce high numbers of conidia able to infect and thereby, contaminate a variety of crops, such as maize, peanut, cotton, and nuts with aflatoxins. During the last 25 years, the aflatoxin contamination process in almond and pistachio, and their causes and control methods, have been inten-

sively studied in California. In Spain, this concern is less well understood and is being addressed by two joint research projects among the University of Cordoba and the University of California, Davis. In this article, the current state of knowledge of the importance, etiology, biology and control of aflatoxins in Spanish nut crops is reviewed.

Key words: Aflatoxins, *Aspergillus* spp., nut crops, biocontrol.

Agradecimientos: Agradecemos al Pistachio Board of California y al Almond Board of California la financiación de los trabajos de investigación presentada. Juan Moral tiene un proyecto Marie Skłodowska Curie GF financiado por la Unión Europea (Nº 658579). M. T. García realiza su Tesis Doctoral en la UCO/UC-Davis sobre control biológico de aflatoxinas.

Bibliografía

- !** Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A., Akande, A., Mutege, C., Atehnkeng, J., Kaptoge, L., y Cotty, P. J., 2016. Biological control of aflatoxins in Africa: current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin Journal*, 9(5): 771-789.
- Camiletti, B. X., Moral, J., Torrico, A. K., Asensio, C. M., Gimenez Pecci, M. D. L. P., Lucini, E. I. y Michailides, T. J., 2017. Characterization of an *Aspergillus flavus* population from Argentina and its potential use as biocontrol agents for mycotoxins in maize. *Phytopathology*, 107(12): 26-26.
- Cotty, P. J., y Jaime-García, R., 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International journal of food microbiology*, 119(1-2): 109-115.
- Donner, M., Atehnkeng, J., Sikora, R. A., Bandyopadhyay, R. y Cotty, P. J., 2009. Distribution of *Aspergillus* section Flavi in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(1): 37-44.
- Doster, M. A. y Michailides, T. J., 1994. *Aspergillus* molds and aflatoxins in pistachio nuts in California. *Phytopathology*, 84(6): 583-590.
- Doster, M. A., Cotty, P. J., y Michailides, T. J., 2014. Evaluation of the atoxigenic *Aspergillus flavus* strain AF36 in pistachio orchards. *Plant Disease*, 98(7): 948-956.
- Holmquist, G. U., Walker, H. W., y Stahr, H. M. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Food Sci.* 48:778-782
- MAGRAMA, Anuario de Estadística, 2017.
- Mahoney, N. E. y Rodriguez, S. B., 1996. Aflatoxin variability in pistachios. *Applied and environmental microbiology*, 62(4): 1197-1202.
- Mauro, A., Garcia-Cela, E., Pietri, A., Cotty, P. J., y Battilani, P., 2018. Biological control products for aflatoxin prevention in Italy: Commercial field evaluation of atoxigenic *Aspergillus flavus* active ingredients. *Toxins*, 10: 30.
- Michailides, T. J., Morgan, D. P., y Doster, M. A., 2016. Foliar, Fruit, and Branch Diseases. Páginas 265-291 *Pistachio Production Manual*. Ferguson, L. (Ed.). Center for Fruit and Nut Research and Information, Davis.
- Northolt, M. D., Egmond, H. P., y Paulsch, W. E. 1977. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and Aflatoxin B₁ production in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.* 40:778-781.
- Ortega-Beltran, A., Moral, J., Puckett, R. D., Morgan, D. P., Cotty, P. J., y Michailides, T. J., 2018. Fungal communities associated with almond throughout crop development: Implications for aflatoxin biocontrol management in California. *PLoS one*, 13(6), e0199127.
- Palumbo, J. D., Mahoney, N. E., Light, D. M., Siegel, J., Puckett, R. D., y Michailides, T. J. (2014). Spread of *Aspergillus flavus* by navel orangeworm (*Amyelois transitella*) on almond. *Plant Disease*, 98: 1194-1199.
- Perrone, G., Gallo, A., y Logrieco, A. F. 2014. Biodiversity of *Aspergillus* section Flavi in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. *Front. Microbiol.* 5:1-5.
- RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed, 2018. European Commission.
- Rastegar, H., Shoeibi, S., Yazdanpanah, H., Amirahmadi, M., Khaneghah, A. M., Campagnollo, F. B., y Sant'Ana, A. S., 2017. Removal of aflatoxin B₁ by roasting with lemon juice and/or citric acid in contaminated pistachio nuts. *Food control*, 71: 279-284.
- Richard, J. L. 2008. Discovery of aflatoxins and significant historical features. *Toxin Rev.* 27:171-201