



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Department of Microbiology and Ecology  
Doctorate programme of Microbiology**

DOCTORAL THESIS

**EMERGING FUNGI AND MYCOTOXINS IN  
CROPS IN THE FRAMEWORK OF CLIMATIC  
CHANGE. DESIGN OF STRATEGIES FOR  
THEIR PREVENTION AND CONTROL**

MEMORY FOR OPTING FOR THE DEGREE OF DOCTOR  
PRESENTED BY  
**Eva María Mateo Jiménez**

DIRECTED BY  
Professor: **Misericordia Jiménez Escamilla**

Valencia, 2015





VNIVERSITATIS VALÈNCIA

**Departamento de Microbiología y Ecología  
Programa de doctorado de Microbiología**

TESIS DOCTORAL

**HONGOS Y MICOTOXINAS EMERGENTES  
EN COSECHAS AGRICOLAS EN EL MARCO  
DEL CAMBIO CLIMÁTICO. DISEÑO DE  
ESTRATEGIAS PARA SU PREVENCIÓN Y  
CONTROL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA  
POR  
**Eva María Mateo Jiménez**

DIRIGIDA POR  
**Dra. Misericordia Jiménez Escamilla**

Valencia, 2015





# VNIVERSITATIS VALÈNCIAE

La Dra. Misericordia Jiménez Escamilla, Catedrática del Departamento de Microbiología y Ecología, de la Universidad de Valencia, como directora de la Tesis Doctoral **“Hongos y micotoxinas emergentes en cosechas agrícolas en el marco del cambio climático. Diseño de estrategias para su prevención y control”** realizada por Eva María Mateo Jiménez, autoriza la lectura y defensa de la misma.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma la presente en Valencia, en febrero de 2015.

Prof. Misericordia Jiménez



A mis padres y  
a mi hermano





## Agradecimientos

---

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a aquellas personas que me han acompañado y ayudado, directa o indirectamente, en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, gracias a la directora de la Tesis, la profesora Misericordia Jiménez, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo lo que me ha enseñado, confiar en mí y facilitarme la asistencia a congresos y estancias en el extranjero que tanto han contribuido a mi formación. Por todo el esfuerzo y el tiempo que me ha dedicado y sus constantes palabras de ánimo que me han guiado en los buenos y en los malos momentos.

A los profesores miembros del grupo de investigación, al profesor Rufino Mateo, por su apoyo, ayuda, y excelentes explicaciones para aclarar mis dudas de química y estadística y su disponibilidad en todo momento. Al profesor José Vicente Gimeno, por su valiosa enseñanza, apoyo incondicional, y gratas y formativas tertulias de ciencia y política que nos ha brindado a todos los miembros del grupo. A la profesora M<sup>a</sup> Ángeles García por su amistad y ayuda en el aprendizaje de técnicas de manipulación de animales de experimentación y de células madre.

Gracias a los más jóvenes investigadores del grupo, mis compañeros del "Equipo Azul", alias mycotrix... A Ángel, por todo lo que me ha enseñado y ayudado en mis primeros años en el Departamento de Microbiología. A Pakito, que hubiera hecho yo sin ti todos esos años!, gracias por ser mi compañero de fatigas, pero también de cervezas, cafés, croissants... te echamos de menos.

A Sarita del "Equipo Rojo", por todo lo que hemos compartido, sobre todo en los últimos años, gracias por tus consejos y ayuda. Eres un gran apoyo para mí, dentro y fuera del laboratorio y te has convertido en una de mis mejores amigas. ¡Ánimo guapa! que ya la tienes tú también. Te deseo

toda la suerte del mundo en esa gran etapa que acabas de comenzar. A Isi y Brenda por facilitarme el aprendizaje y trabajo práctico con ratones que tanto me cuesta.

A nuestro “grupete” con el que comparto todos los días almuerzos y comidas, Sara, Richard, Joaquín y Ángela, gracias por vuestra amistad y compañía. Esos paréntesis de césped y sol en las mesitas del campus, con todos los gatos, son lo mejor del día.

A todos los compañeros que se han integrado en nuestro grupo, estudiantes colaboradores, de trabajos de fin de grado y de fin de máster... especialmente a JV, ha sido muy divertido trabajar contigo y espero que sigas como ahora apuntándote a las “quedadas”. Gracias a todos por hacer de nuestro laboratorio un sitio muy grato para trabajar.

I would like to thank Prof. Naresh Magan, for your warm welcome and integration in the group, for the opportunity to work in your lab, for your help, and personal attention, and sharing nice moments out of the lab during my stays in Cranfield University. It was really appreciated. Thanks to my lab group in Cranfield, Angel, Neus, Ahmed, Youssef, Kalli, Seja, Giannis... for your help, and comradeship, and specially to Gonçalo, for your help with the molecular stuff. Thanks to Meri for your company inside and outside of the lab.

A Inma por tu compañía y los ratitos de castellano que compartimos durante esas estancias en Cranfield, lejos de casa, y a David, por tu apoyo constante y amistad que tanto se agradece en esos periodos.

Gracias a todos los profesores del Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid por su hospitalidad, atención y amabilidad y, muy especialmente, a la Prof. María Teresa González Jaén, por ser mi tutora y estar siempre atenta a lo que he necesitado a pesar de tu apretada agenda. Aprendí mucho durante mi estancia en tu laboratorio. A Patri, que me ayudó en todo momento, y a todas las becarias con las que compartí ciencia y amistad y han hecho inolvidables esos meses que pasé en Madrid. A Karol, Federica y Ana por vuestra compañía en el laboratorio y a Mari Carmen por tu atención y ayuda. A Inés, por tu complicidad, generosidad, y mostrarme lo mejor de tu cultura tunecina. Hago extensivo este agradecimiento a los componentes del grupo del Departamento de Microbiología III de la Universidad Complutense de Madrid y en especial a la profesora Covadonga Vázquez por su apoyo, simpatía y hospitalidad. A todas os agradezco todo lo que me habéis enseñado y vuestra colaboración en la caracterización molecular de los hongos.

A mis amigas Rosa, Carol, Lourdes, Son, Laura P., Laura S. y Teresa, también a Maria, y a todos los chicos, Juanvi, Alcañiz, Rubén, Manolo, Oscar, Luis Sergio... por estar siempre ahí en los buenos y en los malos momentos, gracias por esta genial amistad, así como a Roberto por hacer siempre un hueco en su agenda.

A mis amigos con los que comparto “findes”, Peter, Javi L, Javi M, Llimi, Anna, Sergio, Patricia, Andrea y Jaime, y especialmente a Rafa por tus consejos, optimismo y palabras de ánimo que nunca me han faltado.

A Carolina por su gran amistad y valiosas opiniones. A Toni, por todos los ánimos que me ha dado para que esta Tesis fuera adelante, por tu generosidad. A Pablo por tu ayuda informática y atención y a Estefa, mi amiga y gran compañera de “karaoke”, por tu buen humor que tanto ayuda.

Quiero dar gracias muy especiales a mi familia, a mis padres, por su comprensión, paciencia, ánimos y reprimendas que han hecho posible superar los obstáculos del camino, a mi hermano, por su gran apoyo desde la distancia y su colaboración y disponibilidad para resolver mis problemillas informáticos en el tratamiento de datos como experto en redes neuronales y a la memoria de mis abuelos que tanto habrían disfrutado si hubieran tenido esta Tesis en sus manos.

No quiero finalizar este apartado sin mostrar mi agradecimiento al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) y al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) por la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) que me ha permitido la realización de la Tesis, y de cuatro becas para la movilidad de personal investigador, que me han facilitado efectuar tres estancias en la Universidad de Cranfield (Reino Unido) durante quince meses y una en la Universidad Complutense de Madrid durante seis meses. Universidades, donde se ha desarrollado buena parte de la Tesis.

Asimismo agradezco a las empresas Bayer CropScience, S.A., BASF Crop Protection e Industrias Afrasa, S.A. por su asesoramiento y suministro de todos los agentes antifúngicos usados.

La investigación desarrollada ha sido financiada por los proyectos AGL2007-66416-C05-01/ALI y AGL2010-22181-C04-03/ALI concedidos por el MICINN y el MINECO y por las acciones complementarias ACOMP/2007/155, ACOMP2009/371, ACOMP/2012/220 y ACOMP/2013//176 concedidas por la Generalitat Valenciana.



## Resumen

---

Las micotoxinas son metabolitos secundarios fúngicos que se encuentran frecuentemente como contaminantes naturales en diversos alimentos habituales en la dieta humana y animal. Producen micotoxicosis agudas y crónicas que afectan principalmente al hígado, riñón y sistemas inmunológico y reproductor. Además, algunas de ellas como las aflatoxinas (AFLs) han sido reconocidas por la “International Agency for Research on Cancer” (IARC) como los compuestos naturales con mayor potencial teratogénico y cancerígeno para humanos que se conocen, a ellas le sigue la ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FBs), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), patulina (PAT) y citrinina (CIT). La IARC las ha clasificado en los grupos 1B, 2B, 2B, 3, 3, 3 y 3, respectivamente. Todas ellas están sometidas a legislación en los alimentos de mayor riesgo en la Unión Europea.

Los hongos productores de micotoxinas son saprófitos o parásitos habituales en cosechas agrícolas en todo el mundo, especialmente, en las de cereales, frutas y frutos secos que se cultivan en regiones cálidas, más favorables para su desarrollo. Nuevos escenarios asociados al cambio climático regional y global están propiciando nuevos patrones de distribución fúngica y dominancia de las especies más competitivas bajo condiciones de estrés térmico e hídrico. Ello ha agudizado el problema de algunas micotoxinas producidas por esas especies en cosechas agrícolas. En este marco, se han planteado nuevos retos en seguridad y calidad alimentaria relacionados con hongos y micotoxinas emergentes en alimentos, que es necesario afrontar.

Recientemente, las instituciones europeas competentes (EFSA, RASFF, CE) han alertado a la comunidad científica sobre la necesidad de nuevas investigaciones para conocer la identidad, incidencia, distribución, prevención y control sostenible de los hongos y micotoxinas más frecuentes en alimentos, considerando como tales las AFLs y la OTA. A ellas se han

sumado los tricotecenos A (las toxinas T-2 y HT-2) debido a los altos niveles que se han registrado en cereales, en el centro y norte de Europa en los últimos años.

Estudios predictivos relacionados con el cambio climático sitúan a España como zona de riesgo en materia de hongos y micotoxinas en cereales y uva. En el caso del viñedo y el vino, estudios recientes con metodologías avanzadas nos han permitido establecer que son *Aspergillus carbonarius* y la OTA, los peligros que es necesario controlar, y ello coincide con los países de nuestro entorno. Sin embargo, en cereales, a pesar de haber sido estudiados en el pasado, los conocimientos han quedado obsoletos por lo que la Comisión Europea demanda información actualizada a los países miembros.

Conscientes del estado actual del tema, esta Tesis Doctoral se dirige al estudio de estos riesgos relacionados con hongos y micotoxinas emergentes en estos dos importante cultivos agrícolas españoles y al diseño de estrategias para su prevención y control sostenible. La investigación se recoge en tres capítulos.

En el **primer capítulo** se aborda el estudio de la micobiota y micotoxinas contaminantes de la cebada española cultivada en las principales regiones productoras. Esta investigación se recoge en los **artículos 1 y 2** de la Tesis. La investigación se inicia con un muestreo del cereal, representativo de las principales regiones productoras españolas, seguido de la detección, caracterización y cuantificación de las especies fúngicas en las muestras. Para ello se emplean técnicas clásicas basadas en la morfología macro- y microscópica del hongo, métodos cromatográficos aplicados al estudio de sus perfiles de producción de micotoxinas y protocolos muy recientes de PCR específicos de especie. Se realiza además por vez primera un estudio comparativo de ambos tipos de métodos, y un análisis crítico de las ventajas e inconvenientes para su aplicación en este campo. Esta investigación ha permitido identificar por vez primera especies que no habían sido descritas anteriormente en cebada como *A. carbonarius* y *A. steynii* productoras de OTA y se ha catalogado a *A. flavus*, productora de AFLB<sub>1</sub> y AFLB<sub>2</sub>, como la especie micotoxigénica más frecuente en el cereal. Junto a ellas se han detectado otras de gran importancia en seguridad alimentaria como *A. parasiticus*, productora de AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub>, *A. ochraceus* y *Aspergillus* del agregado *Niger*, productoras de OTA, *Fusarium verticillioides* productora de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>, y *F. graminearum* y *F. culmorum*, productoras de ZEA, DON y nivalenol (NIV). Además de ello, se ha detectado por vez

primera, en cebada española, la especie *F. langsethiae*, productora de las toxinas T-2 y HT-2. Esta especie es propia de cereales del centro y norte de Europa y hasta la fecha no había sido descrita en cereales españoles. Los resultados obtenidos muestran nuevos patrones de distribución de especies productoras de micotoxinas en cebada en España y por tanto, en Europa.

Paralelamente al estudio micológico de la cebada, se aborda el estudio de todas las micotoxinas a las que se ha hecho referencia anteriormente en el cereal. Con este fin, se optimizan y aplican métodos para su extracción a alta presión, purificación mediante diferentes columnas de inmunoafinidad y de extracción en fase sólida, derivatización pre- o post-columna, cuando ello es posible, y análisis por LC o GC con diferentes sistemas de detección (fluorescencia, índice de refracción, ultravioleta, captura de electrones o espectrometría de masas). Este trabajo, además de aportar un importante avance metodológico ha permitido conocer que la micotoxina más frecuente en cebada española es la OTA seguida de DON, AFLB<sub>1</sub>, ZEA, FBs, NIV y las toxinas T-2 y HT-2. Aquí se describe por vez primera la presencia de AFLs en cebada, aunque a niveles que no superan los límites establecidos, y se proporciona información relevante requerida por la Comisión sobre incidencia de micotoxinas en cereales en España y por extensión, en Europa. La investigación recogida en esta primera fase de la Tesis se ha desarrollado en colaboración con científicos expertos del Departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid en el ámbito de proyectos coordinados financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

En el **segundo capítulo**, se aborda el estudio de estrategias para la prevención y control sostenible del crecimiento de las más importantes especies productoras de OTA, AFLs y las toxinas T-2 y HT-2, en la cebada, y de la biosíntesis de las toxinas. La investigación se dirige en primer lugar a la especie ocratoxigénica más frecuente, *A. carbonarius*, bien conocida también como productora de OTA en viñedos, y a la especie *A. ochraceus* como la mayor productora de la toxina de la sección *Circumdati*. Se continúa con *A. flavus* y *F. langsethiae*, especies productoras de AFLs y de las toxinas T-2+HT-2 respectivamente. La selección de los hongos para esta fase de la investigación se realiza en base a los resultados obtenidos en las muestras de cebada estudiadas en el capítulo primero de la Tesis, a anteriores estudios realizados en uva y a las prioridades de la Comisión Europea en materia de micotoxinas. La investigación que conforma este segundo capítulo de la Tesis, se recoge en los **artículos 3, 4 y 5**, y en **trabajos muy recientes**, pendientes de publicación que también se describen en detalle en este capítulo.

En esta investigación se estudia la eficacia de antifúngicos usados en agricultura ecológica (azufre y oxiclóruo de cobre) y convencional (mancozeb). Su efectividad frente a aislados de *A. carbonarius* y *A. ochraceus* fue aceptable, sin embargo, la mayor resistencia de *A. flavus* y *F. langsethiae* a estos compuestos hizo necesario al ensayo de otros antifúngicos más selectivos como azoles (procloraz, tebuconazol) y morfolinas (fempropimorf). En esta Tesis, se determinan por vez primera, y en diferentes condiciones ambientales, las dosis efectivas de todos los fungicidas usados que reducen el crecimiento de las especies citadas en un 50% (ED<sub>50</sub>) y en un 90% (ED<sub>90</sub>). Su efecto en el control de la producción de OTA, AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, T-2 y HT-2 fue también significativo. Ello le convierte en el primer estudio que se realiza con estos antifúngicos, especies fúngicas y toxinas en diferentes condiciones de humedad y temperatura esperables a corto y medio plazo en el contexto del cambio climático.

Los resultados obtenidos son de gran utilidad para el diseño de unas buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento, y alertan sobre interacciones de factores bióticos (especie y cepa fúngica) y abióticos (factores ambientales, tipo y dosis de fungicida) que afectan a la eficacia de los tratamientos en el control del crecimiento fúngico y producción de micotoxinas. Se detectan y describen también situaciones de mediano estrés (hídrico, térmico y niveles bajos de fungicidas) en las diferentes especies estudiadas que lejos de controlar la producción de micotoxinas por el hongo, la potencian. La investigación aporta, además, resultados de fácil e inmediata transferencia al sector empresarial implicado en la fabricación y comercialización de antifúngicos, como las empresas Bayer CropScience S.A., Industrias Afrasa S.A. y Syngenta S.A. que han colaborado y suministrado todas las formulaciones empleadas. Buena parte de esta investigación se ha realizado en colaboración con científicos expertos en el tema de la Universidad de Cranfield, (Reino Unido), país con mayor índice de contaminación de cereales con las toxinas T-2 y HT-2, lo que refuerza su alcance internacional.

Finalmente, el **tercer capítulo** se dirige al estudio y diseño de estrategias para la reducción de la OTA en medios líquidos, susceptibles de empleo en el procesado tecnológico de la cebada o la uva, para la fabricación de la cerveza o el vino. El objetivo de esta investigación fue la búsqueda de alternativas a otros posibles tratamientos, menos inocuos y más agresivos, como el uso de adsorbentes químicos, que pueden afectar a la calidad del producto final. Esta investigación se recoge en los **artículos 6 y 7** de la Tesis.



Para esta investigación se elige una especie bacteriana del ácido láctico, *Oenococcus oeni*, un procariota responsable de la fermentación maloláctica del vino que carece de efectos tóxicos para la salud. Se usan 10 aislados de *O. oeni*, todos ellos obtenidos de vino tinto. La investigación se inicia en medios favorables para el crecimiento de la bacteria suplementados con diferentes niveles de OTA (similares a los que presenta la cerveza o el vino de forma natural) que se inoculan con *O. oeni* en fase exponencial de crecimiento o bien células muertas inactivadas por calor. En estos cultivos se realiza un seguimiento de los niveles de la toxina en el medio mediante LC-FD. Las experiencias se completan con ensayos en medios suplementados con diferentes niveles de etanol más parecidos a una bebida alcohólica como el vino o la cerveza.

Los resultados globales de ambos trabajos fueron excelentes ya que, en función de las condiciones del cultivo, los niveles de reducción de la OTA en el medio por *O. oeni* oscilaron entre 0,9 % y 63% y el proceso es independiente de la viabilidad de la bacteria por lo que *O. oeni* no actúa metabolizando la toxina. La reducción es mayor a mayor número de células en el medio y menor concentración de toxina. La reducción es menor en medios con elevada concentración de etanol y pH muy bajo. Ello concuerda con el hecho de que la eliminación de OTA se pueda producir debido a la adsorción de la toxina a uno o más componentes de la pared celular de *O. oeni*, probablemente a los ácidos teicoicos, y que el pH del medio influye en la adsorción o liberación de la toxina en el medio y, en consecuencia, en la efectividad del proceso. El uso de *O. oeni* como adsorbente de OTA en bebidas alcohólicas como el vino sería, por tanto, más eficaz en vinos en los que ocurre la fermentación maloláctica, ya que el ácido láctico es más débil que el málico y también se vería favorecido en cerveza y en vinos con menor concentración de etanol. Este es el primer trabajo que se realiza usando esta bacteria como posible herramienta para la reducción de la toxina en bebidas derivadas de materias primas contaminadas, abriendo así una importante línea de investigación en seguridad alimentaria. Nuevas investigaciones directamente en vino y cerveza, con cepas de *O. oeni* seleccionadas, serán objeto de futuros trabajos.



## Abstract

---

Mycotoxins are secondary fungal metabolites that are found frequently as natural contaminants in different foods that are habitual in the human and animal diet. They produce acute and chronic mycotoxicoses that affect mainly liver, kidney, and immunologic and reproductive systems. Moreover, some of them, as the aflatoxins (AFLs), have been recognized by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as natural compounds having the highest teratogenic and carcinogenic potential for humans known, followed by ochratoxin A (OTA), fumonisins (FBs), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA) and patulin (PAT). The IARC has classified them into groups 1B, 2B, 2B, 3, 3 and 3, respectively. All of them are regulated in the highest risk food by the European Union.

Mycotoxin-producing fungi are habitual saprophytes or parasites of agricultural crops all over the world, affecting mainly to cereals, fruits and nuts grown in warm regions, more favourable for their development. New scenarios associated to the regional and global climatic change are fostering new patterns of fungal distribution and dominance of the most competitive species under thermic and hydric stress conditions. This has exacerbated the problem of some mycotoxins produced by these species in agricultural crops. In this framework, new challenges in food safety and food quality related to fungi and emerging mycotoxins in food have been raised and it is necessary to tackle them.

Recently, European competent institutions (EFSA, RASF, EC) have alerted the scientific community to the need of new research to know the identity, distribution, prevention, and sustainable control of the most relevant fungi and mycotoxins in food, considering as such, AFLs and OTA. Type A trichothecenes (T-2 and HT-2 toxins) have been summed up to them, owing to the high levels that have been found in cereals in Central and Northern Europe in recent years.

Predictive studies related to the climate change locate Spain as a risky area with regard to fungi and mycotoxins occurring in cereals and grapes. Concerning the vineyard and wine, recent studies using advanced methodologies have permitted to establish that *Aspergillus carbonarius* and OTA, are dangers that are necessary to keep under control in agreement with our surrounding countries. Nevertheless, in spite of past studies, knowledge on this issue in cereals has become obsolete, and, consequently, the European Commission has demanded updated information to the member countries.

Concerned about the current state of the topic, this Doctoral Thesis is aimed to the study of these risks related to fungi and emerging mycotoxins in agricultural Spanish crops. The research is organized in three chapters.

The **first chapter** tackles the study of the mycobiota and mycotoxin contamination of Spanish barley in the main producing areas. This research is collected in **articles 1 and 2** of the Thesis. The research starts with cereal sampling, which is representative of the main producing Spanish regions, followed by the detection, characterization and quantification of the fungal species in the collected samples. For this purpose, classical techniques based on the macro- and microscopic morphology of fungi, mycotoxin producing profiles and very updated species-specific PCR protocols have been used. Moreover, a comparative study of the two kind of methods, and a critical analysis of the advantages and disadvantages for its application in this field has been performed. This study has permitted to identify for the first time fungal species that had not been described previously in barley, such as *A. carbonarius* and *A. steynii*, two OTA producers. Moreover, *A. flavus*, the main producer of AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub>, has been detected as the most common mycotoxigenic species in the cereal. Together with them other species of great importance to food safety have been found. They are *A. parasiticus*, a well-known producer of AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub>, and AFLG<sub>2</sub>, *A. ochraceus* and *Aspergillus niger* aggregate, which are OTA producers, *Fusarium verticillioides*, a producer of FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, as well as *F. graminearum* and *F. culmorum*, two species that can produce ZEA, DON and nivalenol (NIV). In addition to this, the species *F. langsethiae*, which can synthesize T-2 and HT-2 toxins, has been detected for the first time in Spanish barley as a result of the research. This species is characteristic of cereals growing in Central and Northern Europe and, so far, it had not been described in Spanish cereals. These results show new distribution patterns of mycotoxin-producing species in barley in Spain and, therefore, in Europe.

In parallel with the mycological study of barley, this chapter deals with the study of the aforementioned mycotoxins in the cereal. With this purpose, analytical methods have been optimized and applied to mycotoxin extraction at high pressure, clean-up through different immunoaffinity and solid-phase extraction columns, and LC or GC analysis with different detection systems (fluorescence, refraction index, ultraviolet, electron capture or mass spectrometry) using pre- or post-column derivatization when required. This work, in addition to valuable methodological improvement, has allowed us to know that the most frequent mycotoxin in Spanish barley is OTA, followed by DON, AFLB<sub>1</sub>, ZEA, FBs, NIV, and T-2 and HT-2 toxins. Here the presence of AFLs in barley is described for the first time, although at levels below the established limits. Moreover, relevant information required by the EC on mycotoxin incidence in cereals in Europe is provided. The research performed in this first phase of the Thesis has been developed in collaboration with scientific experts of the Department of Genetics of the Complutense University of Madrid in the frame of coordinated projects funded by the Spanish “Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO)”.

The **second chapter** addresses the study of strategies for prevention and sustainable control of growth of the most relevant OTA, AFL, and T-2 and HT-2 producing species in the barley samples and the biosynthesis of the toxins. Research is aimed, first, at studying the most frequent ochratoxigenic species, *A. carbonarius*, which is also a well-known OTA producer in vineyards, and the species *A. ochraceus*, the major producer of this toxin in section *Circumdati*. Research continues with *A. flavus* and *F. langsethiae*, species producers of AFLs and T-2 + HT-2, respectively. Selection of fungi for this phase of the investigation is performed on the basis of the results obtained in the studied barley samples, prior studies carried out in grapes and the priorities of the European Commission in the area of mycotoxins. The research that deals with this second chapter of the Thesis is gathered in **articles 3, 4 and 5**, and **very recent works**, pending of publication that are also included and described in this chapter.

Antifungal agents used in ecological agriculture (sulfur and copper oxychloride) and conventional agriculture (mancozeb) were assayed in the research carried out. Their effectiveness against isolates of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* was acceptable. However, *A. flavus* and *F. langsethiae* showed a great resistance to these compounds and this required the assay of other most selective agents, such as azoles (prochloraz and tebuconazole) and a morpholine (fenpropimorph). In this Doctoral Thesis, for the first time and

under different environmental conditions, the effective doses of all the assayed fungicides that yield fungal growth reduction of 50% (ED<sub>50</sub>) and 90% (ED<sub>90</sub>) are determined. Their effectiveness to control OTA, AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, T-2 and HT-2 production is also established. This makes it the first study on these antifungal compounds, fungi and mycotoxins performed under different humidity and temperature conditions expectable at short and medium term in the framework of the climate change.

The results obtained are very useful for the design of good agricultural and storage practices and to alert from interactions between biotic factors (fungal species and strain) and abiotic elements (environmental factors, type and doses of fungicides) that affect the efficacy of the treatments on the control of fungal growth and mycotoxin production. Situations of medium stress (hydric, thermic, and low levels of fungicides) are detected and described for the different studied species, that far from controlling mycotoxin production, can enhance it. The research provides as well results of easy and immediate transference to the business sectors involved in manufacturing and marketing of antifungals, as the companies Bayer CropScience, S.L., Industrias Afrasa, S.A. and Syngenta Agro, S.A., which have submitted all formulations used. A good part of this research has been performed in collaboration with scientific experts in the topic from the University of Cranfield (United Kingdom), a country with the highest level of contamination of cereals with toxins T-2 and HT-2, which strengthens its international scope.

Finally, a **third chapter** is aimed at the study and design of strategies for OTA reduction in liquid media, which could be used in the technological processing of barley or grapes, e.g. in the manufacturing of beer or wine. The objective of this work was the search for alternatives to other possible, less innocuous and more aggressive treatments, like the use of chemical adsorbents that can affect quality of the final product. This research is collected in **articles 6 and 7** of the Thesis.

For this research a species belonging to the lactic acid bacteria is chosen: *Oenococcus oeni*, a procariota that does not show toxic effects and responsible for the malolactic fermentation of wine. Ten *O. oeni* isolates are used, all of them obtained from red wine. The research is started in media favourable for bacterial growth supplemented with different concentrations of OTA (similar to those that can naturally be present in beer or wine). These media are inoculated either with bacteria at exponential phase of growth or heat-inactivated dead bacteria. In these cultures, toxin levels are monitored

by LC with fluorescence detection. The experiences are also performed in media supplemented with different levels of ethanol to make them more similar to an alcoholic beverage like wine or beer.

The overall results of both experiments are excellent, since depending on culture conditions, OTA reduction levels in the media ranged from 0,9% to 63%. The analysis of the results obtained permits to conclude that *O. oeni* presents ability to remove OTA from the medium, this process being independent of the viability of the bacteria, which indicates that *O. oeni* does not metabolize the toxin. The reduction is higher when the number of cells in the medium increases and concentration of the toxin in the medium decreases. The reduction rate is lower in media with high concentration of ethanol and very low pH. This agrees with the fact that OTA removal can be due to toxin adsorption to one or more components of *O. oeni* cell wall, probably the teichoic acids, and the pH of the medium influences the processes of adsorption/release of toxin to the medium and, consequently, the effectiveness of the process. The use of *O. oeni* as OTA adsorbent in alcoholic beverages, like wine, would be, thus, more effective in wines where malolactic fermentation occurs, since lactic acid is weaker than malic acid. This reduction process would be also favoured in beer and wine with low concentration of ethanol. This is the first study on the use of this species as a possible tool for OTA reduction in beverages derived from contaminated raw material. Further research applied directly to wine and beer, carried out with selected strains of *O. oeni*, will be a target for future work.





## Índice

I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1. Características generales del reino Fungi.....	3
2. Alimentos y Salud. Las micotoxinas .....	6
2.1. Antecedentes históricos.....	6
2.2 Las micotoxinas en la actualidad. Micotoxinas emergentes.....	11
3. Hongos productores de ocratoxina A, aflatoxinas y las toxinas T-2 y HT-2. Peligro potencial en alimentos .....	17
3.1. Identificación.....	18
3.2. El género <i>Aspergillus</i> .....	22
3.2.1. La sección <i>Nigri</i> .....	24
3.2.2. La sección <i>Circumdati</i> .....	27
3.2.3. La sección <i>Flavi</i> .....	32
3.3. El género <i>Fusarium</i> .....	36
4. Ocratoxina A, aflatoxinas y las toxinas T-2 y HT-2. Peligro real en alimentos.....	41
4.1. La ocratoxina A .....	44
4.1.1. Efectos tóxicos.....	45
4.1.2. Presencia en cereales y derivados y en vino .....	50
4.2. Las aflatoxinas.....	61
4.2.1. Efectos tóxicos .....	62
4.2.2. Presencia en cereales y derivados .....	65
4.3. Los tricotecenos .....	71
4.3.1. Las toxinas T-2 y HT-2 .....	73

---

4.3.1.1. Efectos tóxicos.....	74
4.3.1.2. Presencia en cereales y derivados .....	76
5. Producción de cereales y vino en España .....	86
6. Factores que afectan al desarrollo fúngico y a la producción de micotoxinas. Cambio climático global .....	89
6.1. Actividad de agua ( $a_w$ ) .....	92
6.2. Temperatura .....	95
6.3. Concentración de iones hidrógeno (pH) .....	97
6.4. Composición de gases de la atmósfera.....	98
6.5. Fotoperiodo .....	100
6.6. Prácticas agrícolas.....	102
6.6.1. Tratamientos con antifúngicos .....	102
6.6.1.1. Azufre.....	107
6.6.1.2. Oxicloruro de cobre .....	109
6.6.1.3. Mancozeb .....	111
6.6.1.4. Fempropimorf .....	113
6.6.1.5. Tebuconazol.....	116
6.6.1.6. Procloraz .....	118
6.6.2. Rotación de cultivos.....	121
6.6.3. Labranza del suelo .....	122
6.7. Substrato/Hospedador .....	122
6.8. Interacciones microbianas.....	126
6.9. Daños causados por insectos.....	128
7. Eliminación de micotoxinas. Tratamiento tecnológico de las cosechas agrícolas .....	129
7.1. Del cereal a los derivados.....	130
7.2. De la uva al vino .....	137
8. Principios de un Plan APPCC para la prevención y control de micotoxinas en alimentos.....	142
8.1. APPCC en precosecha, postcosecha y procesado tecnológico de los cereales .....	146
8.2. APPCC en viticultura y enología.....	150

---

9. Reglamentación de las micotoxinas en alimentos .....	156
10. Determinación de micotoxinas en alimentos.....	161
11. Predicción de la presencia de hongos y micotoxinas en alimentos.....	170
II. OBJETIVOS.....	177
III. RESUMEN DE LA METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL .....	181
Capítulo I .....	186
Capítulo II .....	193
Capítulo III .....	214
IV. CONCLUSIONES FINALES .....	221
FINAL CONCLUSIONS .....	229
V. BIBLIOGRAFÍA.....	235
VI. ANEXO .....	319
ARTÍCULO 1	
ARTÍCULO 2	
ARTÍCULO 3	
ARTÍCULO 4	
ARTÍCULO 5	
ARTÍCULO 6	
ARTÍCULO 7	



---

## Lista de figuras

---

F.1	<i>Aspergillus carbonarius</i> . (A) Cultivos de 7 días a 25 °C en medio Agar Czapek, (B) Cultivos de 7 días a 25 °C en medio Agar Extracto de Malta, (C y E) Cabezas conidiales globosas biseriadas, (D) Conidios con ornamentación equinulada.....	26
F.2	<i>Aspergillus ochraceus</i> . (A) Colonias en medio CYA cultivadas durante 5 días, (B) Esquema de conidióforos y conidios, (C) Micrografías de conidióforos y conidios. a. x390; b. x1215; c. x1170; d. x6000) .....	29
F.3	<i>Aspergillus steynii</i> . (A) Colonias de 7 días en medio CYA, (B) Colonias de 7 días en medio MEA, (C y D) Conidióforos biseriados, (E) conidios, (F) Micrografía electrónica de conidios. (Escala de las barras: C–E=10 µm, F=1 µm).....	30
F.4	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> . (A) Colonias de 7 días en medio CYA, (B) Colonias de 7 días en medio MEA, (C y D) Conidióforos biseriados, (E) conidios, (F) Micrografía electrónica de conidios. (Escala de las barras: C–E=10 µm, F=1 µm).....	31
F.5	<i>Aspergillus flavus</i> . (A) Colonias de 7 días en agar Czapek, (B) Conidióforo (adaptado de Hedayati et al., 2007), (C, D, E, F) <i>A. flavus</i> (NBRC) 30107 Conidióforos uniseriados y biseriados y conidios. C x130, D x940, E x1600, F x3600.....	35
F.6	(A) Cultivos de 7 días a 25 °C en PDA (Agar Patata Dextrosa) de dos cepas de <i>F. poae</i> , a) BBA, 69074 y b) IBT, 9980) y dos cepas de <i>F. langsethiae</i> , c) IBT, 9951 y d) IBT, 9922), (B) Reverso de los cultivos A de las cepas a, b, c y d, respectivamente, (C) Cultivos de 7 días a 20 °C en PDA de las cepas a, b, c y d, (D) Reverso de los cultivos C de las cepas a, b, c y d, respectivamente, (E) y (F) a) y b) Conidióforos de <i>F. langsethiae</i> , (G) a) y b) Conidióforos de <i>F. poae</i> .....	39
F.7	Estructura de las ocratoxinas A, B y C .....	45
F.8	Principales metabolitos de la ocratoxina A .....	47
F.9	Otros metabolitos de la ocratoxina A .....	47

F.10	Estructura de las principales aflatoxinas .....	61
F.11	Principales metabolitos de la AFLB <sub>1</sub> implicados en su toxicidad .....	64
F.12	Límites de detección de los métodos empleados en el estudio de la presencia de aflatoxinas en muestras de alimentos .....	66
F.13	Estructura general de los tricotecenos .....	71
F.14	Estructura de las toxinas T-2 (R <sub>2</sub> =OAc) y HT-2 (R <sub>2</sub> =OH) .....	73
F.15	Rutas metabólicas de la toxina T-2 en humanos y animales.....	74
F.16	Muestras de alimentos, cereales y piensos analizadas en diferentes países para la evaluación de la presencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en el periodo 2005-2010.....	78
F.17	Muestras de cereales analizadas para la evaluación de la presencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en el periodo 2005-2010.....	79
F.18	Principales grupos de alimentos analizados para la evaluación de la incidencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en diferentes países.....	83
F.19	Producción de cebada en España con respecto a otros países del mundo .....	87
F.20	Previsiones de la FAO sobre la producción, utilización y existencias de cereales en el mundo.....	87
F.21	Producción de vino en España con respecto a otros países del mundo en 2013. (Según OIV, Nota de Coyuntura Mundial presentada en abril de 2014).	88
F.22	Principales factores abióticos y bióticos que afectan al crecimiento de hongos y a la producción de micotoxinas en cosechas agrícolas.....	91
F.23	Estructura del mancozeb .....	111
F.24	Estructura del fempropimorf .....	114
F.25	Estructura del tebuconazol .....	116
F.26	Estructura del procloraz .....	119
F.27	Diagrama de flujo en los procesos de pre-cosecha y post-cosecha de cereales.....	148
F.28	Fusariosis de la espiga: A y B) espigas de trigo, C) espigas de cebada.....	150
F.29	Diagrama de flujo en el proceso de elaboración del vino.....	152
F.30	Racimo de uva blanca afectado por <i>Aspergillus</i> de la sección <i>Nigri</i> . A: cara del racimo a la que ha llegado el tratamiento fitosanitario, B: cara del mismo racimo a la que no ha llegado el tratamiento C. Racimo de uva tinta afectado por <i>Aspergillus</i> de la sección <i>Nigri</i> .....	155
F.31	Países con regulación de micotoxinas en alimentos y piensos.....	159
F.32	Comparison of growth rate determined by daily colony diametric measurement (mm/day) and aflatoxin B <sub>1</sub> and B <sub>2</sub> biosynthesis (determined by HPLC ) of <i>A. flavus</i> grown on YES medium agar plates for 10 days.....	209

---

## Lista de tablas

---

T.1	Resumen de Informes del RASFF (periodo 2003-2013) (European Union, 2014) sobre el número de partidas de alimentos y aditivos alimentarios rechazadas, por presentar niveles inaceptables de micotoxinas .....	15
T.2	Presencia y niveles de OTA en alimentos procedentes de 13 países de la UE (EFSA, 2006) .....	51
T.3	Presencia y niveles de OTA en cereales .....	53
T.4	Presencia y niveles de OTA en pan .....	55
T.5	Presencia y niveles de OTA en cereales de desayuno y alimentos infantiles. ....	56
T.6	Presencia y niveles de OTA en cerveza .....	57
T.7	Presencia y niveles de OTA en vino tinto .....	59
T.8	Presencia y niveles de aflatoxinas en cereales en Europa .....	67
T.9	Principales tricotecenos de tipo A .....	72
T.10	Principales tricotecenos de tipo B .....	72
T.11	Presencia y niveles de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en cereales en Europa .....	80
T.12	Cultivo y producción de cereales en España .....	86
T.13	ED <sub>50</sub> and ED <sub>90</sub> (mg/l) of three fungicide treatments against <i>A. flavus</i> growing on YES medium under different environmental conditions.....	210





## Acrónimos y abreviaturas/Acronyms and abbreviations

---

a.C.	Antes de Cristo/Before Christ (b.C.)
3-ADON	3-Acetil-deoxinivalenol/3-Acetyl-deoxynivalenol
15ADON	15-Acetil-deoxinivalenol/15-Acetyl-deoxynivalenol
ADP	Adenosine diphosphate
AFLB1	Aflatoxina B1/Aflatoxin B1
AFLB2	Aflatoxina B2/Aflatoxin B2
AFLG1	Aflatoxina G1/Aflatoxin G1
AFLG2	Aflatoxina G2/Aflatoxin G2
AFLM1	Aflatoxina M1/Aflatoxin M1
AFLPs	Amplified fragment length polymorphism/ Polimorfismo para la longitud de los fragmentos amplificados
AMFE	Análisis modal de fallos y efectos/Failure mode and effect analysis
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
APPC	Análisis de peligros y puntos críticos de control/Hazard analysis and critical control point system (HACCP)
ASE	Accelerated solvent extraction
ATA	Alimentary toxic aleukia
ATP	Adenosine triphosphate
aw	Water activity/Actividad de agua
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land-und Fortwirtschaft Berlin, Germany
BPA	Buenas prácticas agrícolas/Good agricultural practices (GAP)
BPAL	Buenas prácticas de almacenamiento/Good storage practices (GSP)
BPF	Buenas prácticas de fabricación/Good manufacturing practices (GMP)
BPH	Buenas prácticas higiénicas/Good hygiene practices (GHP)
CCA	Comisión del Codex Alimentarius/Codex Alimentarius Commission (CAC)
CCAAC	Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes/ Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC)
CCRMVA	Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los

	Alimentos/Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods (CCRVDF)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid to mRNA/Ácido desoxirribonucleico complementario del ARNm
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CYA	Czapek yeast extract agar/Agar czapek extracto de levadura
DAD	Diode array detector/Detector de red de diodos
DAS	Diacetoxiescirpenol/Diacetoxyscirpenol
DE50	Dosis efectiva 50/Effective dose 50 (ED50)
DE90	Dosis efectiva 90/Effective dose 90 (ED90)
DFP	Diagrama de flujo del producto
DL50	Dosis letal 50/Lethal dose 50 (LD50)
DL90	Dosis letal 90/Lethal dose 90 (LD90)
DNA	Deoxyribonucleic acid/Ácido desoxirribonucleico (ADN)
DON	Deoxinivalenol/Deoxynivalenol
DP	Dry powder/Polvo seco (PS)
EC	European Commission/Comisión Europea (CE)
ECD	Electron capture detector/Detector de captura de electrones (DCE)
EFSA	European Food Safety Authority/Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (AESA)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
EU	European Union
FAO	The Food and Agriculture Organization of the United Nations/Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (ONUAA)
FB1	Fumonisina B1/Fumonisin B1
FB2	Fumonisina B2/Fumonisin B2
FB3	Fumonisina B3/Fumonisin B3
FD	Fluorescence detector/Detector de fluorescencia (DF)
FDA	Food and Drug Administration/Agencia Estadounidense de Alimentación y Medicamentos (AEAM)
FHB	Fusarium head blight
FIAB	Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas
FID	Flame ionization detector/Detector de ionización de llama
FusX	Fusarenona X/Fusarenone X
GC	Gas-chromatography/Cromatografía de gases (CG)
GCT	Gestión de la calidad total
GRAS	Generally recognized as food safe/Categoría general de alimentos seguros
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography/Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)
HR	Humedad relativa
HT-2	Toxina HT-2/HT-2 toxin

IA	Ingrediente activo/Active ingredient (Ai)
IAC	Immunoaffinity column/Columna de inmunofinidad (CIA)
IARC	International Agency for Research on Cancer/Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IBT	IBT Culture Collection of Fungi
ICOP	International Code of Oenological Practices/Código Internacional de Prácticas Enológicas
IDA	Ingesta diaria admisible/Admissible daily intake (ADI)
IGS	Intergenic spacer region of rDNA/Región espaciadora intergénica del rDNA
ISO	International Organization for Standardization
ITS	Internal transcribed spacer of rDNA/Espaciador intergénico transcrito del rDNA
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives/ Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
LC-FD	Liquid chromatography-Fluorescence detector/ Cromatografía de líquidos con detector de fluorescencia
LOD	Limit of detection/Límite de detección
LOQ	Limit of quantification/Límite de cuantificación
MEA	Malt extract agar/Agar extracto de malta (AEM)
MIP	Molecular imprinted polymers/Polímeros de impresión molecular
MLs	Maximum levels/Niveles máximos
mRNA	Messenger ribonucleic acid/Ácido ribonucleico mensajero
MS	Mass spectrometry/Espectrometría de masas
mtDNA	Mitochondrial DNA/ADN mitocondrial
NACMCF	National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods/ Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para los Alimentos
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NBRC	National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center
ND	No detectado/Not detected
NEO	Neosolaniol
NIV	Nivalenol
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OMG	Organismo modificado genéticamente/genetically modified microorganism (GMO)
OMS	Organización Mundial de la Salud/World Health Organization (WHO)
OTA	Ochratoxina A/Ochratoxin A
OTB	Ochratoxina B/ Ochratoxin B
PAT	Patulina/Patulin
Pb	Pares de bases

PCC	Puntos críticos de control/Critical control points
PCR	Polymerase chain reaction/Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Potato dextrose agar/Agar patata glucosa
PEG	Polietilenglicol/polyethylene glycol
PLE	Pressurized liquid extraction/Extracción con líquidos a presión
PMP	Pathogen modeling program/ Modelos matemáticos aplicados a bases de datos para la predicción y gestión de patógenos
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
ppb	Partes por billón/parts per billion
ppm	Partes por millón/parts per million
PSA	Potato sucrose agar/Agar patata sacarosa
qPCR	Quantitative PCR/PCR cuantitativa
RAPD	Random amplified polymorphic DNA/DNA Polimórfico Amplificado al Azar
RASFF	European Community's Rapid Alert System for Food and Feed/Sistema de Alerta Rápida de la Comunidad Europea para Alimentos y Piensos
rDNA	Ribosomal DNA (DNA sequence that codes for ribosomal RNA)/ DNA ribosómico
RFLPs	Restriction fragment length polymorphism/Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RLM	Regresión lineal múltiple/multiple linear regression (MLR)
RN	Red neuronal artificial/Artificial Neural network
RNA	Ribonucleic acid/Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction/Transcripción inversa cuantitativa por reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction/Transcripción inversa por reacción en cadena de la polimerasa
SCF	Commission's Scientific Committee for Food
SFE	Supercritical fluid extraction/Extracción con fluidos supercríticos
SPE	Solid phase extraction/Extracción en fase sólida
SR	Superficies de respuesta/Response surfaces
T-2	Toxina T-2/Toxin T-2
tRNA	Transfer ribonucleic acid/ Ácido ribonucleico de transferencia
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias/Colony forming units (CFU)
UHT	Ultra high temperatura/Temperatura elevada
UK	United Kingdom
UNEP	United Nations Environment Programme
USDA	United States Department of Agriculture
UVD	Ultraviolet detector/Detector de ultravioleta



# **I. INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1. Características generales del Reino Fungi

---

Los hongos constituyen un grupo muy numeroso de organismos eucariotas, ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sus células se diferencian de las de plantas, principalmente, en la composición de la pared celular y en que carecen de cloroplastos y clorofila y de las de animales, en que tienen pared celular y ergosterol en la membrana citoplásmica. Se han descrito más de medio millón de especies (Hawksworth et al., 1995) pero se estima que pueden existir entre un millón y un millón y medio. Inicialmente, los hongos, fueron clasificados dentro del Reino *Plantae*. Sin embargo, la aplicación de técnicas de biología molecular en taxonomía fúngica ha revelado que están más próximos al Reino *Animalia* que al Reino *Plantae*. En el sistema de clasificación de los seres vivos en cinco reinos los hongos se encuentran situados en el Reino *Fungi*, que se divide en cuatro *Phyla* denominados *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* y *Chytridiomycota*. Los hongos en los que no se conoce la fase de reproducción sexual, forman un grupo heterogéneo denominado Deuteromicetos, hongos imperfectos o mitosporicos.

Los hongos presentan básicamente dos tipos de morfología: multicelular filamentosa y unicelular o levaduriforme. Los hongos filamentosos, en medios de cultivo, sólidos o sobre cualquier superficie en la que se desarrollen, como, frutas, cereales y, en general, sobre materia orgánica, producen colonias muy características con diversas tonalidades, de aspecto algodonoso, aterciopelado, pulverulento, etc. En la mayoría de los hongos filamentosos, las hifas son tabicadas. En algunos casos como en los del *Phylum Zygomycota* las hifas carecen de septos y se denominan cenocíticas o sifonadas. Las hifas de los hongos tabicados suelen tener un diámetro entre 2-5  $\mu\text{m}$  y las de los sifonados entre 10-15  $\mu\text{m}$ . Las hifas se desarrollan a partir de esporas, proceso que se inicia cuando se produce la germinación y, con

menos frecuencia, a partir de fragmentos de otras hifas, y crecen gracias al depósito de nuevos materiales en su extremo. Con mucha frecuencia las hifas se ramifican hasta producir una maraña de filamentos que constituyen el micelio. En la colonia de un hongo filamentosos se produce una diferenciación en las funciones del micelio, de tal forma que el micelio vegetativo penetra en el sustrato para obtener los nutrientes, mientras que el micelio aéreo se proyecta hacia el exterior del sustrato y produce las estructuras reproductoras.

Los hongos levaduriformes en medios de cultivo sólidos producen colonias que recuerdan a las de bacterias. Están formadas por agregados de células individuales o levaduras (3-10 x 5-30  $\mu\text{m}$ ) que se dividen por gemación o por fisión binaria. En algunos casos las células hijas no se separan de la célula madre, formando cadenas cortas denominadas pseudohifas y produciendoseudomicelios que dan lugar a colonias de aspecto similar a las que producen los hongos filamentosos. Algún pequeño grupo de hongos presenta dimorfismo en función de la temperatura a la que crece. En otros casos, como ocurre con la especie *Candida albicans*, puede presentar crecimiento levaduriforme y filamentosos simultáneamente.

La mayoría de los hongos presentan reproducción sexual y asexual. El estado sexual se denomina teleomorfo o meiospórico y el asexual anamorfo o mitospórico. Es relativamente común que un mismo hongo tenga dos nombres, el del estado anamorfo y el del estado teleomorfo, ya que suelen haberse descubierto y nombrado de forma independiente y, en este sentido, nuevas aportaciones se suceden continuamente.

En un grupo importante de hongos solamente se conoce la reproducción asexual, bien porque no se conocen las condiciones adecuadas para que se desarrolle la forma sexual o porque ésta se ha perdido a lo largo de la evolución. Aunque la reproducción asexual puede lograrse por fragmentación de las hifas, ya que cada fragmento puede producir una nueva colonia, normalmente los hongos se reproducen, tanto sexual como asexualmente, por medio de esporas.

Los hongos producen millones de esporas, cada una con la capacidad para desarrollar una nueva colonia. Las esporas sexuales se forman tras la fusión de los núcleos de dos hifas sexualmente compatibles o de dos levaduras y posterior meiosis. La morfología de las esporas sexuales es muy variada y tiene gran interés para la identificación fúngica. Los hongos del *Phylum Basidiomycota* forman basidiosporas en el exterior de una estructura denominada basidio, los de *Ascomycota*, ascosporas, en el interior de una



estructura en forma de saco denominada asca y los del *Zygomycota*, zigosporas. Las esporas asexuales generalmente se producen en hifas especializadas y se denominan de diferente forma según su morfología. Los hongos del *Phylum Zygomycota* producen esporangiosporas en el interior de una estructura en forma de saco denominada esporangio. Los del *Ascomycota* y, en menor grado, los del *Basidiomycota*, producen esporas asexuales denominadas conidios que se desarrollan a partir de una estructura denominada conidióforo. Según su tamaño se diferencian en macroconidios y microconidios.

Los hongos son organismos quimioheterótrofo, obtienen la energía y el carbono a partir de compuestos orgánicos y se nutren por absorción. En la naturaleza se encuentran asociados a la materia orgánica viva o en descomposición, participando en los ciclos biológicos o como patógenos oportunistas de los animales y las plantas. Pueden degradar una gran cantidad de compuestos, para lo que producen diversos exoenzimas que, en algunos casos, pueden servirles como factores de virulencia en el hospedador.

En el laboratorio, los hongos crecen fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo que se suelen preparar con una fuente de carbono orgánica e iones amonio o nitrato como fuentes de nitrógeno. Esta facilidad para crecer en cualquier medio y la presencia de conidios en el aire hace que sean contaminantes medioambientales habituales. Generalmente los hongos filamentosos son aerobios y los levaduriformes, anaerobios facultativos. Son organismos poco exigentes en cuanto a temperatura, actividad de agua ( $a_w$ ) y pH.

Los hongos utilizan una serie de sustancias químicas o metabolitos primarios, esenciales para su crecimiento como ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. El empleo de estos metabolitos primarios se asocia con las fases de germinación y rápido crecimiento. Los metabolitos secundarios se producen más tarde y constituyen una serie de compuestos que no son esenciales para el crecimiento vegetativo. Dentro de este grupo, destacan por su importancia, **las micotoxinas**. Esta Tesis Doctoral se centra en estos metabolitos tóxicos y, más concretamente, en las que en la actualidad se consideran emergentes por diversos motivos que se describirán a lo largo de la misma. Se trata de micotoxinas que constituyen un importante riesgo para la salud por encontrarse en alimentos y piensos. Los hongos productores de micotoxinas son especies, principalmente, de los géneros:

*Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps* y *Alternaria*. Los dos primeros géneros, son los que albergan un mayor y más relevante número de especies toxigénicas y los más frecuentes en productos agrícolas básicos en la dieta de humanos y animales por lo que los hongos que se tratan en esta Tesis Doctoral son especies pertenecientes a los géneros ***Aspergillus* y *Fusarium***, consideradas actualmente como objetivo prioritario en materia de calidad y seguridad alimentaria (Horizon, 2020).

Aunque es notoria la capacidad de los hongos como agentes patógenos del hombre, animales y vegetales, no hay que olvidar y, por tanto, es necesario e ineludible hacer mención a ello, que los hongos, también aportan innumerables beneficios a la humanidad (Meyer et al., 2011). Son organismos muy importantes por sus aplicaciones, como fuente de alimentos, en farmacología y producción de antibióticos, industria, biotecnología, biorremediación y tienen un importante papel en los ciclos biogeoquímicos.

---

## 2. Alimentos y salud. Las micotoxinas

---

La seguridad alimentaria según la FAO (FAO, 2004) se define como “el acceso material y económico de todas las personas y en todo momento a suficientes alimentos, inocuos y nutritivos, capaces de satisfacer sus necesidades alimentarias, y poder así, llevar una vida activa y sana”. En este contexto, las micotoxinas, ocupan un lugar destacado por tratarse de un amplio grupo de compuestos tóxicos que se encuentran de manera natural en diversos alimentos, bebidas, aditivos alimentarios y piensos habituales en la dieta humana y animal. La palabra micotoxina deriva del griego *mikes* (hongo) y *toxikon* (veneno).

---

### 2.1. Antecedentes históricos

---

Las micotoxinas como agentes asociados a episodios de diversas enfermedades en humanos, se remonta a la antigüedad. De todas las micotoxinas y micotoxicosis descritas son, sin lugar a duda, las micotoxinas producidas por hongos del género *Claviceps*, conocido como “cornezuelo del centeno” y la micotoxicosis conocida como “ergotismo”, las que han tenido

una mayor importancia en los inicios de la micotoxicología (Demeke et al., 1979).

Las intoxicaciones causadas por el cornezuelo de centeno son tristemente famosas y los testimonios más antiguos se remontan a la época de los asirios (s. VI a.C.).

Algunos investigadores sostienen que el brebaje consumido por los participantes en los antiguos misterios griegos de los eleusinos, llamado “*kykeon*” y elaborado a partir de poleo y cebada, podría haber producido en los participantes diversos efectos alucinógenos, atribuibles al cornezuelo del centeno. Los asirios lo describen como una pústula nociva en la espiga del centeno. Marr y Malloy (1996), tal y como se refleja en una tablilla asiria del año 600 a. C., postulan que algunas de las 10 plagas mencionadas en La Biblia pueden haberse producido por micotoxinas; incluso en la última de esas plagas, a la que se atribuye la muerte de los primogénitos de las familias, todo apunta a que pudo haberse producido por el consumo de cereales contaminados, en gran medida, no ya, con micotoxinas del género *Claviceps*, sino además, por otro tipo de micotoxinas conocidas hoy en día como tricotecenos, y que pudieron ser producidos por la especie *Stachybotrys chartarum*. En aquel tiempo, por razones culturales, se permitía el acceso al alimento, en primer lugar, a los hombres e hijos varones de la familia, consumiendo éstos altas dosis de toxinas que pudieron haberles provocado la hemosiderosis y hemorragias letales que sufrieron.

En la antigua Persia, alrededor del 400 a. C., se explica que el consumo de cereales afectados por el cornezuelo por mujeres embarazadas originaba contracciones uterinas y abortos o bien la muerte en el parto. Del mismo modo, en la Edad Media, las epidemias de ergotismo, también se asociaron con multitud de abortos (Murray et al., 1992).

Con el paso de los años, y a medida que aumentaba el consumo de centeno en Europa, aumentaban los brotes de ergotismo, que llegó a conocerse como fuego sagrado o “fuego de San Antonio”. San Antonio Abad fue un ermitaño fundador de la vida monástica. Vivió en Egipto desde el año 251 hasta el 356 de nuestra era. Sus restos, por voluntad propia, permanecieron en lugar secreto durante muchos años, pero el interés popular hizo que acabaran siendo encontrados y trasladados a varios lugares, hasta que terminaron en Francia, en la abadía de Saint-Antoine de Viennois. San Antonio era considerado como milagroso porque a la sazón (s. XIII–XVI), se creía que una peregrinación al santuario santo aliviaba los síntomas que

padecían las personas afectadas por la enfermedad, siendo probable que el alivio fuera real, pues los peregrinos no consumían centeno durante el camino (Hardman et al., 1996). Por otra parte, en la abadía, los enfermos consumían pan blanco (llamados panes de San Antonio), elaborado en la abadía a base de trigo seleccionado por su calidad y, por tanto, exento de cornezuelo. Todo ello, originó la recuperación de muchos enfermos por lo que se encargó a esta orden el cuidado de las personas afectadas con estas dolencias.

En 1692, los extraños sucesos de las “brujas de Salem”, en la antigua colonia británica de Nueva Inglaterra, además de servir como fuente de numerosos libros históricos, de ficción, y hasta filmografías, desafortunadamente, provocó la ejecución de innumerables inocentes. Según la historiadora Mary Kilbourne Matossian (1989), los síntomas que presentaban las jóvenes consideradas como brujas, incluían, sensaciones de picor y hormigueo en la piel, distorsiones de la cara, parálisis, alucinaciones, convulsiones y demencia. Estas jóvenes habían consumido centeno contaminado con cornezuelo y los síntomas concuerdan con el cuadro que presentan los individuos afectados por el ergotismo (Cook, 2003).

Por otra parte, se llegó a correlacionar el aumento en el cornezuelo de centeno con un aumento de la lluvia y se pensó que quizá ocurría un cierto proceso de fermentación, sin más consecuencias, por lo que los cereales afectados, molidos, y en forma de polvo, llegaron a administrarse para favorecer las contracciones del parto bajo la denominación *pulvis ad partum* (el polvo del nacimiento) (Moir, 1995), también se consideró y usó como un material con propiedades medicinales y alucinógenas. El correr de los tiempos hizo variar las teorías referentes al cornezuelo de centeno hasta que, en 1815, Augustin Pyramus de Candolle (1778–1841) de Ginebra identificó el cornezuelo del centeno como un hongo. Aunque la controversia se mantuvo durante muchos años, afortunadamente lo cierto fue que, en muchas civilizaciones, la presencia de hongos en los alimentos era suficientemente importante como para descartar ese producto en su alimentación.

La frecuencia del ergotismo disminuyó rápidamente con el progreso de la agricultura y la diversificación de la alimentación; sin embargo, han existido epidemias de ergotismo en el norte y este de Europa hasta el siglo XIX y en 1926 ocurrieron en la ex-URSS. Más recientemente (1977-1978), se han registrado en Etiopía 47 muertes relacionadas con el consumo de cereales contaminados con el cornezuelo. Estos episodios posiblemente se deben a que el cambio en las dietas no ha sido por igual en todos los pueblos y en

Rusia, cuando ocurrió la última epidemia, la dieta era parecida a la de los europeos antes de 1750. Probablemente, el más reciente brote de ergotismo que ha afectado a humanos ha sido el ocurrido en China durante el período 1984–1985 (Coker, 2000).

En Rusia, los alcaloides derivados del género *Claviceps* y la toxina T-2 han afectado a la población de manera simultánea durante muchos años. Popularmente los rusos denominaron al ergotismo como *zlaia korcha* (la maldad se retuerce). La severidad del ergotismo se presentaba de manera distinta en función de la cepa de *Claviceps* y de las condiciones climatológicas, principalmente de la temperatura. Parece que la máxima cantidad de alcaloides se produce entre 17 °C y 20 °C.

En lo que se refiere a la toxina T-2, la primera micotoxicosis por tricotecenos que se identificó en Rusia, en el año 1932, tuvo una tasa de mortalidad del 60% (GajduSek, 1953), y su presencia fue endémica durante las décadas de los 30 y los 40 en la URSS donde hubo episodios con tasas de mortalidad de hasta un 80%. En las regiones más afectadas se encontró que los cultivos presentaban elevada contaminación con *Fusarium sporotrichioides*. Durante la II Guerra Mundial los tricotecenos provocaron la muerte de cientos de miles de habitantes en Rusia y diezmó pueblos enteros, siendo la zona de Siberia y el distrito de Orenburg los lugares más afectados. Las personas enfermas llegaban a presentar atrofia total de la médula. En sus orígenes la enfermedad producida por los tricotecenos se confundió con la escarlatina, difteria, pelagra e, incluso, escorbuto, hasta que en 1943 el gobierno ruso la definió como *Alimentary Toxic Aleukia* (ATA) (Mongi, 1987).

Otro episodio importante asociado a enfermedades por micotoxinas en humanos en poblaciones geográficamente definidas fue el síndrome de “beri beri” (síndrome del arroz amarillo o *shoshin-kakke* en japonés). Se trataba de una afección cardíaca aguda producida por la citreoviridina (o citroviridina), que desapareció tras suprimirse de los mercados el arroz mohoso. La citreoviridina es un producto metabólico de la especie *Penicillium citreonigrum*, que crece rápidamente en el arroz almacenado tras la cosecha, sobre todo en las regiones más frías de Japón (Calvo, 2007). Otro episodio, destacable, fue la nefropatía endémica de los Balcanes, relacionada con la micotoxina ocratoxina A (OTA), que ocurrió en la región homónima (Radic et al., 1997).

El hecho verdaderamente importante y que se puede considerar el inicio del interés por las micotoxinas y el reconocimiento de su importancia

para la salud humana y animal ocurrió en 1960, cuando se declaró una enfermedad hepática aguda en animales de granja en Gran Bretaña que diezmo la población de pavos. El agente responsable, en una primera etapa, no fue identificado pero no había dudas de que se trataba de una micotoxicosis adquirida por el consumo de pienso. La misteriosa enfermedad se denominó "Enfermedad X de los Pavos" o "Turkey X" y causó la muerte de más de cien mil pavos. Más tarde se comprobó que el agente causante de la misma eran las micotoxinas llamadas aflatoxinas, producidas por hongos del género *Aspergillus*. Los inspectores oficiales británicos trazaron la fuente de la micotoxina en un embarque de harina de cacahuete importada de Brasil. Posteriormente se observó que estas toxinas eran potentes hepatocarcinógenos en animales y seres humanos, lo que fomentó la investigación sobre las micotoxinas.

Después del descubrimiento de las AFLs (acrónimo de *Aspergillus flavus* toxin) en 1961, se estudiaron ampliamente los métodos para el cultivo del hongo y las condiciones para la producción de las AFLs y se comprobó que solamente el 30 % de las cepas de *Aspergillus flavus* son toxigénicas y que los métodos microbiológicos clásicos de identificación fúngica no son suficientes para distinguir entre cepas productoras y las que no lo son y, por tanto, no son relativamente eficaces para indicar la posible presencia (peligro potencial) de AFLs y, en general, de micotoxinas (Bradburn et al., 1994).

Más recientemente se han registrado otros episodios que han afectado de manera masiva a la salud pública como las intoxicaciones por micotoxinas que tuvieron lugar en 2004 en Kenia, donde 125 personas murieron y casi otras 200 resultaron gravemente afectadas después de ingerir maíz contaminado con AFLs. Las muertes se asociaron principalmente al maíz de cosecha propia, resultante de agricultura ecológica, que no había sido tratado con fungicidas ni había sido secado correctamente antes de su almacenamiento. Debido a la escasez de alimentos en ese momento, los granjeros pudieron haber cosechado el maíz antes de lo normal para prevenir hurtos en sus campos, de modo que el grano no estaría suficientemente maduro y presentaría excesiva cantidad de agua por lo que pudo ser más susceptible a la infección y desarrollo de los hongos (Lewis et al., 2005).

Las micotoxinas, por tanto, han marcado numerosos episodios en la historia, de los que aquí sólo se ha hecho referencia a algunos de ellos (Richard, 2007; Soriano, 2007), incluso, han sido utilizadas en la ficción novelada convirtiendo a las obras en grandes "best sellers". Conviene citar

dos obras: “El factor humano” de Graham Greene (Greene, 1998) y “Los archivos de Salem” de Robin Cook.

## 2.2. Las micotoxinas en la actualidad.

### Micotoxinas emergentes

---

La calidad, inocuidad y seguridad alimentaria ha permanecido a lo largo del tiempo como una necesidad humana básica. Velar por ello constituye una importante meta en salud pública a nivel mundial, y una buena prueba son las investigaciones que se han llevado y se están llevando a cabo en el campo de la seguridad alimentaria y, más concretamente, en materia de micotoxinas.

Actualmente, en los alimentos y piensos, resultan preocupantes tanto los peligros microbiológicos como los químicos. Entre los peligros químicos la OMS (FAO, 2004) ha caracterizado la contaminación de los alimentos con micotoxinas, de los productos de la pesca con ficotoxinas y de las especies de plantas comestibles, por sus toxinas vegetales, como fuentes importantes de enfermedades transmitidas por los alimentos. De estas tres categorías de toxinas naturales, las micotoxinas son las que han merecido, hasta ahora, mayor atención (Bhat et al., 2010) siendo los contaminantes naturales de los alimentos más extendidos a nivel mundial.

En base a los resultados de numerosos trabajos de investigación, en 1996, Pitt, experto micólogo, definió a las micotoxinas como “metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales y personas” (Pitt, 1996). Aunque en esa fecha existía suficiente información como para hacer tal afirmación, realmente ha sido en la última década cuando verdaderamente se ha avanzado más en el conocimiento de las micotoxinas y sus efectos en humanos y animales, así como en el de los hongos productores de estos metabolitos tóxicos en alimentos. Dichos efectos sobre la salud se conocen como micotoxicosis (Wild y Gong, 2010) y hoy está bien establecido que su gravedad depende de la micotoxina, vía y grado de exposición, edad y estado nutricional del individuo y posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre diferentes micotoxinas u otros agentes químicos a los que esté expuesto el individuo. Si bien hay más investigaciones sobre micotoxicosis en animales que en humanos, la evidencia existente es suficiente para asumir que las micotoxinas están involucradas como agentes etiológicos responsables de

enfermedades y síndromes en humanos y animales de diversa gravedad que va desde leves alteraciones gastrointestinales a efectos muy graves debido a que estos compuestos actúan como agentes inmunosupresores, mutagénicos, cancerígenos o teratogénicos. Pueden afectar a diferentes órganos y tejidos desencadenando afecciones cutáneas, neuropatías, nefropatías, alteraciones de la fertilidad y modificación de la respuesta inmune tornando al individuo más susceptibles a las enfermedades infecciosas (Domijan y Peraica, 2010; Zain, 2011).

Las micotoxicosis pueden manifestarse en forma aguda o crónica, desde una muerte rápida del individuo hasta la formación de un tumor, generalmente, en órganos del sistema digestivo. Aunque como se ha descrito anteriormente, se conocen numerosos episodios de micotoxicosis agudas a lo largo de la historia, en la actualidad los cuadros agudos son esporádicos y afectan sobre todo a regiones subdesarrolladas o en vías de desarrollo porque requieren de la ingesta de cantidades elevadas de micotoxinas que sólo se presentan si el alimento ha estado fuertemente contaminado con hongos productores y en condiciones adecuadas para la producción (Wagacha y Muthomi, 2008). No es habitual el aprovechamiento de estos alimentos en países desarrollados; sin embargo, son las micotoxicosis crónicas a las que se debe prestar especial atención en estos países, en los que, sin duda, la importancia de las micotoxinas obedece a sus efectos tóxicos más a largo plazo (OMS, 2002; Richard et al., 2007). Es, además, fundamental conocer si el individuo se encuentra expuesto a una o a varias micotoxinas de manera simultánea por los efectos sinérgicos o antagónicos que pueden presentar.

Desde hace tiempo, se conoce que la presencia simultánea de diversas micotoxinas puede influir tanto en el nivel de producción de estos metabolitos por los hongos presentes en la cosecha como en la toxicidad del material contaminado. Se ha observado, por ejemplo, que en cereales almacenados la presencia de tricotecenos puede favorecer la producción de AFLs y que, además, existen interacciones sinérgicas que potencian la toxicidad que cada una de ellas tendrían por separado (Speijers y Speijers, 2004).

Se han descrito incluso interacciones en las que se ven implicadas micotoxinas y otros metabolitos fúngicos no tóxicos, como la potente acción sinérgica del desoxinivalenol con otros metabolitos no tóxicos de *F. graminearum* (Dowd et al., 1989). También se han descrito efectos antagónicos, por ejemplo, entre OTA y AFLB<sub>1</sub> (Corcuera et al., 2011). Con el



paso de los años estos trabajos han sido muy escasos por lo que los conocimientos existentes hasta la fecha, en este campo particularmente importante de la micotoxicología, son demasiado limitados (Wild y Gong, 2010). La FAO, en su manual de APPCC, que tiene como finalidad prevenir la presencia de las micotoxinas en los alimentos destinados al consumo humano y animal, hace especial énfasis en este problema y realiza un llamamiento a la comunidad científica para la aportación de nuevos datos sobre esta problemática.

Debido a la elevada resistencia al calor, fermentación y otros tratamientos a que se pueden ver sometidas las materias primas durante su procesado tecnológico (Valle-Algarra et al., 2009), la presencia de micotoxinas en cosechas agrícolas y en sus derivados es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, WHO) (OMS, 2002) de alto riesgo para la salud del consumidor.

Las micotoxinas son, por tanto, consideradas dentro del grupo de los más importantes contaminantes naturales de alimentos. Siguen siendo un problema sin resolver debido a su impacto negativo sobre la salud pública y la economía de muchos países, particularmente los países en desarrollo, por las pérdidas económicas que suponen para ellos las enfermedades en la población y el deterioro y pérdida de las cosechas agrícolas (Peraica et al., 1999; Soriano, 2007; Reddy et al., 2010a; Ramos, 2011; EFSA, 2012).

La introducción de la Ley General de Alimentos 178/2002 (The European Parliament and the Council, 2002a) fue un paso importante en la evolución hacia el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF), tal y como existe en la actualidad. El sistema implica un intercambio rápido de información entre las autoridades competentes de los estados miembros de la Unión Europea y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Independiente de la Comisión Europea, la EFSA fue creada como un comité de expertos para desarrollar valoraciones de riesgos (entre ellos las micotoxinas) en el suministro de alimentos y piensos. En los informes anuales que elabora el RASFF, las micotoxinas suponen siempre la categoría de riesgo con mayor número de notificaciones que suele oscilar en torno a un 40% del total.

Por su parte, el Comité Mixto de Expertos FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios (JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) se reúne periódicamente para evaluar los aditivos alimentarios, los contaminantes, las sustancias tóxicas que se dan naturalmente y los residuos

de medicamentos veterinarios en los alimentos. El JECFA proporciona asesoramiento científico a la Comisión del Codex Alimentarius (CCA), principalmente a través de dos de sus comités generales, el Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes (CCFAC) y el Comité del Codex sobre Residuos de Medicamentos Veterinarios en los Alimentos (CCRVDF). El JECFA también presta sus servicios a los Estados Miembros de la FAO y de la OMS cuando se le solicita un dictamen científico sobre sustancias químicas en los alimentos. Como su cliente preferente es el Codex, sus prioridades son establecidas generalmente por el CCFAC y el CCRVDF. Una de estas prioridades que ocupa un lugar muy destacado es el control y la prevención de micotoxinas en alimentos.

Por otra parte, la producción de alimentos a nivel mundial está íntimamente relacionada con las condiciones ambientales; en este marco hay que destacar la labor del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) (United Nations Environment Programme, UNEP). El PNUMA, con sede en Nairobi, tiene una vasta historia ayudando a los gobiernos en la obtención de información ambiental para la toma de decisiones. Sus principales áreas de acción son el cambio climático, desastres y conflictos, manejo de ecosistemas, sustancias dañinas y eficiencia de recursos velando por el desarrollo sostenible de las naciones.

A medida que se avanza en el conocimiento de los efectos tóxicos de las micotoxinas y de su presencia cualitativa y cuantitativa en alimentos, más allá de la cosecha, procesado y comercialización, la legislación de los diferentes países, va ampliando el número de micotoxinas y alimentos sujetos a control. El Comité mixto UNEP/FAO/WHO sobre monitorización de contaminantes en alimentos inició ya en 1976 un programa a nivel mundial que tiene como objetivo la adquisición de datos acerca de los contaminantes en general y de las micotoxinas en particular. Tales datos y el avance de la investigación en materia de micotoxinas han despertado el interés y la creciente preocupación de los consumidores, autoridades sanitarias y organismos oficiales.

En la Unión Europea y, en consecuencia, en España, en la última década se han revisado y actualizado las reglamentaciones que afectan a la regulación de los niveles máximos de: AFLs (AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub>, AFLG<sub>2</sub> y AFLM<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> y FB<sub>3</sub>), deoxinivalenol, (DON, tricoteceno del grupo B), zearalenona (ZEA), patulina (PAT) y citrinina (CIT). La "International Agency for Research on Cancer" (IARC) las ha

clasificado en los grupos 1, 2B, 2B, 3, 3, 3 y 3, respectivamente (IARC, 1993). En la actualidad se están discutiendo los niveles máximos para las toxinas T-2 (T-2) y HT-2 (HT-2) en cereales, clasificadas, en ambos casos, por la IARC, en el grupo 3, por lo que, con toda probabilidad, y teniendo en cuenta que se presentan generalmente en cereales y derivados, de manera simultánea, los niveles que se autoricen harán referencia a la suma de ambas toxinas. El hecho de existir normativas para estas micotoxinas (apartado 9) permite concluir sin necesidad de descripciones detalladas que, al menos estos compuestos, se consideran un peligro real para la salud humana y animal que hay que controlar. Los informes anuales presentados por la RASFF en la última década (European Union, 2014) en lo que se refiere a partidas de alimentos y de aditivos alimentarios con niveles inaceptables de micotoxinas y, por tanto, rechazados, son los que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resumen de Informes del RASFF (periodo 2003-2013) (European Union, 2014) sobre el número de partidas de alimentos y aditivos alimentarios rechazadas, por presentar niveles inaceptables de micotoxinas.

<b>Micotoxina objeto del rechazo y número de partidas rechazadas</b>							
<b>Año</b>	<b>AFLs</b>	<b>DON</b>	<b>FBs</b>	<b>OTA</b>	<b>PAT</b>	<b>ZEA</b>	<b>TOTAL partidas</b>
2003	762		15	26			803
2004	839		14	27			880
2005	946		2	42	6		996
2006	801		15	54	7	1	878
2007	705	10	9	30		6	760
2008	902	4	2	20	3	2	933
2009	638	3	1	27			669
2010	649	2	3	34			688
2011	585	11	4	35			635
2012	484	4	4	32		4	528
2013	341	8	7	54			410
<b>TOTAL</b>	<b>7652</b>	<b>42</b>	<b>76</b>	<b>381</b>	<b>16</b>	<b>13</b>	<b>8180</b>

Es importante destacar que los datos que aparecen en esta tabla se refieren a casos declarados de presencia de micotoxinas en alimentos debido a la necesidad de los controles analíticos que se requieren para su

comercialización internacional (importación-exportación) pero, sin lugar a duda, existen infinidad de casos de presencia de micotoxinas en alimentos por encima de los niveles admisibles que no han sido declarados, por omisión o, sencillamente, por su desconocimiento debido a que no han sido analizados. En la tabla 1 se puede observar que de las micotoxinas para las que existen reglamentaciones, las que constituyen un mayor riesgo en alimentos son las AFLs y la OTA.

Por otra parte, como se irá ilustrando a lo largo de esta memoria, es importante hacer especial énfasis en que los últimos datos sobre la presencia de tricotecenos de tipo A, las toxinas T-2 y HT-2 en cereales son muy preocupantes (Edwards et al., 2009d; 2009e) y que en la actualidad estas toxinas junto con las AFLs y la OTA son motivo de especial atención a nivel mundial (EFSA, 2010b; European Commission, 2014).

En consecuencia, en esta Tesis Doctoral se prestará especial atención a las micotoxinas: **OTA, AFLs, y las toxinas T-2 y HT-2** como contaminantes de cereales y, en particular, de la cebada española. Junto a ellas, se considerarán también todas las micotoxinas contempladas en la legislación vigente. Asimismo, se realizará una revisión de su presencia en derivados de cereales y en otros alimentos de riesgo como la uva y, especialmente, en uno de sus derivados, el vino, por ser principales fuentes de OTA en la dieta.

En la actualidad para **la prevención y control de micotoxinas en alimentos** habría que dar respuesta a grandes interrogantes como:

- ¿Cuál es la identidad e incidencia de las especies fúngicas productoras de micotoxinas en las diferentes cosechas agrícolas?
- ¿Cuáles son los alimentos de nuestra dieta portadores de **micotoxinas** y a qué niveles se encuentran en ellos?
- ¿Qué influencia tienen las prácticas agrícolas en la presencia de hongos y micotoxinas en las cosechas?
- ¿Qué factores determinan el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas?
- ¿Cómo puede afectar el cambio climático global a la presencia de hongos y micotoxinas en productos agro-alimentarios?
- ¿Qué efecto tiene el procesado tecnológico de las materias primas en la estabilidad y permanencia de las micotoxinas en los productos derivados listos para el consumo?

No cabe duda de que la ingesta diaria de micotoxinas resulta de difícil evaluación debido a que no se conocen con certeza todas las especies fúngicas productoras de micotoxinas cuya presencia en el alimento constituye un **peligro potencial**, de que también pudieran existir micotoxinas, ni todos los alimentos contaminados con micotoxinas y su grado de contaminación por cada una de ellas, lo que constituye un **peligro real** para la salud del consumidor.

### 3. Hongos productores de ocratoxina A, aflatoxinas y las toxinas T-2 y HT-2. Peligro potencial en alimentos

Por lo que se conoce, hasta la fecha, los hongos productores de las más importantes micotoxinas que afectan en la actualidad a cosechas agrícolas de todo el mundo son, principalmente, especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* y, en menor grado, especies de los géneros *Penicillium*, *Alternaria* y *Claviceps*. Todas las especies productoras de micotoxinas y que, por tanto, constituyen un peligro potencial de presencia de micotoxinas en la cosecha, son ubicuas, se encuentran como saprófitos en suelos y sobre materia orgánica, especialmente vegetales y muchas de sus especies son fitopatógenas.

El desarrollo de los hongos productores de micotoxinas, como ocurre con el resto de microorganismos, está ligado a diversos factores bióticos y abióticos, lo que resulta en interacciones muy complejas. La incidencia real de las especies y cepas fúngicas productoras de micotoxinas en alimentos no se conoce con certeza debido, en buena parte, a la continua revisión taxonómica que están sufriendo estos hongos, en unos casos, debido a identificaciones erróneas y, en otros, al descubrimiento de nuevas especies. En este desconocimiento también influyen las variaciones cualitativas y cuantitativas que se suceden en la micobiota de las cosechas debidas a las prácticas agrícolas y a los tratamientos postcosecha que sufren las materias primas durante su procesamiento tecnológico. A pesar de todo, existen suficientes estudios en todo el mundo, incluida España, como para afirmar que la presencia de micotoxinas y, en particular, AFLs, OTA y las toxinas T-2 y HT-2 en productos agrícolas tan importantes como los cereales o la vid, se debe principalmente a especies fúngicas de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (Mateo et al., 2004; Medina et al., 2005a; 2006a; Magan y Aldred, 2007b; Yli-

Mattila et al., 2008; González-Salgado, 2010; Marín-García, 2010; Valle-Algarra, 2010; EFSA, 2012; Nielsen et al., 2014).

Para la correcta evaluación del peligro potencial derivado de la presencia de hongos productores de micotoxinas en productos agroalimentarios es necesario disponer de técnicas rápidas, sensibles y reproducibles que permitan la monitorización de los hongos, su identificación y la evaluación del nivel de contaminación del producto analizado.

Actualmente está bien fundamentado el hecho de que la biosíntesis de micotoxinas en productos agrícolas puede ocurrir en precosecha, durante el cosechado y en postcosecha (procesado, almacenamiento y comercialización) (Perrone et al., 2007a; Gregori et al., 2013). La importancia de cada fase depende, entre otros factores que se analizarán en el apartado 6, de la especie y cepa fúngica implicada y del hospedador. En cereales, *Aspergillus* spp. se desarrollan principalmente durante el almacenamiento (Magan et al., 2004; Magan y Aldred, 2007a) y en la última fase de la maduración, previa a la cosecha, mientras que *Fusarium* spp. se desarrollan mejor en precosecha (Mateo et al., 2004; Marín et al., 2004, Magan y Aldred, 2007a). En uva de vino la fase más crítica para el desarrollo de los hongos es durante la maduración de las bayas, en el viñedo, ya que la etapa de postcosecha apenas existe y las especies micotoxigénicas más destacables son principalmente del género *Aspergillus* (Battilani, et al., 2003; Serra et al., 2003; Medina et al., 2005a). La recogida de muestras para la evaluación de la microbiota se debe realizar, por tanto, en diferentes etapas dependiendo del cultivo y de su procesado tecnológico.

---

## 3.1. Identificación

---

Durante mucho tiempo la identificación de los hongos productores de micotoxinas en alimentos se ha realizado mediante el estudio de la morfología macro- y microscópica del hongo (Hawksworth et al., 1995) y, todavía, esta información sigue siendo un pilar básico en la taxonomía fúngica, cuyo desarrollo ha ido ligado al de las técnicas de microscopía y a los estudios sobre la fisiología de los hongos y, más recientemente, a los estudios sobre su genética (Frisvad et al., 2004; Samson et al., 2004; Pettersson et al., 2008; Pildain et al., 2008; Yin et al., 2009; de Kuppler et al., 2011).

El estudio morfológico del hongo implica métodos laboriosos, requiere

personal muy experto y no distingue variabilidad intra-específica, e incluso, a veces, tampoco es evidente la inter-específica. Ello ha hecho necesario el estudio de caracteres fisiológicos basados en el perfil de producción de metabolitos secundarios, como son las micotoxinas (Samson et al., 2004; 2006; 2007; Frisvad et al., 2007a; 2008).

Por otra parte, el avance en las técnicas basadas en el DNA, al igual que para el resto de organismos, también en el caso de los hongos filamentosos ha tenido un fuerte impacto en su taxonomía y filogenia (Peterson 2008; Jurado et al., 2010; de Kuppler et al., 2011) y ha resuelto los problemas asociados a la subjetividad de la identificación fenotípica y a la variabilidad morfológica y fisiológica debida a las condiciones de cultivo del hongo. En este sentido, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha supuesto una herramienta de gran impacto en el diagnóstico fúngico. Esta técnica es rápida, específica, fácil de realizar y requiere muy poca cantidad de DNA molde, permitiendo la detección de moléculas diana en mezclas complejas como puede ser un alimento (Russell y Paterson, 2006; Niessen, 2007). La técnica de PCR ha constituido una alternativa muy importante a procedimientos moleculares como la electroforesis en gel de campo pulsante (Mortimer et al., 1990), o a los métodos basados en hibridaciones de DNA, como el clásico “Southern Blot” y el “DNA-fingerprinting” (Varela et al., 2000).

Los principales métodos de PCR, que se emplean actualmente para la identificación de hongos filamentosos en general y para *Aspergillus* spp. (González-Salgado, 2010) y *Fusarium* spp. (Marín-García, 2010) en particular, son los siguientes:

- El polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs, “Restriction Fragment Length Polymorphism”). Esta técnica consiste en la amplificación de regiones genómicas con cebadores específicos y su posterior digestión con enzimas de restricción. En función de la región, de su tamaño y de la variabilidad del patrón de restricción obtenido permite la diferenciación entre cepas o linajes (a nivel intraespecífico), entre especies o entre géneros. Se ha empleado en investigaciones realizadas en numerosos hongos filamentosos, entre ellos en *Aspergillus* de la secciones *Nigri* (Medina et al., 2005a) *Circumdati* (Varga et al., 2000) o *Flavi* (Kumeda y Asao, 1996) y dentro del género *Fusarium* (Jiménez et al., 2000, Hinojo et al., 2004, Llorens et al., 2006a; 2006b).
- El ensayo de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD, “Random

Amplified Polimorphic DNA”) (Williams et al., 1990). Con esta técnica los patrones de DNA son generados por amplificación de segmentos de DNA al azar con cebadores cortos de secuencias de nucleótidos arbitrarias. La aplicación de RAPDs permite distinguir a nivel de especies y, en algunos casos, de subespecies (Sartori et al., 2006). Esta técnica presenta problemas de reproducibilidad y reacciones cruzadas por su sensibilidad a DNA no diana.

- El polimorfismo para la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs, “Amplified Fragment Length Polymorphism”) (Vos et al., 1995). Se ha utilizado para la identificación de especies y subespecies de hongos filamentosos como, por ejemplo, *Aspergillus* spp. o *Fusarium* spp. (Schmidt et al., 2004a; 2004b; Perrone et al., 2006; Khodadadi et al., 2011). Con esta técnica se pueden detectar elevados niveles de polimorfismo y es más reproducible que la técnica de RAPDs.
- La PCR con cebadores específicos. Puede estar basada en secuencias relacionadas o no con la biosíntesis de la micotoxina (Kim et al., 2011; Susca et al., 2007; Patiño et al., 2007; Luque et al., 2013). Para el diseño de sistemas específicos de detección han de definirse oligonucleótidos que permitan distinguir cepas, especies o incluso géneros, dependiendo de la finalidad. Es importante elegir bien la secuencia de DNA diana que se va a amplificar mediante PCR, la cual puede ser de genes codificadores, como los genes de EF-1, la  $\beta$ -tubulina, calmodulina o poliquétido sintetasa (Perrone et al., 2004; Samson et al., 2004; Susca et al., 2007), o secuencias de regiones no codificadoras como, por ejemplo, los espaciadores IGS (Intergenic Spacer Region) e ITS (Internal Transcribed Spacer).

Una de las regiones más empleadas actualmente para la distinción entre especies de hongos filamentosos es la del DNA ribosómico (rDNA). El empleo de las regiones del rDNA presenta distintas ventajas frente a otras dianas moleculares como son su mayor sensibilidad debida a la existencia de múltiples copias (100-300 copias repetidas en tándem por genoma haploide) y al patrón de evolución concertada entre estas copias, lo que tiende a homogeneizarlas. Cada copia consiste en regiones altamente conservadas, que incluyen los genes que codifican para las subunidades de rRNA 18S, 5,8S y 28S (White et al., 1990), alternadas con regiones espaciadoras variables (ITS e IGS). Los espaciadores ITS son dos regiones variables no codificantes llamadas



ITS1 e ITS2, que están localizadas entre los genes del rRNA 18S y 5,8S y entre el 5,8S y 28S, respectivamente, y se transcriben. La región IGS separa las unidades 18S y 28S del rDNA y no se transcribe. La región ITS tiene un tamaño de unos 600 pb, mientras que la región IGS tiene entre 1700-2800 pb, y su nivel de variabilidad es menor que el de la región IGS y mayor que los genes codificadores, lo que la hace muy adecuada para discriminar entre especies estrechamente relacionadas en hongos filamentosos o para ensayos de PCR específicos para especies productoras de micotoxinas (Samson et al., 2004; González-Salgado et al., 2005; Patiño et al., 2005; 2007).

Las regiones más conservadas (genes) permiten la comparación de especies más alejadas evolutivamente. Las regiones variables (espaciadores), como las IGS, permiten realizar estudios entre especies más cercanas, por ejemplo, de un mismo género como *Fusarium* (Jurado et al., 2005; 2006; Patiño et al., 2006).

- La técnica RT-PCR (reverse transcription-PCR). Permite la detección del mRNA mediante la amplificación por PCR de sus intermediarios de cDNA, sintetizados por transcripción inversa a partir de dichos mRNAs. Esta técnica ha sido empleada para monitorizar la expresión de genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas (Niessen, 2007). Así, se ha empleado para hongos productores de AFLs (Scherm et al., 2005; Degola et al., 2009; Rodrigues et al., 2009), tricotecenos (Doohan et al., 1999) y fumonisinas (López-Errasquín et al., 2006).
- La PCR cuantitativa (qPCR). A diferencia de la PCR convencional, la técnica de PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) permite monitorizar la amplificación en cada ciclo de la PCR mediante el uso de sondas o moléculas fluorescentes (Ginzinger, 2002) y es capaz así de estimar la cantidad de DNA genómico inicial (Russell y Paterson, 2006). Puede ser realizada tanto con DNA genómico como con cDNA (Real time RT-PCR), permitiendo en este último caso obtener valores precisos (cuantitativos) de expresión génica. A diferencia de la PCR convencional, la qPCR es más rápida y no requiere la visualización de los productos obtenidos en gel reduciendo el riesgo de contaminación post-PCR. La qPCR tiene un mayor rango de amplificación de la molécula diana, de cinco a seis ordenes de magnitud, comparado con los dos o tres órdenes de magnitud que se consiguen normalmente mediante PCR convencional y la cuantificación de DNA es más precisa,

ya que está basada en valores de amplificación intermedios en lugar de medidas en el punto final de la reacción. La qPCR se ha empleado con éxito para la cuantificación de hongos en alimentos entre ellos, cereales, como trigo (Geisen et al., 2004) y avena (Edwards et al., 2012). La mayoría de protocolos de qPCR desarrollados hasta el momento para especies de *Aspergillus* y *Fusarium* están basados en genes de copia única (Mulè et al., 2006; Atoui et al., 2007; 2012; López-Errasquin et al., 2007; Jurado et al., 2008; 2010; Nielsen et al., 2012; Rodríguez et al., 2012). El empleo de secuencias multicopia del rDNA podría aumentar la sensibilidad del método.

Con todos estos métodos al alcance del micólogo, es ineludible y necesario seguir trabajando intensamente en el empleo de técnicas moleculares en el estudio de hongos productores de micotoxinas para conseguir la correcta identificación y ubicación taxonómica de los géneros, especies y cepas fúngicas productoras de micotoxinas, realizar su diagnóstico rápido en precosecha y postcosecha y, en definitiva, aprovechar el enorme potencial de estas técnicas en el conocimiento de los hongos productores de micotoxinas en materias primas y derivados, especialmente en los que constituyen la base de la alimentación humana y animal, como es el caso de los cereales.

---

## 3.2. El género *Aspergillus*

La denominación del género *Aspergillus* se debe a la similitud morfológica de su cabeza conidial con un “aspergillum” (instrumento religioso utilizado para dispersar el agua bendita). Tradicionalmente, el género *Aspergillus* se incluía dentro de los deuteromicetos (suborden *Deuteromycotina*), porque en ellos no se había podido encontrar la forma sexual o teleomórfica y, por ello, no podían clasificarse como ascomicetos, basidiomicetos o zigomicetos por lo que se les conocía como los llamados “hongos imperfectos”. Desde que el género fue descrito, por vez primera, en 1729 por P. A. Micheli, en su obra “*Nova Plantarum Genera*” y, a medida que se ha avanzado en el estudio de su taxonomía, se ha observado que en torno a un tercio de las especies de *Aspergillus* poseen forma sexual conocida (Geiser, 2008, Pitt y Hocking, 2009a). Actualmente, este género está encuadrado dentro del orden *Eurotiales* y pertenece a la familia

*Trichocomaceae*. Los principales géneros en los que se agrupan las formas teleomórficas de *Aspergillus* son *Eurotium* y *Emericella*.

Como se ha indicado anteriormente, tradicionalmente, la clasificación de los hongos filamentosos, como el género *Aspergillus*, se basaba en la observación de sus características morfológicas, macro- y microscópicas y la primera monografía del género se publicó en 1965 (Raper y Fennell, 1965). En ella se describían 150 especies, clasificadas en 18 grupos. Veinte años más tarde, las especies se agruparon en subgéneros y secciones de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, criterio que sigue vigente en la actualidad.

La introducción de los conceptos de filogenia bioquímica y molecular y, especialmente, el concepto filogenético de especie ha tenido una fuerte repercusión en Biología y, en particular, en el campo de los hongos filamentosos. En base a ello, el número de especies de *Aspergillus*, en la actualidad, llega a ser de, aproximadamente, 250 especies distintas (Geiser et al., 2007) y este número sigue aumentando como consecuencia de continuas revisiones (Geiser, 2008) e identificación de nuevas especies.

Las especies del género *Aspergillus* se multiplican rápidamente en vegetales y, en particular, en cultivos de interés agroalimentario, tanto en precosecha como en postcosecha. Aunque se conocen algunas especies fitopatógenas como *A. niger*, implicada en la importante enfermedad conocida como “collar rot” en la planta del cacahuete (Gajera et al., 2010), cuyo control es un objetivo ineludible, lo cierto es que *Aspergillus* spp. se han considerado, principalmente, hongos típicos de postcosecha (Magan y Aldred, 2007a; 2007b; 2007c; Perrone et al., 2007a; Pitt y Hocking, 2009a) u hongos que se desarrollan en las últimas etapas de la maduración del fruto como ocurre en el caso de *A. carbonarius* en la uva (Battilani et al., 2003a; Medina et al., 2005a; Varga et al., 2006). *Aspergillus* spp. son también hongos muy abundantes en suelos, tanto cualitativa como cuantitativamente (Jaime-García y Cotty, 2010) y organismos saprófitos en materia orgánica en descomposición.

A pesar de lo indicado, en gran medida, el interés por *Aspergillus* spp. en los últimos años lo ha motivado su capacidad para producir diversas enfermedades en humanos y animales, tanto de origen infeccioso como de origen tóxico (Hedayati et al., 2007). Actualmente, se conoce que escasamente una decena de especies de *Aspergillus* son responsables de infecciones en humanos. Entre ellas hay que destacar *A. fumigatus*, seguido de *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. clavatus*, *A. flavus*, *A. niveus* y *A. ustus*

(Kradin y Mark, 2008). Producen enfermedades alérgicas, colonizaciones saprofitas o crónicas y enfermedades invasoras o sistémicas (Vonberg y Gastmeier, 2006). Son, sin embargo, las aspergilosis en vegetales las que dan lugar a micotoxicosis o intoxicaciones alimentarias en humanos y animales que pueden llegar a ser muy graves. Estas enfermedades se consideran, por tanto, intoxicaciones alimentarias de origen microbiano. Las principales micotoxinas producidas por *Aspergillus* spp., implicadas en micotoxicosis en humanos y animales son las AFLs y la OTA (IARC, 1993; Perrone et al., 2007a; European Union, 2014).

Por otra parte, es muy importante mencionar también aspectos positivos de *Aspergillus* spp. Algunas especies se han utilizado desde antiguo para la producción de sustancias como aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y metabolitos secundarios. *A. niger* ha sido la principal especie utilizada para la producción de ácido cítrico y ácido glucónico (Papagianni, 2007). Otra especie con especial importancia es *A. oryzae*, empleada, entre otras aplicaciones, para la producción de  $\alpha$ -amilasa, enzima de amplio uso en la industria panadera (Wosten et al., 2007). En Asia y, en menor medida en países de África y América del Sur, *A. oryzae*, se utiliza desde hace casi 2000 años como fermento natural en la producción de alimentos tradicionales, principalmente el koji, una masa elaborada a partir de cereales y leguminosas fermentadas que constituye la base del miso, la salsa de soja o el sake (Baker y Bennett, 2008). Los productos obtenidos de ambas especies, *A. niger* y *A. oryzae*, poseen la Categoría General de Alimentos Seguros (GRAS: "Generally Recognized as Safe") de la Agencia Estadounidense de Alimentación y Medicamentos (FDA: "Food and Drug Administration"). Es importante, por tanto, una correcta elección de la cepa para evitar problemas relacionados con intoxicaciones alimentarias.

---

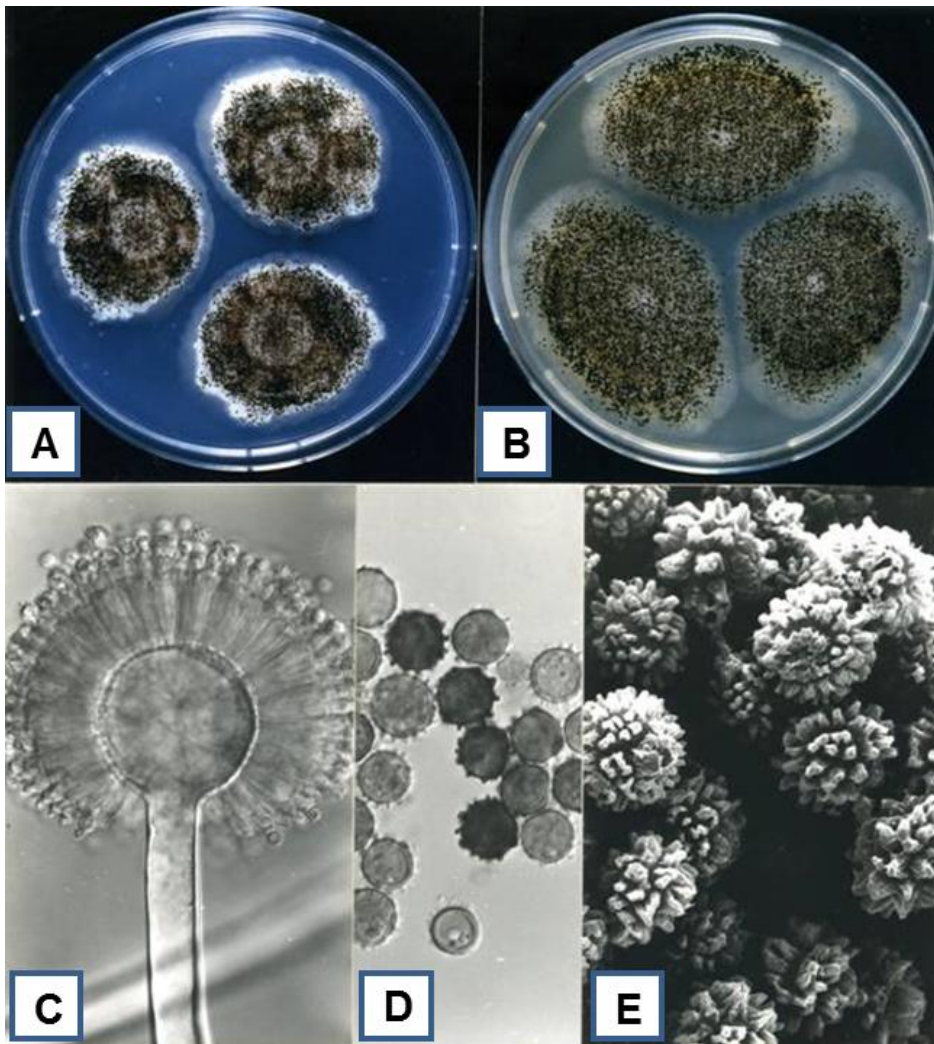
### 3.2.1. La sección *Nigri*

La sección *Nigri* de *Aspergillus* está formada por los llamados "hongos negros", término simple y, sin embargo, quizás el más unificador debido al color que presentan las colonias. A pesar del tiempo transcurrido entre las primeras monografías (Raper y Fennell, 1965) y la actualidad (Samson et al., 2007; Peterson, 2008; Chiotta et al., 2011) y a pesar del empleo de criterios basados en la morfología, fisiología y genética, lo cierto es que estos hongos siguen constituyendo un grupo muy controvertido desde el punto de vista

taxonómico. Según las primeras referencias, el número de especies incluidas en esta sección era 13. En la década de los noventa esta cifra se redujo a 6 y en los últimos 10 años han surgido nuevas discrepancias (Abarca et al., 2004; Samson et al., 2004; Serra et al., 2006a; Noonim et al., 2008a; Perrone et al., 2008) llegando a describirse en torno a 20 taxones. La visión más general y unificadora ha sido descrita por Samson et al. (2007) mediante varios árboles filogenéticos y, especialmente, por Peterson (2008) que proporciona un dendrograma consenso para la sección basado en las secuencias de la región ITS, calmodulina y RNA polimerasa II. Algunas especies de hongos pertenecientes a la sección *Nigri* han sido descritas como productoras de OTA. La más importante es *A. carbonarius* (Horie, 1995). Otras especies son, por ejemplo, *A. niger* (Abarca et al., 1994), *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* (Samson et al., 2004), *A. tubingensis* (Medina et al., 2005a) o *A. ibericus* (Serra et al., 2006a).

***A. carbonarius***. Dentro de las especies de esta sección, *A. carbonarius* muestra el potencial ocratoxigénico más alto, tanto en lo que se refiere a porcentaje de cepas productoras de OTA como a los niveles de toxina producidos (Medina et al., 2005a; Serra et al., 2006b; Samson et al., 2007). Se diferencia de las demás especies ocratoxigénicas de la sección *Nigri* por su micro-morfología. Presenta conidios más grandes que el resto con ornamentación equinulada (Figura 1). Las técnicas de RFLPs del rDNA y mtDNA, RAPDs y secuenciación de las regiones espaciadoras del rDNA permiten diferenciar claramente *A. carbonarius* del resto de especies del agregado *A. niger* (González-Salgado, 2005; Medina et al., 2005a; Samson et al., 2007). En la primera década del siglo XXI, la curiosidad y el interés que ha despertado en la comunidad científica la presencia de OTA en vino ha contribuido de manera significativa al avance del conocimiento sobre la taxonomía de los hongos de la sección *Nigri*. En estos años, la búsqueda de las especies productoras de OTA en uva en todas las regiones vitivinícolas del mundo y su caracterización morfológica, fisiológica y molecular ha sido exhaustiva.

*A. carbonarius* no parece ser una especie fúngica invasiva; es más bien un hongo oportunista que infecta la uva u otros cultivos agrícolas después de que éstos han sido dañados a causa de diversos factores como lluvia, impactos mecánicos, insectos u otros patógenos fúngicos invasivos como *Botrytis cinerea*, etc. La colonización de la uva por *A. carbonarius* se produce, preferentemente, en torno a la vendimia, que suele ser el momento en el que la uva está más dañada (Serra et al., 2003).



**Figura 1.** *Aspergillus carbonarius*. (A) Cultivos de 7 días a 25 °C en medio Agar Czapek, (B) Cultivos de 7 días a 25 °C en medio Agar Extracto de Malta, (C y E) Cabezas conidiales radiadas a globosas, biseriadas, (D) Conidios con ornamentación equinulada de 5.6-12.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Adaptado de: [http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal\\_detail.jsp?id=FU200802210018](http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp?id=FU200802210018)

Si el daño a la uva ha sido intenso y ocurre con mucha anterioridad al momento de la vendimia, la posibilidad de que se desarrolle *A. carbonarius* será aún mayor y, en consecuencia, mayor la concentración de OTA final que podrá encontrarse en el vino. Hay que mencionar que en algunos estudios en

los que se han realizado inoculaciones experimentales con esporas de *A. carbonarius* en uvas, tras un corto periodo de incubación se ha observado que el hongo es capaz de invadir las bayas (Battilani et al., 2004) si bien no se ha analizado el mecanismo de invasión, por lo que son necesarios más estudios, ya que ninguna de las especies de la sección *Nigri* ha sido descrita como invasiva. No obstante, se ha postulado que las esporas de *A. carbonarius* podrían establecerse ya en la floración y permanecer en la uva hasta la cosecha (Kazi et al., 2008).

Actualmente no hay duda de que *A. carbonarius* es la principal especie fúngica responsable de la presencia de OTA en uva, en los viñedos de la cuenca mediterránea (Battilani et al., 2003a; Medina et al., 2005a; Perrone et al., 2006; Serra et al., 2006b; Lasram et al., 2007; Samson et al., 2007), y en otras localizaciones como, por ejemplo, Israel (Guzev et al., 2006), Australia (Leong et al., 2007b) o en Sudamérica (Chulze et al., 2006). Otras especies de la sección *Nigri* productoras de OTA en uva son *A. tubingensis* y *A. niger* (Medina et al., 2005a). La investigación en estas especies, en los últimos años, en uva ha sido intensa y se ha encontrado que, por ejemplo, la especie *A. niger* es productora también de FB<sub>2</sub> y FB<sub>4</sub> en uva (Frisvad et al., 2007b; Mogensen et al., 2010; Chiotta et al., 2011). Sin embargo, muy poco se conoce sobre medidas efectivas para su prevención y control y sobre su posible presencia en cereales. Esta investigación, en concreto para las especies de *Aspergillus* del agregado *Niger* y para la especie *A. carbonarius* en cebada se aborda en el **ARTÍCULO 1** de esta Tesis Doctoral.

---

### 3.2.2. La sección *Circumdati*

---

La sección *Circumdati*, constituye el llamado “grupo *Aspergillus ochraceus*” de Raper y Fennell (1965), y contiene especies con conidios que van de color amarillo a ocre y no producen esclerocios negros. A esta sección pertenecen las especies tradicionalmente consideradas como las más productoras de OTA (van der Merwe et al., 1965a; 1965b; Hesseltine et al., 1972), mucho antes de que se detectase esta propiedad en especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*. La taxonomía del grupo ha ido revisándose paulatinamente con el paso de los años (Frisvad et al., 2004) y la lista de especies y cepas incluidas en esta sección ha ido modificándose, especialmente desde el uso de secuencias y marcadores genómicos. De esta manera, se han añadido especies nuevas y se han transferido otras a

diferentes secciones (*Flavi*, *Candidi* y *Wentii*), dando lugar, finalmente, a una sección, *Circumdati*, más homogénea, compuesta por hongos más estrechamente relacionados (Peterson, 2000). Hongos de la sección *Circumdati* se asocian a miembros del género teleomorfo *Neopetromyces* (Frisvad y Samson, 2000).

En lo que respecta a la producción de OTA, en 2004, se propusieron 7 nuevas especies, de las cuales todas, excepto una (*A. robustus*), se describieron como productoras de la toxina (Frisvad et al., 2004). Como resultado del trabajo de Frisvad et al., (2004) y de otros estudios, las especies, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* van adquiriendo más relevancia que *A. ochraceus*, considerada durante largo tiempo como la principal especie implicada en la presencia de OTA en café (Taniwaki et al., 2003), uvas o cereales (Refai et al., 1996), entre otros productos agrícolas.

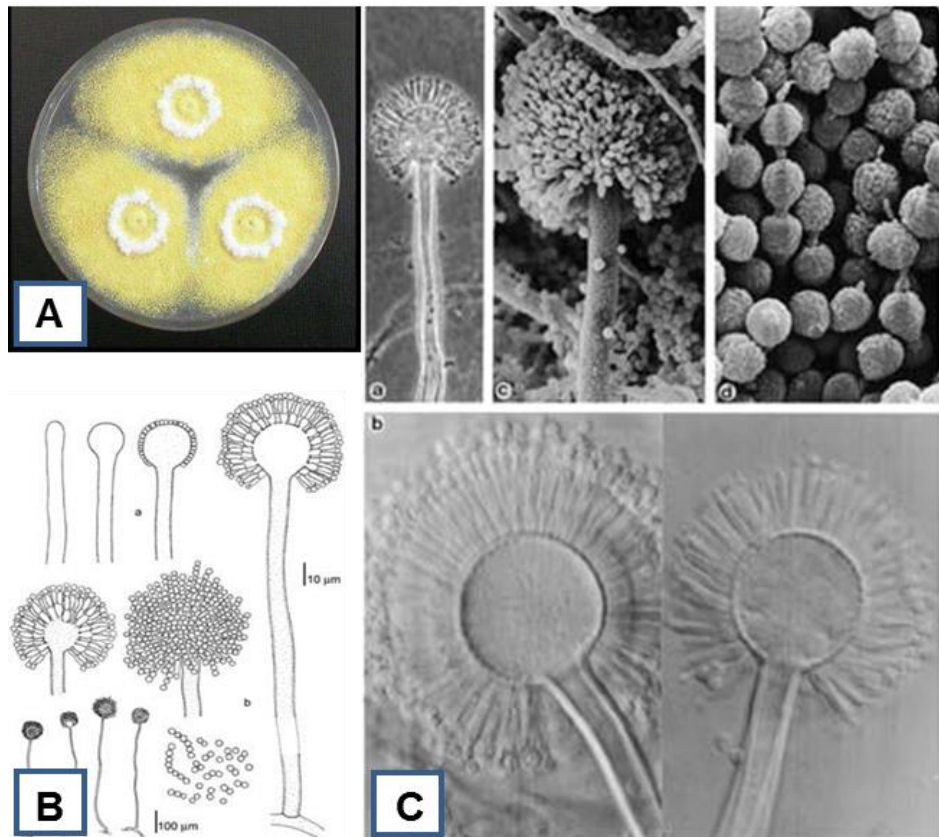
Actualmente, la contribución relativa de las especies de la sección *Circumdati* a la incidencia media de OTA en alimentos de origen agrícola no está establecida debido principalmente a las identificaciones erróneas realizadas en el pasado, basadas en la morfología, a la escasez de trabajos publicados y a la controversia existente entre los diferentes autores debido a la similitud fenotípica y filogenética que comparten (Batista et al., 2003; 2009; Samson et al., 2006 Palumbo et al., 2007). Todo ello dificulta el conocimiento de la incidencia y distribución geográfica y por cultivos de las diferentes especies de esta sección. Ha sido Peterson (2008) el autor del árbol filogenético más consensuado de la sección *Circumdati* basado en las secuencias de la  $\beta$ -tubulina, calmodulina, ITS y RNA polimerasa II. Especies importantes de esta sección, que se tratan en esta Tesis Doctoral, son *A. ochraceus* y *A. steynii*.

***A. ochraceus*, *A. steynii* y *A. westerdijkiae*.** *A. ochraceus* recibe su nombre por el color ocre de las colonias que forma (Figura 2). Habita en vegetación seca, semillas y frutos. Fue inicialmente descrita como la especie más frecuente dentro de la sección *Circumdati* (Gams et al., 1985). Ha sido habitualmente aislada a partir de granos de café, cereales y diferentes vegetales almacenados en climas cálidos y tropicales (Pardo et al., 2006). Esta especie, junto con *Penicillium verrucosum*, ha sido considerada durante largo tiempo como la más productora de OTA.

La importancia relativa de *A. ochraceus* como responsable de la presencia de OTA en productos agrícolas, decreció después de la descripción de *A. steynii* (Figura 3) y *A. westerdijkiae* (Figura 4) como dos nuevas

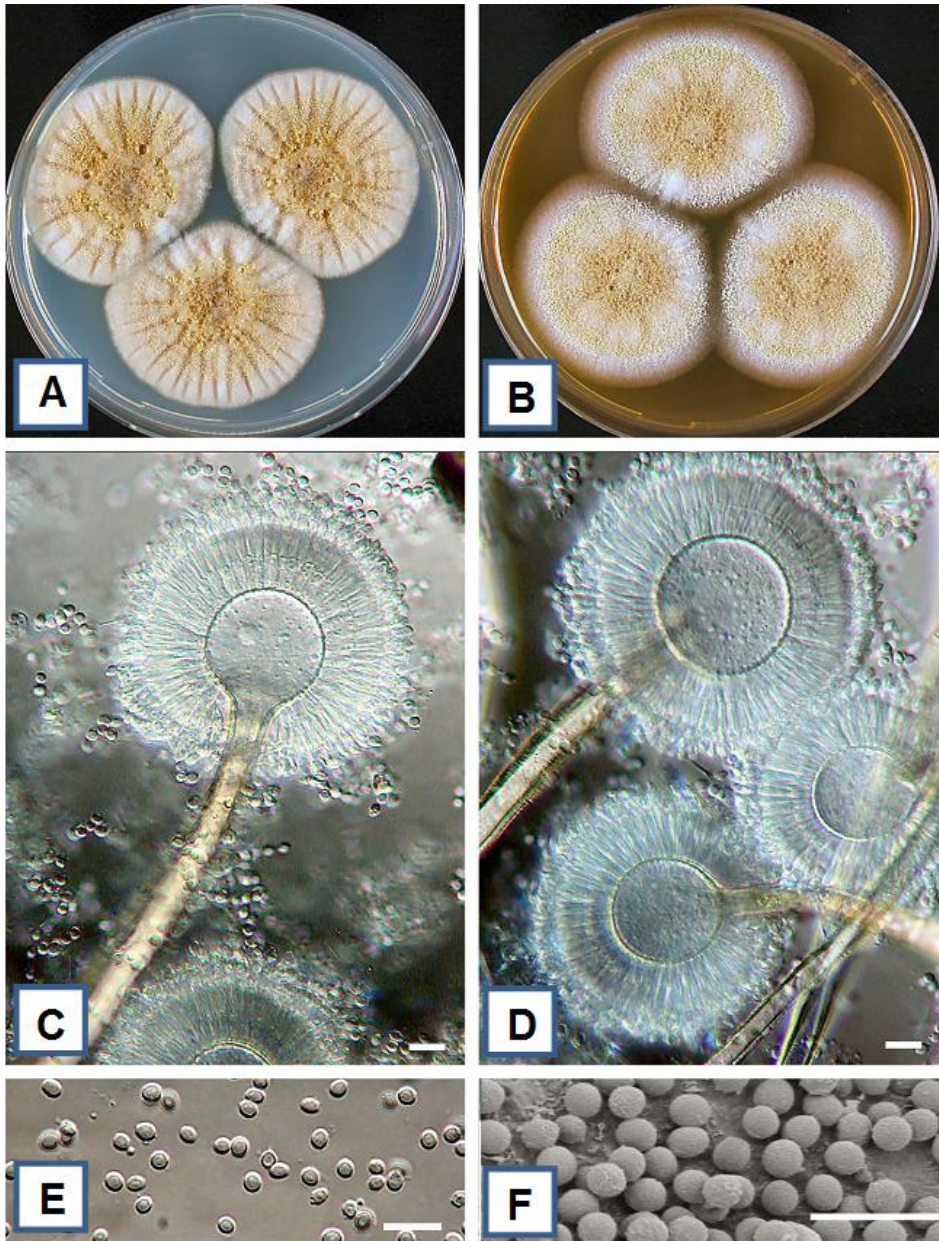


especies productoras de la toxina (Frisvad et al., 2004; Leong et al., 2007a; Noonim et al., 2008b; Díaz et al., 2009) y morfológicamente similares, especialmente la última.

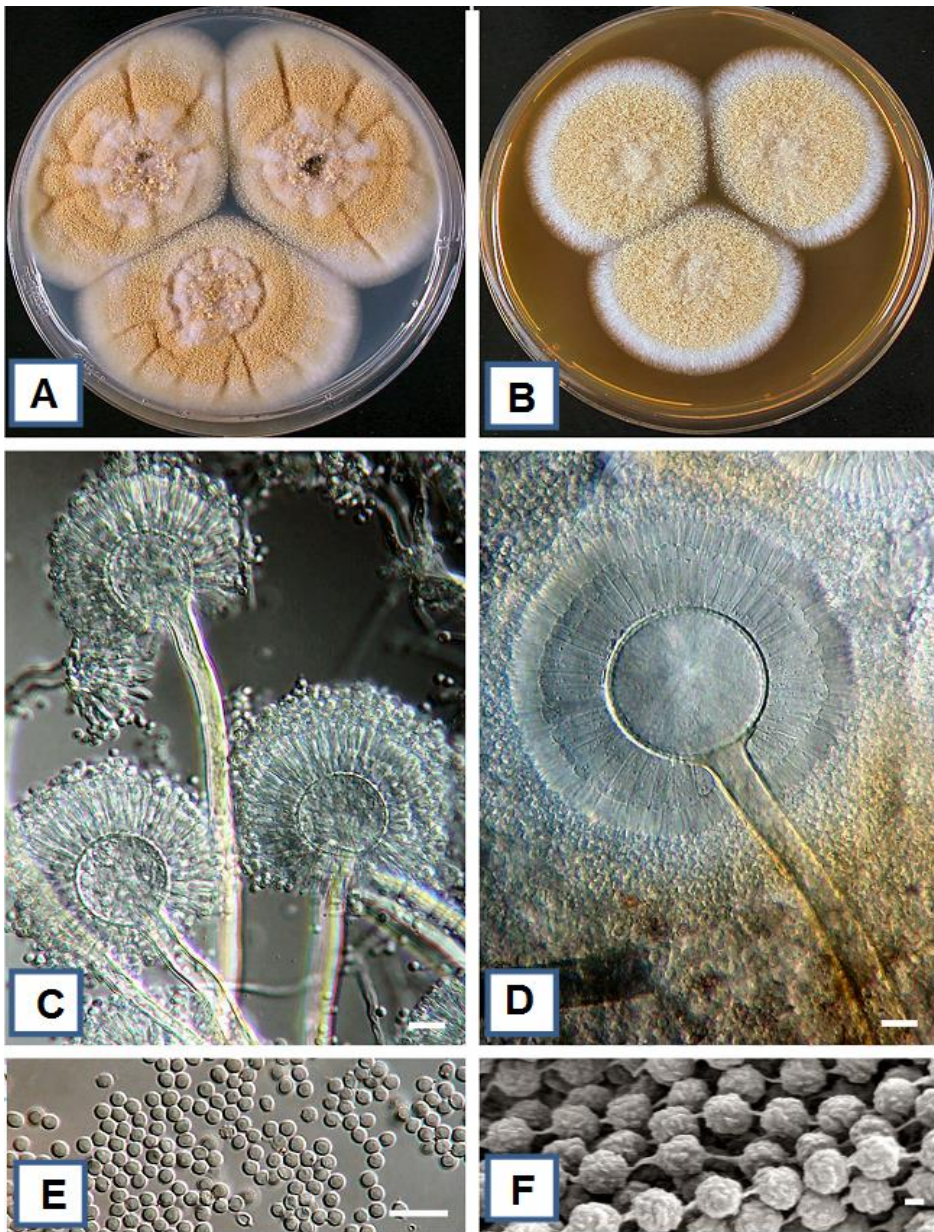


**Figura 2.** *Aspergillus ochraceus*. (A) Colonias en medio CYA cultivadas durante 5 días, (B) Esquema de conidióforos y conidios, (C) Micrografías de conidióforos y conidios. a. x390; b. x1215; c. x1170; d. x6000. (Adaptada de González-Salgado, 2010 y MycoBank MB190223).

Una vez descrita la especie *A. westerdijkiae*, estudios recientes indican que su frecuencia podría superar a la de *A. ochraceus* (Riba et al., 2008; Batista et al., 2009). Varios autores sugieren que todos los aislados de *A. ochraceus* descritos antes de la descripción de *A. westerdijkiae* corresponden de hecho a esta última especie y proponen re-nombrarla como *A. westerdijkiae* (Marino et al., 2009).



**Figura 3.** *Aspergillus steynii*. (A) Colonias de 7 días en medio CYA, (B) Colonias de 7 días en medio MEA, (C y D) Conidióforos biseriados, (E) conidios, (F) Micrografía electrónica de conidios. (Escala de las barras: C–E=10  $\mu$ m, F=1  $\mu$ m). Adaptada de Frisvad et al. (2004). *Aspergillus steynii* (Frisvad & Samson, sp. nov. MycoBank MB500006).



**Figura 4.** *Aspergillus westerdijkiae*. (A) Colonias de 7 días en medio CYA, (B) Colonias de 7 días en medio MEA, (C y D) Conidióforos biseriados, (E) conidios, (F) Micrografía electrónica de conidios. (Escala de las barras: C–E.=10  $\mu$ m, F=1  $\mu$ m). Adaptada de Frisvad et al. (2004). *Aspergillus westerdijkiae* (Frisvad & Samson, sp. nov. MycoBank MB500000).

Se necesitan nuevos estudios en los cuales se preste especial atención a algunas características de ambas especies, ya que, aunque presentan una morfología similar, *A. westerdijkiae* difiere de *A. ochraceus* en que no crece a 37 °C, en medio agar extracto de malta, y en el color de los esclerocios: los de *A. ochraceus* presentan tonalidad blanca a crema y los de *A. westerdijkiae* son de color rosa a púrpura. *A. steynii* no crece a 37 °C y presenta conidios elipsoidales de color amarillo pálido. Por otra parte, técnicas basadas en el DNA diferencian ambas especies entre sí y de *A. steynii* (Gil-Serna et al., 2009), por lo que su aplicación puede resolver identificaciones erróneas realizadas en el pasado, y otras en nuevos estudios que se realicen en el presente y en el futuro. Ello permitirá analizar la posible correlación entre la presencia de cada especie de la sección *Circumdati* y la de OTA y realizar estudios comparativos entre los resultados obtenidos, aplicando técnicas clásicas de recuento (UFC) y técnicas de PCR, a fin de unificar la metodología a emplear. Esta investigación se aborda en el **ARTÍCULO 1** de esta Tesis en el cereal más importante en España, la cebada.

---

### 3.2.3. La sección *Flavi*

Las especies incluidas en el género *Aspergillus* de la sección *Flavi*, se encuentran ampliamente extendidas en la naturaleza. Se aíslan con frecuencia en áreas tropicales y subtropicales a partir de suelos, forrajes, materia orgánica en descomposición y cultivos agrícolas, especialmente cereales, en pre-cosecha, durante la cosecha, en el almacén y durante el procesado (Diener et al., 1987; Pildain et al., 2005; Pushvinder y Desai, 2006; Abbas et al., 2009). La sección *Flavi* de *Aspergillus*, históricamente, incluye especies con cabezas conidiales de color amarillo-verdoso a marrón y esclerocios oscuros. Algunas especies como *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. tamarii* se usan en procesos fermentativos para la obtención de alimentos orientales. Cepas de *A. oryzae* genéticamente modificadas se emplean para la producción de enzimas como: pectin estearasa, lipasas, proteasas y xilanas (Pariza y Johnson, 2001). Sin embargo, la sección *Flavi* de *Aspergillus* contiene dos especies particularmente muy importantes en salud humana y animal, *A. flavus* y *A. parasiticus* (Raper y Fennell, 1965) productoras de AFLs, entre ellas, la AFLB<sub>1</sub>, que es el metabolito más tóxico producido por hongos. Especies de la sección *Flavi* se asocian a miembros del género teleomorfo *Petromyces* (Subramanian, 1972).

**A. flavus y A. parasiticus.** *A. flavus* (Figura 5) se considera el hongo responsable del inicio de la micotoxicología moderna que se podría situar a finales de los años 50 y principios de los 60. En ese tiempo se produjo una alta mortalidad en aves de corral y otros animales productores de alimentos como consecuencia de la ingestión de pienso que contenía cacahuete procedente de Sudamérica. Se observó que en estos piensos existía una fuerte contaminación con *A. flavus* y con metabolitos del hongo (Blount, 1961; Sargeant et al., 1961) que más tarde se identificaron como AFLs, sustancias con potente actividad carcinogénica (IARC, 1993).

A pesar del tiempo transcurrido *A. flavus* sigue siendo un gran problema en cereales; por ejemplo, en el norte de Italia, el verano del año 2003 fue particularmente seco y caluroso y esto favoreció el desarrollo de *A. flavus* en granos de maíz, lo que originó altos niveles de AFLM<sub>1</sub> en leche (Battilani et al., 2005). Del mismo modo en China se han encontrado recientemente resultados muy alarmantes sobre presencia de AFLM<sub>1</sub> en leche. Zheng et al. (2013) han encontrado que el 20,3% de 153 muestras de leche UHT y el 65,4% de 26 muestras de leche pasteurizada estudiadas presentaban niveles de AFLM<sub>1</sub> por encima del límite legal autorizado en la UE (0,05 µg/l). Además de su implicación en intoxicaciones alimentarias, *A. flavus* ha sido descrita como la segunda causa de aspergilosis en pacientes inmunodeprimidos (Hedayati et al., 2007; Rokas et al., 2007).

Es importante, sin embargo, considerar que la caracterización morfológica de *A. flavus* es difícil y, por tanto, puede haber numerosas identificaciones erróneas realizadas en el pasado. Esta especie se describe, macroscópicamente, como un hongo aterciopelado, de color amarillo a verde o marrón con reverso dorado a rojo-marrón (Hedayati et al., 2007), características que comparte con la especie *A. parasiticus*.

Desde hace tiempo se ha intentado encontrar alguna característica distintiva y de fácil observación que permitiese distinguir entre *A. flavus* y *A. parasiticus* a nivel morfológico; en este sentido, algunos autores han indicado que solamente las cepas de *A. flavus* producen esclerocios (Kozakiewicz, 1989). Otros autores han ido más allá y han afirmado que el tamaño de los esclerocios es una característica fenotípica de *A. flavus* que puede ser usada para distinguir dos grupos a nivel intraespecífico (Horn, 2003; Abbas et al., 2005). Estos grupos estarían formados por las cepas L que presentan esclerocios de diámetro superior a 400 µm y las cepas S con esclerocios de diámetro inferior a 400 µm.

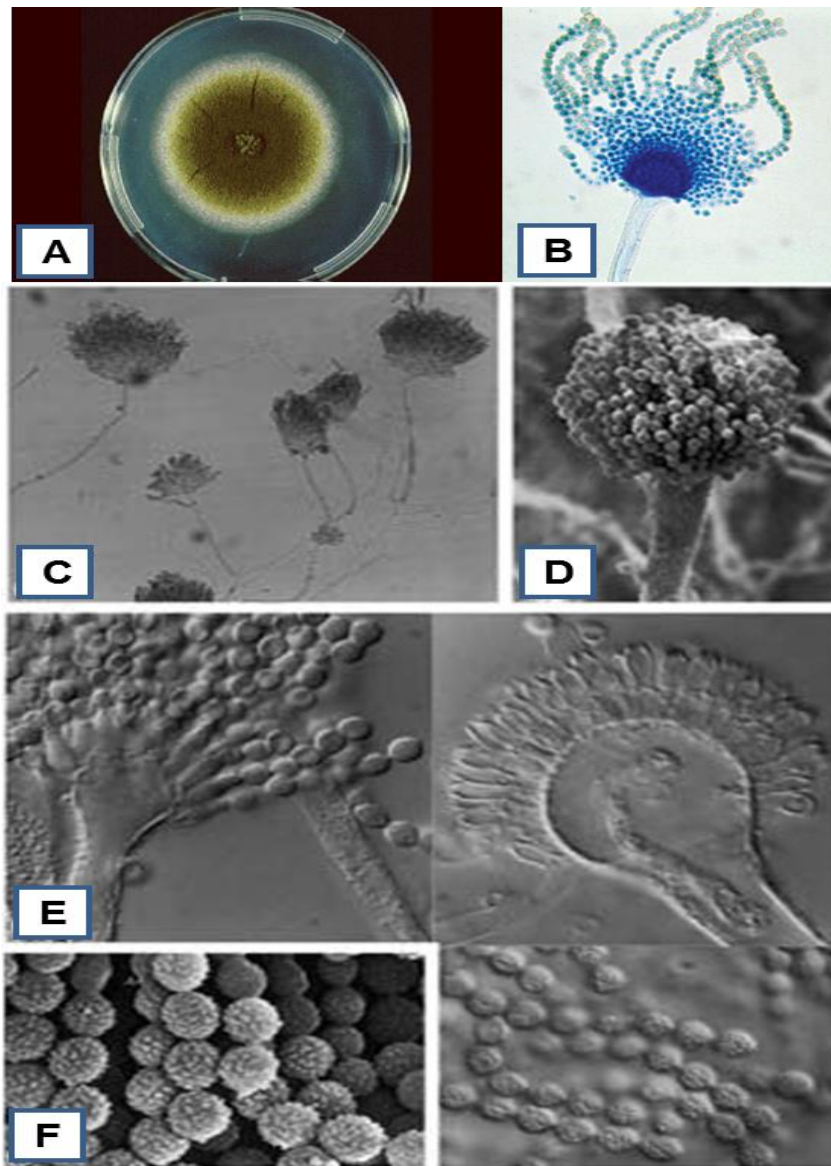
Se ha apuntado también que la capacidad para producir AFLs podría estar relacionada con esta característica fenotípica, pero en este aspecto los resultados entre autores son contradictorios. Abbas et al. (2005) indican que las cepas L son productoras de elevadas cantidades de AFLs, mientras que las cepas S producen niveles muy bajos de AFLs o no son productoras. En cambio, Probst et al. (2005) en el mismo año defienden la teoría contraria.

Por otra parte, en un estudio realizado por Giorni et al. (2007) con 70 cepas de *Aspergillus* de la sección *Flavi* aisladas de maíz encuentran que 65 eran de la especie *A. flavus* y 5 de *A. parasiticus*. Del total de cepas estudiadas el 63% fueron productoras de esclerocios, 4 de ellas de la especie *A. parasiticus* y 40 de la especie *A. flavus*. No parece, por tanto, que la presencia de esclerocios sea una característica útil para distinguir entre ambas especies porque las dos son capaces de formarlos.

Una de las características que han ayudado a distinguir a estas dos especies ha sido su capacidad para producir diferentes AFLs. Así, se ha mantenido que *A. flavus* produce AFLB<sub>1</sub> (biometabolizada y presente en leche y nombrada como AFLM<sub>1</sub>) y AFLB<sub>2</sub>, además de ácido ciclopiazónico, aflatrem, ácido 3-nitropropiónico, sterigmatocistina, versicolorina A y aspertoxina, mientras que *A. parasiticus*, es capaz de producir AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub> y versicolorina A (Smith y Moss, 1985; Diener et al., 1987; D'Mello y Macdonald, 1997; Wilson et al., 2002).

Otros autores, sin embargo, han encontrado AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub> en cultivos de cepas de *A. flavus* (Gabal et al., 1994; Cotty y Cardwell, 1999). En la actualidad se defiende más bien la primera conclusión (Schmidt-Heydt et al., 2010) y se mantiene el convencimiento de que en ambas especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* existen cepas productoras de AFLs y cepas que no son aflatoxigénicas (Smith y Moss, 1985; Abdel-Hadi et al., 2011).

Actualmente *A. flavus* y *A. parasiticus* se consideran dos taxa estrechamente relacionadas e incluso estudios basados en el DNA indican que existe suficiente complementariedad (96%) entre ambas como para concluir que son co-específicas (Cary y Ehrlich, 2006). Debido a la importancia de los miembros de la sección *Flavi*, especialmente de estas dos especies, han llegado a ser uno de los grupos de hongos filamentosos mejor estudiados (Rokas et al., 2007). Su taxonomía se encuentra en continua revisión y ha ido modificándose debido a la realización de análisis filogenéticos cada vez más amplios (Peterson, 2008).



**Figura 5.** *Aspergillus flavus*. (A) Colonias de 7 días en agar Czapek, (B) Conidióforo (adaptado de Hedayati et al., 2007), (C, D, E y F) *A. flavus* (NBRC) 30107. Conidióforos uniseriados y biseriados y conidios. C x130, D x940, E x1600, F x3600 (adaptado de MycoBank).

<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TargetKey=14682616000002126&Rec=3659>

En el presente, no hay duda de que varias de las especies asignadas a la sección *Flavi* no pueden distinguirse en base, únicamente, a la morfología (Frisvad et al., 2005; Pildain et al., 2008) por lo que nos podemos encontrar ante numerosas identificaciones erróneas realizadas en el pasado.

Sin duda, las técnicas que pueden permitir la distinción entre *A. flavus* y *A. parasiticus* e, incluso, entre cepas productoras y no productoras de AFLs deben ser técnicas basadas en el DNA (Degola et al., 2009; Sardiñas et al., 2011).

Se puede concluir, por tanto, que la contribución de *A. flavus* y *A. parasiticus* a la presencia de AFLs en alimentos no se conoce, ya que, al igual que ocurre con las especies de la sección *Circumdati*, también en la sección *Flavi* se han realizado identificaciones erróneas en el pasado. Por ello, el estudio de la presencia de cada una de estas especies en cultivos agrícolas mediante métodos de PCR específicos es una investigación que hay que abordar. Una vez que se dispone de protocolos específicos de PCR para su identificación, será necesario realizar muchos estudios para averiguar su verdadera incidencia y distribución geográfica y por cultivos agrícolas empleando estas técnicas.

Por otra parte, ambas especies son, en la actualidad, objetivo prioritario en seguridad alimentaria por su gran resistencia a condiciones de baja  $a_w$  y elevada temperatura y, en consecuencia, su gran capacidad competitiva en el marco del cambio climático global.

Hasta la fecha, no se había realizado ningún estudio sobre la presencia de las especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* en cebada cultivada en España aplicando protocolos de PCR. Tampoco se había estudiado la posible correlación entre la presencia de estas especies y la presencia de AFLs en las muestras de cereal ni se habían realizado estudios comparativos sobre la efectividad de los métodos clásicos de recuento de esporas viables y los métodos de PCR para evaluar el grado de contaminación de las semillas. Esta investigación se aborda en el **ARTÍCULO 1** de esta Tesis Doctoral.

---

### 3.3. El género *Fusarium*

El género *Fusarium* pertenece al phylum *Ascomycota*, orden *Hypocreales*. Algunas de las especies del género *Fusarium* sólo presentan una fase asexual (anamorfo o forma imperfecta), mientras que otras pueden



presentar además un estado teleomórfico (forma sexual o perfecta). Los estados teleomórficos de *Fusarium* están incluidos en cuatro géneros, *Gibberella*, *Cosmospora*, *Neocosmospora* (*Haematonectria*) y *Albonectria* (Seifert y Lévesque, 2004).

Los primeros datos sobre hongos del género *Fusarium* fueron aportados por un monje franciscano en México en el siglo XVI y estaban relacionados con episodios de podredumbres observadas en cereales, principalmente, maíz. Más tarde apareció la primera descripción científica del género (Link, 1809) y, después de ello, se fueron sucediendo numerosas clasificaciones, lo que ha hecho que la taxonomía de este género se halle en continua revisión y el número de especies aceptadas haya variado dentro de un amplio rango (Wollenweber y Reinking, 1935; Snyder et al., 1956; Gerlach y Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983). Las herramientas empleadas en estas clasificaciones se han centrado en el estudio de la morfología y en la presencia o ausencia de los tres tipos de esporas asexuales que las especies de este género pueden producir: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Otras características utilizadas que complementan a las anteriores son la morfología de la colonia, pigmentación y presencia o ausencia de peritecios. En base a ello, el número de especies del género *Fusarium* depende, por tanto, del sistema taxonómico empleado. Gerlach y Nirenberg (1982) aceptaron 90 especies, basándose en la escuela de Berlín (Wollenweber y Reinking, 1935), mientras que Nelson et al. (1983) aceptaron 43 especies, basándose en la escuela Americana (Snyder y Hansen, 1940; 1941; 1945). En las últimas dos décadas se han identificado más de 40 nuevas especies de *Fusarium*, en su mayoría de la sección *Liseola*.

Por tanto, como para el resto de géneros fúngicos, también para *Fusarium*, hasta los años 90, el concepto de especie estuvo basado principalmente en caracteres morfológicos. Después de esta fecha, nuevas herramientas como el perfil de metabolitos que producen y diferentes técnicas moleculares se convirtieron en valiosos instrumentos que se usaron para revisar y corregir la descripción tradicional de especie (Torp y Nirenberg, 2004). La aparición del concepto de especie filogenética ha dado lugar a la construcción de “filogenias moleculares” también en *Fusarium*. Según este concepto, los límites de una especie estarían determinados por la congruencia entre las filogenias derivadas de análisis multilocus. Estos estudios de concordancia genealógica (Taylor et al., 2000) han sido usados para determinar el carácter monofilético de algunas de las especies de *Fusarium* y

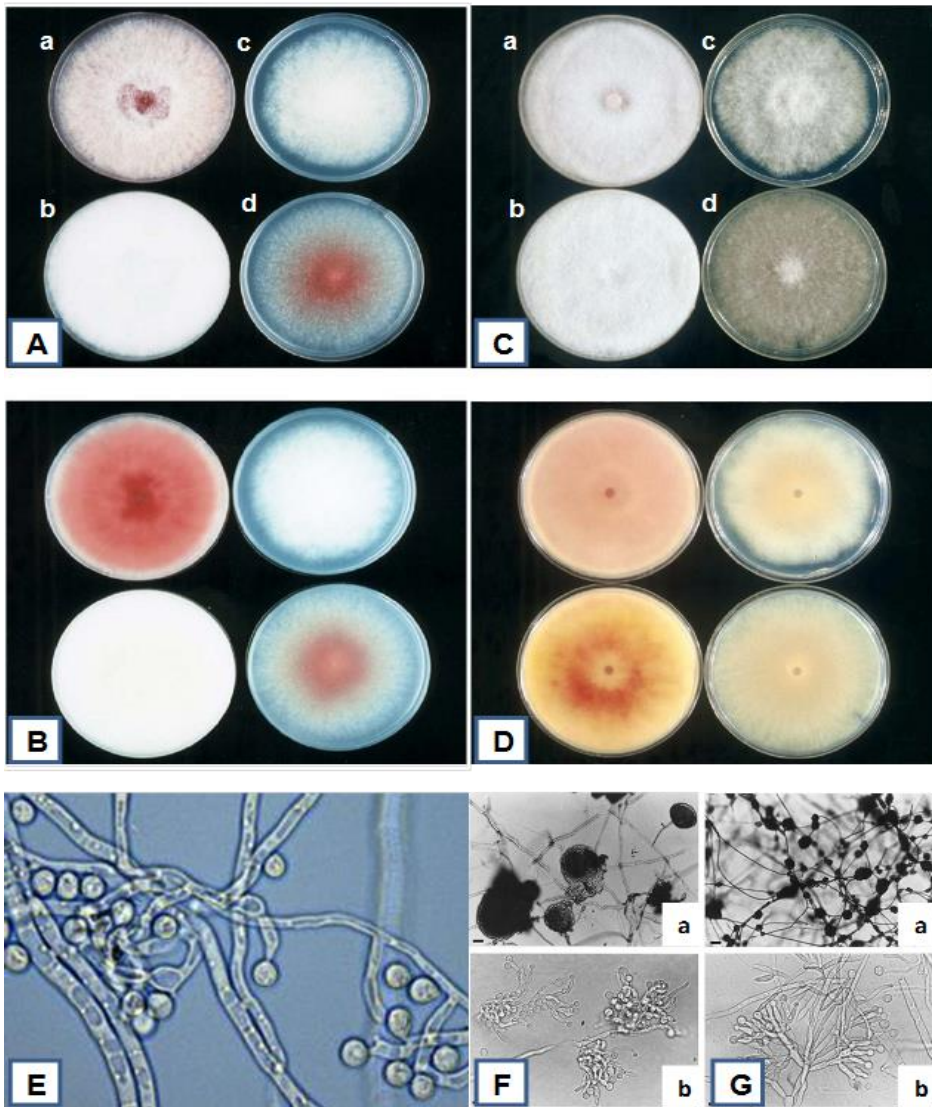
la existencia de diferentes linajes en una misma especie, o incluso, para discernir entre especies muy próximas entre sí y, por tanto, casi idénticas.

En la actualidad, se han descrito alrededor de 150 especies de *Fusarium* morfológica y/o filogenéticamente diferentes y bien caracterizadas y aceptadas por los taxónomos pero no existe ningún manual disponible para abordar el tema de una manera clara, sencilla y rápida (Seifert y Lévesque, 2004).

Dentro de este género, en el presente, la especie que atrae mayor atención es ***Fusarium langsethiae*** por su elevada implicación en la frecuente presencia de tricotecenos A y, más concretamente, de las toxinas T-2 y HT-2, detectadas en la última década en cereales en Europa. Esta especie fue descrita por vez primera por Torp y Langseth (1999). Estos autores, en un principio, la describieron como una posible nueva especie de *Fusarium* con la micro-morfología de *F. poae* y el perfil de producción de micotoxinas de *F. sporotrichioides*. Estas dos investigadoras comenzaron estudiando 18 aislados de la que, en principio, denominaron, “powdery *F. poae*”, que habían sido aislados de cereales en Noruega, Austria y Holanda y todos ellos eran productores de la toxina T-2, al igual que ocurre con la mayor parte de los aislados de *F. sporotrichioides* y en contra de lo que ocurre con los de *F. poae*. Esto les hizo cuestionarse si se trataba de una nueva especie.

Ya anteriormente al trabajo de Torp y Langseth se había descrito la presencia de *Fusarium* spp. y de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales en Noruega, sobre todo en avena, y también, que eran producidas por una especie de *Fusarium* de identidad incierta (Abildgren et al., 1987). Tuvo que transcurrir más de una década hasta que Torp y Langseth (1999) la describieron por primera vez como “powdery *F. poae*”.

Cinco años más tarde a esta primera descripción, Torp y Nirenberg (2004) definieron formalmente a *F. langsethiae* como una nueva especie de la sección *Sporotrichiella* que presentaba los perfiles de producción de micotoxinas similares a los de *F. sporotrichioides* y apenas se diferenciaba morfológicamente de *F. poae*, aunque presentaba algunas diferencias como: crecimiento más lento, menor cantidad de micelio aéreo, ausencia de exudado y olor a melocotón y conidios napiformes o globosos terminales en el micelio aéreo (Figura 6). Cepas de esta nueva especie de *Fusarium* se han identificado en cereales de Austria, la República Checa, Dinamarca, Inglaterra, Noruega, Holanda y Alemania (Torp y Adler, 2004; Edwards et al., 2012).



**Figura 6.** (A) Cultivos de 7 días a 25 °C en PDA (Agar Patata Dextrosa) de dos cepas de *F. poae*, a) BBA, 69074 y b) IBT, 9980) y dos cepas de *F. langsethiae* c) IBT, 9951 y d) IBT, 9922), (B) Reverso de los cultivos A, de las cepas a, b, c y d, respectivamente, (C) Cultivos de 7 días a 20 °C en PDA de las cepas a, b, c y d, (D) Reverso de los cultivos C de las cepas a, b, c y d, respectivamente, (E) y (F) a) y b). Conidióforos de *F. langsethiae*, (G) a) y b) Conidióforos de *F. poae*. Adaptado de Torp y Nirenberg (2004) y on-line (2013).

Una vez identificada como una nueva especie del género *Fusarium*, pronto interesó a la comunidad científica la gran capacidad de *F. langsethiae* para producir micotoxinas y, muy especialmente, las toxinas T-2 y HT-2 en cereales, sobre todo en avena y se plantearon cuál sería su incidencia real. Para dar respuesta en lo que se refiere a la presencia de *F. langsethiae* en cereales a nivel mundial, diferentes autores coinciden en que es muy posible que las cepas de *F. poae* descritas en el pasado en la bibliografía como productoras de T-2 y HT-2 sean realmente cepas de *F. langsethiae* (Knutsen et al., 2004; Torp y Nirenberg, 2004) ya que su similitud morfológica no permite distinguirlas. Aunque algunos aislados de *F. poae* pueden producir T-2 y HT-2 en cultivos, cuando se comparan los niveles producidos con los de *F. sporotrichioides* o *F. langsethiae*, se observa que en los cultivos de *F. poae* los niveles de ambas toxinas son significativamente más bajos (Thrane et al., 2004; Yli-Mattila et al., 2011).

Por otra parte, diferentes especies de *Fusarium* como *F. avenaceum*, *F. culmorum* y *F. graminearum*, y dos especies de *Microdochium*, *M. nivale* y *M. majus* (Parry et al., 1996; Xu et al., 2005) se han descrito como productoras de la grave enfermedad de los cereales conocida como “Fusarium head blight” (FHB) que puede dar lugar a bajo rendimiento de la cosecha (Goswami y Kistler, 2004), de la calidad del grano (Snijders, 2004) y de la semilla (Gilbert y Tekauz, 1995) y a la contaminación con micotoxinas (Bottalico y Perrone, 2002).

Sin embargo, no parece que *F. langsethiae* se encuentre implicada en esta enfermedad de la planta (Imathiu, 2008; Nicolaisen et al., 2009; Imathiu et al., 2010; Fredlund et al., 2010) ni en ninguna otra por lo que su presencia es poco evidente. En estudios muy recientes (Edwards et al., 2012) en los que se emplean cebadores específicos para el diagnóstico de *F. langsethiae* (Wilson et al., 2004), de *F. sporotrichioides* (Wilson et al., 2004) y de *F. poae* (Nicolaisen et al., 2009) se demuestra que *F. langsethiae* es la especie responsable de la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en la avena cosechada en los últimos años en el Reino Unido.

Por tanto, se puede concluir que es necesario realizar un estudio general aplicando técnicas de PCR al análisis de la microbiota de cereales, de diferentes orígenes geográficos, a fin de evaluar la verdadera incidencia de las especies de la sección *Sporotrichiella* y conocer su epidemiología. Al mismo tiempo es necesario actualizar los conocimientos sobre otras especies de *Fusarium* productoras de tricotecenos B, zearalenona y fumonisinas en

cereales. Esta investigación en cebada cultivada en España se aborda por vez primera en el **ARTÍCULO 2** de la Tesis.

## 4. Ocratoxina A, aflatoxinas y las toxinas T-2 y HT-2. Peligro real en alimentos

---

La ingesta diaria admisible (IDA) de las diferentes micotoxinas, según la OMS, varía dependiendo de la micotoxina y del individuo. Sin embargo, aunque se fijen niveles admisibles medios para individuos adultos y para individuos jóvenes, lo cierto es que, hasta ahora, no se ha podido evaluar adecuadamente la cantidad real que se ingiere diariamente de cada micotoxina y sus posibles efectos sinérgicos. De este hecho surge la necesidad de desarrollar a nivel mundial un plan intensivo de investigación que informe sobre el verdadero peligro real que presenta, para el consumidor, la presencia de micotoxinas en los productos que componen su dieta.

**Los cereales** cebada, trigo, maíz, avena y arroz, alimentos básicos en la dieta humana y animal, son los productos agrícolas que presentan un mayor peligro de ser portadores de una o múltiples micotoxinas por tratarse de cultivos donde se desarrolla una amplia diversidad de especies fúngicas productoras de estos metabolitos tóxicos. La importancia global de los cereales en la dieta humana y animal se ha descrito a lo largo de la historia del hombre y de la agricultura. Su relevancia histórica, mitológica, cultural, religiosa y económica todavía, en muchos aspectos, subsiste en la actualidad. Constituyen el grupo de alimentos más ubicuo e importante en el mundo, lo que hace que tengan una posición privilegiada en la nutrición de las diferentes poblaciones del planeta. Los cereales son fuente de energía, fibra, proteínas, lípidos ricos en ácidos grasos esenciales y minerales (Dewettinck et al., 2008). Se ha estimado que el consumo de cereales proporciona el 50% de proteínas y energía necesaria en la dieta humana (FAO, 1999).

Por tanto, la contaminación de los cereales con micotoxinas constituye una fuente directa e indirecta de exposición humana a estos metabolitos fúngicos, debido al consumo directo del cereal y de los derivados de mismo, y también al consumo de alimentos de origen animal, obtenidos de animales alimentados con piensos elaborados con cereales contaminados con micotoxinas.

Los cereales son la materia prima básica en diversos procesos tecnológicos, industriales, domésticos y tradicionales. En la actualidad el pan es uno de los productos más importantes; se elabora con una amplia variedad de cereales, en muchos casos, integrales por su mayor aporte en fibra. El cereal usado depende del tipo de pan, así se usa harina de trigo (roti indio, baguette francesa, diferentes panes españoles, etc.), arroz (pumpernickel alemán), maíz (broa portugués), multicereales integrales, o bien desprovistos de cubierta (en todo el mundo), etc.

Otros alimentos importantes son los cereales de desayuno de los que existe una extraordinaria variedad y cuyo consumo ha aumentado hasta el punto de igualarse con los productos de bollería y pastelería en muchos países. Los cereales se usan también en la preparación de bebidas alcohólicas tales como whisky, cerveza, vodka, bourbon americano, sake japonés, etc. y variedades únicas de alimentos como boza turco, injera etíope o kenkey de Ghana.

La producción de micotoxinas en los granos del cereal ocurre tanto en precosecha como en postcosecha. Por otra parte, debido a la resistencia de estos compuestos a los tratamientos tecnológicos del cereal, las micotoxinas permanecen en los productos derivados. Son, por tanto, los alimentos por excelencia donde se pueden presentar, de forma simultánea, diversas micotoxinas (Schollenberger et al., 1999; 2005; Mateo et al., 2004; Roscoe et al., 2008; Villa y Markaki, 2009; Zinedine y Mañes, 2009; Cano-Sancho et al., 2011; Ibáñez-Vea et al, 2011a; 2011b, Škrbić et al., 2012, Kirincic, et al., 2015).

**Las frutas** constituyen también una fuente primaria importante de micotoxinas en la dieta aunque, en este caso, el número de micotoxinas que potencialmente podría encontrarse de manera simultánea es menor, ya que en las frutas, habitualmente, coexiste un número más reducido de especies fúngicas productoras. Sin embargo, considerando que una única especie puede ser productora de varias micotoxinas, también, en este caso, la coexistencia de varias micotoxinas es probable, si bien su número sería más limitado que en el caso de los cereales.

El orden de importancia de los hongos productores de micotoxinas en frutas y otros vegetales es *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. (Barkai-Golan, 2008a; 2008b; 2008c) y las principales micotoxinas que se han encontrado han sido OTA en uva y derivados de la uva y OTA y las AFLs en

higos; todas ellas son producidas por especies de *Aspergillus* (Barkai-Golan, 2008a, European Union, 2014).

Es también importante la patulina en manzana y derivados de la manzana, toxina producida principalmente por *Penicillium expansum* (Barkai-Golan, 2008b; Valle-Algarra, 2010; Marín et al., 2011). Finalmente, cabe citar el ácido tenuazónico, alternariol y alternariol monometil éter, producidos por diferentes especies de *Alternaria* (Barkai-Golan, 2008c), que colonizan la parte aérea de muchos vegetales y son frecuentes en materia vegetal en descomposición.

En la obra completa de Barkai-Golan (2008) se recopila información sobre el estado actual de la presencia de micotoxinas en frutas y vegetales a través de diferentes capítulos escritos por diferentes autores. En esta obra se concluye que es la OTA, presente en uva y derivados de la uva, la micotoxina más importante en la actualidad, seguida de la patulina, en manzana y derivados de la manzana.

Además de los cereales, las frutas, y sus respectivos derivados, incluso, derivados fermentados como el pan, la cerveza o el vino, donde se han encontrado micotoxinas (Anselme et al., 2006; Mateo et al., 2007; Duarte et al., 2010a; 2010b) es muy importante considerar que existen otros productos agroalimentarios donde la presencia de una o varias micotoxinas puede ser significativa porque en ellos coexisten diversos hongos productores. Ello sucede, por ejemplo, en frutos secos (Bayman et al., 2002), café (Vecchio et al., 2012), especias, especialmente en pimentón (Fazekas et al., 2005; Mandeel, 2005; Santos et al., 2011), aceites (Cavaliere et al., 2007) hierbas medicinales (Ventura et al., 2004), cacao (Copetti et al., 2011) y un largo etc. Incluso en los últimos años un producto muy apreciado por los consumidores más exigentes que ha llamado la atención ha sido el polen de abeja. Se emplea como aditivo y complemento alimentario, y su consumo se está potenciando en programas de dietética y nutrición como ingrediente en alimentos funcionales debido, entre otras propiedades beneficiosas, a su elevado contenido en aminoácidos libres. Los únicos estudios existentes hasta la fecha sobre hongos y micotoxinas en polen de abeja se han realizado en nuestro laboratorio (Medina et al., 2004; 2005b; Mateo et al., 2008a).

El aporte de micotoxinas a la dieta humana debido a alimentos de origen animal ha sido muy escasamente estudiado, especialmente en España y los estudios que se han llevado a cabo están localizados en una región geográfica muy restringida del norte del país (Jiménez et al., 2001). En

general, la presencia de micotoxinas se ha descrito principalmente en carne e hígado de cerdo y aves (Jørgensen, 1998; Matrella et al., 2006). El estudio de estos alimentos y de los piensos más importantes en la dieta de los animales de consumo es fundamental para una evaluación más correcta de la ingesta de micotoxinas en nuestro país. Es, por tanto, ésta una línea de investigación en la que se tiene que trabajar con la finalidad de establecer metodologías eficaces para su análisis en los alimentos contaminados y poder realizar estudios de incidencia comparativos, dentro y fuera de España. La lista de alimentos portadores de micotoxinas en la dieta está, por consiguiente, abierta y existen todavía muchos alimentos por explorar (Bhat et al., 2010).

En este contexto de actualidad y haciendo una revisión y estudio crítico de la bibliografía se puede concluir que **OTA**, **AFLB<sub>1</sub>**, **AFLB<sub>2</sub>**, **AFLG<sub>1</sub>** y **AFLG<sub>2</sub>**, así como las toxinas **T-2** y **HT-2** son las toxinas de mayor interés en la actualidad.

---

## 4.1. La ocratoxina A

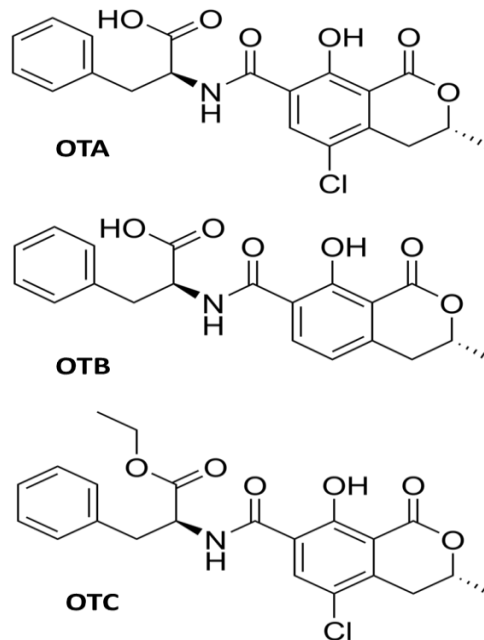
---

Las ocratoxinas constituyen una amplia familia de moléculas de las cuales la más importante es la OTA debido a que es la más frecuente en alimentos y piensos y a su mayor toxicidad. Se trata de una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida (Figura 7).

La OTA es un sólido cristalino blanco con un punto de fusión de 169 °C que emite fluorescencia verde que cambia a celeste en presencia de un álcali. La forma ácida es soluble en disolventes orgánicos polares y la sal sódica en agua. Es inestable a la luz; sin embargo, en una disolución etanólica es estable si se mantiene en la oscuridad y a baja temperatura. Posee dos constantes de acidez, una debida al grupo carboxílico ( $pK_a=4.4$ ) y otra debida al grupo hidroxilo del anillo bencénico ( $pK_a=7.1$ ) (Valenta, 1998). Su espectro de absorción UV varía con el pH y la polaridad del disolvente, siendo el máximo de absorción a 330 nm en metanol.

La ocratoxina B (OTB) es el derivado no clorado de la OTA y la ocratoxina C (OTC) es su éster etílico (Figura 7). La OTA y la 4-hidroxi-OTA, junto con la OTB, y sus ésteres metílico y etílico son metabolitos fúngicos.





**Figura 7.** Estructura de las ocratoxinas A, B y C.

### 4.1.1. Efectos tóxicos

La OTA se absorbe en el tracto gastrointestinal, la mayor parte de esta absorción tiene lugar a nivel del estómago y yeyuno proximal y pasa a la circulación sistémica, por lo que se detecta en sangre y tejidos. Los animales en que se absorbe con mayor eficacia son el cerdo, la rata, el ratón y el pollo, a niveles que oscilan entre el 40 y el 60%. Los rumiantes absorben muy poca OTA, ya que la microbiota del rumen del animal la transforma en OT $\alpha$  (Sreemannarayana et al., 1988; Kuiper–Goodman y Scott, 1989). No obstante, se ha encontrado la micotoxina en suero o en las heces y orina de oveja tras el consumo de cantidades elevadas de OTA (por encima de 2 mg/kg de pienso), demostrando que una importante cantidad de micotoxina no se degrada en el aparato digestivo (Höhler et al., 1999). Las concentraciones más altas de OTA se detectan en los órganos de mayor actividad metabólica como riñón, hígado, músculo y grasa (Martínez-Larrañaga y Anadón, 2006).

Durante su distribución, la OTA tiene una alta capacidad de fijación a

proteínas plasmáticas; en el torrente sanguíneo se encuentra unida a la albúmina y a otras proteínas sanguíneas (Sreemannarayana et al., 1988; Kuiper–Goodman y Scott, 1989), tiene también una eficiente circulación enterohepática (Kuiper–Goodman y Scott, 1989; Petzinger y Weidenbach, 2002; Sangare–Tigori et al., 2006) y presenta una vida media variable, con valores de 72-120 horas en el cerdo y 840 horas (35 días) en el hombre, siendo la fracción libre de toxina < 0,2% (Studer-Rohr et al., 2000).

La OTA es la micotoxina que se detecta con mayor frecuencia en la sangre de individuos sanos. Desde hace más de una década, en distintos estudios realizados a nivel mundial se ha detectado OTA en concentraciones de ppb en un 50% a un 100% de las muestras de sangre humana de individuos sanos analizadas (Burdaspal y Legarda, 1998; Ueno et al., 1998; Filali et al., 2002; Lino et al., 2008; Hmaissia-Khlifa et al., 2010) y también en individuos enfermos (Zaied et al., 2011; Hmaissia-Khlifa et al., 2012). La OTA también ha sido detectada en riñón, orina y en leche de mujer (Duarte et al., 2012), lo cual constituye un riesgo para el recién nacido afectándole de manera directa en su crecimiento y desarrollo. Un caso excepcional es el de los rumiantes ya que la OTA no es habitualmente excretada por vía láctea debido a su previa degradación por acción de la microbiota del rumen (Creppy, 2002). Pese a ello, hay que indicar que se ha detectado OTA en leche de vaca (Skaug, 1999).

La OTA puede actuar como sustrato del enzima fenilalanina hidroxilasa dando lugar a los epímeros (4S)-hidroxiocratoxina A y (4R)- hidroxiocratoxina A que aparecen en orina. El primero se forma principalmente en hígado de cerdo y el segundo en hígado de humanos y rata. Al igual que la OTA son compuestos tóxicos y son los principales metabolitos de la toxina. Además del metabolismo hepático la microbiota intestinal actúa hidrolizando la OTA a la forma OT $\alpha$  que también se absorbe a nivel intestinal. En ratas, se ha observado que la inhibición de esta microbiota mediante neomicina aumenta la concentración de OTA en sangre. En rumiantes la microbiota del rumen actúa sobre la OTA degradándola también a la forma OT $\alpha$  (Figura 8). La OT $\alpha$  ha sido aislada de la orina de animales de experimentación a los que se había administrado OTA (Sreemannarayana et al., 1988). Del mismo modo la OTB es hidrolizada a ocratoxina  $\beta$  (OT $\beta$ ) de escasa toxicidad y a (4R)-hidroxiocratoxina B.

Además de estos metabolitos, se han descrito otros productos resultantes del metabolismo de la OTA (Figura 9) como los conjugados de la

OTA con pentosas y hexosas, que han sido detectados en orina (Gross-Steinmeyer et al., 2002; Zepnik et al., 2003).

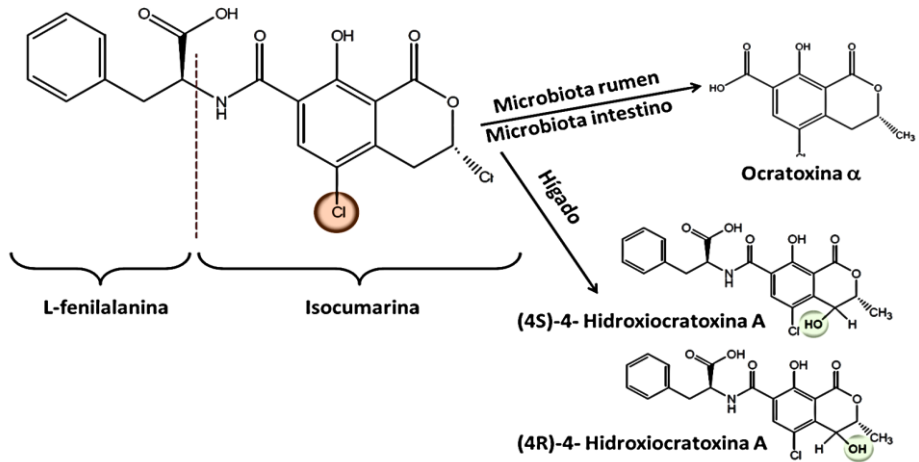


Figura 8. Principales metabolitos de la ocratoxina A.

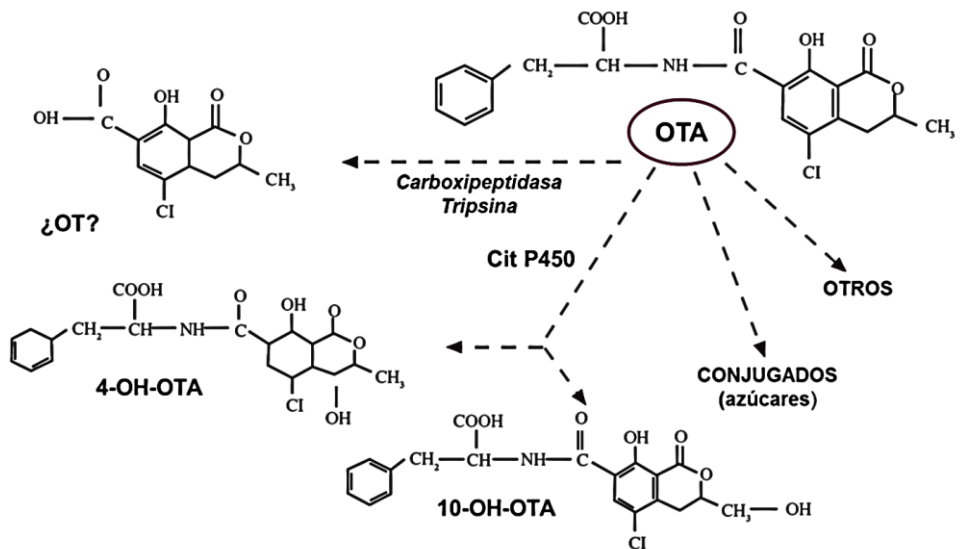


Figura 9. Otros metabolitos de la ocratoxina A.

También en algunas especies de animales se ha descrito la hidroxilación de la OTA a nivel hepático a la forma 10-OH-OTA. Aunque todos estos productos de degradación de la OTA parece que presentan escasa toxicidad, diferentes autores sugieren la formación de otros metabolitos cuya toxicidad es actualmente objeto de investigación.

Los principales mecanismos de acción de la OTA mediante los cuales ejerce su acción tóxica son:

- Alteración de la respiración celular: La OTA actúa inhibiendo competitivamente la actividad de la ATPasa, la succinato deshidrogenasa y la citocromo C oxidasa lo que genera efectos similares a los producidos en una lesión celular, obteniendo como productos finales radicales hidroxilados por peroxidación lipídica (Xiao et al., 2006).
- Alteración de la síntesis de proteínas: Este mecanismo se produce a nivel post-transcripcional por inhibición competitiva de la Phe- ARNt sintetasa. Por tanto, este efecto de la OTA es principalmente resultado de su similitud estructural con el aminoácido esencial fenilalanina (Phe), lo que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas (Creppy et al., 1984; Dirheimer y Creppy, 1991). En su mecanismo de acción se han descrito otros efectos secundarios como la inhibición de la síntesis de DNA y RNA. La inhibición de la síntesis de proteínas que produce la OTA es fácilmente reversible por la adición de fenilalanina al medio. Sin embargo, esta competitividad entre la OTA y la fenilalanina, a igualdad de concentración, siempre es a favor de la segunda, aunque puede ocurrir lo contrario debido a que la OTA se acumula en el interior de la célula alcanzando concentraciones intracelulares que superan con mucho a las de la fenilalanina. Creppy et al. (1983a) demostraron que la concentración de OTA en un cultivo celular dentro de las células es entre 200 y 300 veces superior con respecto a la concentración de OTA en el medio de cultivo. La OTA es, además, capaz de interactuar con otros enzimas que usan la fenilalanina como sustrato (Zanic-Grubisic et al., 2000) y producir peroxidación lipídica, superoxidación y formación de radicales peróxido de hidrógeno (Baudrimont et al., 1994). Estudios *in vitro* con células renales demuestran un efecto inductor de la OTA sobre la caspasa y la protein kinasa que induce a la alteración de la síntesis de ADN con sus consiguientes consecuencias (Dorrenhaus et al., 2000).

- Secuestro de calcio microsomal: Este mecanismo constituye una reacción temprana y ligada al fenómeno de peroxidación lipídica. Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran que la OTA produce una inhibición en el bombeo y captación de calcio a través del retículo endoplasmático del hepatocito. Se ha descrito que los niveles de calcio en ratas y en cultivos de microsomas hepáticos descienden cuando se tratan con concentraciones elevadas de OTA (López de Cerain et al., 2000).

La OTA presenta acción nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena, teratogénica y neurotóxica (Kuiper-Goodman, 1996; EFSA, 2006; 2010a). La IARC (IARC, 1993) la ha clasificado en el grupo 2B por considerarla un compuesto con “posibles efectos carcinogénicos en humanos” y probados efectos carcinogénicos en animales (Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007). La ingestión de alimentos con OTA se ha relacionado con evidencias epidemiológicas de cáncer testicular debido a la formación de aductos con el DNA (Schwartz, 2002). Los biomarcadores urinarios de OTA ofrecen mejores resultados en la valoración de la exposición a la toxina que los niveles detectados en plasma (Scott, 2005).

La toxicidad aguda de la OTA depende de la especie. La  $DL_{50}$  por vía oral presenta un intervalo entre 20-50 mg/kg en ratas y ratones, y entre 0,2-1 mg/kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de una intoxicación aguda consisten en pérdida de peso, poliuria, polidipsia y hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en los órganos de mayor actividad metabólica (bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón), así como nefrosis y necrosis hepáticas y efecto tóxico en células neurales de ratón (Paradells et al., 2015). La toxicidad crónica de la OTA se traduce en una nefropatía intersticial en los animales de granja (pollos y cerdos) conocidas como nefropatías porcinas y aviares. La OTA constituye, además, el principal factor determinante del desarrollo de tumores en el tracto urinario en el hombre (Kuiper-Goodman, 1991) y de la “Nefropatía endémica de los Balcanes” (EFSA, 2010a), presentando gran incidencia en las regiones del sudeste de Europa (Bosnia, Serbia, Croacia, Bulgaria y Rumanía), y caracterizada por ser una grave afección histopatológica que cursa con una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, que deriva en atrofia tubular y fibrosis glomerular, produciendo daños similares a los observados en animales.

Anteriormente al trabajo desarrollado por nuestro grupo no se había

establecido la relación entre la presencia y niveles de OTA en sangre de la población española sana y la edad, sexo y dieta del individuo. Este estudio se ha realizado paralelamente a la investigación desarrollada en la presente Tesis Doctoral y ha sido posible gracias a la colaboración de nuestro grupo con el centro de transfusiones de la Comunidad Valenciana (Medina et al., 2010b).

### **4.1.2. Presencia en cereales y derivados y en vino**

---

La detección de la presencia de OTA en alimentos junto a las AFLs marcan el inicio de la micotoxicología, como una ciencia individual, en los años 60. Con el paso de los años, la OTA sigue ocupando un lugar muy destacado en materia de seguridad alimentaria. Hace más de una década la JECFA recopiló más de 10000 resultados analíticos sobre la presencia de OTA en los alimentos de mayor riesgo. Buena parte de esos datos fueron obtenidos en una primera cooperación científica de los países de la Unión (EU scientific cooperation, SCOOP task No 3.2.2) (European Community, 1995). Siete años más tarde, un segundo estudio (European SCOOP task No 3.2.7. (European Community, 2002; Miraglia y Brera, 2002) facilitó la recogida de 18599 resultados analíticos adicionales de alimentos procedentes de 13 estados miembros.

La concentración media de OTA en los alimentos considerados de mayor riesgo en ambos estudios es muy similar y es la que se indica en la Tabla 2 (EFSA, 2006). De este estudio global se podría destacar, por ejemplo, que en cereales, la OTA se encontró en 13 de 25 muestras de avena y en 8 de 22 muestras de centeno importadas en Dinamarca (Jørgensen et al., 1996), en 15 de 108 muestras de trigo y en 12 de 41 muestras de centeno importadas en Noruega (Langseth, 1999) y en 14 de 139 muestras de maíz importadas en Reino Unido (Scudamore y Patel, 2000).

En estos años también se disponía de pruebas indirectas de la presencia de OTA en alimentos, así por ejemplo, en Sierra Leona (África) se observó que el 35% de la muestras de leche materna presentaban OTA. El nivel medio de la toxina en las muestras analizadas era de 7,9 µg/kg que superaba los niveles permitidos en piensos, en los países desarrollados (Jonsyn et al., 1995). Estos datos indican una considerable exposición humana a esta toxina incluyendo bebés de muy corta edad. En la última

década del siglo XX también se describió, por ejemplo, en Túnez (Maaroufi et al., 1995) una inesperada concentración de OTA en cereales, legumbres secas y aceitunas que llegó a niveles de 33000 µg/kg. Esto impactó a la comunidad científica, hasta el punto de que uno de los autores de la publicación (E. Creppy) fue consultado para que confirmase si se trataba de µg/kg o había un error y se trataba de ng/kg. Este autor confirmó que los datos de la publicación eran correctos y que, efectivamente, las concentraciones de OTA en las muestras eran muy elevadas. El consumo de estos alimentos parece que, además, estaba relacionado con nefropatías en las familias consumidoras. Con posterioridad a 2002 no se ha recopilado ningún conjunto de datos por parte de la EFSA procedentes de los estados miembros sobre la presencia de OTA en los alimentos de mayor riesgo; sin embargo, si existe una abundante literatura científica y alguna revisión sobre ello publicada en la última década. En la Tabla 3 se muestra una síntesis de algunas de estas revisiones y trabajos en cereales (Duarte et al., 2010a, Ravelo Abreu et al., 2011).

**Tabla 2.** Presencia y niveles de OTA en alimentos procedentes de 13 países de la UE (EFSA, 2006).

Alimentos	JECFA (FAO/WHO, 2001)		SCOOP (EC, 2003)	
	Nº muestras (% positivas)	Media OTA (µg/kg)	Nº muestras (% positivas)	Media OTA (µg/kg)
Cereales y derivados	1538 (15,38)	0,20	5180 (27,86)	0,29
Cerveza	975 (9,75)	0,02	496 (2,67)	0,03
Vino	1828 (18,28)	0,32	1470 (7,91)	0,36
Zumo de uva	87 (0,87)	0,39	146 (0,79)	0,55
Cacao	171 (1,71)	0,55	547 (2,94)	0,24
Derivados del cerdo	3603 (36,03)	0,17	1860 (10,0)	0,20
Café tostado	2085 (20,85)	0,62	1184 (13,78)	0,72
Café instantáneo	767 (7,67)	0,76	-	-

La presencia de OTA en cereales se considera dependiente, primero de las condiciones del grano en el momento de la cosecha y, más tarde, del secado y condiciones del almacén (Eskola, 2001). En el norte y oeste de Europa y otras áreas templadas como Canadá, los cereales presentan un

riesgo mayor de contener OTA porque los granos se cosechan con un alto contenido en humedad, a veces sobre un 20% (Scudamore et al., 2003) y a la persistencia de elevadas  $a_w$  durante el almacenamiento (Jørgensen y Jacobsen, 2002; Uysal et al., 2009). Para evitar problemas de crecimiento de hongos y producción de OTA, los granos no deben superar el 15% de humedad. En una determinada región también hay que considerar que las condiciones climatológicas varían de un año a otro y, en consecuencia, los resultados pueden ser muy diferentes dependiendo de la cosecha analizada. Así, Czerwiecki et al. (2002a, 2002b) estudiaron los niveles de OTA en diferentes cereales cosechados en 1997 y en 1998 en Polonia y encontraron que, independientemente del cereal, los niveles de la toxina fueron significativamente más elevados en 1998. Los autores justifican estos resultados argumentando que en ese año se registraron abundantes lluvias en Polonia.

Resultados similares fueron obtenidos en trigo y arroz por Jørgensen et al. (1996) en Dinamarca. En Turquía, Terken et al. (2005) encontraron que el 98% de las muestras de harina de cereales analizadas contenían OTA y AFLs. En el mismo país, Baydar et al. (2005) encontraron una frecuencia de muestras contaminadas con OTA del 100%. Por su parte, Zinedine et al. (2006) en Marruecos, encontraron entre un 40 y un 55% de muestras de trigo, maíz y cebada contaminadas con OTA y Zaied et al. (2009), en Túnez, describieron que, en todas las muestras de cereales positivas para OTA, los niveles de toxina superaban a los niveles máximos permitidos en la legislación europea (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). También en Túnez Ghali et al. (2008) han descrito niveles medios de OTA de 1,9, 2,9 y 3,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en cebada y sus derivados, trigo y sus derivados y maíz, respectivamente. Entre un 52% y un 60,7% de las muestras analizadas fueron positivas y en la mayor parte de ellas encontraron, además, AFLs.

En países en vías de desarrollo, como Vietnam, las micotoxinas en cereales especialmente la OTA y las AFLs constituyen un grave problema (Nguyen et al., 2007). Las condiciones climatológicas favorables para el desarrollo de las especies productoras, las malas condiciones de almacenamiento de las cosechas y el hecho de que la producción de mayor calidad se dedica a la exportación, hace que la población autóctona se vea sometida a condiciones de malnutrición y alta exposición a micotoxinas (Eskola et al., 2001). Los estudios realizados en Sudamérica, por el contrario, indican escasa incidencia de OTA en cereales (Duarte et al., 2010a).



**Tabla 3.** Presencia y niveles de OTA en cereales.

<b>Origen</b>	<b>Cereal</b>	<b>Nº Muestras (% positivas)</b>	<b>Niveles OTA (µg/kg) Rango (media)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Reino Unido</b>	Trigo	201 (15,9)	0,3- 231	Prickett et al., 2000
	Cebada	106 (18,9)	0,3-117	
<b>Polonia</b>	Centeno	100 (21,6)	0,21-10 (2,28)	Czerwiecki et al., 2002a
	Trigo	71 (3,85)	ND- 1,2 (0,42)	
	Cebada	66 (11,9)	0,3-57,0 (13,0)	Czerwiecki et al., 2002b
	Centeno	83 (10,85)	2-35,3 (10,6)	
	Trigo	71 (36,05)	0,6-1024 (132,1)	
	Cebada	53 (8,65)	1,2-35,3 (11,93)	
<b>Dinamarca</b>	Trigo	405 (53,6)	ND-32 (0,3)	Jørgensen y Jacobsen, 2002
	Centeno	405 (63,3)	ND-63 (0,9)	
	Trigo	14 (42,9)	ND-1,6 (0,3)	
	Centeno	17 (82,4)	ND-45 (3,9)	
<b>Italia</b>	Maíz	70 (27,1)	ND-5,2 (1,7)	Palermo et al., 2002
	Trigo	70 (8,6)	ND-1,4 (1,47)	
<b>España</b>	Cereales	115 (50,4)	0,219	Araguás et al., 2003
	Arroz	83 (18,95)	ND-27,3 (8,52)	González et al., 2006
<b>Corea</b>	Cebada	22 (22,7)	ND-0,9 (0,8)	Park et al., 2005
	Arroz	60 (8,3)	ND-6,0 (1,0)	
<b>Croacia</b>	Maíz	49 (38,7)	ND-2,54 (1,47)	Domijan et al., 2005
<b>Etiopía</b>	Cebada	103 (26,2)	ND-164 (17,2)	Ayalew et al., 2006
	Sorgo	78 (21,8)	ND-2106 (175)	
	Teff	33 (27,3)	ND-80 (32,7)	
	Trigo	107 (23,4)	ND-66 (19,6)	
<b>Costa de Marfil</b>	Maíz	31 (100)	3-1738 (150,5)	Sangare-Tigori et al., 2006
<b>Marruecos</b>	Maíz	(40)	ND-7,22 (1,08)	Zinedine et al., 2006
	Trigo	(40)	ND-1,73 (0,42)	
	Cebada	(55)	0,04-0,8 (0,17)	Zinedine et al., 2007a
	Arroz	20 (90)	ND-32,4 (4,15)	
<b>España/ Portugal</b>	Cereales	83 (21,8)	ND-27,1 (1,69)	Juan et al., 2008a
<b>Portugal</b>	Arroz	42 (14,3)	ND-3,52	Pena et al., 2005
<b>Japón</b>	Arroz	10 (90)	ND-1,59 (1,05)	Kumagai et al., 2008
<b>Túnez</b>	Trigo	110 (38)	ND-250 (55)	Zaied et al., 2009
	Cebada	103 (40)	ND-940 (96)	
	Sorgo	113 (38)	8-950 (117)	
	Arroz	96 (28)	ND-150 (44)	
<b>Vietnam</b>	Arroz	100 (35)	ND-2,78 (0,75)	Nguyen et al., 2007
<b>Chile</b>	Arroz	31 (72)	ND-12,5	Vega et al., 2009
<b>India</b>	Trigo	50 (58%)	1,36-21,17 (5,8)	Kumar et al., 2012

Por otra parte, se han registrado mayores niveles de OTA en cereales integrales que en cereales sin cascarilla (33% *versus* 14% de muestras contaminadas, respectivamente) (Juan et al., 2008a). Estos resultados son coherentes con el hecho de que los hongos se desarrollan principalmente en la superficie del grano y alertan sobre el mayor riesgo que pueden presentar las dietas más ricas en fibra. Otro factor que afecta al nivel de OTA es la composición química del cereal. Se ha observado, por ejemplo, que el contenido en ácido glutámico (González-Osnaya et al., 2007) o fenilalanina (Medina et al., 2008a) favorece la producción de la toxina. Asimismo, las semillas con mayor porcentaje de aceites retienen menor cantidad de agua y son menos susceptibles a la contaminación con OTA que las semillas con mayor contenido en proteínas y almidón.

Finalmente, también la distribución geográfica de las especies productoras de OTA tiene una fuerte influencia en la incidencia de la toxina. Las especies fúngicas que la producen están perfectamente adaptadas a un amplio abanico de condiciones climatológicas y en su mayoría son del género *Aspergillus*, aunque se ha descrito también alguna del género *Penicillium* como *P. verrucosum*. En este último caso, la distribución de la especie, tanto geográfica como por cultivos, es más restringida y se ha asociado a cereales cultivados en regiones frías (Lund y Frisvad., 2003). Aunque se ha detectado en cereales comercializados en España (Cabañas et al., 2008) su presencia en cereales cultivados en este país es muy escasa.

Entre los derivados de cereales que pueden presentar OTA ocupan lugares muy destacados el pan, los cereales de desayuno, las papillas para bebés y alimentos infantiles y la cerveza.

El pan es una de las principales fuentes de carbohidratos, en forma de almidón, en la dieta humana (Dewettinck et al., 2008) y su consumo es alto en la mayor parte de los países del mundo. En varios estudios se ha indicado que el pan constituye una de las mayores fuentes de OTA en la dieta. Aunque la toxina puede producirse en el pan cuando no se han añadido conservantes, la humedad final del mismo es elevada y el pH adecuado (Arroyo et al., 2005). Sin duda, la presencia de OTA en el pan (Tabla 4) procede principalmente de la harina del cereal usado para su elaboración porque durante la fermentación y el horneado la toxina se elimina sólo parcialmente (Valle-Algarra et al., 2009). Diferentes autores han descrito que la cebada, avena, maíz y otros cereales presentan mayores niveles de OTA que el trigo y, por tanto, si se usan para la elaboración de pan, los niveles de OTA en el mismo son más

altos que en el pan de trigo (Jørgensen et al., 1996; Rafai et al., 2000; Cengiz et al., 2007; Juan et al., 2008b; Roscoe et al., 2008; Duarte et al., 2009; Kabak, 2009) si bien en algún artículo se afirma lo contrario (González-Osnaya et al., 2007).

**Tabla 4.** Presencia y niveles de OTA en pan.

Origen	Tipo de pan	Nº Muestras (% positivas)	Niveles OTA		
			Rango (media)	Referencia	
<b>España</b>		93 (100%)	(0,45)	Legarda y	
<b>Holanda</b>		29 (100%)	(0,39)	Burdaspal, 2001	
<b>U.S.A.</b>		24 (100%)	(0,41)		
<b>Suiza</b>		20 (100%)	(0,07)		
<b>Brasil</b>	Trigo	15 (100%)	(0,09)		
<b>Francia</b>		14 (100%)	(0,25)		
<b>Italia</b>		12 (100%)	(0,34)		
<b>Alemania</b>		11 (100%)	(0,35)		
<b>Irlanda</b>		9 (100%)	(0,36)		
<b>Austria</b>		9 (100%)	(0,08)		
<b>Túnez</b>		9 (100%)	(0,30)		
<b>Bélgica</b>		7 (100%)	(0,23)		
<b>Alemania</b>		986 (91%)	0,17-0,19	Miraglia y Brera, 2002	
<b>España</b>		Trigo	20 (10%)	2,55-1,82 (2,19)	González-Osnaya et al., 2006
		Trigo	87 (19,5%)	0,03-10,81	González-Osnaya et al., 2007
	Cereales	13 (23,8%)	0,39-2,59		
<b>Marruecos</b>	Trigo	100 (48%)	0,14-149 (13)	Zinedine et al., 2006	
<b>Portugal</b>	Maíz	15 (60%)	0,43	Juan et al., 2007	
	Maíz	30 (70%)	0,44	Juan et al., 2008b	
	Maíz	5 (80%)	ND-0,36 (0,28)	Duarte et al., 2009	
	Trigo	24 (79,2%)	ND-0,41 (0,21)		
	Mafra	12 (41,7%)	0,1		
	Trigo	50 (73%)	ND-0,49 (0,21)	Bento et al., 2009	

En muchos países, los cereales de desayuno presentan similar o mayor consumo que el pan. En una revisión (Tabla 5) realizada en Canadá a nivel nacional, se encontró OTA, en orden decreciente, en cereales de desayuno elaborados con avena, multi-cereales, trigo, maíz y arroz. Además, otros componentes diferentes al cereal como chocolate, salvado, uvas pasas, o frutos secos, pueden constituir una fuente adicional de OTA. Así, en Francia,

Molinié et al. (2005) detectaron OTA en un 25% de las muestras de cereales de desayuno con esos ingredientes a niveles que superaban el límite máximo permitido de 3 µg/kg. Estos resultados han sido confirmados por otros autores en diferentes países como Grecia (Villa y Markaki, 2009), Turquía (Kabak, 2009) o España (Araguás et al., 2005). Los alimentos infantiles van dirigidos a grupos de población muy vulnerables, con una dieta muy restringida y un alto y asiduo consumo del mismo alimento con respecto a su peso corporal. También, aquí se han publicados diferentes resultados (Tabla 5). Araguás et al. (2005) encontraron mayores niveles de OTA en papillas multicereales integrales que en las que no tenían gluten.

**Tabla 5.** Presencia y niveles de OTA en cereales de desayuno y alimentos infantiles.

Origen	Alimento	Nº Muestras (% positivas)	Niveles OTA (µg/kg) Rango (media)	Referencia
<b>España</b>	Cereales de desayuno	21 (90,5%)	ND-0,975 (0,265)	Araguás et al., 2005
<b>Francia</b>		45 (69%)	ND-8,8	Molinié et al., 2005
<b>Grecia</b>		55 (60%)	ND-0,87 (0,11)	Villa y Markaki, 2009
<b>Canadá</b>		156 (35%)	ND-1,4	Roscoe et al., 2008
<b>Turquía</b>		24 (37,5%)	ND-1,84 (0,752)	Kabak, 2009
<b>Marruecos</b>		48 (8,3%)	ND-224,6	Zinedine et al., 2010
<b>España</b>	Alimentos infantiles	20 (70%)	ND-0,740 (0,187)	Araguás et al., 2005
<b>Turquía</b>		24 (16,7%)	ND-0,374 (0,221)	Kabak, 2009
<b>Marruecos</b>		20 (0%)	ND	Zinedine et al., 2010
<b>Canadá</b>		161 (26,1%)	ND-6,9 (0,82)	Lombaert et al., 2003

Otra fuente importante de OTA es la cerveza, bebida derivada de cereales, principalmente, cebada. Se ha detectado la toxina en muestras de cerveza elaborada en todos los países del mundo. En la Tabla 6, se muestra una revisión de los niveles de toxina encontrados en los principales países productores.

Tabla 6. Presencia y niveles de OTA en cerveza.

Origen	Nº Muestras (% positivas)	Niveles OTA (µg/l) Rango (media)	Referencia
<b>Bélgica</b>	62 (97%)	0,01-0,185 (0,033)	Tangni et al., 2002
	13 (84,6%)	ND-0,1204 (0,0595)	Medina et al., 2005c
	15 (40%)	0,010-0,135 (0,049)	Visconti et al., 2000
	15 (80%)	0,0023-0,0662 (0,0112)	Nakajima et al., 1999
<b>Alemania</b>	35 (25,7%)	ND-0,26 (0,085)	Degelmann et al., 1999
	15 (66,6%)	ND-0,204 (0,045)	Medina et al., 2005c
	161 (63,3%)	0,02-0,33 (0,031)	Meyer y Neugebauer, 2000
<b>Japón</b>	22 (95,5%)	0,022-0,048 (0,0125)	Nakajima et al., 1999
<b>España</b>	91,4%	<0,03-0,5 (<0,1)	Mateo et al., 2007
	35 (100%)	0,008-0,498(0,070)	Medina et al., 2006b
	31(83,8%)	ND-0,1468 (0,036)	Medina et al., 2005c
	21 (67%)	ND-0,205 (0,038)	Araguás et al., 2005
<b>Holanda</b>	6 (100%)	0,003-0,025 (0,011)	Nakajima et al., 1999
<b>Canadá</b>	41 (63,5%)	0,023-0,2 (0,061)	Scott y Kanhere,1995
<b>América Central</b>	6 (100%)	0,0023-0,021 (0,01)	Nakajima et al., 1999
<b>Sudamérica</b>	4 (50%)	0,0037-0,099 (0,0034)	Nakajima et al., 1999
<b>Norte-América</b>	20 (100%)	0,002-0,03 (0,009)	Nakajima et al., 1999
<b>Dinamarca</b>	21 (100%)	0,001-0,160	Jørgensen, 1998
<b>Sudáfrica</b>	13/29	3-2340	Odhaw y Naicker, 2002
<b>Hungría</b>	25 (100%)	0,030-0,250 (0,127)	Varga et al., 2005a
<b>Eslovenia</b>	20 (0%)	0	Dasko et al., 2005
<b>Suiza</b>	7 (100%)	0,01-0,033 (0,020)	Zimmerli y Dick, 1995
	12(100%)	0,0114-0,1320 (0,0254)	Medina et al., 2005c
<b>Italia</b>	10 (30%)	0,020-0,022 (0,021)	Visconti et al., 2000 Gamus et al., 2004
<b>Turquía</b>	150 (28%)	0,1-8,10	Gamus et al., 2004

Como se puede observar el porcentaje de muestras contaminadas con la toxina oscila entre un 25 y un 100%. Los estudios publicados indican que los cereales son la principal fuente de OTA en la dieta humana y animal. La comunidad científica coincide en que quizá más del 50% del total de OTA que se ingiere tenga este origen (EFSA, 2006; 2010a). En Canadá Lombaert et al. (2003) han detectado una distribución homogénea de la toxina en alimentos infantiles derivados de avena, cebada, soja o multicereales, así como en galletas. En Italia, por el contrario, no se ha encontrado OTA en este tipo de alimentos independientemente de las prácticas agrícolas empleadas en el cultivo del cereal (convencional, integrada u orgánica) (Beretta et al., 2002). Esta discordancia hace necesario un mayor número de estudios.

Después de los cereales, la segunda fuente más importante de OTA en la dieta es la uva y sus derivados, especialmente, el vino. Se ha encontrado OTA en vinos de todo el mundo (Tabla 7) (Mateo et al., 2007) Aunque pueda admitirse que la presencia de OTA en vino haya sido considerada por muchos expertos y desde hace tiempo como un peligro, al menos potencial, no se encuentra referida como tal en la bibliografía científica hasta bien entrada la década de los noventa (Zimmerli y Dick, 1996). Después de esta primera publicación, se disparó la alarma y los estudios sobre incidencia de OTA en uva y derivados de la uva, en especial, en vino, han sido numerosos. Como consecuencia de ello, se ha llegado a la conclusión de que, sin duda, después de los cereales, el vino es la segunda fuente directamente implicada en la ingesta de OTA.

La CCA admitió ya a finales de la década de los noventa que más del 15% de la OTA que se ingiere en Europa proviene de la uva y sus derivados (FAO, 1998). La OTA está presente asimismo en las uvas pasas (Covarelli et al., 2012) y el mosto (Sáez et al., 2004; Battilani et al., 2006; Mateo et al., 2007) entre otros, pero, sin lugar a duda, es el vino, debido a su importancia económica y nivel de consumo, el derivado más importante. Los niveles máximos de OTA admitidos en los países de la UE para uvas pasas (10 µg/kg), vinos y mostos (2 µg/l) se encuentran recogidos en el reglamento de la CE, No 1881/2006 (European Commission, 2006a).

Como ya se indicó en el apartado 3.2.1, el origen de la OTA en la uva y en los productos derivados (Mateo et al., 2007) se ha atribuido fundamentalmente a especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, principalmente, *A. carbonarius* y, en menor medida, a *A. tubingensis* y *A. niger* (Medina et al., 2005a).

Tabla 7. Presencia y niveles de OTA en vino tinto.

Origen	Nº Muestras (% positivas)	Niveles OTA ( $\mu\text{g/l}$ )	
		Rango (media)	Referencia
España	72 (91,7)	<0,003-0,603 (0,038)	Burdaspal y Legarda, 1999
	28 (46,4)	0,056-0,316 (0,147)	López de Cerain et al., 2002
	130 (18,5)	0,06-4,24 (0,465)	Bellí et al., 2004a
	61 (34,4)	0,06-0,53 (0,281)	Blesa et al., 2004
	94 (57,4)	0,004-0,179 (0,037)	Quintela et al., 2011
Francia	8 (100)	0,004-0,452 (0,225)	Burdaspal y Legarda, 1999
	5 (40,0)	0,028 (0,028)	Rosa et al., 2004
	14 (92,9)	0,010-0,237 (0,058)	Quintela et al., 2012a
Italia	38 (97,4)	<0,01-7,63 (1,24)	Visconti et al., 1999
	96 (85,4)	<0,001-3,18 (0,419)	Pietri et al., 2001
	43 (83,7)	0,04-1,44 (0,30)	Bacaloni et al., 2005
	112 (78,6)	<0,01-4,93 (0,64)	Perrone et al., 2007b
	1002 (69,4)	<0,0072-2,63 (0,121)	Spadaro et al., 2010
	773 (69,2)	<0,01-7,50 (0,34)	Brera et al., 2008
Croacia	1002 (69,4)	<0,0072-2,63 (0,121)	Spadaro et al., 2010
	10 (80,0)	<0,005-0,021 (0,015)	Flajs et al., 2009
Grecia	104 (68,3)	<0,05-2,69 (0,34)	Stefanaki et al., 2003
	14 (64,3)	<0,02-2,51 (0,68)	Soufleros et al., 2003
	22 (77,2)	0,01-0,71(0,09)	Sarigiannis et al., 2014
Turquía	35 (100)	0,04-1,92 (0,728)	Anli et al., 2005
	51 (86,3)	<0,010-0,815 (0,110)	Var y Kabak, 2007
	20 (100)	0,39-7,96 (2,85)	Altiokka et al., 2009
Hungría	33 (100)	0,03-0,533 (0,117)	Varga et al., 2005a
Eslovaquia	18 (66,7)	<0,011-0,463	Belajová y Rauova, 2007
Rusia	7 (42,9)	1,8-4,4 (2,9)	Rusanova et al., 2009
U.S.A.	8/71	>0,05	Soleas et al. 2001
	69/83	<0,01	Siantar et al, 2003
Sudamérica	22 (31,2)	0,028-0,071 (0,039)	Rosa et al., 2004
Marruecos	30 (100)	0,04-3,24 (0,94)	Filali et al., 2001
Sudáfrica	24 (100%)	0,07-0,39	Shephard et al., 2003
Portugal	340 (20,3%)	<2,1	Ratola et al., 2004
Australia	-	>0,05-0,62	Leong et al., 2006a

Se ha descrito que *A. carbonarius* es el principal hongo responsable de la producción de esta toxina en uvas de vino en la cuenca Mediterránea (Pitt, 2000; Battilani et al., 2003a; Medina et al., 2005a; Perrone et al., 2006; Serra

et al., 2006b; Leong et al., 2007b) y ocurre preferentemente en torno a la vendimia, que suele ser el momento en el que la uva está más dañada (Serra et al., 2003) y presenta mayor contenido en azúcar lo que favorece el desarrollo de hongos xerófilos.

Si el daño a la uva ha sido intenso y ocurre con mucha anterioridad al momento de la vendimia, la posibilidad de que se desarrolle *A. carbonarius* será aún mayor y, en consecuencia, mayor la concentración final de OTA que podrá encontrarse en el vino.

La OTA es también un contaminante habitual en el café (Batista et al., 2009; Vecchio et al., 2012), los productos del cacao (Mounjouenpou et al., 2008; Brera et al., 2011; FAO/WHO, 2011; Copetti et al., 2013), los frutos secos (Bircan, 2009) y las especias (Santos et al., 2011; Ozbey y Kabak, 2012). En la actualidad, la comunidad científica y las autoridades sanitarias consideran a la **OTA** como una micotoxina muy destacable por lo que ha sido la micotoxina para la que más se ha ampliado la lista de alimentos, bebidas, aditivos alimentarios, etc. sujetos a regulación en la última década.

Por todo lo indicado, se puede concluir que es necesario el estudio de estrategias y medidas para la prevención y control de la OTA, medidas que pueden ser de dos tipos: preventivas, impidiendo la producción de la toxina, y reductoras, es decir, métodos de descontaminación o eliminación de la OTA ya producida.

En base al estado actual del tema, en el **ARTÍCULO 1** de la presente Tesis Doctoral se realiza un estudio en el que uno de sus objetivos consiste en determinar la presencia y niveles de OTA en cebada, por ser el cereal más importante en España, e investigar su relación con las especies ocratoxigénicas presentes en el grano así como con la región agro-climática del cultivo. En el **ARTÍCULO 3** se evalúa la efectividad de diferentes agentes antifúngicos como herramienta para la prevención del desarrollo de las más importantes especies productoras de OTA contaminantes de la cebada y otros cultivos agrícolas como la uva. En los **ARTÍCULOS 6 y 7** se estudia la capacidad de las bacterias lácticas y, más concretamente, de *Oenococcus oeni* como instrumento para la reducción o eliminación de OTA en medios elaborados con extractos de uva o similares al vino o la cerveza. Los resultados de esta investigación ayudan a clarificar la acción de este grupo de bacterias sobre la OTA presente en la materia prima que posteriormente pasa al mosto.

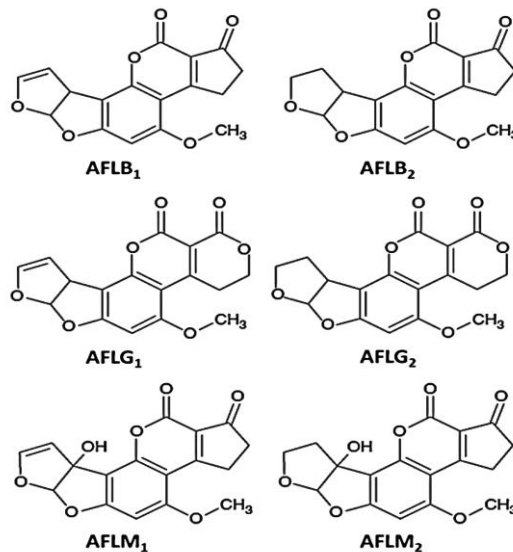


## 4.2. Las aflatoxinas

Las AFLs químicamente son compuestos de la familia de las difuranocumarinas y se clasifican en dos grupos acorde a su estructura química, las difuro-cumaro-ciclopentanonas (AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLB<sub>2A</sub>, AFLM<sub>1</sub>, AFLM<sub>2</sub>, AFLM<sub>2A</sub> y aflatoxicol) y las difuro-cumaro-lactonas (AFLG<sub>1</sub>, AFLG<sub>2</sub>) (Figura 10). Estos dos grupos se diferencian debido a que el anillo de furano de las AFLs B se convierte en un anillo de lactona en las AFLs G.

En leche de individuos que han ingerido AFLs pueden ser excretados metabolitos hidroxilados de las mismas, éstos son la AFLM<sub>1</sub> y la AFLM<sub>2</sub> (Garrido et al., 2003) que son las formas hidroxiladas de la AFLB<sub>1</sub> y la AFLB<sub>2</sub>, respectivamente.

Aunque con escasa frecuencia, los hongos también pueden producir estas formas hidroxiladas de las AFLs. La letra B indica que estos compuestos presentan fluorescencia azulada (blue) a la luz ultravioleta de longitud de onda en torno a 365 nm, mientras que la letra G hace referencia a su fluorescencia verde amarillenta (green) bajo la misma radiación.



**Figura 10.** Estructura de las principales aflatoxinas.

---

## 4.2.1. Efectos tóxicos

---

El término "aflatoxinas" fue acuñado a comienzos del decenio de 1960, cuando miles de pavos, patos y otros animales domésticos murieron a causa de una enfermedad conocida como "enfermedad X de los pavos" (Blount, 1960; 1961), que se atribuyó a la presencia de toxinas de *A. flavus* en harina de cacahuete importada de Sudamérica (Sargeant et al., 1961). Un año más tarde se demostró que el compuesto consumido era cancerígeno en ratas (Lebreton et al., 1962) y poco después se determinó su estructura química (Asoa et al., 1963). Diversos autores, estudiando la epidemiología del cáncer de hígado, describieron que las AFLs estaban asociadas a cáncer de hígado en humanos (Kraybill y Shimkin, 1964; Oettle, 1964; Austwick, 1978), teoría que se mantiene en la actualidad.

Cuando la FAO y la WHO en los programas de alimentación, en zonas afectadas por hambrunas, establecieron un primer límite de 30 µg de AFLs por kg de alimento, la comunidad científica lo consideró muy elevado e inadmisibles pero se estimó que el peligro para la salud de la población por malnutrición era superior al peligro que las AFLs podían producir en el hígado (Anon, 1966). En 1998 ante la evidencia de la enorme toxicidad de las AFLs la Comisión de la Comunidad Europea estuvo de acuerdo en reducir el nivel máximo a 2 µg de AFLs por kg de alimento (European Commission, 1998).

Las AFLs son eficientemente absorbidas por difusión pasiva en el tracto gastrointestinal y son transferidas hasta el hígado (Hsieh y Wong, 1994). Los individuos jóvenes absorben las AFLs con mayor eficiencia que los viejos y, además de la edad, en el nivel de absorción influye la especie y el sexo e incluso el propio individuo (Williams et al., 2004).

La aflatoxicosis es la enfermedad que resulta tras la ingestión de AFLs. Una revisión de la abundante bibliografía existente permite concluir que la dosis y la duración de la exposición es determinante en la sintomatología de la enfermedad. Se han identificado dos formas de aflatoxicosis: la primera consiste en una intoxicación aguda severa que produce cirrosis hepática muy grave, infiltración grasa, necrosis del hígado y carcinomas. Frecuentemente ocasiona la muerte del individuo. Se produce por ingestión de altas dosis de AFLs. Esta intoxicación aguda se manifiesta por vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar y cerebral (USDA, 2006). El estado nutricional del individuo es importante en la intensidad de la sintomatología; una dieta baja en lípidos hace más vulnerable el hígado a las AFLs, lo mismo ocurre con las dietas

deficientes en proteínas; al contrario, el hígado con gran cantidad de ácidos grasos insaturados es menos afectado por estas toxinas. También están bien documentadas las aflatoxicosis crónicas producidas por AFLs a dosis sub-letales. Se manifiestan sobre todo mediante cuadros de malnutrición, reducción del crecimiento e inmunosupresión lo que produce disminución de la productividad y aumento de la susceptibilidad a enfermedades (Williams et al., 2004). En particular, se ha observado una fuerte sinergia entre las AFLs y el virus de la hepatitis B y C (Groopman, 1993) y también con el grado de retraso del crecimiento y bajo peso en niños (Gong et al., 2002).

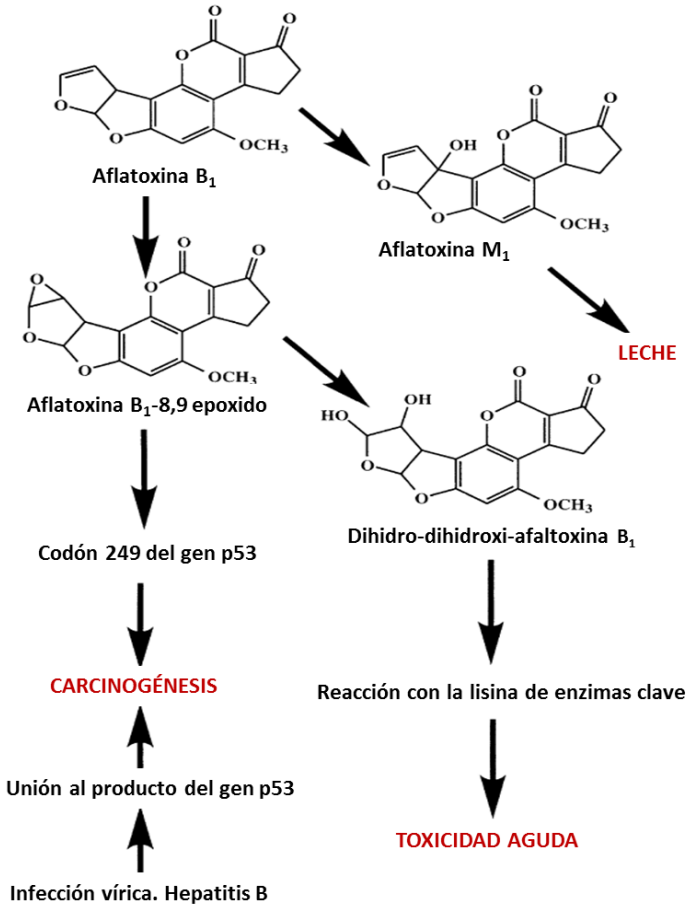
El debate que surgió en la década de los noventa sobre el papel del virus de la hepatitis B y las AFLs en la etiología del cáncer de hígado en humanos parece que ha sido resuelto debido a que la mayoría de los autores aceptan que existe una interacción entre ambos factores, ya que la AFL reacciona con el DNA (del gen) y los virus de la hepatitis B y C interaccionan con la proteína producto del mismo gen (Sell et al., 1991; Groopman, 1993).

Las AFLs son, por tanto, compuestos carcinogénicos (Wogan et al., 1971; IARC, 1993) y el orden en el grado de carcinogenicidad es AFLB<sub>1</sub>>AFLG<sub>1</sub>>AFLB<sub>2</sub>>AFLG<sub>2</sub>. Son también teratogénicos (Ellis y di Paolo, 1967) y mutagénicos (Ong, 1975; Wong and Hsieh, 1976). Se ha demostrado que existe una cierta variabilidad en relación con la susceptibilidad del individuo a las AFLs que puede ser de tipo genético (especie, sexo, raza, cepa, etc.), fisiológico (edad, nutrición, otras enfermedades, presencia de otras toxinas) y ambiental (clima, técnicas agrícolas, etc.) (EFSA, 2012). En cualquier caso es importante tener en cuenta que cualquier dosis de AFLs tiene efectos acumulativos y puede afectar a la aparición de cáncer (Logrieco et al., 2003; Williams et al., 2004).

En humanos las AFLs son predominantemente percibidas como compuestos que producen cáncer hepático al ser ingeridas con los alimentos (Gorelick et al., 1993; IARC, 1993), y, en menor grado, durante la manipulación de granos contaminados (Kelly et al., 1997). Debido a su capacidad mutagénica, teratogénica y cancerígena, la IARC en 1987 clasificó a las AFLs como agentes carcinogénicos del grupo 1 y al virus de la hepatitis B como un agente carcinogénico en humanos en 1993 (Castegnaro y McGregor, 1998).

El conocimiento de la biotransformación de las AFLs en el organismo es muy importante en la comprensión de su toxicología. Ocurre principalmente en el hígado pero también se produce en el riñón y en el tracto intestinal. La

mayoría de las investigaciones se han realizado sobre la biotransformación de la AFLB<sub>1</sub> (Figura 11).



**Figura 11.** Principales metabolitos de la AFLB<sub>1</sub> implicados en su toxicidad.

El papel de la activación metabólica de la AFLB<sub>1</sub> en la toxicidad de los productos resultantes ya fue extensamente revisada por Gorelick (1990) y sumariada más tarde por Neal (1998). A excepción del derivado AFLB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, los productos de la biotransformación son menos tóxicos que la AFLB<sub>1</sub>. Sin embargo, este epóxido forma aductos con las proteínas y el DNA a nivel de la guanina en sitios específicos, uno de los cuales es la tercera base del codón 249 del gen p53 (Hsu et al., 1991). Diferentes autores ya en

los años noventa describieron ampliamente la evidente correlación entre ingestión de AFLB<sub>1</sub> y mutaciones en el codón 249 del gen p53 en individuos con carcinoma hepatocelular en Asia, África y Norteamérica (Harris, 1996).

### 4.2.2. Presencia en cereales y derivados

---

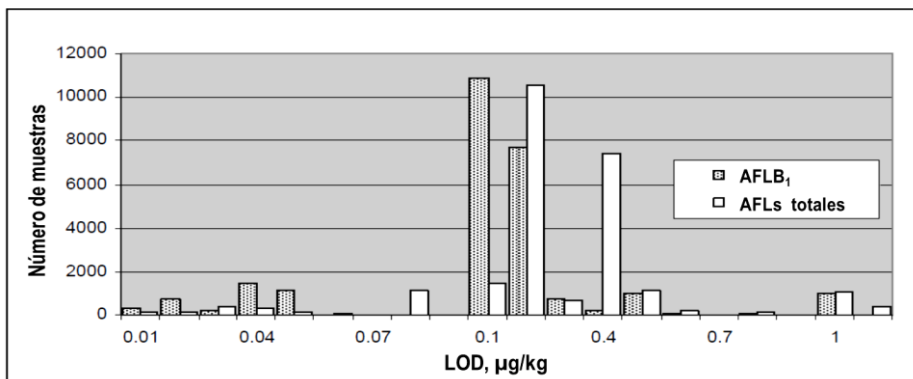
Los niveles de exposición de la población a AFLs a escala global han sido estudiados y revisados (Williams et al., 2004) y de esta revisión se concluye que 4,5 billones de personas que viven en países en desarrollo presentan una exposición crónica a cantidades de AFLs no controladas. La presencia de AFLs en alimentos es un fenómeno global pero, generalmente, las cosechas de las regiones tropicales y subtropicales son más susceptibles a la contaminación. Los países más afectados son todos los situados en la franja entre 40 ° de latitud norte y 40 ° latitud sur. Por otra parte, como el clima juega un papel crucial en la producción de AFLs, el problema puede variar de un año a otro. En Europa se considera que las AFLs son un problema “importado” y, por ello, se realiza un estricto control en los alimentos importados más críticos, como frutos secos y cereales (Curtui et al., 2004).

Las AFLs, como se ha indicado (apartado 3.2.3), son producidas principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*, especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi*. Estas especies, principalmente, las dos primeras, están muy extendidas por todo el mundo, en especial en regiones con clima templado, subtropical y tropical. Las AFLs se producen tanto antes como después de la cosecha (Moss, 2002; Ghali et al., 2008).

En 2007 la UE hizo un llamamiento a los estados miembros para el suministro de datos sobre incidencia de AFLs en alimentos. En respuesta a ello fueron suministrados un total de 49748 resultados analíticos procedentes de 22 países (EFSA, 2007). Se detectaron AFLs en 34326 muestras. El LOD varió ampliamente entre laboratorios, tipo de alimento, método usado y el momento en el que se adoptó el método más sensible. El mínimo LOD que se encontró fue 0,0002 µg/kg y el máximo 10 µg/kg pero, en general, lo más frecuente es que se encontrara en torno a 0,1 or 0,2 µg/kg para AFLB<sub>1</sub> y 0,2 µg/kg para AFLs totales. La distribución del LOD para todas las muestras analizadas es el que se muestra en la Figura 12. En general la AFLB<sub>1</sub> es el metabolito predominante en todas las muestras estudiadas. EL LOD para AFLs totales usado por todos los estados miembros fue la suma de los LODs

individuales para la AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub> y, en general, fue cuatro veces o superior el nivel de la AFLB<sub>1</sub>.

Posteriormente a este estudio (EFSA, 2007), los efectos palpables del cambio climático en el desarrollo de hongos productores de AFLs en cosechas agrícolas ha llevado a un nuevo llamamiento a la comunidad científica por parte de la EFSA para informar sobre el estado actual del tema. Como fruto de esta revisión se ha elaborado un reciente informe (EFSA, 2012) del que se deduce que, aunque en los países del sur de Europa no suelen darse altas temperaturas y sequedad durante el cultivo de los cereales, dependiendo del año, las condiciones climatológicas se ven sometidas a grandes variaciones por lo que existen cosechas en las que pueden darse condiciones ambientales favorables para el desarrollo de *Aspergillus* spp. de la sección *Flavi* y para la producción de AFLs en el cereal.



**Figura 12.** Límites de detección de los métodos empleados en el estudio de la presencia de AFLs en muestras de alimentos (EFSA, 2007).

En Europa, el cereal más estudiado ha sido el maíz, seguido del trigo, pero no se ha estudiado la presencia de AFLs en cebada o en arroz. En la Tabla 8 se muestra una revisión de la incidencia de AFLs en Europa (EFSA, 2012). Según se puede observar en la Tabla 8, por ejemplo en Turquía, país con óptimas condiciones para el crecimiento de hongos productores de AFLs, de 423 muestras de maíz estudiadas en el periodo 1986-2006, el máximo nivel (432 μg/kg) se encontró en 2006 en maíz de la región de Bursa (Oruc et al., 2007). También se encontraron altas concentraciones en 2002 y 2005 (nivel máximo, 133 y 120 μg/kg, respectivamente) (Nizamlyodlu y Oguz, 2003; Giray et al., 2009) en muestras de la región de Turquía donde las condiciones climatológicas para el desarrollo de los hongos son óptimas.

**Tabla 8.** Presencia y niveles de aflatoxinas en cereales en Europa y norte de África.

País (Región)		Nº Muestras /% positivas	Niveles OTA (µg/kg)		Referencia
			Rango (media)		
<b>Suiza</b>	Maíz	55/2	¿?-3,2 (1,8)		Steiner et al., 1991
		99/15	0,1-1,5 (0,55)		Noser et al., 2001
<b>Turquía</b>	Maíz	58/27	0-73,9		Ozay y Heperkan, 1989
<b>Turquía</b> (Bursa)		19/¿?	0,01-32,3 (10,94)		Oruc et al., 2006
		5/¿?	¿?-431,90 (133)		Oruc et al., 2007
<b>Turquía</b> (Kahranmamaras)		28/21	Nd-108,86 (14,90)		Alptekin et al., 2009
<b>Turquía</b> (Kukuroba)		73/17	0,7-50		Gursoy y Bicici, 2003
<b>Turquía</b> (Kinya)		26/15	< 1,5-133		Nizamlyodlu y Oguz, 2003
<b>Turquía</b>		167/46	3-70		Alperden et al., 1990
<b>Turquía</b>		47/22	<1,75-120,33		Giray et al., 2009
<b>Francia</b>	Maíz	97/0	<0,1-5,8		Scudamore y Patel, 2000
<b>Chipre</b>	Maíz	55/0	-		Ioannou-Kakouri et al., 2004
<b>Italia</b>	Maíz	111/39	0,10-1,02		Micco et al., 1986
		480/13	>0,20		Reyneri et al., 2006
		503	< 0,05-159 (1,86)		Pietri et al., 2004
		634	< 0,05-233 (9,02)		Battilani et al., 2008a
		255	(16)		Battilani et al., 2008b
		110/82	¿?-154,5 (4,4)		Piva et al., 2006
<b>Rumanía</b>	Maíz	54/20	0-46,4 (6,86)		Tabuc et al., 2009
	Trigo	35	0-6,4 (1,83)		Tabuc et al., 2009
	Maíz	11/3	0-3,92		Braicu et al., 2008
	Trigo	26/9	0-5,7		Braicu et al., 2008
<b>Rep. Checa</b>	Maíz	8/0	-		Monbaliu et al., 2010
<b>Portugal</b>	Maíz	12/0	-		Monbaliu et al., 2010
<b>España</b>	Maíz	14/0	-		Monbaliu et al., 2010
		55/0	-		Muñoz et al., 1990
<b>Marruecos</b>	Maíz	20/15	0,03-11,2 (0,83)		Zinedine et al., 2007b
	Trigo	17/3	0,03-0,15 (0,07)		Zinedine et al., 2007b

En Italia, entre 1986 y 2008 de más de 2000 muestras de maíz estudiadas, el máximo nivel de AFLs encontrado fue de 233 µg/kg (Battilani et al., 2008a). En 2003 también se registró una elevada contaminación (155 µg/kg) de AFLB<sub>1</sub> (Piva et al., 2006); este fue un año con temperatura elevada y una alta sequía en el periodo entre mayo y septiembre.

En Rumanía, otro país comunitario donde también se pueden destacar los estudios realizados en maíz aunque más limitados que en los países anteriores, de 55 muestras de maíz estudiadas, el máximo nivel de AFLs fue de 46,4 µg/kg (Tabuc et al., 2009).

Alguno de los estudios citados en la Tabla 8 describe la distribución de muestras positivas y rangos de AFLB<sub>1</sub> en función del lugar donde se cultiva el cereal (Ozay y Heperkan, 1989; Battilani et al., 2008a; 2008b; Braicu et al., 2008; Alptekin et al., 2009; Giray et al., 2009). Esos datos son muy útiles para la validación de modelos predictivos de la presencia de micotoxinas bajo la influencia del cambio climático.

Los estudios sobre contaminación con AFLs de otros cereales distintos al maíz en Europa son muy escasos; se ha realizado alguno en trigo y se ha observado que los niveles de contaminación son más bajos que en el maíz (Tabla 8) pero son necesarios más trabajos. Aunque no se dispone de datos acerca de la presencia de AFLs en otros cereales diferentes al trigo y maíz, cultivados en Europa, sí se ha realizado algún estudio en arroz en otras partes del mundo donde el cultivo del cereal es más extensivo y las condiciones climatológicas son más favorables para la producción de AFLs. Tras una revisión bibliográfica se han encontrado dos estudios en este cereal. En uno de ellos se analizan 28 muestras visiblemente enmohecidas de un área de Nigeria con temperatura media anual de 31,7 °C y humedad media de 51,6%. Región cálida y húmeda, especialmente entre mayo y octubre (29,5 °C y 73,1%) (Hussaini et al., 2007). Las muestras se recogieron justo antes de la cosecha en el año 2000. De las 28 muestras estudiadas, 11 contenían AFLB<sub>1</sub> en el rango 0-464 µg/kg, con una media de 35,89 µg/kg. En el segundo estudio realizado en Malasia se analizaron 40 muestras, 10 de ellas fueron positivas en un rango entre 0,15-4,42 µg/kg (Soleimany et al., 2012).

Además de los trabajos en cereales en Europa, también se ha descrito la presencia de *Aspergillus* spp. en granos de arroz en el Sur de Asia (Reddy et al., 2010b), en la India (Reddy et al., 2009), en Brasil (de Carvalho et al., 2010; Guimarães et al., 2010), en Nigeria (Somorin y Bankole, 2010) o en arroz almacenado en Africa (Surekha et al., 2011). De todos esos trabajos



solamente en Brasil se describieron niveles bajos de AFLs (de Carvalho et al., 2010). Sin embargo, a pesar de estos resultados, resulta curioso el hecho de que se haya estudiado en la India en diferentes cultivares de arroz la acumulación de AFLB<sub>1</sub> *in vitro* después de su inoculación con *A. flavus* (Reddy et al., 2010c). El interés por estos estudios sugiere la existencia de un problema velado de AFLs en arroz en estos países. La atención a la seguridad alimentaria en esas áreas donde el riesgo de presencia de AFLs es alto, es muy escasa; probablemente ésta sea la razón de que los datos de que se dispone sean muy limitados.

Por otra parte, en países no comunitarios se han publicado datos muy alarmantes sobre presencia de AFLs en cereales. Por ejemplo, se ha descrito el fallecimiento de personas a causa de intoxicación aguda con AFLs en la India en 1974, coincidiendo con lluvias intempestivas y escasez de alimentos que impulsaron al consumo de maíz muy contaminado (Krishnamachari et al., 1975). En China en un estudio realizado en maíz se ha encontrado que el 85% de las muestras estudiadas contenían entre 9 y 2496 µg/kg y, de ellas, el 75% excedía la cantidad de 20 µg/kg de AFLB<sub>1</sub> (Li et al., 2001). Las muestras, además, contenían otras micotoxinas, como fumonisinas. En Sudáfrica, en manteca de cacahuete consumida en escuelas infantiles, se han descrito niveles de AFLs totales de 27163 µg/kg y de 16505 µg/kg de AFLB<sub>1</sub> (Williams et al., 2004).

Las principales AFLs que se encuentran en cereales y, en general, en alimentos y piensos son AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub>, AFLG<sub>2</sub>, y en leche la AFLM<sub>1</sub> (Williams et al., 2004). Es muy importante destacar, también, que en los últimos años se han detectado niveles altos de AFLM<sub>1</sub> en leche (Battilani et al., 2005; Zheng et al., 2013) y ello ha disparado la alarma en la comunidad científica y autoridades sanitarias que han mostrado su interés en la evaluación de la situación no sólo en cereales (EFSA, 2012) sino también en derivados de cereales y, en general, en los alimentos de mayor riesgo (EFSA, 2007). Ante la necesidad de actualizar la información sobre la presencia de AFLs en alimentos, en general y no solamente en cereales, se están realizando numerosos estudios posteriores a los recogidos por la EFSA (2007). Entre ellos se podrían destacar algunos realizados en nueces comestibles o frutos secos (Cheraghali et al., 2007; Lutfullah y Hussain, 2011; Chala et al., 2012; Danielle et al., 2012; Pietri et al., 2012; Rodrigues et al., 2012), cereales de desayuno (Ibáñez-Vea et al., 2011b), cerveza (Benešová et al., 2012; Burdaspal y Legarda, 2013) otros derivados de cereales frecuentes en alimentación infantil (Kabak, 2012) chocolate (Copetti et al.,

2011), legumbres (Lutfullah y Hussain, 2012), especias (Santos et al., 2011; Jalili y Jinap, 2012; Ozbey y Kabak, 2012), hierbas medicinales e infusiones (Ali et al., 2005; Romagnoli et al., 2007), entre otros. En la mayor parte de estos estudios no solo se encuentran altos porcentajes de muestras contaminadas con AFLs, sino que se encuentran simultáneamente otras micotoxinas en la misma muestra, especialmente, OTA.

Es importante destacar que la exposición a AFLs es muy variable en función de los países y ello está fuertemente influido por la región agroclimática y la dieta. Así, se ha estimado en algunos países que la exposición oscila en los rangos: 3,5–14,8 (Kenia), 11,4–158,6 (Swazilandia), 38,6–183,7 (Mozambique), 4–115 (Transkei, Sudáfrica), 11,7–2027 (Gambia) y 6,5–53 ng/kg/día (Tailandia). En Estados Unidos es de 2,7 ng/kg/día. En algunos países, como Ghana, solo el consumo de cacahuets supone una ingesta de AFLs entre 9,9–99,2 ng/kg/día (Williams et al., 2004).

La legislación vigente, además de AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub> en diferentes alimentos, regula los niveles máximos admisibles de AFLM<sub>1</sub> en leche. Las dos primeras son producidas principalmente por la especie *A. flavus* y las cuatro son producidas por la especie *A. parasiticus*. Ambas especies son en la actualidad objetivo prioritario por su gran resistencia a condiciones de baja  $a_w$  y elevada temperatura y, en consecuencia, su gran capacidad competitiva en el marco del cambio climático global.

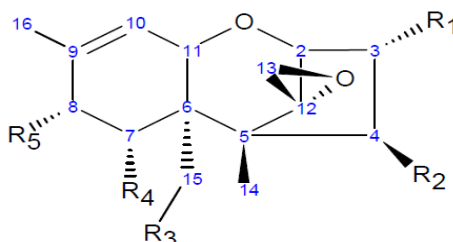
En base a lo expuesto, para sintetizar, se puede indicar que las AFLs, al igual que la OTA, se encuentran en productos agro-alimentarios básicos en la dieta humana y animal, entre los que destacan los cereales y derivados y los frutos secos, especialmente, cacahuete y pistacho. Considerando los datos sobre su presencia y niveles en alimentos en los últimos años, se ha observado que, junto con la OTA, las AFLs son micotoxinas emergentes sobre cuya producción y distribución en las diferentes regiones agroclimáticas podría tener una importante influencia el cambio climático global. De todo este banco de información se puede concluir que en Europa se han realizado muy pocos estudios acerca de la contaminación de cereales con AFLs y, particularmente en España, no existe prácticamente ninguna información. En el **ARTÍCULO 1** de la presente Tesis Doctoral se realiza por primera vez un completo estudio sobre incidencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en cebada cultivada en España y se analiza de manera muy minuciosa la presencia de las diferentes AFLs en el cereal. Con anterioridad al estudio realizado en esta Tesis Doctoral, no se había descrito la presencia de AFLs en cebada.

## 4.3. Los tricotecenos

Una clase importante de micotoxinas son los compuestos conocidos con el nombre común de tricotecenos. Los hongos productores de tricotecenos son principalmente especies de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticimonosporium*, *Cephalosporium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium* y *Cylindrocarpon*. *Fusarium* es el más importante de estos géneros porque alberga las especies con mayor capacidad productora de tricotecenos y las que se encuentran más extendidas en cultivos agrícolas básicos, en la alimentación humana y animal en el mundo. Se conocen algo más de 150 tricotecenos, de los cuales, sólo unos pocos son importantes debido a su presencia en plantas cultivadas usadas en la nutrición humana y animal.

Químicamente los tricotecenos constituyen una familia de compuestos sesquiterpenoides tóxicos producidos por diferentes especies fúngicas que afectan a vegetales. Tienen un esqueleto común con un anillo tetracíclico 12,13-epoxitricotecen-9-eno (Figura 13). Se ha visto que la estabilidad del grupo epoxi situado entre los carbonos 12 y 13 es esencial para su toxicidad. Los tricotecenos se dividen en cuatro grupos o tipos:

- Tipo A: presentan un grupo funcional distinto al de una cetona en posición C8.
- Tipo B: presentan un grupo carbonilo en posición C8.
- Tipo C: presentan un segundo grupo epoxi en posición C7-C8 o C9-C10.
- Tipo D: presentan un anillo macrocíclico entre C4 y C15 con dos enlaces éster.



**Figura 13.** Estructura general de los tricotecenos.

Diferentes especies de *Fusarium* están implicadas en la producción de tricotecenos de tipo A y B, pero no en los de tipo C y D, por lo que estos dos últimos tipos no se van a mencionar en el presente estudio. Por otra parte, en alimentos se han encontrado ampliamente distribuidos los del tipo A y B pero muy raramente los del C y D.

En alimentos, los más importantes tricotecenos del tipo A son la toxina T-2, la toxina HT-2, el diacetoxiescirpenol (DAS) y el neosolaniol (NEO) (Tabla 9). Otros menos frecuentes son la toxina T-2-triol (T2-triol), el monoacetoxiscirpenol y el verrucarol. En la actualidad los tricotecenos de tipo A, en particular las toxinas T-2 y HT-2 son objeto de estudio por su inminente regulación en cereales y derivados de cereales. Los tricotecenos de tipo B más importantes son el nivalenol (NIV), el deoxinivalenol (DON), el 3-acetil-deoxinivalenol (3-ADON) y el 15-acetil-deoxinivalenol (15-ADON) (Tabla 10), menos frecuente es la fusarenona X (FusX).

**Tabla 9.** Principales tricotecenos de tipo A.

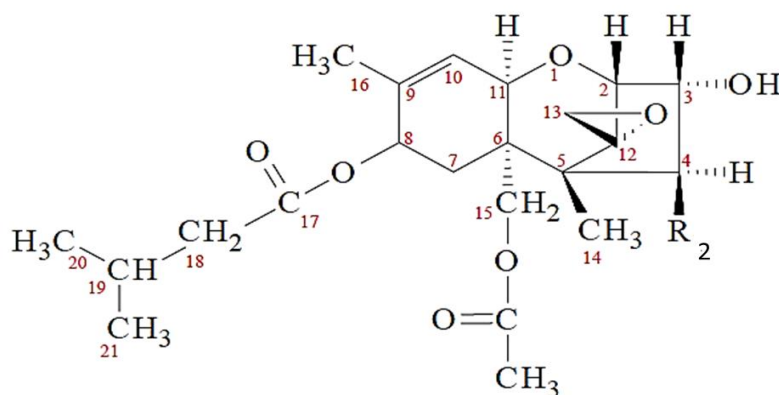
Nombre	Fórmula molecular	PM	R1	R2	R3	R4	R5
<b>T-2</b>	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	466	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>HT-2</b>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	424	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>DAS</b>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	366	OH	OAc	OAc	H	H
<b>NEO</b>	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	382	OH	OAc	OAc	H	OH

**Tabla 10.** Principales tricotecenos de tipo B.

Nombre	Fórmula molecular	PM	R1	R2	R3	R4	R5
<b>NIV</b>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	312	OH	OH	OH	OH	O
<b>DON</b>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296	OH	H	OH	OH	O
<b>3-ADON</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338	OAc	H	OH	OH	O
<b>15-ADON</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	338	OH	H	OAc	OH	O
<b>FusX</b>	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	354	OH	OAc	OH	OH	O

### 4.3.1. Las toxinas T-2 y HT-2

La estructura química de las toxinas T-2 y HT-2 es la que se indica en la Figura 14. Ambos compuestos se diferencian entre sí únicamente en el grupo unido al carbono 4. La solubilidad de T-2 y HT-2 es buena en disolventes orgánicos como metanol, etanol, acetona, cloroforno, acetato de etilo, dietil éter y acetonitrilo (Yates et al., 1968) pero es menos soluble en agua. Al igual que el resto de tricotecenos son estables en acetonitrilo o en atmósfera de argón, al menos, durante dos años, a temperatura ambiente (25 °C). Sin embargo, son inestables en acetato de etilo a temperatura de congelación (Pettersson y Langseth, 2002b).



**Figura 14.** Estructura de las toxinas T-2 ( $R_2=OAc$ ) y HT-2 ( $R_2=OH$ ).

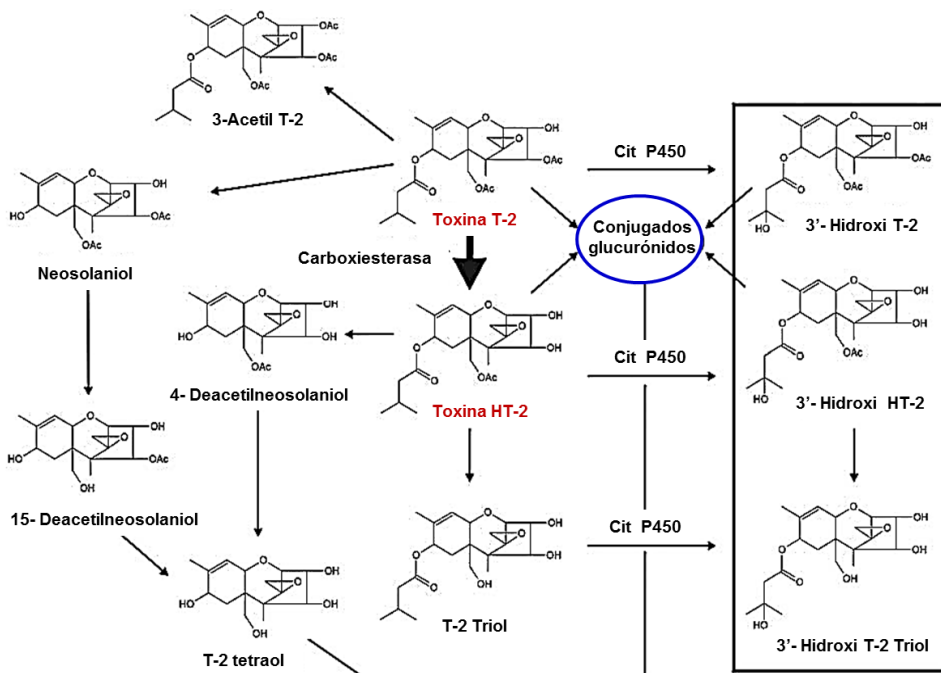
En disolución acuosa, en un rango fisiológico de pH, la vida media de T-2 y HT-2 es de 3,9 y 8,5 años, respectivamente (Duffy y Reid, 1993). No son volátiles y no se degradan durante el procesado de los alimentos. Son estables a pH neutro y ácido y, consecuentemente, no se hidrolizan en el estómago durante la digestión (Rocha et al., 2005). Los tricotecenos de tipo A son más tóxicos que los de tipo B que también se encuentran en alimentos (Miller, 2002).

En la actualidad toda la información relacionada con las propiedades de la T-2 y HT-2, efectos tóxicos en humanos y animales, dosis diaria tolerable, presencia en alimentos y piensos, métodos analíticos para su correcta determinación en alimentos y piensos, etc. son objetivos prioritarios en el

campo de la seguridad alimentaria (EFSA, 2010a; 2010b; 2011; European Commission, 2013).

### 4.3.1.1 Efectos tóxicos

La T-2 es rápidamente metabolizada a HT-2 y otras sustancias (Figura 15) por varios animales y también por plantas *in vivo* e *in vitro* (Dohnal et al., 2008; Vlastimil et al., 2008; Königs et al., 2009). Aunque se han realizado pocos estudios comparativos, la información de que se dispone indica que las toxinas T-2 y HT-2 inducen efectos tóxicos muy similares en el hombre y los animales (WHO/FAO, 2001; EFSA, 2010c; EFSA, 2011) por lo que la toxicidad aguda de ambas está en el mismo rango y los efectos tóxicos observados se deben a la suma de las dos.



**Figura 15.** Rutas metabólicas de la toxina T-2 en humanos y animales (Dohnal et al., 2008; EFSA, 2010b).

La toxina T-2 se absorbe rápidamente por vía oral y por inhalación. La absorción dérmica es baja. Una vez absorbida es rápidamente distribuida por todo el organismo y metabolizada. Los conjugados glucurónidos de la T-2 y sus metabolitos son los principales productos de excreción en orina y heces. La biotransformación de la T-2 ocurre principalmente en el hígado, también en el intestino y plasma sanguíneo. En rumiantes tiene lugar principalmente en el rumen (Cavret y Lecoœur, 2006). Los principales metabolitos que se producen durante la biotransformación de la T-2 son los aparecen en la Figura 15.

Tanto T-2 como HT-2 son compuestos muy tóxicos por vía oral. Actúan predominantemente en tejidos tales como la médula ósea, los nódulos linfáticos, el timo y la mucosa intestinal. También producen efectos inespecíficos como pérdida de peso, daños hepáticos, neurotoxicidad, efectos hematotóxicos e inmunotóxicos y severa irritación en la piel. La exposición a tricotecenos causa también retardo en el crecimiento en eucariotas, disfunción reproductora en mamíferos e inhibición de la germinación y del crecimiento en plantas (Rocha et al., 2005).

La toxicidad más severa de los tricotecenos A resulta de su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas, RNA Y DNA. El efecto nocivo más importante de los tricotecenos en general y de los de tipo A en particular se atribuye a su capacidad para interactuar con la subunidad 60 S de los ribosomas 80 S de los eucariotas (McLaughlin et al., 1977; WHO/FAO, 2001; Jaradat, 2005). Otros efectos de los tricotecenos descritos en diferentes revisiones (Ueno, 1977; 1985; Rocha et al., 2005; Foroud y Eudes, 2009) incluyen alteración de la síntesis de los ácidos nucleicos (Thompson y Wannemacher, 1986; Minervini et al., 2004), de la función mitocondrial (Pace et al., 1988; Minervini et al., 2004), de la integridad de la membrana (Bunner y Morris, 1988; Kang y Buchenauer, 1999) y de la división celular. Los tricotecenos inducen fragmentación del DNA y apoptosis en células animales (Canady et al., 2001; Bouaziz et al., 2008; Caloni et al., 2009; EFSA, 2010c) y pueden inducir la muerte celular programada en plantas (Rocha et al., 2005).

La ingestión de granos contaminados con tricotecenos A ha producido diversos episodios de muertes masivas en las poblaciones afectadas. La enfermedad se conoce como ATA (Alimentary Toxic Aleukia). Se caracteriza por un estado inicial de irritación intestinal con vómitos y diarrea, seguido de aleucia y anemia intensa que puede, finalmente, acabar con la vida del individuo.

Aunque se han descrito epidemias con los síntomas de ATA en New

Hampshire en los años 1730s (Stack, 2003). El primer episodio documentado de ATA ocurrió en Siberia en 1913 y, sobre todo, fueron devastadores los efectos de la enfermedad en Rusia en el periodo comprendido entre 1942 y 1948, en el que murieron más de 10000 personas. El tricoteceno causante de la intoxicación alimentaria fue la T-2 que, se piensa, fue producida por *F. sporotrichioides* y *F. poae*, que se desarrollaron en los granos de cereal debido a que en estos años se presentaron temperaturas muy suaves durante el invierno (Mayer, 1953; Yagen y Joffe, 1976). No fue hasta los años 1950 cuando se estableció la correlación entre la ATA y las toxinas de *Fusarium*.

---

### 4.3.1.2. Presencia en cereales y derivados

---

Las toxinas T-2 y HT-2 se encuentran principalmente en cereales. Por tanto, la principal fuente de tricotecenos en la dieta procede de alimentos vegetales cosechados en todo el mundo, incluyendo países con climas fríos. La acumulación de tricotecenos ocurre cuando las espigas del cereal son infectadas por los hongos productores durante o después de la floración (Del et al., 2007). En el primer caso, los efectos en la planta son más graves y suelen acabar en la pérdida de la cosecha o en un rendimiento muy bajo de la misma (Bushnell et al., 2003; Steffenson, 2003). En el segundo caso, los daños por el hongo pueden ser más o menos visibles, incluso la infección puede resultar asintomática; sin embargo, la acumulación de micotoxinas es progresiva. No existen evidencias sobre acumulación de T-2 y HT-2 en tejidos específicos de animales alimentados con piensos contaminados por lo que los alimentos de origen animal no se consideran alimentos de riesgo en lo que se refiere a estas toxinas.

En la última década el empleo de técnicas basadas en el DNA ha permitido la identificación en una nueva especie, *F. langsethiae*, de la sección *Sporotrichiella*, y ha permitido averiguar que actualmente es esta especie la principal responsable de la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales en el centro y norte de Europa (Torp y Adler, 2004; Torp y Nirenberg, 2004). Actualmente, se especula que quizá fue también esta especie y no *F. poae* la implicada en la producción de los tricotecenos del grupo A causantes de la ATA en el pasado. Esta hipótesis se basa en el hecho de que *F. langsethiae* está muy bien adaptada a climas fríos y presenta una micro-morfología similar a la de *F. poae*, hasta el punto de que es muy difícil la distinción entre ellas a menos que se utilicen técnicas basadas en el DNA, no empleadas en el



pasado. Por otra parte, actualmente, los diferentes autores coinciden en que *F. poae* no produce o produce escasos niveles de tricotecenos A.

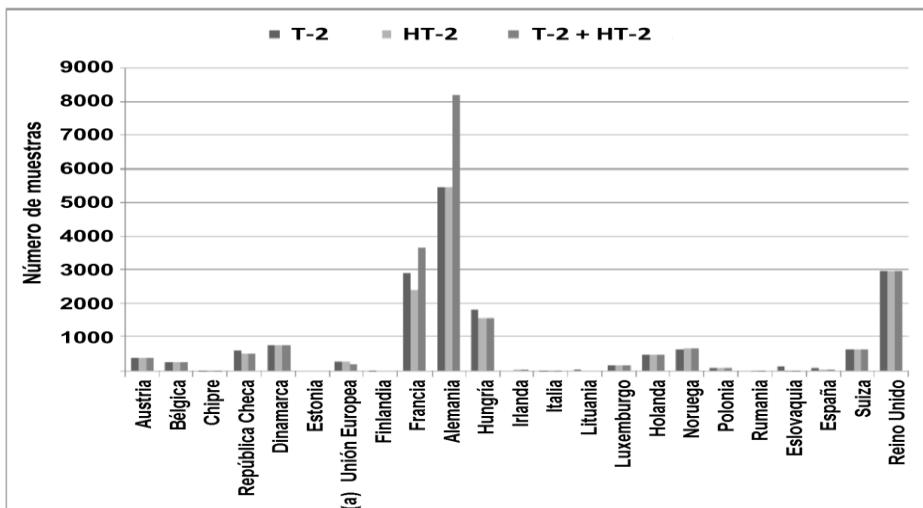
Dependiendo de las especies fúngicas la contaminación por tricotecenos se puede intuir, o no, tras la observación de la planta infectada. Las especies que producen FHB, como *F. graminearum* y *F. culmorum*, ocasionan lesiones y decoloración de las semillas y son productoras de tricotecenos B, como DON. Los resultados de varios estudios indican que el porcentaje de granos dañados por *Fusarium* spp. sirve como una acertada estimación del contenido en DON (Miedaner et al., 2001; Mesterházy, 2002; Foroud et al., 2008). Este screening visual rápido de granos dañados por *Fusarium* spp. debe ser interpretado con mucha cautela ya que si la contaminación con el hongo ocurre en etapas avanzadas de la maduración de la semilla pueden no producirse lesiones visibles en la misma (Hart et al., 1984; Del et al., 2007) por afectar a la ultraestructura de la semilla (Oliveira et al., 2012) o bien puede tratarse de especies no implicadas en la FHB ni en ninguna otra enfermedad sintomática de la planta pero productoras de tricotecenos como ocurre con *F. langsethiae* (Imathiu et al., 2010). Por tanto, las estimaciones sobre la presencia de los tricotecenos A en cereales requieren el análisis de las toxinas en el grano.

Los datos sobre la presencia de las toxinas T-2 y su deacetil-derivado, la toxina HT-2, en alimentos, principalmente cereales, anteriores a 2002 fueron recogidos en diferentes revisiones (FAO/WHO, 2001; SCF, 2002). Los datos posteriores a esta fecha se han resumido en algunas revisiones más recientes (Foroud y Eudes, 2009; van der Fels-Klerx y Stratakou, 2010; EFSA, 2011). Tras el análisis crítico de la bibliografía existente se deduce que, a pesar de haber transcurrido casi un siglo desde que se detectaron los primeros episodios de micotoxicosis conocidos como ATA, las toxinas T-2 y HT-2 en cereales y derivados de cereales siguen constituyendo un importante factor de riesgo para la salud humana y animal.

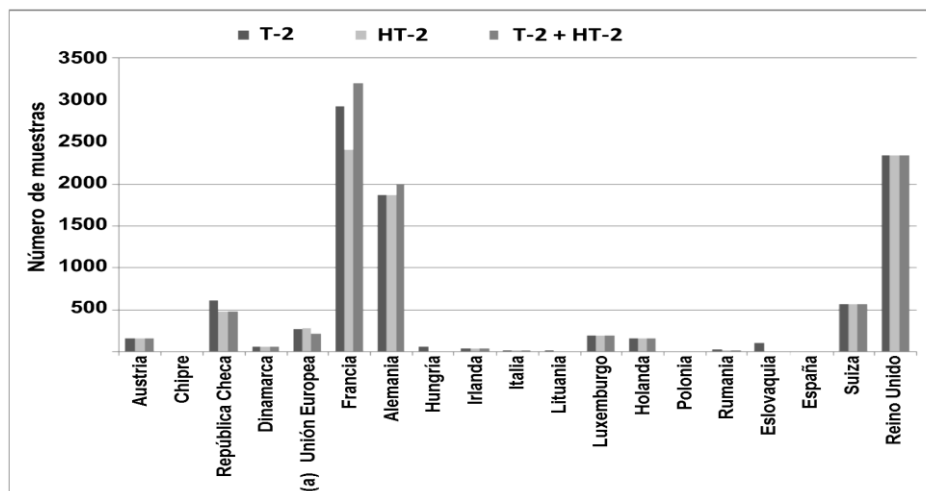
Los resultados de estudios llevados a cabo, especialmente en los últimos diez años, sobre la incidencia de estos dos compuestos en cereales son preocupantes. La Comisión Europea en 2010 solicitó a la EFSA su opinión científica sobre el riesgo que supone, para la salud, la presencia de T-2 y HT-2 en alimentos y piensos en el presente. Para realizar esta tarea la EFSA a su vez pidió la colaboración de autoridades nacionales implicadas en alimentación, entidades de investigación y asociaciones de empresas del sector alimentario, para el suministro de datos fiables (EFSA, 2010a; 2010b)

sobre la presencia de T-2 en alimentos y piensos. Aunque los datos solicitados cubrían el periodo de 2001 a noviembre de 2010, la mayoría de los datos suministrados (95%) procedían de estudios realizados en cosechas posteriores a 2004.

Por otra parte, debido a que los límites de detección y cuantificación de las toxinas en las muestras fueron mejores en las publicaciones que se habían realizado a partir de 2005, la EFSA decidió elaborar el informe basándose principalmente en la información procedente de las muestras recogidas desde el año 2005 hasta noviembre de 2010. Esta revisión se plasma en un documento publicado en 2011 (EFSA, 2011). En esta revisión se recogen 17.683 y 16.536 resultados analíticos de T-2 y HT-2, respectivamente, en cereales no procesados y en alimentos y piensos basados, principalmente, en cereales procedentes de 22 países europeos. Se estudiaron ambas toxinas en 16.463 muestras que, junto a 4.056 resultados adicionales descritos para la suma de las dos, permitió disponer de 20519 resultados analíticos totales para la suma de T-2 y HT-2. La distribución por países, de las muestras estudiadas para determinar la incidencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas se indica en la Figura 16. Si se considera únicamente la categoría de muestras de cereales no procesados, la distribución de las muestras por países es la que se muestra en la Figura 17.



**Figura 16.** Muestras de alimentos, cereales y piensos analizadas en diferentes países para la evaluación de la presencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en el periodo 2005-2010 (EFSA 2011). (a) Estado miembro de la UE no identificado.



**Figura 17.** Muestras de cereales analizadas para la evaluación de la presencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en el periodo 2005-2010 (EFSA, 2011). (a) Estado miembro de la UE no identificado

Las muestras de cereales analizadas (Figura 17) fueron trigo, seguido de avena, cebada, maíz y, en menor cantidad, arroz y otros granos. En total se consideraron 9332 resultados para T-2, 8538 para HT-2 y 9415 para la suma de la T-2 y la HT-2 debido a que en 938 casos la información a la que se tuvo acceso ofrecía únicamente resultados para la suma de ambas toxinas.

El estudio más profundo (EFSA, 2011) de la información recogida en la Figura 17 muestra que, si se consideran los niveles de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en el cereal, los trabajos más relevantes se han realizado en la última década, y han ido ligados a la mejora de los métodos analíticos. Así, desde los trabajos de Langseth (1999) y Langseth y Rundberget (1999) en Noruega hasta los últimos años (EFSA, 2011) los resultados obtenidos por los diferentes autores indican que los niveles más elevados de T-2 y HT-2 se registran, principalmente, en cereales procedentes del centro y norte de Europa y se encuentran especialmente en avena y derivados de la avena (Tabla 11).

El análisis de los niveles de las toxinas T-2 y HT-2 en los cereales de los países más destacables de la Figura 17 y Tabla 11, como por ejemplo, Reino Unido, nos lleva a los trabajos de Edwards (2007a; 2007b; 2009a, 2009b; 2009c). En los estudios publicados, por ejemplo, en 2009, este investigador analiza tres cereales básicos en la dieta: cebada, trigo y avena.

Las muestras se tomaron en un periodo de cuatro años (2001-2005), justo antes de la cosecha, y se analizó un número muy elevado de muestras (1624, 446 y 458 muestras de trigo, cebada y avena, respectivamente), por lo que se puede considerar un estudio bastante representativo. Se encontró T-2 en el 16% de las muestras de trigo y en el 12% de las muestras de cebada a concentraciones medias < 10 µg/kg. Sin embargo, en avena se detectó T-2 en el 84% de las muestras a concentraciones mínimas, medias y máximas de 84, 140 y 2406 µg/kg, respectivamente.

**Tabla 11.** Presencia y niveles de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en cereales en Europa.

Cereal	Nº Muestras	% positivas >LOQ	Media (µg/kg) Total/Positivas	Máximo (µg/kg)
<b>T-2</b>				
<b>Trigo</b>	4799	24%	1,7/8,0	345
<b>Cebada</b>	1370	51%	6,2/9,2	288
<b>Maíz</b>	1166	50%	5,9/16	370
<b>Avena</b>	1453	74%	68/69	2321
<b>Arroz</b>	43	5%	0,37/5,1	9,0
<b>Otros cereales</b>	482	11%	0,41/5,2	138
<b>HT-2</b>				
<b>Trigo</b>	4471	30%	3,7/8,8	820
<b>Cebada</b>	1307	59%	20/22	602
<b>Maíz</b>	828	66%	11/14	321
<b>Avena</b>	1412	85%	168/169	6480
<b>Arroz</b>	43	58%	7,0/9,1	38
<b>Otros cereales</b>	465	16%	1,7/6,6	361
<b>T-2 + HT-2</b>				
<b>Trigo</b>	4738	23%	4.9/15	1165
<b>Cebada</b>	1412	51%	26/31	839
<b>Maíz</b>	1249	48%	13/24	750
<b>Avena</b>	1422	74%	234/236	8399
<b>Arroz</b>	43	5%	7,3/14	47
<b>Otros cereales</b>	533	20%	2,0/9,9	499

La toxina HT-2 se detectó en el 31 y 36 % de las muestras de trigo y cebada, respectivamente. La concentración media en estas muestras fue también  $< 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Sin embargo, el 92% de las muestras de avena contenían la toxina a niveles mínimos, medios y máximos de 430, 151 y 7584  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente (el LOQ para T-2 y HT-2 fue  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

En un estudio posterior (Edwards et al., 2012) se indica que entre el 1 y el 30% de muestras de avena recogidas en el periodo 2002-2008 presentaban niveles de T-2 + HT-2 superiores a  $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$  (nivel máximo que la Comisión Europea está barajando para la inminente regulación de la suma de estas toxinas en cereales).

También en el Reino Unido, otros autores han descrito la presencia y niveles de T-2 y HT-2 en muestras de trigo, avena y maíz, recogidas, en este caso, en el periodo 2004-2007, así como el nivel de consumo de harinas por la población inglesa (Scudamore et al., 2007; 2009a). Por ejemplo, en el último de estos trabajos, los autores estudiaron 60 muestras de trigo (todas de UK), 27 de avena (UK/Irlanda, 21 y Escandinavia, 6) y 86 de maíz (Francia y Argentina). Sólo 3 muestras de trigo fueron positivas para T-2 ( $10\text{-}13 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Todas las muestras de avena presentaron T-2; las de UK/Irlanda a niveles entre 20 y  $1610 \mu\text{g}/\text{kg}$  y las de Escandinavia a niveles entre 5 y  $499 \mu\text{g}/\text{kg}$ . En 22 muestras de maíz francés se encontró la toxina a niveles entre 10 y  $499 \mu\text{g}/\text{kg}$ . La toxina HT-2 se detectó en 12 muestras de trigo ( $10\text{-}49 \mu\text{g}/\text{kg}$ ), 18 muestras de avena ( $50\text{-}3570 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) de UK/Irlanda y en las seis muestras de los países escandinavos ( $50\text{-}999 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). En 34 muestras de maíz francés se encontró la toxina a niveles entre 10 y  $499 \mu\text{g}/\text{kg}$ .

Resultados similares y su relación con la presencia de *Fusarium* spp. productoras de las toxinas se han encontrado también en Suecia (Fredlund et al., 2010). En Noruega, en un estudio en el que se analizaron 310 muestras de cereales de cultivo convencional y 310 muestras de cultivo orgánico (108 de cebada, 110 de avena y 92 de trigo en ambos casos) (Bernhoft et al., 2010), no se encontró la toxina en ninguna muestra de trigo ni de cebada. Sin embargo, en avena se encontraron niveles entre  $< 30\text{-}30 \mu\text{g}/\text{kg}$  en avena orgánica y de  $< 30\text{-}45 \mu\text{g}/\text{kg}$  en avena convencional (LOQ  $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). La HT-2 se encontró en avena orgánica a niveles medios de  $< 20\text{-}80 \mu\text{g}/\text{kg}$  y en avena convencional a niveles medios de  $< 20\text{-}117 \mu\text{g}/\text{kg}$  (LOQ  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ).

En Alemania también se ha estudiado la presencia de la T-2 y HT-2 en muestras de avena (Schwake-Anduschus et al., 2010). En este caso se empleó un método con un límite de detección más bajo ( $\text{LOD} \leq 3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) que

en los estudios citados anteriormente. La concentración de T-2 en las muestras osciló entre 14 y 214 µg/kg. La HT-2 se encontró en todas las muestras ( $\text{LOD} \leq 5 \text{ µg/kg}$ ) y en las siete restantes a niveles entre 81 y 758 µg/kg.

En la República Checa, en un estudio realizado en 148 muestras de cebada cosechadas en el periodo 2005-2008, se encontró T-2 en el 50% de las muestras con una concentración mínima de 30 µg/kg ( $\text{LOQ} 5 \text{ µg/kg}$ ) y HT-2 en el 62% con concentraciones entre 110 y 716 µg/kg ( $\text{LOQ} 10 \text{ µg/kg}$ ) (Malachova et al., 2010).

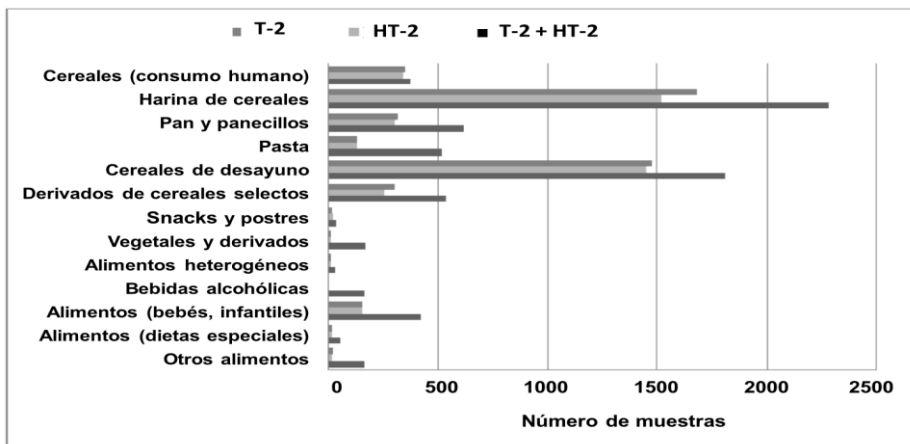
En España, en un estudio realizado en Navarra en el que se analizaron 44 muestras de cebada cosechadas en 2007 (Ibáñez-Vea et al., 2011a; 2012b), se encontró que el 11% de las muestras contenían T-2 a niveles comprendidos entre el LOD (0,4 µg/kg) y el LOQ (20 µg/kg). Solamente una muestra, en la que encontró un nivel de 22,6 µg/kg, superó el LOQ del método. En cambio el 23 % de las muestras fueron positivas para HT-2 con concentraciones entre 7,8 y 16,4 µg/kg ( $\text{LOD} 2,0 \text{ µg/kg}$ ;  $\text{LOQ} 20 \text{ µg/kg}$ ).

Los niveles a los que se encuentran las toxinas en cereales cosechados en el resto de los países que aparecen en la Figura 17 oscilan en un amplio intervalo y pueden ser consultados en los informes de la EFSA (2010a; 2010b; 2011) y en la bibliografía que se recoge en ellos, aunque hay que destacar que el número de muestras estudiadas en estos casos es muy escaso y, por tanto, es necesario realizar estudios más representativos que permitan extraer conclusiones fiables relativas a la incidencia de estas toxinas en cereales y derivados consumidos en países del sur de Europa, entre ellos España, donde la información es extraordinariamente escasa.

Otras fuentes de tricotecenos A en la dieta son, principalmente, los derivados de cereales. En el informe de la EFSA de 2011, aunque el estudio de la T-2 y HT-2 en el conjunto de muestras de alimentos se centró en un principio en datos procedentes de 22 países europeos, dada la dispersión en los LODs y LOQs entre los diferentes métodos empleados para conseguir sintetizar la información, se consideraron solamente los resultados obtenidos para la suma de T-2 y HT-2 cuando se emplearon métodos con  $\text{LOQs} \leq 20 \text{ µg/kg}$ . El conjunto de datos finalmente considerado fue de 4458, 4204 y 7139 resultados analíticos para T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas, respectivamente. El estudio de las toxinas en derivados de cereales quedó restringido a 15 países.

Las muestras estudiadas en los diferentes tipos de alimentos se indican en la Figura 18. En ella hay que destacar el elevado número de muestras de harinas para panadería, bollería y repostería, cereales de desayuno, pan, pasta y alimentos más selectos, como galletas y otros alimentos infantiles. También es relevante que, en general, en todas las muestras analizadas tanto de cereales como de derivados de cereales, la mayor parte de los autores encuentran mayores niveles de HT-2 que de T-2. La relación HT-2/T-2 suele oscilar entre 2 y 7 (Langseth y Rundberget, 1999; Scudamore et al., 2007; Gottschalk et al., 2009; Schwake-Anduschus et al., 2010).

Los niveles de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en harinas y otros derivados de cereales varían dentro de un amplio rango. En Alemania, por ejemplo, en el periodo 2005-2006, se estudió un total de 289 muestras: 130 derivados de trigo, 61 derivados de arroz y 98 derivados de avena (Gottschalk et al., 2009), encontrándose T-2 en el 85%, 87% y 100% de las muestras, respectivamente. El nivel más alto (34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se detectó en copos de avena. Asimismo, se encontró HT-2 en el 94%, 93% y 99% de las muestras, respectivamente, el nivel más alto (51  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se encontró también en copos de avena. Estos autores en un estudio previo (Gottschalk et al., 2007) analizaron 43 muestras de copos de avena y encontraron T-2 y HT-2 en el 100% de las muestras con niveles medios de 6,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente y niveles máximos de 34  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 51  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente.



**Figura 18.** Principales grupos de alimentos analizados para la evaluación de la incidencia de T-2, HT-2 y la suma de ambas toxinas en diferentes países (EFSA, 2011).

En el periodo entre 2005-2009 en el estudio presentado por “European Breakfast Cereal Association” en el que participaron Reino Unido, Alemania, Finlandia, Polonia e Irlanda (Pettersson, 2009). Se estudiaron un total de 243, 529 y 105 muestras de avena integral, copos de avena y harina de avena, respectivamente y en la mayor parte de las muestras se encontraron T-2 y HT-2 simultáneamente. Se halló T-2 en el 73% de las muestras de avena integral (mínima, 32 µg/kg), 24% de las muestras de copos de avena (mínima, 5 µg/kg) y 17% de las muestras de harina de avena (mínima, 4 µg/kg). La toxina HT-2 se encontró en el 91% de las muestras de avena integral (mínima, 62 µg/kg) 68 % de las muestras de copos de avena (mínima, 12 µg/kg) y 34 % de las muestras de harina de avena (mínima, 7 µg/kg). El LOD para T-2 y para HT-2 fue de 5 µg/kg.

En el Reino Unido, en un estudio de cuatro años realizado en muestras de alimentos derivados de trigo, maíz y avena, sólo se encontró T-2 y HT-2 en los derivados de avena y el nivel de las toxinas fue menor cuando se trataba de derivados elaborados con avena sin cascarilla. La concentración de T-2 en estos productos osciló entre 10 y 499 µg/kg y la de HT-2 entre 10 y 499 µg/kg. (Scudamore et al., 2009a; 2009b).

Estudios realizados en España en alimentos derivados de cereales, como pan y pasta, indican que estas toxinas se encuentran en un bajo porcentaje de muestras y los niveles son muy bajos, pocas veces superan los LOQ (Cano-Sancho et al., 2011; González-Osnaya et al., 2011). Es importante destacar que en estos estudios no se incluyen derivados de avena, por lo que son necesarias nuevas investigaciones en derivados de este cereal.

El estudio más representativo sobre la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en alimentos derivados de cereales es quizá el que se llevó a cabo en el “SCOOP Task 3.2.10 project on the occurrence of *Fusarium* toxins in Europe” (SCOOP, 2003) en el que se obtuvieron datos de diferentes países europeos (Dinamarca, Finlandia, Noruega, Austria, Francia, Reino Unido, Italia y Portugal). En este estudio de 3490 muestras analizadas, el 20% estaban contaminadas con T-2 a niveles que oscilaron dependiendo del cereal del que se había elaborado el alimento y del país. La toxina se detectó en el 21 % de las muestras de derivados del trigo en el rango 2-160 µg/kg (la media varió entre 1,7 µg/kg en UK y 90 µg/kg en Dinamarca), el 3 % de las muestras de derivados de la cebada en el rango 1,7-280 µg/kg (la media varió entre 0,8 µg/kg en UK y 280 µg/kg en Italia), el 16 % de las muestras de derivados de la



avena en el rango 10-550 µg/kg (la media osciló entre 4,2 µg/kg en Finlandia y 68 µg/kg en Austria), el 21% de las muestras de derivados del sorgo en el rango 10-193 µg/kg y el 28 % de las muestras de derivados del maíz (la media osciló entre 3 µg/kg en Francia a 255 µg/kg en Austria) (Schothorst y van Egmond, 2004).

En este mismo proyecto se analizaron 3032 muestras para la determinación de HT-2. El 14% presentaron la toxina, aunque los niveles también oscilaron dependiendo del tipo de cereal de partida. Así, el 12% de las muestras de derivados del trigo presentaron la toxina en el rango 3,3-50 µg/kg, el 5% de las derivadas de la cebada en el rango 1,7-287 µg/kg, el 41% de las derivadas de la avena en el rango 10-1150 µg/kg, el 17 % de las derivadas del sorgo en el rango 10-70 µg/kg y el 24 % de la derivadas del maíz en el rango 3-120 µg/kg (Schothorst y van Egmond, 2004).

En base a lo expuesto se puede concluir que el interés actual en estos metabolitos fúngicos tóxicos (los tricotecenos del grupo A y, en especial, T-2 y su metabolito HT-2) en alimentos, se debe, entre otros factores, a la altísima frecuencia y concentración con que se han hallado recientemente en cereales.

Su interés en Micología es debido a que las principales especies productoras pertenecen al género *Fusarium*, género muy polémico desde el punto de vista taxonómico. Prueba de ello es la reciente identificación de nuevas especies productoras de las toxinas, mediante técnicas basadas en el DNA, como *F. langsethiae* y *F. sibiricum* (Yli-Mattila et al., 2011) que sustentan de manera muy sólida la sospecha de que al menos la primera de estas especies puede haber sido la principal implicada en las intoxicaciones por tricotecenos A registradas a lo largo de la historia. Los resultados de la revisión realizada ponen en evidencia, una vez más, posibles identificaciones erróneas realizadas en el pasado.

En última instancia, los estudios sobre estas toxinas tienen una relevancia especial por la urgente necesidad de investigar todos los aspectos relacionados con estos metabolitos fúngicos debido a que la EC (Comisión Europea) tiene previsto su inminente regulación en alimentos en los países de la UE (apartado 9).

En esta Tesis Doctoral se analiza por vez primera la incidencia de las toxinas T-2 y HT-2 en cebada cultivada en España por ser el principal cereal que se produce y al que se dedica mayor superficie de cultivo. La investigación desarrollada se describe en el **ARTÍCULO 2**.

## 5. Producción de cereales y vino en España

En España, los cereales son fundamentales en la agricultura, la economía y la nutrición humana y animal. Entre ellos la cebada es el cereal con mayor superficie de cultivo. Según los datos más recientes del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en 2011 la producción de cebada en España con respecto a la de otros cereales fue la que se indica en la tabla 12. No se han publicado los datos de campañas posteriores.

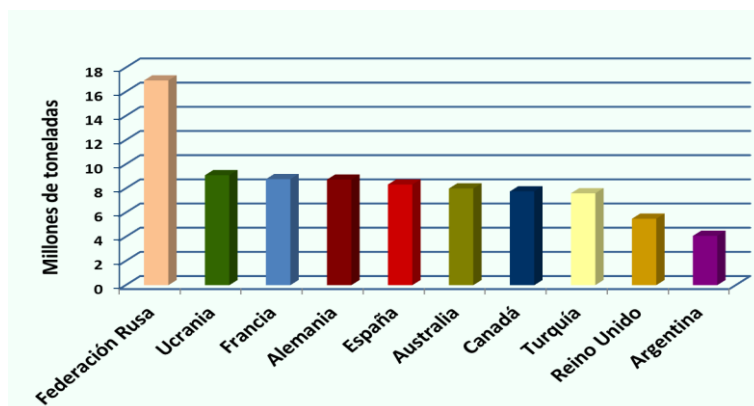
**Tabla 12.** Cultivo y producción de cereales en España.

<b>Cereal</b>	<b>Área cosechada (ha)</b>	<b>Rendimiento (hg/ha)</b>	<b>Producción (toneladas)</b>
<b>Cebada</b>	2697900	30869	8328200
<b>Trigo</b>	1993000	34621	6900000
<b>Maíz</b>	368300	104692	3855800
<b>Avena</b>	491300	21956	1078700
<b>Arroz</b>	121700	76409	929900

(<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/cereales/>).

Si se compara la producción de cebada en España con respecto a la de otros países del mundo, en 2011 España ocupó el quinto lugar, con una producción de 8328200 toneladas (t), después de la Federación de Rusia, Ucrania, Francia y Alemania donde la producción, respectivamente, fue de 16938000, 9097700, 8775000 y 8733800 t (Figura 19). Por otra parte, hay que destacar que en España, la cebada es prácticamente, el único cereal del que se obtienen dos cosechas anuales, la de invierno o de periodo largo y la de primavera o de periodo corto. Las previsiones de la FAO sobre la producción cerealista para 2013-2014 en el mundo son de un progresivo aumento (Figura 20).

La cebada es el principal cereal empleado en la fabricación de cerveza, maltas especiales, sustitutivos del café, obtención de azúcares, diversos productos alimenticios, harinas para panificación como ingrediente en alimentos ricos en fibra y alimentos funcionales y en destilería para obtener alcohol. Es también, un cereal fundamental en alimentación animal.



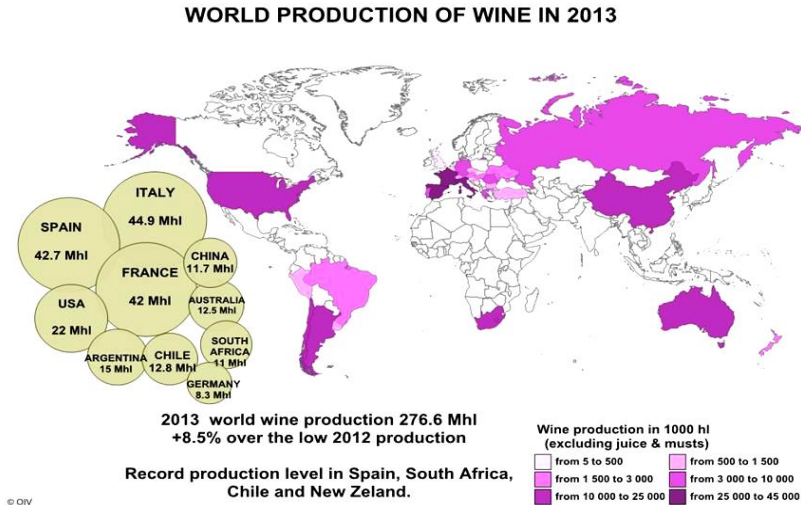
**Figura 19.** Producción de cebada en España con respecto a otros países del mundo en la campaña 2010-2011



**Figura 20.** Previsiones de la FAO sobre la producción, utilización y existencias de cereales en el mundo (<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>).

El vino es el derivado más importante de la uva. Según los datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente y de la OIV, recogidos en su Nota de Coyuntura Mundial presentada en abril de 2014, las cifras declaradas sobre la producción de vino en España en 2013 con respecto a la de otros países son las que se indican en la Figura 21. En ella se observa que, a pesar de la depresión económica que afecta a nuestro país, en 2013 España, ha sido el segundo país del mundo en cuanto a producción de vino (42,7 millones de hectolitros, Mhl), después de Italia (44,9 Mhl) y el

primero en cuanto a superficie de viñedo con 1018000 hectáreas (ha) cultivadas. Le siguen Francia (800000 ha) e Italia (769000 ha).



**Figura 21.** Producción de vino en España con respecto a otros países del mundo en 2013. (Según OIV, Nota de Coyuntura Mundial presentada en abril de 2014).

([http://www.oiv.int/oiv/info/en\\_le\\_secteur\\_du\\_vin\\_retrouve\\_son\\_equilibre](http://www.oiv.int/oiv/info/en_le_secteur_du_vin_retrouve_son_equilibre))

Los consumidores de vino demandan constantemente alta calidad en el producto y ello produce un fuerte impacto en el nivel de competitividad en el mercado nacional e internacional. Desde que a mediados de la década de los 90 se detectara por primera vez OTA en vino, éste ha sido quizá el producto que ha atraído mayor atención, en lo que se refiere a presencia de esta toxina (apartado 4.1.2).

Tras la primera publicación (Zimmerli y Dick, 1996) sobre la alta incidencia de OTA en uva y derivados, especialmente vino, se alertó a la comunidad científica y ello ha conducido a diversos estudios que se han mencionado previamente. En ellos se llegó a la conclusión de que el vino es, sin lugar a dudas, la segunda fuente directamente implicada en la ingesta de OTA después de los cereales.

En los últimos años los Programas de Investigación nacionales e internacionales han situado el problema de la presencia de OTA en vino como un objetivo prioritario en el marco de la seguridad alimentaria y, gracias a ello, los estudios han sido numerosos, multidisciplinarios y de alta calidad científica.

## 6. Factores que afectan al desarrollo fúngico y a la producción de micotoxinas. Cambio climático global

---

El nivel de colonización fúngica de un determinado sustrato, u hospedador, y la biosíntesis y acumulación de micotoxinas en el mismo, depende de múltiples factores (Figura 22), que pueden tener una mayor o menor incidencia en uno o en ambos procesos. Algunos de estos factores en determinadas ocasiones son controlables, pero otros escapan al control de la mano del hombre. Estos factores son de dos tipos:

- Factores **abióticos** como son los ligados a la climatología, tipo de suelo, prácticas de labranza, rotación de cultivos y los relacionados con la clase de cultivo, si es ecológico o tradicional y en este punto juega un papel muy importante el tipo y dosis de antifúngico que se emplea.
- Factores **bióticos** como el hospedador, la microbiota competitiva, la variabilidad asociada a la especie y cepa fúngica y los daños producidos por insectos en el hospedador.

Las interacciones de todos ellos y su influencia en el crecimiento del hongo y en la producción de micotoxinas es muy compleja. El conocimiento de estas interacciones y sus efectos es clave en la comprensión del crecimiento del hongo y producción de micotoxinas en el hospedador y en sus derivados, en la predicción del desarrollo de los hongos y acumulación de micotoxinas en los cultivos de las diferentes regiones agroclimáticas del mundo, y bajo los efectos del cambio climático global, en el diseño de tratamientos adecuados de los cultivos agrícolas, en el desarrollo de métodos para la eliminación de micotoxinas, en el diseño de estrategias dirigidas a su prevención y control y, en consecuencia, en la producción de alimentos seguros.

Factores ambientales fundamentales como la humedad relativa, la temperatura, la concentración de gases en la atmósfera y el fotoperiodo no pueden ser controlados durante el cultivo del vegetal en el campo y, por tanto, aun a sabiendas de que van a influir cualitativa y cuantitativamente en la microbiota de la planta y en su ataque al hospedador, así como en la biosíntesis de micotoxinas, no es posible actuar sobre ellos. Sin embargo, el conocimiento *a priori* del efecto de estos factores en el desarrollo de los hongos y en la producción de las micotoxinas, sí permitiría predecir lo que va

a ocurrir y, en función de ello, emplear medidas preventivas y de control como podría ser el empleo adecuado de antifúngicos.

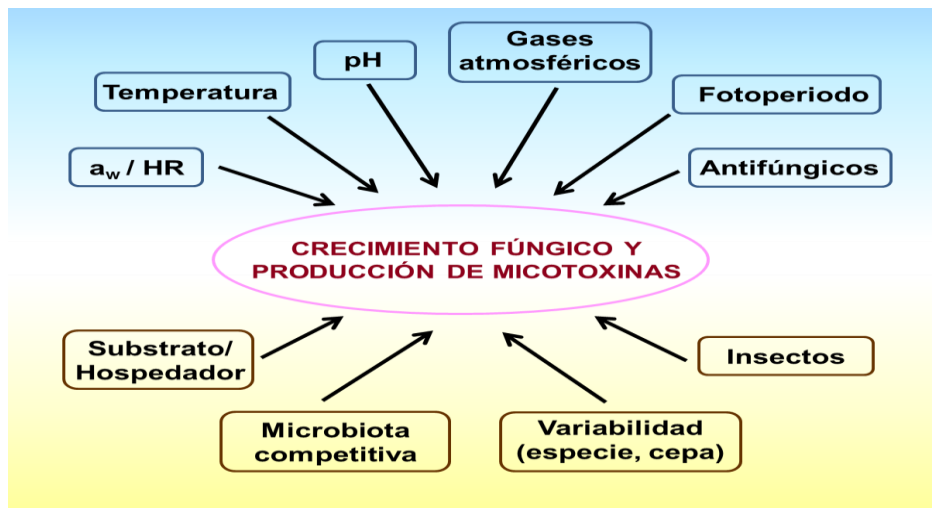
Por otra parte, es imprescindible citar aquí la importancia que puede tener el **cambio climático global** en el crecimiento de hongos y en la producción de micotoxinas. Se estima que en los próximos 10-20 años la temperatura media del planeta aumentará en torno a una media de 0,03 °C al año, aunque este aumento dependerá de la región. En Europa, por ejemplo, las estimaciones indican que en este periodo (los próximos 10-20 años) la temperatura en los países del sur puede sufrir un incremento de 4-5 °C con largos periodos de sequía, lo que puede resultar en una relativa desertificación y, en consecuencia, en una disminución del rendimiento de las cosechas. En áreas del centro, este aumento, se estima en 3-4 °C e iría acompañado de un incremento de las lluvias. En países del norte se espera que la temperatura se eleve en torno a 3-4,5 °C y ello estará asociado a un gran aumento de las precipitaciones (30-40%). Por consiguiente, parece que el rendimiento de las cosechas agrícolas podría verse favorecido. El éxito de la cosecha, sin embargo, no se basa únicamente en su rendimiento sino también en la calidad de los productos cosechados y, en este sentido, estos cambios climáticos pueden ir asociados a consecuencias todavía impredecibles en lo que respecta a la seguridad de los alimentos y, en última instancia, a la alimentación a nivel mundial (European Commission, 2007a; Solomon et al., 2007; Miraglia et al., 2009; Paterson et al., 2010; Magan et al., 2011; Battilani et al., 2012).

Aunque podría hacerse extensivo al conjunto de géneros fúngicos que albergan especies productoras de micotoxinas, para los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, que son a los que pertenecen las especies que se emplean en el presente trabajo, los factores más importantes que influyen en el desarrollo del hongo y en la producción de micotoxinas son los indicados en la Figura 22.

En el presente, algunas micotoxinas ya conocidas desde hace tiempo, como la OTA, AFLs y tricotecenos A como la toxina T-2 y HT-2 se consideran emergentes, debido principalmente a su alta incidencia en alimentos y a la relación que este hecho parece tener con el cambio climático global. En esta línea, especies del género *Aspergillus* como *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. flavus*, *A. parasiticus* y especies del género *Fusarium* como *F. langsethiae* atraen actualmente la atención. Ello se debe en el caso de *Aspergillus* spp. a su perfecta adaptación a condiciones de estrés

hídrico y térmico, lo que puede tener consecuencias importantes en la seguridad alimentaria presente y futura en el marco del cambio climático global y, en el caso de *F. langsethiae*, a su rápida difusión desde regiones frías y húmedas del norte y centro de Europa a regiones situadas más al sur como Francia, España o Italia (Infantino et al., 2007), lo que indica igualmente su adaptación y tolerancia a temperaturas más elevadas y menores niveles de humedad relativa.

Datos sobre estas especies y las micotoxinas que producen en los cultivos agrícolas españoles y su presencia en derivados para consumo humano son muy escasos. En la presente Tesis Doctoral se realiza una importante aportación en esta línea centrándose en determinadas etapas de los sistemas: uva/vino y cereales/derivados de cereales.



**Figura 22.** Principales factores abióticos y bióticos que afectan al crecimiento de hongos y a la producción de micotoxinas en cosechas agrícolas.

Aunque a continuación se analiza la influencia de estos factores en el crecimiento del hongo y en la producción de las micotoxinas, se evitarán descripciones excesivamente detalladas ya que la lista de trabajos y resultados sería extraordinariamente extensa y, sin duda, confusa, debido a que las condiciones en las que se han realizado los trabajos por los diferentes autores difieren entre sí y dificultan el análisis crítico comparativo de los resultados (Cole y Cox, 1981; Doohan et al., 2003; Dowd et al., 2005; Murphy et al., 2006; Magan y Aldred, 2007a).

A todo ello habría que sumar, además, el efecto clave que ejercen las diferentes prácticas agrícolas y la particular tecnología aplicada en cada caso hasta que el producto llega a la mesa del consumidor. Así, por ejemplo, en los DFP (diagramas de flujo del proceso) mostrados en las Figuras 27 y 29, en el sistema “de la uva al vino” la fase de postcosecha, previa al estrujado de la uva, prácticamente no existe por lo que no afecta o afecta muy poco al contenido en micotoxinas del producto final, el vino. En cambio en el proceso “del cereal al derivado del cereal” ambas etapas, precosecha y postcosecha, afectan al nivel de micotoxinas en el producto listo para el consumo y, en este caso, la segunda tiene incluso una mayor influencia que la primera.

---

## 6.1. Actividad de agua ( $a_w$ )

---

La actividad de agua ( $a_w$ ) se define, desde el punto de vista microbiológico, como el agua libre de un sustrato en equilibrio con la humedad relativa ambiental a una determinada temperatura. Sus valores mínimo y máximo son 0 y 1. Se trata por tanto del agua disponible para el crecimiento microbiano y, en consecuencia, también para el crecimiento fúngico. La  $a_w$  se define como la relación entre la presión de vapor del agua de un sustrato ( $P$ ) y la presión de vapor del agua pura ( $P_0$ ), medidas ambas a la misma temperatura. Por tanto,  $a_w = P/P_0$ .

La  $a_w$  se puede expresar como potencial de agua total ( $\Psi_T$ ), y se define como la fracción disponible del contenido de agua total, necesaria para el crecimiento microbiano o fúngico. Se mide en pascales (p) o megapascales (Mp) y es la suma de tres factores: (i) potencial de agua, debido a la presencia de iones y otros solutos, el agua fluiría desde una solución poco concentrada a una solución más concentrada; (ii) potencial matricial, debido a las fuerzas que mantienen unidas las moléculas de agua a una matriz en espacios pequeños (fuerzas de capilaridad o tensión superficial); y (iii) potencial de turgor, debido al balance del medio interno (célula microbiana o fúngica) y del medio externo (medio ambiente), el agua fluiría desde un sistema con presión alta hasta un sistema con baja presión.  $\Psi_T$  se relaciona con la  $a_w$  mediante la siguiente fórmula:  $\Psi_T = (RT/V) \ln a_w (+P)$ , donde  $R$  es la constante universal de los gases perfectos,  $T$  es la temperatura absoluta en grados Kelvin,  $P$  es la presión atmosférica y  $V$  es el volumen molar parcial del agua (Palazzini et al., 2009).



La disponibilidad de agua es quizás uno de los factores más importantes y limitantes en la colonización fúngica de un determinado substrato y/u hospedador. También influye en su comportamiento fisiológico y, por tanto, en la producción de metabolitos como es el caso de las micotoxinas. La disponibilidad de agua para el hongo determina la germinación de las esporas, la rapidez de la misma, la tasa respiratoria, la velocidad de crecimiento y, en consecuencia, la capacidad para colonizar el medio y para la producción de las micotoxinas (Llorens et al., 2004a; 2004b; Marín et al., 2004; Ramírez et al., 2004; 2006; Hinojo et al., 2006; Samapundo et al., 2007a).

De todos los microorganismos que pueden afectar a vegetales, son los hongos filamentosos los que pueden crecer con menor cantidad de agua disponible y, por tanto, son los principales causantes del deterioro y pérdida de las cosechas (Lacey y Magan, 1991). En el crecimiento fúngico es también muy importante el contenido en agua de la fase gaseosa o atmósfera en la que se encuentra el sustrato donde crece el hongo. El contenido en agua de esta atmósfera se expresa en términos de humedad relativa (HR) y está en equilibrio con la  $a_w$ . Por tanto, su valor deriva de la misma relación que la  $a_w$  pero expresada en porcentaje.

En precosecha, en productos agrícolas como la uva o los cereales, la  $a_w$  es consecuencia del estado de maduración del grano en formación en la planta, así como el resultado de la penetración de agua de lluvia o nieve en el grano. En postcosecha depende del secado adecuado del grano antes del almacenamiento o de la migración del agua debido al gradiente de temperaturas y, en consecuencia, de la humedad relativa en el interior del silo (Lacey, 1989; Dowd et al., 2005; Cotty y Jaime-García, 2007).

La actividad de agua mínima para el desarrollo de los hongos en productos agrícolas se estima que se encuentra en torno a 0,70. Sin embargo el rango entre el mínimo y el máximo de  $a_w$  que permite el crecimiento del hongo puede variar dependiendo del género fúngico, especie, e incluso, cepa. *Aspergillus* spp. implicadas en la producción de OTA crecen con dificultad o no crecen a  $a_w$  inferiores a 0,85 (Varga et al., 1996; Bellí et al., 2004b; Esteban et al., 2006; Leong et al., 2006a; Romero et al., 2007; Schmidt-Heydt et al., 2008). Otros estudios con cepas de *A. carbonarius* de diferentes países indican que no es capaz de crecer a  $a_w$  0,85 y muy pocos aislados lo hacen a  $a_w$  0,88 (Bellí et al., 2004b). Es importante, por tanto, tener en cuenta los resultados obtenidos por los diferentes autores para especies concretas.

Se ha descrito, por ejemplo, que *A. flavus* y *A. parasiticus* pueden crecer en medios con potenciales de agua más bajos que -35 MPa (0,77  $a_w$ ) (Klich, 2007). Otros estudios indican que *A. flavus* puede crecer y producir AFLs en medios con  $a_w$  en torno a 0,73 y 0,85, respectivamente (Sanchis y Magan, 2004). Estos dos valores de  $a_w$ , por ejemplo, en maíz corresponden a contenidos en humedad de 8-12 % y 17-19%, respectivamente (Battilani et al., 2007). Se ha descrito que en condiciones óptimas ( $a_w > 0,95$  y temperatura 15-45 °C) la germinación de las esporas de estas especies es siempre posible y cesa por debajo de  $a_w$  0,80, independientemente de la temperatura (Marín et al., 1998a; Schmidt-Heydt et al., 2010).

En algún estudio se ha observado que *A. ochraceus* crece con valores de  $a_w$  entre 0,80 y 0,99 y produce OTA en el intervalo 0,90-0,99. El valor de  $a_w$  óptimo para el crecimiento y producción de la toxina es 0,95 (Suárez-Quiroz et al., 2004). Sin embargo, otros estudios realizados con otras cepas de *A. ochraceus* demuestran que el rango de  $a_w$  para el crecimiento y la producción de OTA es el mismo y oscila entre 0,85 y 0,99 (Pardo et al., 2004a; 2004b; 2005a; 2005b). Estos resultados son, por tanto, muy discordantes y demuestran que no es posible fijar valores mínimos, óptimos y máximos específicos de especie ya que existe una alta variabilidad asociada a la cepa.

Usualmente los cereales almacenados en silos tienen un contenido en humedad en torno a 14-15%. El secado insuficiente de las semillas o la alta humedad relativa del silo, o de determinadas zonas de mismo con ventilación deficiente, puede inducir a la existencia de “bolsas” con alto contenido de humedad donde el desarrollo de los hongos puede ser óptimo y la producción de micotoxinas, muy elevada (Magan y Aldred, 2007a). Esto justifica la importancia de un muestreo adecuado de cada lote de cereal, o del producto agrícola almacenado de que se trate, antes de determinar la intensidad de la infección fúngica y el contenido en micotoxinas del mismo.

Para *Fusarium* spp. productoras de diferentes micotoxinas se ha descrito que la  $a_w$  requerida para la germinación de las esporas es igual o superior a 0,88 y que el crecimiento se observa a partir de  $a_w$  0,90 (Marín et al., 2004; Ramírez et al., 2004; Ramírez et al., 2006; Palmero et al., 2008); en concreto, por ejemplo, para *F. langsethiae* la  $a_w$  para el crecimiento se encuentra entre 0,90 y 0,99 y para la producción de las toxinas T-2 y HT-2 entre 0,93 y 0,99. Las toxinas no se producen a valores de  $a_w$  inferiores a 0,93 (Medina y Magan, 2010; 2011). De ahí que las especies de este género se consideren, más bien, hongos de campo por presentar mayor facilidad para

colonizar la semilla cuando el contenido en humedad de la misma es más elevado.

Es importante destacar que en diversos estudios se ha demostrado la interacción de la actividad de agua con otros factores fisicoquímicos como la temperatura, substrato, pH, composición de la atmósfera, presencia de luz y con factores bióticos como el hospedador y la cepa fúngica (Lacey y Magan, 1991; Guynot et al., 2003; Magan et al., 2004) y se ha visto que estas interacciones influyen en la germinación de las esporas, en la tasa de crecimiento del hongo y en la producción de las micotoxinas.

Todos estos estudios ponen de manifiesto que, generalmente, los rangos de  $a_w$  o  $\Psi_T$  concretos para cada especie o cepa fúngica en los que es posible la germinación de las esporas, el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas no coinciden, siendo, en general, menos restrictivos los que permiten el crecimiento del hongo y más restrictivos los que permiten la producción de micotoxinas. El estudio del efecto de la  $a_w$  en el crecimiento de las especies *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus* y *F. langsethiae* productoras de OTA, AFLs y tricotecenos A se realiza en los **ARTÍCULOS 3, 4, 5** y texto que le acompaña dentro del capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

## 6.2. Temperatura

---

De la misma manera que ocurre con la disponibilidad de agua en el medio, la temperatura ejerce un papel decisivo en la capacidad del hongo para crecer y producir micotoxinas. Cada especie fúngica tiene una temperatura mínima, óptima y máxima para la germinación de sus esporas, el desarrollo y la colonización del hospedador o medio en que se encuentra (Lacey, 1989) y síntesis de micotoxinas. Generalmente, los hongos crecen en un amplio rango de temperaturas, que puede oscilar entre -4 °C hasta temperaturas máximas de 60-65 °C. La mayoría de los hongos que colonizan frutas o cereales, antes, durante y después de la cosecha, crecen entre 0 y 35 °C (Lacey, 1989; Marín et al., 2004; Ramírez et al., 2006). El rango de producción de las toxinas, generalmente, difiere del de crecimiento y dependerá de cada especie fúngica y, al igual que se ha visto para la  $a_w$ , depende incluso de la cepa. La mayor parte de las especies de *Aspergillus* crecen a temperatura comprendidas en torno a 25° de latitud norte y sur y se

pueden encontrar en latitudes 26° y 37°. No se dispone de datos en latitudes en torno a 45° (Klich, 2007).

En estudios *in vitro* y para especies concretas como, por ejemplo, *A. flavus* y *A. parasiticus*, se ha observado que crecen entre un mínimo de 10-12 °C hasta un máximo de 43-48,8 °C y presenta un crecimiento óptimo en torno a 33,8 °C (entre 25-42 °C) (Klich et al., 1994; Payne, 1998; Payne y Brown, 1998; Pitt y Hocking, 2009a; 2009b). Teniendo en cuenta estos valores de temperatura y los ya descritos en relación con la  $a_w$ , estas especies son consideradas semitermófilas y semixerófilas. En regiones agroclimáticas con altas temperaturas y baja humedad relativa, estas especies pueden llegar a ser muy competitivas y, en consecuencia, constituir la micobiota dominante (Payne, 1998).

En algunos estudios se ha observado que *A. ochraceus* crece a temperaturas entre 8-10 °C y 37-40 °C y presenta un crecimiento óptimo entre 24 y 31 °C. Produce OTA entre 12 y 37 °C con óptimos en torno a 27-31 °C, (Pitt y Hocking, 2009b; Suárez-Quiroz et al., 2004) y *A. carbonarius* crece a temperaturas entre 13 y 35 °C con óptimos en torno a 25 y 35 °C, y produce OTA entre 10 y 25-35 °C con producción óptima en torno a 15-20 °C (Bellí et al., 2004b).

Al igual que en *Aspergillus* spp, en el caso de *Fusarium* spp., los rangos de temperatura y los valores óptimos para el crecimiento y producción de micotoxinas varían en función de la especie, cepa y condiciones (Llorens et al., 2004a; 2004b; Hinojo et al., 2006). En concreto, para *F. langsethiae* existe muy poca información pero la que existe, extraída de resultados obtenidos con cepas productoras de las toxinas T-2 y HT-2 aisladas de cereales de diferentes países del centro y norte de Europa, indica que este hongo crece bien a temperaturas entre 10 y 35 °C (Medina y Magan, 2010) y que la producción de las toxinas es óptima entre 20 y 30 °C dependiendo de la  $a_w$ . A 5 °C produce las toxinas después de largos periodos de incubación. Este comportamiento se ha observado que es bastante general e independiente del origen de la cepa (Medina y Magan, 2011).

Es muy importante, de nuevo, tener en cuenta que estos valores de temperatura se encuentran en general condicionados a otros parámetros, especialmente la  $a_w$ , y que, a su vez, la temperatura tiene una considerable influencia sobre la disponibilidad de agua, pues los requerimientos mínimos para el crecimiento fúngico y la producción de las toxinas son distintos a diferentes temperaturas. Cada factor por separado y el conjunto de todos ellos

y sus interacciones con la temperatura tiene influencia sobre las especies fúngicas que están colonizando el fruto o cereal, pudiéndose establecer especies predominantes más o menos tolerantes a la temperatura según sean el resto de condiciones (Magan y Aldred, 2007a).

El estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento de las especies *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus* y *F. langsethiae* productoras de OTA, AFLs y tricotecenos A se realiza en los **ARTÍCULOS 3, 4, 5** y texto que le acompaña dentro del capítulo 2 de esta Tesis Doctoral.

---

### 6.3. Concentración de iones hidrógeno (pH)

---

En general, existe muy poca información relacionada con la influencia del pH del medio o del hospedador en el crecimiento de los mohos y en la producción de micotoxinas durante su fase vegetativa. En cultivos de laboratorio, a pesar de la práctica habitual de controlar el pH en el medio de partida y la gran cantidad de información existente relacionada con este pH inicial del medio, pocos trabajos se han dedicado al estudio de la evolución del pH a lo largo del tiempo en cultivos de hongos filamentosos o mohos, y cómo influye este hecho, en el crecimiento del hongo y en la producción de micotoxinas. Esta investigación es, sin embargo, extraordinariamente habitual en el caso de los cultivos de bacterias y levaduras. Quizá sea debido a que para su identificación, generalmente, son necesarios estudios sobre su metabolismo, ya que las características morfológicas de estos hongos aportan una información muy limitada.

La concentración de iones hidrógeno en el medio afecta al crecimiento y viabilidad del hongo debido, principalmente, a su papel en la estabilidad de la membrana. Por otra parte, en un medio con pH de partida óptimo, los productos ácidos o básicos que se generan como consecuencia del metabolismo del propio hongo o de la microbiota acompañante pueden alterar el pH del medio hasta el extremo de inhibir completamente el crecimiento del hongo, e incluso afectar a su viabilidad. En condiciones donde el pH es más extremo el crecimiento fúngico se dificulta y comienzan a producirse metabolitos secundarios (Holmquist et al., 1983).

Los hongos suelen crecer en medios con pH entre 4 y 7. El pH óptimo para casi todas las especies contaminantes de vegetales es de 5,6. Estos valores pueden variar dependiendo de la especie e incluso cepa, Se ha

observado, por ejemplo, que *A. carbonarius* crece mejor a pH 4,5 que a pH 2,8 y 7; en cambio, produce mayor cantidad de OTA a valores de pH extremos, como 2,8 y 7, que a 4,5. Algunos estudios genéticos relacionados con el efecto del pH sobre la biosíntesis de micotoxinas han demostrado que en medios con pH ácido se crea el ambiente idóneo para comenzar a sintetizar las toxinas.

Para algunas especies como *F. verticillioides* se ha descrito la existencia de un gen (*PAC1*) que codifica para uno de los principales reguladores transcripcionales como respuesta a cambios en el pH. Flaherty et al. (2003) y Flaherty y Woloshuck (2004) determinaron que a pH ácido hay un aumento de la síntesis de las fumonisinas en cultivos de *F. verticillioides* mientras que a pH básico no se producía la toxina. La interrupción de *PAC1* daba como resultado un mutante que, tanto a pH ácido como básico, producía mucha mayor cantidad de fumonisinas que el tipo silvestre. Estudios más recientes han demostrado que *F. graminearum* aumenta la expresión del gen *TRI5* y, por tanto, la concentración de DON en cultivos con un pH extracelular bajo (Gardiner et al., 2009a).

En hábitats naturales, en general, se ha observado que el pH es menos limitante para el crecimiento fúngico que la  $a_w$  de forma que en medios con pH cercano a la neutralidad y con elevada  $a_w$  los hongos son muy poco competitivos con respecto a las bacterias. En cambio en medios con  $a_w$  en torno a 0,90 los hongos claramente son los que se imponen con independencia del pH del medio. En nichos en los que las bacterias no parecen tener un papel como patógenos, ciertas especies de *Aspergillus* o *Penicillium* son muy competitivas y capaces de colonizarlos, incluso en medios con elevada  $a_w$  y pH neutro (Wheeler et al., 1991).

---

## 6.4. Composición de gases de la atmósfera

---

Los hongos productores de micotoxinas son aerobios y, en consecuencia, necesitan oxígeno en el medio para crecer y desarrollar sus funciones, preferiblemente a concentraciones en torno a las que existen en la atmósfera (20-21%). Sin embargo, no todas las especies responden del mismo modo en cuanto a requerimientos de  $O_2$ .

En el ecosistema en que se encuentran los cereales y otras semillas almacenadas, se ha demostrado que los factores que afectan, en mayor

medida, al crecimiento de los hongos contaminantes del grano y a la producción de micotoxinas son la  $a_w$  y la temperatura y, además, cuando el grano está húmedo, la composición de gases de la atmósfera del silo y sus interacciones con los otros dos parámetros, ejerce un importante papel (Guynot et al., 2003; Magan et al., 2004). Existe abundante información relacionada con los dos primeros factores, pero son muy escasos los trabajos que hacen referencia a la influencia de la composición de gases de la atmósfera en el crecimiento fúngico y en la producción de micotoxinas. No obstante se conoce que ambos procesos están afectados por los niveles ambientales de  $O_2$ ,  $CO_2$  y, en menor medida,  $N_2$  (Pitt y Hocking, 2009b).

Estudios recientes sugieren que la producción de micotoxinas es menos sensible a los diferentes niveles y tipo de gases atmosféricos que el crecimiento fúngico. Se ha descrito que a  $a_w$  0,92 y 0,95, en atmósferas controladas que contienen un 25% de  $CO_2$ , se observa una ligera reducción del crecimiento de *A. flavus* con respecto a los controles pero no se reduce la producción de AFLs, siendo necesario al menos un 50% de  $CO_2$  para reducir significativamente la síntesis de AFLs (Giorni et al., 2008). Otros estudios sobre el crecimiento y producción de AFLs por *A. flavus* en atmósferas modificadas con  $CO_2$  y otros gases ( $O_2$  y  $N_2$ ) han demostrado que el hongo es capaz de crecer en pan de trigo y arroz en atmósferas con concentraciones de  $CO_2$  de hasta un 75% (Suhr y Nielsen, 2005). Resultados similares se han obtenido para otras especies fúngicas. Así, se ha observado que concentraciones de  $CO_2$  de un 50% tienen escaso impacto en la síntesis de OTA por *P. verrucosum* y *A. ochraceus* en un amplio rango de  $a_w$  (Pateraki et al., 2007). Parece que son necesarias concentraciones de entre 50-75% (dependiendo de la  $a_w$ ) para inhibir el crecimiento de estas y otras especies ocratoxigénicas como *A. carbonarius* (Cairns-Fuller, 2004; Cairns-Fuller et al., 2005; Pateraki et al., 2007).

Para diferentes *Fusarium* spp. (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*) de la sección *Liseola*, se ha descrito que concentraciones de un 30% de  $CO_2$  inhiben la producción de fumonisina  $B_1$  a valores de  $a_w$  relativamente elevados (0,985) y que, en función de la  $a_w$  del medio, esta inhibición puede ocurrir a concentraciones de  $CO_2$  que oscilan entre 10 y 40% (Samapundo et al., 2007b). Estos autores encontraron que en algunas condiciones que inhiben la producción de la toxina aún se puede producir crecimiento fúngico. En otros trabajos se ha observado, por ejemplo, que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* pueden crecer incluso en atmósferas modificadas con tan sólo un 2% de  $O_2$ . En cambio, la producción de fumonisina  $B_1$  por *F. verticillioides* y *F.*

*proliferatum*, se reduce significativamente en atmósferas con un 70% y 20% de O<sub>2</sub>, respectivamente (Samapundo et al., 2007c). Además, estos estudios han demostrado que la composición gaseosa tiene un efecto sinérgico inhibitorio sobre el crecimiento fúngico y la producción de la fumonisina B<sub>1</sub> en ambas especies (Samapundo et al., 2007b). Otros estudios han descrito que la disminución del ion amonio aumenta de manera significativa la expresión del gen *FUM1* en una cepa de *F. proliferatum*, mientras que el crecimiento no se ve afectado. Por tanto, existiría un riesgo potencial de aumento significativo de la producción de las fumonisinas en atmósferas con deficiencia de nitrógeno (Kohut et al., 2009).

En base a lo expuesto, se puede deducir que la sensibilidad de cada especie fúngica a la composición gaseosa de la atmósfera es un factor relevante que hay que tener en cuenta en post-cosecha, ya que el empleo de atmósferas controladas con concentraciones adecuadas de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> se podría usar como herramienta para la prevención y control del crecimiento fúngico y producción de micotoxinas en el almacén. En pre-cosecha, al igual que ocurre con la humedad relativa y la temperatura, no es posible actuar sobre este factor. Sin embargo, considerando los resultados obtenidos hasta la fecha, es importante destacar que, en general, las posibles variaciones en la composición de gases de la atmósfera debidas al cambio climático global, estimadas en un ligero aumento de la concentración relativa de CO<sub>2</sub> no tendría ningún efecto en el crecimiento fúngico y en la producción de micotoxinas en cultivos y cosechas agrícolas (Russell et al., 2010).

---

## 6.5. Fotoperiodo

El fotoperiodo se calcula a partir de la duración del día en horas a lo que se suma 0,9 h que es lo que se estima el equivalente al efecto de las bajas intensidades de radiación que se presentan poco antes de la salida y puesta del sol. La longitud del fotoperiodo, en horas, es especialmente importante en el desarrollo del vegetal y, en consecuencia, en el rendimiento de la cosecha. El proceso fotosintético es clave e imprescindible en el desarrollo de la planta y desde hace tiempo se han realizado numerosos trabajos para averiguar la influencia del fotoperiodo en el rendimiento y calidad de las cosechas. Por su importancia en la alimentación humana y animal, desde hace tiempo las investigaciones y revisiones sobre el tema, han adquirido especial atención en el caso de los cereales (Warrington y



Kanemasu, 1983; Yin, 1996; Yan y Wallace, 1998; McMaster et al., 2008; Battilani et al., 2012).

Los hongos son organismos heterótrofos por lo que la presencia de luz no está relacionada con funciones fotosintéticas. Sin embargo, se han realizado algunos estudios para tratar de conocer si la presencia de luz o la alternancia luz-oscuridad durante el periodo de incubación de cultivos *in vitro* de especies fúngicas productoras de micotoxinas tiene algún efecto en el crecimiento del hongo y en la producción de las micotoxinas con respecto a cultivos realizados en oscuridad. Los resultados obtenidos son confusos y, a menudo, cada autor obtiene diferentes resultados; por ejemplo, se ha encontrado que la presencia de luz puede aumentar, disminuir o no tener efecto en la producción de AFLs por especies de la sección *Flavi* (Joffe y Lisker, 1969; Bennett et al., 1978; 1981; Aziz y Moussa, 1997). Del mismo modo se ha observado que en cultivos de *A. carbonarius* en presencia de luz y con alternancia luz/oscuridad el crecimiento del hongo se ve favorecido con respecto a los cultivos en oscuridad aunque la presencia de luz no afecta a la producción de OTA (Bellí et al., 2006a).

Más recientemente se ha encontrado que la luz tiene influencia en el crecimiento, morfología y producción de OTA por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* y que, dependiendo de la longitud de onda e intensidad de la radiación, puede ocurrir un cese total del crecimiento y síntesis de OTA (Schmidt-Heydt et al., 2011). En estos trabajos más recientes, se describe incluso que el impacto de la luz parece ser selectivo para determinados metabolitos secundarios más que para la especie fúngica. Por ejemplo, en cultivos de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *A. niger*, tratamientos con luz azul originaron un aumento de la producción de fumonisinas; en contraste, se redujo la producción de OTA en la misma cepa de *A. niger* y también en cepas de otras especies como *A. carbonarius*, *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Schmidt-Heydt et al., 2011; Fanelli et al., 2012a).

*Fusarium* spp. son hongos que se desarrollan especialmente bien en pre-cosecha y, hasta ahora, en estas especies, la única foto-respuesta bien caracterizada ha sido la inducción de la biosíntesis de carotenoides (Prado et al., 2004; Thewes et al., 2005; Prado-Cabrero et al., 2007) pero poco se conoce sobre las bases moleculares de la producción de micotoxinas en respuesta a la luz (Estrada y Avalos 2008; Avalos y Estrada, 2010). Algunos estudios muy recientes indican que en cultivos de *F. verticillioides*, tratados con luz de longitudes de onda del espectro visible, del rojo (627 nm) al azul

(470-455 nm), estimulan el crecimiento y aumentan la producción de fumonisinas en un 150% en relación con los cultivos realizados en oscuridad. Sin embargo, resulta muy interesante el hecho de que si la intensidad de la radiación de 455 nm se eleva de 200 a 1700 lux la biosíntesis de fumonisinas disminuye. De igual manera luz azul de baja longitud de onda (390 nm) y pulsos de luz blanca disminuyen la producción de fumonisinas. En esos cultivos, medidas efectuadas mediante RT-PCR de los niveles de expresión de los genes *Fum1*, *Fum21* y *FvVE1* que codifican para proteínas implicadas en la ruta biosintética de las fumonisinas, indican que existe una significativa correlación entre expresión de genes y niveles de fumonisinas en el medio (Fanelli et al., 2012a). Resultados similares han obtenido estos mismos autores en estudios semejantes realizados en cultivos de *F. proliferatum* (Fanelli et al., 2012b). Ambas especies de la sección *Liseola* son importantes patógenos de cereales.

Se ha descrito reiteradamente la influencia del estrés a que se puede ver sometido el hongo como consecuencia de las condiciones de crecimiento en que se pueda encontrar en la activación de genes implicados en la biosíntesis de micotoxinas (Jayashree y Subramanyam, 2000; Jurado et al., 2008; Schmidt-Heydt et al., 2008; Kohut et al., 2009). Parece que la exposición a la luz en determinadas condiciones de longitud de onda e intensidad podría inducir en el hongo un estado de estrés que resulte en una mayor producción de micotoxinas como consecuencia de su respuesta y adaptación a esas condiciones (Fanelli et al., 2012a; 2012b).

---

## 6.6. Prácticas agrícolas

---

### 6.6.1. Tratamientos con antifúngicos

---

El empleo de agentes antifúngicos para el control de hongos fitopatógenos ha ido precedido de estudios sobre mecanismos de acción, dosis efectivas y pruebas de toxicidad para otros organismos con el fin de preservar la salud humana y animal y evitar en lo posible efectos adversos en el medioambiente. El objetivo de su empleo ha sido principalmente impedir el deterioro de la planta y la pérdida de la cosecha. Sin embargo, hasta la fecha, se ha prestado muy poca atención al conocimiento de la eficacia de estos

antifúngicos en el control del crecimiento de hongos productores de micotoxinas y en el control de la biosíntesis de estos metabolitos tóxicos, a pesar de que la comunidad científica coincide en que cada especie e incluso cada cepa fúngica, responde de manera diferente a un mismo principio activo o a una mezcla de ellos. Por esta razón, estos tratamientos con agentes antifúngicos no siempre son eficaces para el control de especies productoras de micotoxinas. Por otra parte, existen especies como *F. langsethiae* productora de tricotecenos A que no están implicadas en ningún tipo de fusariosis en la planta y su presencia en el vegetal y en las semillas es asintomática por lo que pasa desapercibida y no despierta alarma en el agricultor que justifique el tratamiento de la planta.

El uso de fungicidas como inhibidores del metabolismo, crecimiento y proliferación de los hongos en general es una práctica agrícola habitual y se aplica en la producción de alimentos para humanos y animales. El espectro de acción depende de diversos factores entre los que destacan la naturaleza del compuesto y su dosis, la especie y cepa fúngica y las condiciones ambientales. La industria química ha desarrollado antifúngicos de amplio espectro (benomilo, carbendazima, mancozeb, etc.) que se emplean para el control de diferentes especies y en diversos cultivos pero su eficacia frente a especies concretas productoras de micotoxinas es discutible (Arroyo et al., 2005; Bellí et al., 2006b; Medina et al., 2007a).

Los escasos estudios realizados en lo que se refiere al efecto de antifúngicos frente a especies y cepas productoras de micotoxinas se iniciaron principalmente con *A. flavus* y *A. parasiticus* y la producción de AFLs. Los resultados obtenidos indicaron que la cantidad de AFLs producida puede aumentar o disminuir con respecto a los controles dependiendo del fungicida empleado y la dosis aunque no existe acuerdo entre los diferentes autores (Buchanan et al., 1987; Badii y Moss, 1988; El-Kady et al., 1993). Probablemente las discrepancias se deben, en buena medida, al uso de diferentes cepas y diferentes condiciones experimentales.

A medida que se ha ido descubriendo la frecuente presencia de OTA en cereales y derivados y en otros cultivos, como uva y derivados, se han ido realizando algunos estudios sobre la eficacia de diferentes fungicidas sobre el crecimiento y la producción de OTA por *Aspergillus* spp. de la sección *Nigri* (Battilani et al., 2003b; Bellí et al., 2006b; Medina et al., 2007a; 2007b) o de la sección *Circumdati* (García-Cela et al., 2012). Del mismo modo, debido a su importancia, también se han realizado estudios, por ejemplo, sobre el efecto

de diferentes antifúngicos en el crecimiento de *Fusarium* spp. productoras de fumonisinas y de *Fusarium* spp. productoras de tricotecenos de tipo B (Hope et al., 2002; Ramírez et al., 2004).

A pesar de la importancia de *F. langsethiae* como principal especie productora de tricotecenos A en cereales, anteriormente a esta Tesis Doctoral, no se había realizado ningún estudio dirigido a su prevención y control en la cosecha. Esta ausencia de información se debe principalmente a que se trata de una especie con una morfología muy similar a la de otras especies de la sección *Sporotrichiella* como *F. poae*, lo que ha propiciado su confusión y la ignorancia de su presencia en el cultivo. Por otra parte, también obedece a que se trata de una especie que no está implicada en el deterioro de la planta. Sin embargo, una vez conocida, en los últimos años, su enorme importancia en cereales, especialmente en avena, es urgente conocer las condiciones que afectan al desarrollo del hongo y la producción de las toxinas T-2 y HT-2 y los principios activos que resulten más eficaces para su control.

Se ha realizado algún trabajo sobre la influencia de algunos factores ambientales en el desarrollo de *F. langsethiae* (Medina y Magan, 2010) y en la producción de T-2 y HT-2 (Medina y Magan, 2011). En este sentido es necesario asumir que, aun conociendo la influencia de las condiciones ambientales como la temperatura y la actividad de agua del cereal, no se puede actuar sobre estos factores porque en pre-cosecha nos encontramos en un ecosistema abierto y esos parámetros dependen de la región agroclimática y de las condiciones meteorológicas de cada año. El control de la temperatura y humedad relativa no se puede considerar por tanto, como posibles estrategias para el control del hongo. La medida más efectiva es, sin duda, el tratamiento con agentes antifúngicos adecuados integrados en unas buenas prácticas agrícolas evitando así el crecimiento de *F. langsethiae* y la producción de las toxinas T-2 y HT-2. Esta parece la medida más urgente para bloquear la entrada de las toxinas en la cadena alimentaria.

Los resultados obtenidos en los escasos trabajos que se han realizado sobre el efecto de fungicidas en el control de especies productoras de micotoxinas indican que existen ciertos compuestos antifúngicos que reducen el crecimiento del hongo y la producción de las micotoxinas, compuestos que no dan lugar a diferencias significativas con respecto a los controles carentes del principio activo y compuestos que estimulan la producción de las toxinas. Estos efectos se han observado en ensayos *in vitro*, principalmente, y son dependientes del agente antifúngico, dosis, especie y cepa fúngica,

condiciones ambientales, e interacciones entre todos estos factores. Los trabajos en campo son mucho más escasos, pero también en este caso, se ha observado que estos parámetros afectan a la eficacia de los fungicidas aplicados *in vivo* (Lo Curto et al., 2004).

Por otra parte, hay que mencionar que en los últimos años el interés en la seguridad alimentaria ha evolucionado de manera muy rápida, hasta el punto de que se ha llegado a cuestionar el empleo de antifúngicos para el control de hongos en cultivos agrícolas, en base a que el propio fungicida supondría un riesgo para la salud del consumidor. De ahí el auge de la agricultura ecológica. Sin embargo, diferentes autores (Finamore et al., 2004; Juan et al., 2008a) han encontrado que la reducción del uso de fungicidas conduce a un aumento de los niveles de micotoxinas en las cosechas. Aunque esta conclusión parece muy lógica, otros autores defienden que el nivel de contaminación con micotoxinas es mayor en cultivos convencionales (tratados con antifúngicos sintéticos) que en cultivos ecológicos (Birzele et al., 2002; Edwards, 2009a; 2009b; 2009c).

La agricultura ecológica, orgánica o biológica, es un sistema de producción con unas bases técnicas y una normativa propia que tiene como principal objetivo obtener alimentos de máxima calidad sin utilizar para ello sustancias químicas de síntesis (plaguicidas, abonos químicos, etc.) ni organismos modificados genéticamente (conocidos como OMGs o transgénicos), fomentar e intensificar los ciclos biológicos dentro del sistema agrario, comprendiendo los microorganismos, flora y fauna del suelo, las plantas y los animales, emplear en la medida de lo posible recursos renovables en sistemas agrarios organizados localmente, mantener o incrementar a largo plazo la fertilidad de los suelos. Sin embargo, la FAO se plantea si la agricultura ecológica podría cubrir las necesidades nutricionales del planeta.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, el riesgo para la salud de los consumidores asociado a la presencia de residuos de fungicidas en alimentos, se considera un riesgo mucho menor que el debido a la presencia de micotoxinas (Muri et al., 2009). Por consiguiente, es un objetivo prioritario determinar la sensibilidad de las especies micotoxigénicas más relevantes a los fungicidas que se usan, generalmente, en los sistemas de producción agrícola y analizar la influencia de esos tratamientos no solo en el crecimiento del hongo sino en la producción de micotoxinas. Estos estudios deberán, además, determinar la influencia de variables ecológicas asociadas

al clima, como la humedad y la temperatura, en el crecimiento y en la producción y valorar las interacciones entre todos esos factores. Estos estudios serán de gran utilidad para la construcción de modelos predictivos capaces de elucidar la posible presencia de micotoxinas en cosechas cultivadas en las diferentes regiones agroclimáticas o bajo la presión del cambio climático regional y global (Magan et al., 2011).

La investigación realizada hasta la fecha demuestra que el empleo indiscriminado de fungicidas no solo no es eficaz sino que puede ser, incluso, muy negativo para el control de la producción de micotoxinas, ya que la presencia del antifúngico en el medio, a dosis sub-letales, puede estimular la biosíntesis de micotoxinas debido a un fenómeno de stress del hongo productor (Bellí et al., 2006b; Medina et al., 2007a; 2007b).

Es necesario, por tanto, un estudio profundo de los compuestos activos usados, condiciones de empleo y condiciones ambientales en las que se aplican para obtener la máxima eficacia en el control de hongos y micotoxinas en productos agrícolas. Es, además, una información fundamental a tener en cuenta en cualquier estudio de peligro potencial de presencia de micotoxinas en alimentos, en la consideración de las ventajas e inconvenientes de la agricultura ecológica y en la predicción del efecto de los fungicidas en condiciones de estrés hídrico y térmico, asociado a la región agroclimática y al cambio climático global.

Estos estudios permitirán determinar los tratamientos más eficaces y minimizar los peligros que suponen la aparición de resistencias por dosis insuficientes del principio activo, tratamientos inadecuados o acumulación excesiva innecesaria del antifúngico en la cosecha. La gestión adecuada de los factores controlables se traducirá en la gestión integrada de la contaminación por micotoxinas (Abbas et al., 2009).

Las micotoxinas se producen en diferentes etapas tanto en pre-cosecha como post-cosecha. El control de la producción en el ecosistema abierto es mucho más difícil que en el cerrado porque los factores inherentes a la región agroclimática y a las condiciones meteorológicas de cada año no admiten ninguna actuación por lo que las estrategias deben centrarse en el control de otros factores que puedan paliar los efectos negativos de una climatología adversa. En esta Tesis Doctoral se estudia el efecto de los siguientes fungicidas:

Hasta ahora, muy poco, o nada, se conocía sobre la sensibilidad/resistencia de *A. carbonarius* y *A. ochraceus* a fungicidas comunmente

usados en agricultura ecológica como, el azufre o el oxiclورو de cobre, y en agricultura tradicional como, el mancozeb. Esta investigación se aborda en el **ARTÍCULO 3**. Del mismo modo, nada se conocía sobre la efectividad de agentes antifúngicos habitualmente empleados en cereales como son los azoles y morfolinas en el control de *F. langsethiae* o *A. flavus* y mucho menos de la influencia de la temperatura y la  $a_w$  y sus interacciones en la efectividad de estos antifúngicos. Esta investigación se aborda por vez primera en la presente Tesis Doctoral y se describe en los **ARTÍCULOS 4, 5** y en **estudios complementarios** muy recientes que se recogen en el capítulo 2 (resultados no publicados), donde se estudia en detalle y se determina por vez primera las dosis efectivas,  $DE_{50}$  y  $DE_{90}$ , de fungicidas selectivos como fempropimorf, procloraz y tebuconazol, en diferentes condiciones ambientales.

---

### 6.6.1.1. Azufre

Situación en el registro de la UE: Incluido en el anexo I según la Directiva 2009/70/CE de la Comisión de 25 de junio de 2009 [DO L 164 de 26.06.2009]. Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas.

El azufre inorgánico o azufre elemental ( $S^0$ ) es un sólido amarillo, insoluble en agua y, sin duda, el más antiguo de los plaguicidas empleados. Sus propiedades para prevenir plagas son conocidas desde la más remota antigüedad, fue usado ya por los griegos en el año 1000 a. C. Se ha citado también en la alquimia y en la mística, no tanto como un elemento en sí, sino por las cualidades que presentaba. La OMS lo ha clasificado, en la categoría III, como muy ligeramente tóxico para humanos y animales. El azufre es necesario para el desarrollo de los vegetales por tratarse de un macronutriente requerido por la planta, de ahí, que existan presentaciones para añadir directamente al suelo como abono y corrector de suelos alcalinos. Su uso en agricultura ecológica como fungicida, acaricida e insecticida está autorizado.

En los hongos, todavía se estudia el modo de acción del azufre y aunque se pensaba que su toxicidad se debía al ácido sulfhídrico formado en las propias células del hongo, ocasionando la destrucción de esporas y micelio, actualmente, se piensa que el  $SH_2$  no es el responsable de la acción

fungicida del azufre sino que más bien esta ocurre a nivel de metabolismo del hongo. Parece que ciertas formas de azufre, incluyendo el ácido sulfhídrico y los polisulfuros, afectan a la acumulación de algunos ácidos orgánicos que dan lugar a la inactivación de enzimas importantes. Se ha observado que la fosforilación oxidativa disminuye y se acumula adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico. Ello aumenta la oxidación de substratos endógenos para formar mayor cantidad de adenosín trifosfato (ATP), pero la adición de azufre competitivo llega a causar una disminución en la asimilación de oxígeno, los substratos son agotados lentamente y el ATP requerido para el metabolismo no se forma en cantidades suficientes, el organismo es rápidamente desposeído de su energía almacenada en forma de carbohidratos, ácidos grasos y otros compuestos energéticos; esto, sumado a la poca disponibilidad de lípidos y ácidos nucleicos, afecta a las esporas del hongo que llegan a morir. Existen ciertas diferencias en la respuesta al azufre de los microorganismos; esto puede explicarse por la diferencia en la penetración de dicho elemento en las células. El azufre por tanto es un fungicida preventivo, inhibidor del metabolismo energético.

En cuanto a formulación, el azufre puede presentarse como polvo seco DP, polvo mojable WP, floable o micronizado. En forma de suspensión concentrada y de polvo mojable, para pulverización, las dosis oscilan entre 250-750 g/100 litros de agua, en función de la temperatura, ciclo del cultivo, etc. En las presentaciones en polvo a partir de micronizados, molidos y sublimados, las dosis utilizadas oscilan entre 20-40 kg/ha. Se puede usar también como polisulfuro de calcio, soluble en agua, producto resultante de la ebullición de una mezcla de lechada de cal viva más azufre. En esta forma se usa exclusivamente para tratamientos invernales en frutales y en vid.

En tratamientos en espolvoreo, combina bien con caolín y con bentonitas, todos ellos en presentaciones finamente molidas. Existen también preparados comerciales con cobre (2-4 %) en forma de oxiclورو para espolvoreo. Esta presentación se emplea para el control de oídio y de mildiu. Por otra parte, en forma mojable se puede mezclar con *Bacillus thuringiensis*, sobre todo en vid, con el fin de controlar oídio y larvas de la polilla del racimo.

A excepción de algunas variedades de manzano y peral, así como algunas cucurbitáceas, en general, el azufre es bastante seguro y su campo de acción alcanza a todo tipo de cultivos como cereales, vid, hortícolas, frutales y ornamentales. Las precauciones más importantes a tener en cuenta serían la de dejar pasar al menos 21 días antes o después de tratar con



aceites minerales y evitar su aplicación con temperaturas superiores a 28 °C. Se ha especulado que las partículas de azufre concentran los rayos solares que generan calor y ello produce quemaduras en la superficie foliar tratada. Lo más adecuado para tratamientos en espolvoreo es hacerlos a primera hora de la mañana, aprovechando el rocío, para que se adhiera mejor o a última hora de la tarde cuando la temperatura se torna más suave.

Por tanto, en lo que se refiere a su acción antifúngica, se puede concluir que el azufre se usa para el control de oídios y otros ascomicetos que atacan superficialmente a los cultivos pero no se conoce su acción sobre hongos productores de micotoxinas.

---

### 6.6.1.2. Oxiclорuro de cobre

---

Situación en el registro de la UE: Incluido en el anexo I según la Directiva 2009/37/CE de la Comisión de 23 de abril de 2009 [DO L 104 de 24.04.2009]. Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas.

El oxiclорuro de cobre  $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$  es un polvo fino de color verde, inodoro, que se descompone en torno a los 220 °C con liberación de ácido clorhídrico. Es muy estable en medios a pH neutro pero en medios alcalinos produce óxidos. Es insoluble en agua y disolventes orgánicos, y soluble en ácidos inorgánicos dando las correspondientes sales de cobre. También es soluble en disoluciones de amonio y aminas. El cobre elemental ( $\text{Cu}^0$ ) puede perder con relativa facilidad 2 electrones y formar el ion cúprico  $\text{Cu}^{2+}$  que es el estado de oxidación más importante del cobre y es el que, en general, se encuentra en el agua.

El cobre es un elemento químico esencial para todos los organismos vivos. En vegetales, no solamente actúa como nutriente sino que participa o influye en procesos tan importantes como el metabolismo de los hidratos de carbono, metabolismo del nitrógeno, síntesis de lignina, reproducción (viabilidad del polen y producción de semillas), resistencia a enfermedades (deficiencias de cobre implican mayor sensibilidad a enfermedades). Es por tanto un elemento esencial para la vida de las plantas y aunque su concentración en ellas es baja (3–30 ppm), su acción fisiológica es múltiple,

actúa como cofactor enzimático en varios procesos metabólicos, como componente no proteico de diversos compuestos (plastocianina, citocromo-oxidasa, superóxido-dismutasa y polifenol-oxidasa) y como receptor en el transporte de electrones del sistema energético. Participa también en la formación de la clorofila y en la fotosíntesis.

La absorción del cobre por la raíz de la planta depende de su concentración en la solución del suelo, generalmente, este nivel es muy bajo (0,01 ppm). Los síntomas visibles de deficiencia de cobre incluyen, principalmente, clorosis y muerte descendente, pero las alteraciones internas causadas por un bajo contenido de cobre son difíciles de detectar. Por tanto, es aconsejable proporcionar al cultivo un suministro preventivo.

Las mayores concentraciones de cobre, dentro de la planta, se encuentran en el cuello de la raíz y su transporte es muy lento, razón por la cual, son muy recomendables aplicaciones foliares, asimilables, dirigidas a las hojas jóvenes y a los frutos. Dada la importancia de sus funciones en la planta, el suministro de cobre debe asegurarse en todas las etapas del cultivo.

La acción de todas las formulaciones de cobre contra enfermedades de la planta producidas por hongos y bacterias es debida a la presencia de iones  $\text{Cu}^{2+}$  en solución acuosa. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  son adsorbidos por el hongo y las bacterias hasta que el nivel acumulado resulta letal para las células. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  se unen a diversos grupos químicos como imidazoles, carboxilos, fosfatos, sulfidrilos, aminas o hidroxilos, presentes en numerosas proteínas enzimáticas, provocando una acción múltiple en las células, mediante bloqueo del proceso respiratorio, inhibición de la síntesis de proteínas, y reducción de las actividades de la membrana y transferencia de sustancias. Esta acción multi-sitio del cobre implica a diferentes procesos controlados por diferentes genes, por lo que la aparición de resistencias en los microorganismos es muy poco probable.

En cuanto a su formulación, en polvo, el tamaño de partícula es un aspecto clave en la acción de los productos cúpricos. La reducción del tamaño de partícula aumenta la adherencia del producto a la planta, gracias a la mayor capacidad de dispersión y a la mayor superficie de contacto con el vegetal, formando un entramado extenso de gran resistencia aumentando, con ello, la eficiencia del producto que actúan impidiendo la germinación de las esporas o de los órganos reproductores del hongo, por lo que tienen carácter "preventivo", no curativo. Los tratamientos deben realizarse con precaución, de menos a más concentración y dilatada en el tiempo. En la

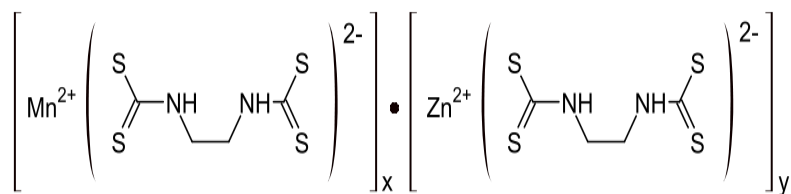
Agricultura ecológica solo se permiten preparados a base de “oxicloruro de cobre” y “sulfato de cobre” no usándose puro por presentar riesgos de quemaduras y poca persistencia sobre las hojas. Ambos se utilizan para la preparación del “Caldo Bordelés” y el “Caldo Borgoñón”, usados desde muy antiguo. El periodo de seguridad es entre dos y tres semanas.

Los compuestos de cobre se han empleado principalmente para el control de bacterias y hongos que afectan a viñedos, frutales de hueso y de pepita, cítricos, olivar y hortícolas. Se utiliza para el control de hongos endoparásitos, como los que producen las enfermedades de la “abolladura” en las hojas, “cribado”, “mildiu”, “monilia”, “moteado”, “roya”, etc.

No existe información sobre la efectividad de los compuestos de cobre en el control preventivo de hongos productores de micotoxinas en cereales. Esta Tesis es el primer trabajo en el que se aborda este estudio.

### 6.6.1.3. Mancozeb

Situación en el registro de la UE: Incluido en el anexo I según la Directiva 2005/72/CE de la Comisión de 21 de octubre de 2005 [DO L 279 de 22.10.2005]. Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas. El mancozeb es el producto de coordinación del ion  $Zn^{2+}$  y etilen bis ditiocarbamato de manganeso ( $C_4H_6N_2S_4Mn + C_4H_6N_2S_4Zn$ ), se clasifica en el grupo de los llamados “etilen bis ditiocarbamatos” (Figura 23).



**Figura 23.** Estructura del mancozeb.

Se trata de un polvo amarillo grisáceo, con olor rancio. Es soluble en agua a pH 7,5 y 25 °C y prácticamente insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Es estable bajo condiciones de almacenamiento secas pero se descompone lentamente por calor (204 °C) en ambientes húmedos y en condiciones de pH ácido y básico. No tiene propiedades corrosivas. Su masa molecular es 266,31 Da y su estructura química es la que se muestra en la figura 23.

Tras su aplicación, el mancozeb está presente en el aire en forma de partículas que son eliminadas de este medio al depositarse con la lluvia y el polvo. En el suelo presenta baja movilidad y persistencia (vida media de 1 a 7 días). Este plaguicida se degrada de forma espontánea en presencia de agua y oxígeno formando etilentiourea, como principal producto de degradación, la cual muestra una mayor persistencia que varía de 5 a 10 semanas.

El mancozeb se degrada en el agua (vida media de 1 a 2 días) en condiciones ligeramente ácidas o ligeramente básicas pero esta degradación puede verse retrasada por la formación de complejos entre el ditiocarbamato y los oligoelementos presentes en el suelo, así como en condiciones anaerobias. Su toxicidad varía de moderada a alta para peces, anfibios y otros organismos acuáticos y de alta a prácticamente nula para el zooplancton. Es ligeramente tóxico para aves, pero no es tóxico para abejas y plantas.

El mancozeb, por contener manganeso y cinc, corrige carencias de estos elementos y sirve como fertilizante para el vegetal. Su uso no está autorizado en agricultura ecológica pero si está autorizado y es habitual en agricultura convencional. El mancozeb también tiene cierta acción acaricida y contra ninfas de *Cacopsylla pyri* pero su principal acción es como fungicida preventivo. Actúa por contacto controlando enfermedades foliares de la planta producidas por hongos endoparásitos.

La acción del mancozeb se debe a que impide la actividad de enzimas sulfhidrúlicas, en general, y de la cisteína en particular. Forma complejos con enzimas que contienen metales como las que intervienen en la producción del ATP. Normalmente la sensibilidad de los hongos a los fungicidas sistémicos está regulada por un gen simple ya que estos fungicidas actúan sobre un punto concreto del metabolismo; ello permite la aparición, por mutación genética individual, de mutantes resistentes que pueden dar origen, por multiplicación asexual, a una población resistente al fungicida. Mancozeb es un inhibidor que actúa sobre múltiples procesos, multi-sitio, regulados por varios genes, por lo que son necesarias mutaciones múltiples para desarrollar

un individuo resistente y, por tanto, una población resistente, todo lo cual dificulta, y en la práctica impide, la aparición de resistencias en los hongos patógenos tratados constituyendo, por ello, un componente esencial de los programas de pulverización o de formulaciones mixtas con fungicidas sistémicos o no.

Entre sus formulaciones, el mancozeb se presenta como floable, gránulos dispersables, polvo humectable, disolución acuosa, suspensión acuosa, suspensión concentrada y suspensión oleosa. Son preparados que actúan por contacto impidiendo la germinación de las esporas e inhibiendo el desarrollo del tubo germinativo del hongo. La molécula de mancozeb libera gradualmente un gas, el etileno diisotiocianato, que es el principio activo que actúa sobre los hongos, al liberarse forma un halo de inhibición que hace que el compuesto ejerza control sobre una superficie aproximadamente 12 veces mayor al área cubierta por el depósito del mismo.

Alguna de sus formulaciones en forma de gránulos dispersables, polvo humectable o suspensión acuosa puede ser utilizada en todos o parte de los cultivos y plantaciones siguientes: cereales (avena, cebada, centeno, maíz grano, maíz palomero, maíz para semilla, arroz y trigo) ajo, algodón, apio, cacahuate, calabaza, cebolla, espárrago, manzano, melón, membrillo, papaya, pepino, peral, plátano, remolacha, tabaco, tomate, vid, zanahoria y ornamentales. En todos los cultivos citados se emplea para el control de hongos de diversas especies pero no se conoce su efecto en hongos productores de micotoxinas.

En cereales como arroz y trigo se usa para el control de “cenicilla y oídio”, “mancha reticular”, “mancha común”, “escaldado de la hoja” y “roya de la hoja” producidos, respectivamente, por *Oidium* spp., *Helminthosporium teres*, *Helminthosporium sativum*, *Rhynchosporium secalis* y *Puccinia hordei*. Ninguno de ellos está asociado a la producción de micotoxinas en el cereal. Por todo ello, el mancozeb ha sido seleccionado como uno de los agentes antifúngicos de interés en la presente Tesis Doctoral.

---

#### 6.6.1.4. Fempropimorf

---

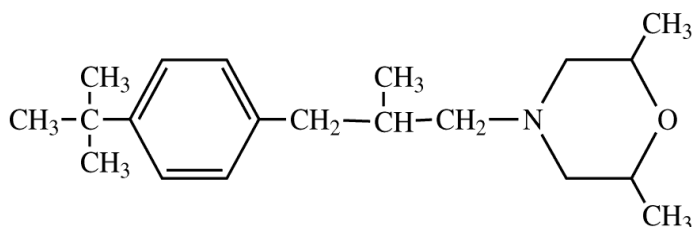
Situación en el registro de la UE: Incluido en el Anejo I según la Directiva 2008/107/CE de la Comisión de 25 de noviembre de 2008 [DO L 316 de 26.11.2008]. Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión

de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas.

Su nombre común es fenpropimorph (en el registro español: fempropimorf). Su nombre químico es: ( $\pm$ ) – *cis*-4-[3-(4-*tert*-butylphenyl)-2-methylpropyl]-2,6-dimethylmorpholine (IUPAC) o bien es: *cis*-4-[3-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-2-methylpropyl]-2,6-dimethylmorpholine (CA). Su fórmula molecular es  $C_{20}H_{33}NO$ , tiene una masa molecular de 303,5 Da y su estructura química es la que se muestra en la figura 24.

El fempropimorf se presenta como un líquido coloreado con un punto de ebullición de 120 °C (a 0,067 mbar). Es un compuesto muy estable con una vida media de 64 días a 50 °C (pH 5-9), mayor de 64 días a 70 °C (pH 5) y de unos 15 días a 70 °C (pH 7-9).

En general, en la naturaleza, se puede considerar que su vida media es de unos 93 días en suelos areno-arcillosos, con alto contenido de humus y de 15 días en los suelos con moderado contenido de humus. Se degrada por oxidación del grupo butilo terciario junto a la oxidación y rotura del anillo dimetilmorfolina. Se ha observado que es estable bajo luz artificial de longitud de onda mayor o igual a 290 nm durante 30 días a pH 5 y 25 °C. Su punto de ebullición supera los 250 °C a 1 atmósfera.



**Figura 24.** Estructura del fempropimorf.

En cuanto a formulación se puede presentar sólo en forma de concentrado emulsionable a una concentración máxima de 750 g de *ia* (ingrediente activo)/l, como concentrado soluble o como polvo mojable también son frecuentes formulaciones en forma de mezclas con uno o más ingredientes activos adicionales diferentes. Entre estos preparados se pueden

citar los combinados de fempropimorf con propiconazol, fempropidina, fembuconazol, clorotalonil, carbendazima, mancozeb, tridemorf, procloraz, epoxiconazol y flusilazol. En las formulaciones en forma combinada, la concentración de fempropimorf suele oscilar entre 118 y 563 g/l. En cereales no se debe tratar después del comienzo de la floración.

El principio activo del fempropimorf (la morfolina) con actividad fungicida sistémica, se absorbe fácilmente por hojas y raíces y es traslocado en sentido acrópeto. Protege al cultivo, incluso a las hojas recién desarrolladas, durante 3-4 semanas. Es preventivo, curativo y erradicante. Actúa impidiendo la síntesis del ergosterol provocando una acumulación de los D-8 esteroides no metilados por lo que su actividad afecta tanto a la formación y germinación de conidios como al crecimiento micelial y desarrollo de los tubos germinativos y haustorios fúngicos. También impide la esporulación por un largo periodo de tiempo.

El metabolismo del fungicida en plantas y animales es similar en cuanto a que el primer paso es siempre la oxidación que va seguida de la degradación del anillo de la morfolina, sin embargo los productos de degradación, en su mayor parte, son diferentes en plantas y animales.

El fempropimorf es un fungicida de uso común en cereales (cebada, avena, sorgo, trigo, etc.) y otros cultivos agrícolas. Su aplicación más destacada está dirigida al control de la podredumbre causada por oídio y la roya de los cereales. Es efectivo para el control de *Erysiphe graminis* (oídio de cereales), *E. betae* (oídio de la remolacha), *E. cruciferarum* (oídio de la coliflor y otras coles) *Leveillula taurica* (oídio del puerro), *Puccinia graminis* (roya negra de cereales), *P. hordei* (roya parda de la cebada), *P. recondita* (roya parda del trigo), *P. striiformis* (roya amarilla de los cereales), *Rhynchosporium secalis* (escaldado de la cebada), etc.

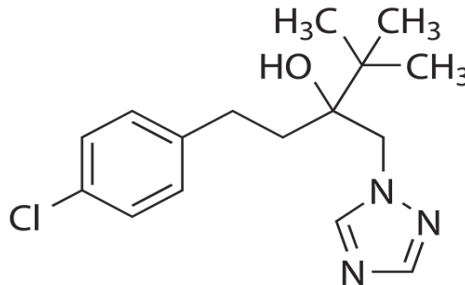
Se ha descrito también su actividad en post-cosecha contra especies de *Penicillium* y *Diplodia* y contra las especies *Alternaria citri* y *Phomopsis citri* en cítricos, aunque su uso en estos cultivos es menos frecuente que en cereales. Se emplea también para el control fúngico en productos hortícolas como remolacha, puerro, curcubitáceas, girasol, col y coliflor.

A pesar de su amplia utilización en diversos cultivos agrícolas, no se conoce la efectividad del fempropimorf en el control de hongos productores de micotoxinas por lo que en el presente capítulo de esta Tesis se ha abordado este estudio frente a la especie *F. langsethiae* implicada en la producción de tricotecenos A en cereales.

### 6.6.1.5. Tebuconazol

Situación en el registro de la UE: Incluido en el anexo I según la Directiva 2008/125/CE de la Comisión de 19 de diciembre de 2008 [DO L 344 de 20.12.2008]. Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 de la Comisión de 25 de mayo de 2011 por el que se aplica el Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la lista de sustancias activas autorizadas.

Su nombre común es tebuconazole (en el registro español: tebuconazol), pertenece al grupo químico de los triazoles. Su nombre químico es: (RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol (IUPAC) o bien ( $\pm$ )- $\alpha$ -[2-(4-chlorophenyl)ethyl]- $\alpha$ -(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol (CA). Su fórmula molecular es  $C_{16}H_{22}ClN_3O$ , tiene una masa molecular de 307,8 Da y su estructura química es la que se muestra en la figura 25. El tebuconazol es un polvo cristalino, incoloro con un punto de fusión de 101 °C y olor característico, su presión de vapor es  $1,7 \times 10^{-3}$  mPa a 20 °C y su solubilidad en agua a esta temperatura es de 0,036 g/kg, su pH es 7,3.



**Figura 25.** Estructura del tebuconazol.

Se presenta con diferentes tipos de formulación, principalmente como emulsión de aceite en agua, concentrado emulsionable, concentrado floable, gránulos dispersables en agua y como polvo mojable. Se emplean suspensiones concentradas al 2,5% para tratamiento de simiente de avena, cebada, centeno y trigo para protegerlas del ataque de diversos hongos que se transmiten por la semilla; la emulsión de aceite en agua del 20% se utiliza en ajo, albaricoquero, arroz, berenjena, calabacín, cebada, cebolla, cerezo,



ciruelo, judía verde, manzano, melocotonero, nectarino, olivo, pepino, peral, pimiento, tomate, trigo y vid; la emulsión de aceite en agua del 25% se puede aplicar en ajo, arroz, berenjena, calabacín, cebada, cebolla, judía verde, olivo, pepino, pimiento, tomate, trigo y vid; y el granulado dispersable en agua del 25% en albaricoquero, berenjena, cerezo, ciruelo, manzano, melocotonero, nectarino, peral, pimiento, tomate y vid. En mezcla con procloraz se utiliza en arroz, cebada y trigo; y con resinas sintéticas se utiliza en árboles frutales y no frutales y en vid.

El modo de acción del tebuconazol es por contacto y vía sistémica. Penetra la cutícula y entra en la planta una hora después de la aplicación y los depósitos que quedan en la superficie brindan una prolongada acción residual que dura unas semanas. Por su actividad sistémica, proporciona un buen control no sólo de los hongos presentes en la superficie externa de la semilla sino también de los que se encuentran en su interior.

Presenta actividad fungicida preventiva, curativa y erradicante. En la planta se mueve en sentido acropétalo de forma que es bien absorbido por las partes vegetativas y transportado hacia los meristemas terminales en los que se acumula ligeramente. En el suelo se degrada con rapidez y no se acumula. La penetración a través del sistema radicular es muy efectiva; sin embargo no sufre lixiviación por lo que debido a su escasa movilidad en el suelo los tratamientos en suelo deben ser realizados en condiciones que aseguren el contacto con la mayor parte del sistema radicular para que pueda ser absorbido sistémicamente. En el agua se hidroliza y sufre fotólisis con una vida media de unos 28 días. En condiciones naturales su degradación es relativamente rápida. En animales su metabolismo y eliminación es completa después de tres días y los productos resultantes son excretados por orina y heces. En plantas como el trigo, uva, o cacahuate su metabolismo da lugar a compuestos de escasa toxicidad. En el tejido de la planta (cereal) la vida media del tebuconazol es de 12 días.

Al igual que otros triazoles el tebuconazol actúa inhibiendo la biosíntesis del ergosterol, componente de la membrana celular de los hongos que se encarga de su integridad física, favorece su crecimiento y la división celular. Si la síntesis de este componente se inhibe el hongo detiene su desarrollo y se bloquea la esporulación. El modo de acción del tebuconazol consiste básicamente en que impide la desmetilación del C<sub>14</sub> del lanosterol que da lugar a la acumulación de trimetilesteroles. Adicionalmente el tebuconazol a diferencia de otros triazoles en un paso posterior, impide la

deshidrogenación con lo que también se produce una acumulación de otros esteroides diferentes al ergosterol. Por esta razón su nivel de riesgo relacionado con la aparición de resistencia es menor que el de otros miembros de este grupo de fungicidas.

En cereales el tebuconazol se emplea para el control de numerosas especies fúngicas como *Blumeria (Erysiphe) graminis* (oídio de los cereales), *Cochliobolus sativus* (mal del pie de los cereales), *Phaeosphaeria avenae* (septoriosis de la avena), *Phaeosphaeria nodorum* (septoriosis de los cereales), *Puccinia* spp. (roya de los cereales), *Tilletia foetida* (caries o tizón de los cereales), *Ustilago avenae* (carbón desnudo de la avena), *Ustilago nuda* (carbón desnudo de la cebada y del trigo), y *Davidiella tassiana* (cladosporium, ennegrecimiento de los cereales). Se emplea también para el control de numerosas especies que afectan a los cultivos citados anteriormente. Sin embargo, se conoce muy poco sobre su efecto en el control de hongos toxigénicos o sobre la producción de micotoxinas, por lo que en esta Tesis se aborda por vez primera este estudio en la especie *F. langsethiae*, aislada de avena.

---

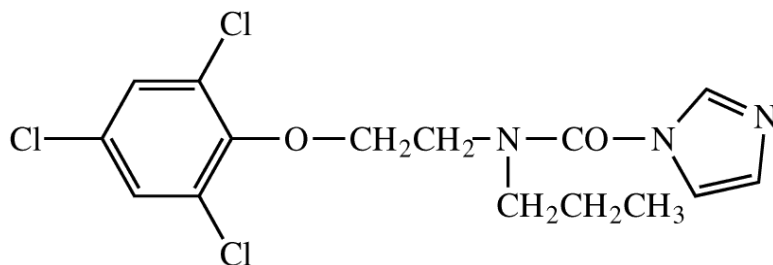
### 6.6.1.6. Procloraz

---

Situación en el registro de la UE: incluido en el anexo I según el Reglamento de Ejecución (UE) nº 1143/2011 de la Comisión de 10 de noviembre de 2011 [DO L 293 de 11.11.2011] por el que se aprueba la sustancia activa procloraz con arreglo al Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y se modifican el anexo del Reglamento de Ejecución (UE) nº 540/2011 y la Decisión 2008/934/CE. Su nombre común es procloraz (en el registro español: procloraz), su nombre químico es *N*-propyl-*N*-[2-(2,4,6-trichloro-phenoxy) ethyl] imidazole-1 carboxamide (IUPAC), o bien, *N*-propyl-*N*-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy) ethyl]-1*H*-imidazole-1-carboxamide (CA). Pertenece al grupo químico de los imidazoles, su masa molecular es 376,7 Da y su fórmula molecular es  $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ . La estructura química es la que se muestra en la figura 26.

En estado puro el procloraz es un sólido cristalino de color blanquecino e inodoro. Su punto de fusión se sitúa entre los 46,5 y 49,3 °C o entre 102,5-105,0 °C dependiendo de su pureza (99,3 o 99,7%, respectivamente). Su presión de vapor es de  $3,5 \times 10^{-6}$  Pa a 20 °C. Su solubilidad en agua oscila

entre 27,6 - 23,6 g/l a pH 5-9 a 20 °C. Es soluble en acetona, diclorometano, etanol, acetato de etilo, hexano, metanol, propanol, tolueno, etc. Se descompone durante el calentamiento prolongado a temperaturas superiores a 200 °C.



**Figura 26.** Estructura del procloraz

La vida media del procloraz bajo condiciones básicas (pH 9) oscila entre 61,7 y 78,9 días. Los principales productos de degradación son el 2,4,6 triclorofenol y la N-propil-N-2-(2,4,6-triclorofenoxy) etilamina. A pH 5 y 7 es más estable; se han observado niveles de degradación menores del 20% en 35 días a 25 °C. En general, en condiciones naturales en campo, su vida media oscila entre 5 días en suelos arcillosos y 37 días en los arenosos, pudiendo llegar a más de 130 días en suelos ácidos y con abundante materia orgánica y en oscuridad. Esta degradación parece que depende también de la microbiota propia del tipo de suelo.

En los sistemas terrestres su movilidad es baja, se adsorbe muy bien a los coloides del suelo y no se lixivia fácilmente. En ese medio es susceptible a la fotólisis y a la hidrólisis. Se ha observado que su vida media es de 11-12 días a 25 °C bajo luz artificial de una lámpara de xenón con un fotoperiodo de 12 h de luz/12 h de oscuridad.

Las formulaciones más frecuentes son en forma de concentrado emulsionable, suspensión acuosa concentrada (SC) y, menos frecuente, como polvo mojable (WP). El procloraz puede emplearse también en combinación con otros antifúngicos. Emulsiones al 40% se emplean, por ejemplo, en cultivos de arroz, avena, cebada, remolacha azucarera y trigo, y en el tratamiento postcosecha de frutos cítricos. Emulsiones de aceite en

agua al 45% se emplean en cultivos de arroz, y para aplicar al suelo, al cuello de la planta, diluida en el agua de riego en cultivos de arroz, melón, sandía y tomate. El polvo mojable al 46% se puede usar en cultivos de arroz y champiñón. La formulación del procloraz con propiconazol se utiliza en arroz, cebada, remolacha azucarera y trigo, y la formulación con tebuconazol en arroz, cebada y trigo.

El procloraz es un imidazol (principio activo) con actividad fungicida preventiva, curativa y erradicante. No es propiamente un fungicida sistémico pero muestra cierta acción traslaminar. Como otros azoles actúa impidiendo la síntesis del ergosterol, componente esencial de la membrana celular, bloqueando la desmetilación en la posición C<sub>14</sub>. Es particularmente adecuado para el control de Ascomicetos y Deuteromicetos en muchos cultivos agrícolas.

Se usa para controlar enfermedades fúngicas foliares y de granos como las producidas por *Blumeria (Erysiphe) graminis* (oídio de los cereales), *Cochliobolus miyabeanus* (helmintosporiosis del arroz), *Cochliobolus sativus* (mal del pie de los cereales), *Fusarium culmorum* (podredumbre del cuello de los cereales, etc.), *Fusarium* spp. (fusariosis diversas), *Gaeumannomyces graminis* (mal del pie de los cereales), *Giberella zeae* (podredumbre del pie de los cereales), *Puccinia* spp. (diversas royas de los cereales), *Pyrenophora teres* (helmintosporiosis, seca reticulada de la cebada), *Rhynchosporium secalis* (escaldado de la cebada), *Septoria* spp. (septoriosis del trigo). Se emplea también para el control de especies fúngicas que afectan a curcubitáceas, leguminosas, liliáceas, etc y para el control preventivo de podredumbres producidas por *Alternaria* spp., *Botryosphaeria rhodina*, *Botryotinia fuckeliana*, *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium digitatum*, *P. expansum*, *P. italicum*, etc., durante la etapa de almacenamiento de diversos frutos.

Al igual que en el caso de los agentes antifúngicos citados anteriormente, no se conoce el efecto del procloraz en el control de hongos productores de micotoxinas ni en la producción de estos metabolitos tóxicos por lo que en esta Tesis se aborda por vez primera el estudio de la efectividad de este agente antifúngico en el control del crecimiento de *F. langsethiae* y en el control de la producción de tricotecenos A en diferentes medios y condiciones ambientales. Además del uso de antifúngicos en pre-cosecha inciden otros factores importantes (Munkvold, 2003) que también son controlables, como la rotación de cultivos y la labranza del suelo.

---

## 6.6.2. Rotación de cultivos

---

Diferentes autores han indicado que el tipo de cultivo de los años previos al de la cosecha afecta a la incidencia de los hongos productores de micotoxinas. Por ejemplo, se ha observado que la población de *A. flavus* en suelos cultivados con cereales se incrementa rápidamente en primavera cuando el cultivo anterior ha sido maíz. Este incremento es mucho menor cuando el cultivo anterior ha sido algodón o trigo (Abbas et al., 2004). De manera similar, se ha encontrado que las comunidades de *A. flavus* (UFC/g) en suelo son más elevadas en los campos donde previamente se ha cultivado maíz (1485 UFC/g) que en los que se ha cultivado algodón (566 UFC/g) o sorgo (157 UFC/g). Sin embargo, se encontró mayor porcentaje de cepas S de *A. flavus* en los campos cultivados previamente con algodón (28.6%) que en los que se cultivó maíz (17.0%) (Jaime-García y Cotty, 2006).

De estos estudios, se concluye que las variaciones en la densidad de la población de *A. flavus* y en el tipo de cepa en el suelo se ven afectadas por las condiciones climáticas y por la composición del suelo (Jaime-García y Cotty, 2006; Zablotowicz et al., 2007). En E.E.U.U. en los últimos años la rotación de los cultivos es una práctica habitual para mejorar el rendimiento, reducir el uso de fungicidas y mejorar la calidad del suelo (Reddy et al., 2006).

Existen, sin embargo, autores que defienden que la rotación de los cultivos no tiene efectos, a corto plazo, en las poblaciones fúngicas del suelo y que estas poblaciones dependen más del periodo de lluvias y de la susceptibilidad del cultivo, aunque reconocen que la dispersión de conidios durante la cosecha y los restos de la misma pueden también contribuir a la colonización del suelo por los hongos toxigénicos una vez que se han depositado las esporas (Horn, 2005).

La textura del suelo también parece ser un factor importante. Se ha encontrado que las poblaciones D de *A. flavus* son más altas en suelos con mayor cantidad de materia orgánica, los cuales tienen mayor capacidad para almacenar agua (Klich, 2002; Zablotowicz et al., 2007). El tipo de suelo y las condiciones climatológicas influyen, por tanto, en la concentración del inóculo fúngico en el suelo. Este aspecto se puede considerar en orden a definir niveles de riesgo de contaminación con micotoxinas del grano de la siguiente cosecha pero no se puede modificar. La rotación de los cultivos, en cambio, si puede ser elegida por el granjero y, por ello, puede ser una importante medida de prevención y control de micotoxinas.

### 6.6.3. Labranza del suelo

---

Estas prácticas influyen en las características físicas y químicas del suelo, enraizado y crecimiento de los cultivos, disponibilidad de nutrientes y en otras poblaciones de microorganismos del suelo lo que en última instancia afectaría a la viabilidad del patógeno y a la resistencia de la planta (Singh y Sharma, 2002). Sin embargo, en la literatura sobre el tema se encuentran resultados contradictorios. Algunos autores (Locke et al., 2006) indican que, por ejemplo, el maíz produce altos niveles de residuos en comparación con otros cereales por esta razón la adopción de no labranza del suelo hace que aumente la materia orgánica en la superficie. La elevada cantidad de residuos y su alta estabilidad y persistencia resulta en una reducida erosión y un aumento de la fertilidad del suelo (Reddy et al., 2006). Las poblaciones de *A. flavus* incrementan en los campos sin labranza en comparación con los campos adyacentes sometidos a arado y limpieza convencional (Reddy et al., 2007).

Otros autores no han encontrado diferencias en la contaminación fúngica del cereal en suelos sometidos a labranza y en suelos donde no se ha practicado (Ahmad e Iram, 2008). Sin embargo, parece lógico que las adecuadas prácticas de labranza del suelo sean una buena vía para reducir el inóculo fúngico en el campo, ya que elimina los residuos de plantas donde los hongos fácilmente pueden sobrevivir y esporular resultando en una disminución de la concentración de esporas en la capa superficial del suelo lo que dificulta que se encuentren en condiciones favorables para su desarrollo y contaminación del nuevo culti

Ante los resultados conflictivos existentes en la bibliografía, lo más adecuado es realizar nuevas investigaciones sobre este tema.

### 6.7. Substrato/Hospedador

---

Los hongos productores de micotoxinas se pueden comportar como fitopatógenos o saprófitos, *in vivo*, en casi cualquier vegetal y también se desarrollan sin dificultad en residuos vegetales muertos. Sus esporas son extremadamente abundantes y germinan fácilmente en suelos cultivados y no cultivados y en la planta tanto en pre-cosecha como en post-cosecha. Del mismo modo, son capaces de crecer *in vitro* en una amplia gama de medios

de cultivo. Los diferentes sustratos ofrecen diferentes nutrientes al hongo y esto tiene un efecto decisivo en su colonización, y susceptibilidad al ataque por el hongo afectando igualmente al metabolismo fúngico y, en consecuencia, a su capacidad productora de micotoxinas.

El uso de cultivares e híbridos de plantas resistentes a las infecciones, en general, y a las fúngicas, en particular, parece muy prometedor. La elección de plantas resistentes a las infecciones es una estrategia de primer orden para controlar el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas.

En muchas regiones, donde los cereales constituyen la base de la alimentación, como Latinoamérica, África y Asia e incluso, en países europeos, las limitaciones económicas impiden el uso de híbridos. En este sentido, el cereal para el que se ha avanzado más es el maíz, aunque, con frecuencia, el maíz que crece en esas regiones no presenta resistencia genética para tolerar estrés hídrico y altas temperaturas y, en consecuencia, presenta una alta susceptibilidad a la infección fúngica y producción de micotoxinas, especialmente AFLs (Bruns, 2003).

Diferentes investigadores han destacado la necesidad de encontrar marcadores moleculares que permitan cuantificar la resistencia del vegetal al patógeno (Anderson, 2007; Foroud y Eudes, 2009). El estudio de las interacciones hospedador-patógeno se ha centrado, principalmente, en los hongos que resultan más agresivos, especialmente en cereales como, por ejemplo, *F. graminearum* o *F. culmorum*, que causan la conocida “*Fusarium Head Blight (FHB)*” (Walter et al., 2009), especialmente, en trigo.

Se ha conseguido averiguar los mecanismos de penetración de los hongos y los mecanismos de resistencia del hospedador, se ha observado que las propias micotoxinas pueden constituir factores de virulencia del hongo contra la planta (Bai y Shaner, 2004; Walter et al., 2008; 2009) y también que la resistencia del vegetal depende de la microbiota que se desarrolla sobre el mismo (Xu et al., 2008) y de su origen geográfico debido a las adaptaciones previas a diferentes condiciones climatológicas (Reynoso et al., 2009).

Es importante hacer mención al uso de variedades transgénicas más resistentes a la infección o a la producción de micotoxinas. En este sentido, el uso del denominado “maíz Bt” reduce el daño que los insectos provocan en él y, en consecuencia, reduce la contaminación fúngica e invasión de la planta por especies micotoxigénicas y la acumulación de micotoxinas (Munkvold, 1999; Kumar et al., 2008; Folcher et al., 2009).

Sin duda, es necesario seguir investigando en este campo, no sólo con la finalidad de obtener variedades comercialmente más apreciadas, sino variedades que permitan óptimos rendimientos de la cosecha y alta calidad de la misma.

También se ha observado en estudios *in vitro* que la naturaleza del medio es determinante en la calidad y cantidad de metabolitos tóxicos que produce el hongo y, por consiguiente, que se acumulan en el sustrato. La lista de medios de cultivo que se han empleado *in vitro* para el estudio del crecimiento de especies fúngicas productoras de micotoxinas y determinación de los niveles de producción de la toxinas es extensa e incluye medios sintéticos inductores o medios con componentes más naturales, como extractos de frutas o harinas de cereales, e incluso polen de abeja y medios naturales como granos de cereales. Los resultados han revelado la existencia de diferencias significativas tanto en el crecimiento de los hongos como en la concentración extracelular de las diferentes micotoxinas dependiendo del sustrato (Llorens et al., 2004b; Marín et al., 2004; Medina et al., 2004; 2005a; 2005b; Ramírez et al., 2006, Giorni et al., 2011). Aspectos de esta investigación relacionados con la influencia del medio de cultivo son abordados en los **ARTÍCULOS 4 y 5** de la Tesis.

En todos los casos se ha observado que el medio u hospedador ejerce un papel decisivo en el crecimiento del hongo y en la producción de micotoxinas pero no se ha definido con exactitud el papel de cada compuesto orgánico o inorgánico concreto porque en muy pocas ocasiones se han empleado medios definidos, preparados con nutrientes químicamente puros. Este es un estudio que hemos abordado en nuestro laboratorio (Medina et al., 2008a). Las diferencias observadas en el desarrollo fúngico y en la producción de micotoxinas hay que atribuir las a la diferencia en las características físicas y químicas de cada sustrato y sus interacciones con el resto de factores del ecosistema.

Las características físicas, en el caso de cosechas agrícolas, incluyen el tipo de cultivo, el daño causado por fenómenos meteorológicos u otros organismos (bacterias, insectos, aves, etc.), resistencia de la planta al ataque fúngico, parámetros como la  $a_w$  intrínseca del sustrato o la que presenta tras un determinado tratamiento, la resistencia mecánica al embalaje lo que determina su integridad, el aire residual y, por tanto, la disponibilidad de oxígeno, así como la conductividad térmica, que influye en la migración de la temperatura de la mercancía (Battilani et al., 2012).



Las características químicas, como el contenido en grasas, proteínas, minerales traza, composición en ácidos grasos y aminoácidos, pueden influir en la producción de micotoxinas. Por ejemplo, si se consideran macronutrientes como el nitrógeno o el carbono, se ha observado que en cultivos de *A. ochraceus* que contienen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en lugar de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como única fuente de nitrógeno, la cantidad de OTA en el medio se reduce en un 25% sin que ello afecte al crecimiento (masa de micelio) (Mühlencoert et al., 2004).

En otros trabajos, empleando diversas fuentes de nitrógeno inorgánicas y orgánicas se ha observado que el uso de fenilalanina como única fuente de nitrógeno favorece significativamente la producción de OTA en cultivos de *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. tubingensis* con respecto a otras fuentes de nitrógeno usadas (Medina et al., 2008a). Del mismo modo el uso de ciertos azúcares, como arabinosa o glucosa, sola o en combinación con sacarosa, favorece la producción de OTA en cultivos de *Aspergillus* spp. (Ferreira y Pitout, 1969; Mühlencoert et al., 2004; Medina et al., 2008a).

Es importante también destacar que algunos componentes del medio pueden potenciar el crecimiento del hongo pero no la producción de micotoxinas llegando incluso a disminuirla. Este hecho se conoce desde hace tiempo, así Davis et al. (1969) observaron que el extracto de levadura potencia el crecimiento de *A. ochraceus* pero disminuye la concentración de OTA en el medio.

Otros factores, como el nivel de proteína y de los aminoácidos prolina y ácido glutámico, tienen un efecto inverso, aumentando la producción de OTA y manteniendo el crecimiento del hongo más o menos estable (Hägglom y Ghosh, 1985). Estudios realizados en diferentes hospedadores indican igualmente que la producción de AFLs, OTA, o tricotecenos se ve favorecida en determinados cultivos agrícolas con respecto a otros, e incluso, por ejemplo, en cebada y trigo se ha visto que es dependiente de la variedad (Hägglom y Ghosh, 1985).

La aplicación de técnicas más recientes basadas en el DNA (Gardiner et al., 2009b) están permitiendo estudios a nivel genético que ponen de manifiesto la existencia de compuestos de la propia planta que inhiben la expresión de los genes implicados en la ruta de síntesis de tricotecenos (Boutigny et al., 2009). Del mismo modo, intermediarios de la ruta de síntesis de la arginina-poliamina o el bicarbonato sódico o amoniaco inhiben la síntesis de fumonisinas (Samapundo et al., 2007d).

## 6.8. Interacciones microbianas

---

En un determinado ecosistema las interacciones microbianas afectan significativamente al desarrollo de cada una de las poblaciones y al conjunto de todas ellas. Estas interacciones entre microorganismos pueden ser intra e inter-específicas y determinan la imposición de unas especies, e incluso de unas cepas, sobre otras.

En el caso concreto de los hongos productores de micotoxinas, las interacciones pueden tener un profundo efecto en el crecimiento del hongo y en el nivel de micotoxinas que produce. En la dominancia de unas especies sobre otras, son factores fundamentales el medio y las condiciones ambientales. Si el medio es adecuado para el crecimiento bacteriano, los hongos pueden llegar a ser poco competitivos debido a la rápida multiplicación bacteriana y, en consecuencia, al rápido consumo de nutrientes. Si, por el contrario, el medio y condiciones favorecen el crecimiento de los hongos, la competitividad se establecerá entre especies y cepas fúngicas, principalmente. En cualquier caso, bien sean bacterias u hongos que comparten el mismo nicho ecológico, además de competir por los nutrientes, con frecuencia producen metabolitos, generalmente secundarios, que pueden afectar drásticamente el desarrollo del hongo y la producción de micotoxinas (Magan, 2007a; Giorni et al., 2009).

Diferentes estudios sobre interacciones microbianas entre especies fúngicas que colonizan cereales han mostrado, por ejemplo, que la tasa de crecimiento de *F. proliferatum* y *F. verticillioides* (especies del complejo *Gibberella fujikuroi*) disminuye en presencia de *F. graminearum* al igual que la producción de fumonisinas. Sin embargo, el crecimiento de *F. graminearum* y la producción de zearalenona por esta especie no se ven afectados (Marín et al., 1998a; Velluti et al., 2000).

También se han descrito interacciones que pueden influir en la cantidad de AFLs que se acumulan en cosechas de cereales. En un experimento donde se inocularon granos de maíz con esporas de *A. flavus* y otras 13 especies fúngicas habitualmente presentes en ese cereal en el campo, se observaron diferencias en la producción de AFLs relacionadas con diferentes niveles de antagonismo. Cuando las cepas fueron menos competitivas que *A. flavus* (*Candida guilliermondii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata* o *Alternaria alternata*) se produjeron los mayores niveles de AFLs (media 1410 µg/kg) mientras que cuando las cepas fueron más competitivas que *A.*

*flavus* (*Fusarium moniliforme*, *Nigrospora oryzae*, *Acremonium strictum*, *Penicillium oxalicum*, *P. funiculosum*, *P. variable*) se registraron los menores niveles de AFLs (media 848 µg/kg). Cuando *A. flavus* se combinó con *A. niger* o *Trichoderma viride* no se detectaron AFLs en el medio probablemente porque estos dos hongos son más competitivos que *A. flavus* y ello influye en su desarrollo (Wicklow et al., 1980; Diener et al., 1987).

A nivel intraespecífico se ha observado esta competitividad e incluso se ha usado como herramienta para el control de cepas aflatoxigénicas. La exclusión biocompetitiva puede resultar en la disminución de las AFLs presentes por la misma especie que las produce (Doyle y Marth, 1978). En experimentos en campo se ha observado que cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* pueden competir con cepas productoras y contribuir a la disminución de las AFLs en suelos agrícolas. Durante el primer año de tratamiento la cantidad de AFLs se puede reducir en un 87% y durante el segundo en un 66% (Dorner et al., 1999). Por tanto, estas cepas de *A. flavus* son muy importantes como agentes biocompetitivos. Cotty (1994, 2006) ha demostrado que la aplicación de cepas atoxigénicas de *A. flavus* reduce el riesgo de la presencia de AFLs y la vulnerabilidad de las cosechas plantadas en esos campos a la contaminación debido a que los cambios en la comunidad fúngica persisten durante varios años.

En la práctica comercial, por ejemplo, en trigo, cebada o sorgo se usan esporas de cepas atoxigénicas como componente de una fuente de nutrientes en la que el hongo crece, esporula y se dispersa en el ambiente de la cosecha (Antilla y Cotty, 2004). La aplicación de formulaciones en polvo de cepas atoxigénicas han conseguido mayor resistencia al ataque por cepas aflatoxigénicas de los cultivos que crecen en esos campos tratados y, además, se consigue la producción y permanencia de las esporas en ellos durante largos periodos de tiempo (Cotty, 2006).

El uso de agentes de biocontrol también ha sido propuesto más recientemente por otros autores (Abbas et al., 2009). En otros estudios se intenta explicar la falta de antagonismo fúngico; así, por ejemplo, se ha descrito que *F. verticillioides* y *A. flavus* en el maíz utilizan diferentes fuentes de carbono y, en consecuencia, no parece que se establezca una competitividad nutricional entre ellos. Sin embargo, la dominancia de una especie sobre la otra sí se observa en condiciones de estrés hídrico y térmico (Giorni et al., 2009), así se ha descrito que en años en los que la contaminación con AFLs es un serio problema, la temperatura es más elevada

y el nivel de lluvias es menor (Abbas et al., 2004; Scheidegger y Payne, 2005). Estudios en campo en E.E.U.U. muestran que los años con temperaturas de 2-3 °C superiores a la media se producen altos niveles de AFLs; en cambio, la humedad elevada y la irrigación de los campos reduce la contaminación con AFLs. Estos resultados indican que el cambio climático podría alterar cualitativa y cuantitativamente la micobiota presente en cosechas agrícolas y, en consecuencia, sus interacciones, y afectar al tipo y niveles de micotoxinas presentes en semillas y frutos.

---

## 6.9. Daños causados por insectos

---

Los insectos pueden contribuir a la infección y colonización fúngica de las cosechas agrícolas de diferentes formas: (i) transporte primario del inóculo a las estructuras en floración, aunque éstas ya podría estar infectadas previamente por el hongo y, en ese caso, aumentarían el nivel de esporas en espigas, mazorcas, etc. en formación; (ii) introduciendo el inóculo desde el exterior de estas estructuras a su interior; (iii) diseminando el inóculo en el interior de las semillas y frutos en maduración; (iv) dañando los tejidos, semillas o frutos y facilitando su colonización fúngica. Las altas temperaturas y baja humedad favorecen la actividad de los insectos y comprometen el sistema defensivo de la planta huésped.

En el pasado existía la convicción de que la infección del maíz en precosecha por *A. flavus* ocurría sólo después de que las mazorcas habían sido dañadas por insectos. Esta idea se debía a que se observaba esporulación visible del hongo localizada en el área dañada. Estudios posteriores confirman que, efectivamente, existe una correlación positiva entre el daño causado por insectos, infección por *A. flavus* y presencia de AFLs en cereales (Wilson et al., 1981; Sinha y Sinha, 1992; Beti et al., 1995). Asimismo, se observa esta correlación entre la infección por *F. verticillioides* y *A. flavus* y el daño que los insectos producen en la planta (Cardwell et al., 2000). Sin embargo, hay que destacar que este tipo de daño no es una condición necesaria para la infección fúngica del vegetal ya que diferentes investigadores han demostrado que mazorcas y semillas de maíz libres de daños por insectos pueden presentar elevados niveles de AFLs (Lee et al., 1980; Lillehoj et al., 1980; Wilson et al., 1981).

No cabe duda de que los insectos causan importantes deterioros de la

semilla antes, durante y después de la cosecha, ya que actúan como vectores que transportan esporas fúngicas en pelos, boca, intestino, etc. facilitando su entrada en la semilla e incrementando la infección fúngica a través de las alteraciones causados en el pericarpio de los granos (Payne, 1992).

Los insectos pueden también interaccionar con la microbiota presente en el grano y causar un ambiente propicio para el crecimiento fúngico, pues producen un calentamiento y liberación de agua debido a su actividad metabólica, respiración e incluso procedente de los tejidos dañados. Por su parte, los hongos pueden atraer o inhibir la presencia de insectos, quizás a través de compuestos volátiles o micotoxinas (Wright et al., 1976) o incluso pueden servirles como alimento (Lacey y Magan, 1991).

Diferentes autores han encontrado que el uso de pesticidas que disminuye la población de insectos que dañan el maíz reduce la cantidad de fumonisinas (Folcher et al., 2009) o de AFLs (Plasencia, 2004) en la cosecha. Por ello, proponen un control adecuado de los insectos con pesticidas como medida para controlar la infección fúngica y producción de micotoxinas. El problema en la mayor parte de los casos es económico debido al coste de los tratamientos (Bruns, 2003). Por otra parte, además de los insectos, en la actualidad no existe duda de que otras especies de artrópodos contribuyen a dispersar las esporas fúngicas (Scully et al., 2009) en las cosechas. También en estos casos es necesario su control.

## **7. Eliminación de micotoxinas. Tratamiento tecnológico de las cosechas agrícolas**

---

Una vez que la micotoxina se ha producido y acumulado en los productos agrícolas es casi imposible su eliminación debido a que los tratamientos que se han propuesto, como resultado de diferentes investigaciones, son excesivamente costosos y no son inocuos por lo que son poco viables para la detoxificación de alimentos.

Los métodos ideales de detoxificación deberían ser fáciles y económicos y no generar compuestos tóxicos o alterar parámetros de calidad del alimento tales como el contenido en nutrientes o las propiedades físico-químicas. Consecuentemente, el conocimiento de la estabilidad y permanencia de las micotoxinas en alimentos y bebidas resultantes de

procesos tecnológicos más o menos complejos es una investigación relevante y muy necesaria que despierta gran interés en la comunidad científica.

Conocer la evolución de la micotoxina o las micotoxinas presentes inicialmente en las materias primas (cereales, frutas) durante estos procesos industriales es fundamental, ya que si se produce una disminución o eliminación de la misma durante el proceso sería una forma extraordinaria de detoxificación y producción de alimentos seguros. En el caso de que este procesado no afecte o afecte de manera insuficiente al nivel de micotoxinas inicialmente presentes en la materia prima y ello implique la presencia de niveles inadmisibles en el producto listo para el consumo, no debe ser empleada.

La legislación vigente en los países comunitarios prohíbe la mezcla de alimentos o bebidas no contaminadas con micotoxinas con otras que si lo están a fin de diluir estos compuestos tóxicos en las partidas contaminadas hasta niveles admisibles (European Commission, 2006a). En base a ello, esta práctica es ilegal y, en consecuencia, no se puede considerar como una medida posible.

En esta línea de investigaciones, la cerveza, el pan y el vino son los productos que atraen mayor atención en la actualidad, especialmente, en lo que se refiere a presencia de OTA en el caso del vino y de OTA, AFLs y tricotecenos en el caso de cereales y derivados, como el pan o la cerveza.

---

## 7.1. Del cereal a los derivados

---

La eliminación de micotoxinas durante el procesado tecnológico de los cereales implica métodos y estrategias particulares. Por esta razón, lo primero que será necesario conocer es el efecto que tienen las diferentes etapas de procesado del cereal en la reducción de los niveles de micotoxinas que pudieran encontrarse inicialmente en el grano y así evaluar *a priori* los niveles esperables en el alimento listo para el consumo. Por otra parte, es muy importante conocer los conjugados resultantes de la unión de las micotoxinas a otras moléculas como proteínas y los productos de degradación de las micotoxinas que se generan durante el procesado, así como su toxicidad. Estos aspectos han sido hasta ahora muy escasamente estudiados (Bullerman et al., 2007; He et al., 2010).

Los tratamientos más frecuentes a que se someten los cereales para la obtención de alimentos derivados dependen del derivado que se desea producir pero, en líneas generales, son: clasificación, limpieza, pelado, molienda, cocinado, horneado, fritura, tostado, enlatado y estrusionado; también el malteado y la fermentación son tratamientos importantes en la elaboración de cerveza y la fermentación en la obtención de productos de panadería, bollería, etc (Terzi et al., 2014). Los tratamientos se aplican de forma individual o combinada, en función del producto final que se desea obtener.

La primera operación que puede disminuir significativamente el contenido en micotoxinas es la limpieza de la cosecha mediante eliminación de las espigas y mazorcas dañadas, así como de los granos decolorados, rotos y partículas finas. Los fragmentos de granos, generalmente, proceden de semillas dañadas y frágiles, con frecuencia, colonizadas por hongos. Para la segregación de este material particulado se realizan suspensiones en agua o en soluciones de cloruro sódico (Scott, 1991; Trenholm et al., 1991). Se ha observado que esta práctica puede disminuir, por ejemplo, entre un 40 y 80% el contenido de AFLs en cereales (Park, 2002), en un 2-3% el de OTA en trigo (Scudamore et al., 2003), en un 5,5-19% el de DON en trigo (Abbas et al., 1985) o en un 26,2-69,4% el de fumonisinas en maíz (Sydenham et al., 1995).

El descascarillado o pelado de la semilla y separación del salvado puede disminuir en la harina de trigo el contenido en OTA y otras micotoxinas en un 25% (Scudamore et al., 2003) o el de T-2 y HT-2 en harina de avena en un 90-95% (Pettersson et al., 2008; Schwake-Anduschus et al., 2010). Esto se debe principalmente a que los hongos se desarrollan en la superficie de la semilla y es allí donde se encuentra la mayor parte de las micotoxinas que producen.

La molienda del cereal entero para la obtención de harina no parece que afecte a la estabilidad de las micotoxinas (Scudamore et al., 2003), pero sí contribuye a su homogeneización en toda la partida. En cambio, si se realiza un fraccionamiento, se ha demostrado que las micotoxinas tienden a concentrarse en determinadas fracciones como el germen y la cascarilla (Chelkowski et al., 1981; Scott et al., 1984; Abbas et al., 1985; Alldrick, 1996; Katta et al., 1997; Park, 2002; Scudamore et al., 2003; Brera et al., 2004). Así, por ejemplo, en un estudio en el que se analizan los niveles de T-2 y HT-2 en granos de trigo entero, harina, germen y salvado, se ha observado que los niveles de las toxinas son tres veces más altos en el germen y seis veces más

altos en el salvado que en la fracción destinada a harina (Scudamore et al., 2009a). La coincidencia en los resultados obtenidos por los distintos autores ha llevado al fraccionamiento de la semilla de modo que las fracciones más contaminadas se usan en alimentación animal y para la obtención de aceites y las fracciones libres de toxinas para la obtención de harinas empleadas en alimentación humana.

En el caso de algunos cereales, como ocurre con el maíz, la molienda húmeda puede disolver las micotoxinas en el agua o redistribuirlas en los productos resultantes. Se ha observado que, al final de esta molienda, las micotoxinas se concentran en la fase acuosa y en el gluten, fibra y germen de la semilla mientras que los almidones están libres o tienen un contenido muy bajo (Bennett et al., 1996; Lauren y Ringrose, 1997; Park, 2002; Ryu et al., 2002). De estos estudios, se puede concluir que las harinas procedentes de cereales integrales presentan mayor riesgo de contener micotoxinas que las que se obtienen mediante fraccionamiento del grano.

El procesado térmico ha sido un tratamiento básico en el cocinado ordinario y conservación de alimentos durante toda la historia de la humanidad. Los métodos principales que se incluyen en ese tratamiento son hervido, fritura, horneado, tostado y enlatado. La estabilidad de las micotoxinas durante estos tratamientos por calor es, quizá, más vulnerable que en otros tratamientos y, por ello, ha sido el más estudiado durante mucho tiempo (Boudra et al., 1995; Jackson et al., 1996a; 1996b; Pineda-Valdés y Bullerman, 2000; Ryu et al., 2003; Valle-Algarra et al., 2009). Los resultados dependen de múltiples factores entre los que cabe destacar la micotoxina, el tipo y condiciones de tratamiento, tipo de cereal, tamaño de las piezas, etc.

Entre la principales micotoxinas que se pueden encontrar en cereales podrían destacarse AFLs, OTA, tricotecenos A y B y fumonisinas. Su resistencia al calor varía dentro de un amplio intervalo. Así, se ha publicado que el 87±4% del contenido en AFLs de maíz naturalmente contaminado con esas micotoxinas permanece en bollos elaborados con harina de ese cereal (Stoloff y Trucksess, 1981).

El cocinado ordinario del arroz puede disminuir su nivel en un 34%. Sin embargo, el cocinado bajo presión lo disminuye en un 78–88% (Park et al., 2005a; 2005b; Park y Kim, 2006). El hervido del maíz lo disminuye en un 28%, mientras que la fritura lo hace en un 34–53% (Stoloff y Trucksess, 1981). El tostado del pistacho produce un 17–63% de reducción (Yazdanpanah et al.,



2005), el tostado del café un 42-56% (Soliman, 2002) y la producción de tortillas de cereales por cocinado alcalino entre 52 y 84% (Torres et al., 2001).

En el caso de la OTA, los resultados entre autores difieren ampliamente; algunos no detectan ninguna disminución de la toxina durante el horneado del pan (Scudamore et al., 2003) y otros detectan entre un 80 y un 94% (Boudra et al., 1995; Lancova et al 2008b). Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio indican que el porcentaje de reducción medio de OTA durante el horneado de pan de harina de trigo contaminada con diferentes niveles de la toxina es de un 32,9%. No se encontraron diferencias significativas en el nivel de reducción dependientes de las condiciones temperatura/tiempo de horneado (Valle-Algarra et al., 2009), aunque sí se apreciaron diferencias con respecto al interior y exterior de la pieza, que oscilaron entre una reducción de un 7,3–38,2% en el interior y entre el 20,4 y el 51,3% en la corteza, en función de las condiciones de horneado empleadas. Por otra parte, otros autores obtienen rangos de disminución de la OTA muy variados dependiendo del tipo de tratamiento (horneado, hervido en agua con y sin presión, autoclavado, tostado, etc.) (Bullerman et al., 2007). El número de trabajos que se han realizado es muy numeroso pero es importante destacar que la variabilidad asociada a las condiciones de cada estudio dificulta la extracción de conclusiones generales.

Con respecto a los tricotecnos, se ha estudiado la estabilidad de la toxina T-2 añadida a harina de trigo durante el horneado (200 °C durante 1 hora) mediante el estudio de los productos de degradación (Beyer et al., 2009) y se ha observado que el nivel de la toxina disminuye en un 10-20%. Otros autores (Schwake-Anduschus et al., 2010) también han descrito que el cocinado y horneado afecta poco al contenido de T-2 y HT-2 cuando se trata de harinas de trigo o avena contaminadas naturalmente con las toxinas. En el caso de los tricotecnos B, especialmente del DON, los resultados son más discordantes, probablemente debido a la diversidad de las condiciones experimentales usadas por lo diferentes autores. Así, se ha descrito que el horneado apenas afecta al nivel de la toxina (Sugita-Konishi et al., 2006b) o que la disminuye en un 16,8–96,6% (Neira et al., 1997).

En nuestros trabajos en los que se ha estudiado el efecto del horneado en el contenido en NIV, 3-ADON y DON, los resultados indican que la disminución media de las toxinas fue de 76,9%, 65,6% y 47,9%, respectivamente (Valle-Algarra et al., 2009), y existen diferencias significativas dependientes de las condiciones de horneado, tanto en el interior de la pieza

46,4–83,4% (NIV), 42,5–64,7% (3-ADON) y 18,1–62,6% (DON) como en el exterior 72,0–93,1% (NIV), 58,3–83,4% (3-ADON) y 41,0–70,7% (DON). Por tanto, el tamaño de la pieza juega un papel importante en el nivel de reducción de la toxina. Este puede haber sido uno de los factores más importantes que hayan influido en la variabilidad de resultados entre autores.

Las fumonisinas, especialmente la B<sub>1</sub>, son muy estables a altas temperaturas. No se alteran, por ejemplo, por hervido en agua durante 30 minutos y posterior secado a 60 °C durante 24 horas (Alberts et al., 1990). Tratamientos a temperaturas más elevadas como las que se usan en el tostado de almendras (218 °C durante 15 minutos) resultan en la pérdida total de fumonisinas (Castelo et al., 1998a). En bollos de cereales horneados a 175 °C y 200 °C el nivel de fumonisinas disminuyó entre 16 y 28%, respectivamente. A ambas temperaturas la pérdida en el interior de la pieza es menor que en la corteza (Jackson et al., 1997) y se ha observado también que el pH ejerce un importante papel en la estabilidad de las fumonisinas frente a altas temperaturas. Son más estables a pH neutro que a pH ácido o alcalino (Jackson et al., 1996a; 1996b). Asimismo, son más estables cuando se unen a azúcares reductores. La esterilización de cereales mediante radiación gamma reduce el nivel de fumonisina B<sub>1</sub> en un 20% y la micotoxina inalterada puede permanecer estable en las muestras irradiadas al menos durante seis meses a 25 °C (Visconti et al., 1996). Aunque se han obtenido resultados contradictorios como en el resto de micotoxinas, los resultados obtenidos por los diferentes autores, en general, coinciden en que son muy resistentes a los tratamientos por calor (Soriano y Dragacci, 2004).

En los tratamientos que implican la obtención de copos de cereales también se ha estudiado la estabilidad de micotoxinas como las AFLs, OTA y fumonisinas (Castelo, 1999; De Girolamo et al., 2001; Meister, 2001). Se ha observado que el cocinado de la sémola, para la preparación de los copos, disminuye el contenido en AFLs en un 64–67% y el tostado posterior de los copos, con y sin azúcar, en un 78-85% (Lu et al., 1997). Del mismo modo, también se reduce el contenido en OTA (Aish et al., 2004) y fumonisinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en un porcentaje similar (De Girolamo et al., 2001). Algunos autores (Meister, 2001) han estudiado la reducción de los niveles de micotoxinas en las diferentes etapas del proceso y han encontrado que la extrusión y gelatinización reducen entre un 30 y un 55%, el cocinado de la sémola para los copos entre un 20y un 65% y el tostado de los copos entre un 6 y un 35%. También se ha encontrado que la presencia de glucosa en la sémola favorece la reducción de la toxina con respecto a la que carece de azúcar o posee

azúcares diferentes a la glucosa como sacarosa, maltosa o fructosa (Castelo, 1999). La obtención de copos de cereales se ha descrito como un proceso en el que también se produce reducción de los niveles de micotoxinas enmascaradas como las fumonisinas unidas a proteínas (Kim et al., 2003).

Durante el proceso de estrusionado que se usa en la preparación de cereales de desayuno, aperitivos de cereales o en la manufactura de piensos se ha estudiado también la estabilidad de diferentes micotoxinas. El proceso se caracteriza por el uso de temperaturas elevadas (Linko et al., 1984), altas presiones y severas fuerzas de cizalladura que contribuyen a la producción de reacciones químicas y modificación molecular de los compuestos (Harper, 1992; Francis, 2000).

Se ha descrito que la mayor reducción de micotoxinas ocurre a temperatura de 160 °C o superiores durante tiempo prolongado de permanencia en el estrusionador. El efecto del estrusionado depende también, entre otros factores, de la presencia de aditivos y contenido en humedad. Así, en función de las condiciones empleadas, se ha observado, por ejemplo, que el nivel de reducción de las AFLs puede oscilar entre un 50 y un 95% (Hameed, 1993), el de la OTA entre un 12 y un 40% (Scudamore et al., 2004), el de la ZEA entre un 66 y un 63% (Ryu et al., 1999), el del DON ha llegado a superar el 95% (Cazzaniga et al., 2001) y el de las fumonisinas entre un 34 y un 95% (Castelo et al., 1998b; Katta et al., 1999). Es importante destacar que durante este proceso podrían formarse derivados de las micotoxinas cuya toxicidad es poco conocida (Bullerman et al., 2007).

Otras estrategias serían el uso de conservantes y antioxidantes alimentarios, como el ácido propiónico, el ácido gálico, los benzoatos o las sales de potasio que inhiben el crecimiento fúngico en algunos casos (Palumbo et al., 2007). Sin embargo, esta práctica no está exenta de riesgos para la salud. Los consumidores demandan, cada vez más, alimentos sin sustancias conservantes o antimicrobianas sintetizadas químicamente y asocian alimentos sanos y seguros con alimentos frescos o mínimamente procesados (Wagacha y Muthomi, 2008). Por otro lado, no se conoce el efecto que presentan concentraciones sub-letales de estos compuestos en la producción de micotoxinas por cada especie fúngica. Un problema recientemente observado es que algunos de estos productos químicos (antifúngicos o conservantes), especialmente a dosis subletales, pueden estimular la producción de micotoxinas por una activación secundaria de los genes de biosíntesis (Arroyo et al., 2005; Schmidt-Heydt et al., 2008).

En la fabricación de la cerveza las micotoxinas presentes en los granos se transfieren a la cerveza. La fuente de esas micotoxinas procede no sólo del cereal malteado sino de los adyuvantes (sémola o jarabe de maíz, sémola de arroz, cebada no malteada, almidón de trigo, o sémola de sorgo) que se emplean para proporcionar carbohidratos fermentables para las levaduras encargadas de la fermentación (Hoseney, 1994; Scott, 1996). En la fabricación de la cerveza se distinguen varias etapas que son el malteado, obtención del mosto, fermentación, embotellado y comercialización. El estudio de la estabilidad de las micotoxinas durante el proceso de fabricación de cerveza comenzó en la década de los 70 y se centró principalmente en las micotoxinas de mayor interés en ese tiempo como las AFLs y la OTA. A pesar de que las técnicas cromatográficas para la determinación de las micotoxinas en las muestras estaban en un estado mucho menos avanzado que en la actualidad, ya en esos años se encontró que el nivel de ambas toxinas disminuye durante el proceso (Chu et al., 1975), aunque se observó que eran relativamente estables a las temperaturas de hervido pero más sensibles a la hidrólisis proteolítica, calentamiento posterior y fermentación. Del mismo modo Scott et al. (1995) observaron que durante la fermentación se reduce en un 2–13% el nivel de OTA, en un 3–28% el de FB<sub>1</sub> y en un 9–17% el de FB<sub>2</sub>. En revisiones más recientes se indica que durante la fermentación la eliminación de OTA oscila entre 2 y 69% (Amézqueta et al., 2009; Valle-Algarra et al., 2009). Se ha descrito también que durante la fermentación de la masa del pan pueden disminuir el contenido de micotoxinas en el medio de manera significativa (Bejaoui et al., 2004; Valle-Algarra et al., 2009).

En lo que se refiere a tricotecnos, algunos autores han descrito que durante el malteado el contenido en T-2 y HT-2 se eleva con respecto al inicial en el grano hasta duplicar su nivel (Lancova et al., 2008a). Otros autores como Fournier (2009) estudiando las diferentes etapas encuentran que la T-2 y HT-2 se eliminan en un 80-100% durante el steeping y durante la germinación se sintetiza de nuevo entre un 0 % y un 50 % del nivel inicial. Por tanto, los niveles de T-2 y HT-2 en la malta serían más bajos que en el grano inicial aunque parece que la relación entre la T-2/HT-2 en la cebada y la que resulta en la malta no es constante (Slaiding, 2008; 2009; Fournier, 2009). Por otra parte, al tratarse de una bebida, al igual que en el caso del vino, para la cerveza se han investigado métodos que tienen por objetivo la eliminación de micotoxinas, especialmente la OTA. Entre ellos se han descrito fibras vegetales insolubles (Tangni et al., 2005) o zeolitas modificadas (Daković et al., 2003; 2005; Tomašević-Čanović et al., 2003). En general, los adsorbentes

descritos para el caso del vino podrían ser aplicados a la cerveza así como levaduras seleccionadas, usadas en la fermentación.

Investigaciones dirigidas al estudio de métodos aplicables a la cerveza, más inócuos que los propuestos hasta ahora para la reducción de la OTA son abordadas en los **ARTÍCULOS 6 y 7** de la Tesis.

---

## 7.2. De la uva al vino

---

Después de los cereales, la segunda fuente de OTA en la dieta es el vino (European Commission, 2002). Numerosos estudios lo han revelado y esos trabajos muestran también que el vino tinto posee los niveles más elevados de la toxina, seguido del rosado y blanco. Este hecho evidencia una clara relación entre la maceración del mosto con el hollejo de la uva y la solubilización en el mismo de la OTA presente en el hollejo.

Las considerables diferencias climatológicas en las diferentes regiones vitivinícolas también tienen fuerte influencia el nivel de OTA en el vino. En Europa, por ejemplo, los vinos procedentes de viñedos del sur tienen mayor contenido en OTA que los que proceden de viñedos del norte. Por tanto, dependiendo del vino será necesario la aplicación de diferentes medidas de control de la OTA.

En Europa se produce cerca del 50% del vino del mundo y se exporta el 70% del vino que se consume en el mundo (OIV, 2011). La presencia de OTA en vino afecta a la salud de los consumidores y, por consiguiente, a la economía de los países productores, principalmente España, Italia, Francia y Portugal. No cabe duda de que el diseño de métodos para eliminar la OTA del vino compatibles con la calidad del producto y con la salud de los consumidores no es una tarea fácil pero si muy necesaria.

Los procedimientos más recientes que algunos autores (Quintela et al., 2013) han propuesto para eliminar la OTA del vino son los siguientes:

Métodos físicos. Existen pocos estudios sobre métodos físicos para reducir la OTA en vino. Este hecho puede deberse a que los que se han propuesto no son económicamente asequibles para la industria del vino. Algunos autores han propuesto métodos que podrían ser aplicables como la eliminación de racimos afectados visiblemente por hongos antes del estrujado. Ello puede reducir el nivel de OTA en el vino hasta en un 98%

(Rousseau, 2004). Otros autores proponen el empleo de presiones en torno a 8 atm en lugar de 80 atm para el estrujado de la uva. Esto puede reducir el contenido en OTA hasta cuatro veces (Gambutí et al., 2005). También podría ser efectivo el realizar varios pases de los mostos o vinos contaminados con la toxina a través de la pulpa exprimida de uvas carentes de OTA de la misma variedad. Esta práctica podría eliminar entre un 50-65% de la toxina (Solfrizzo et al., 2010). Parece que los parámetros de calidad del vino sólo se verían alterados cuando esta práctica se realiza con pulpa de uvas de otra variedad. Algunos autores han ensayado la filtración del vino a través de filtros de membrana de 0,45 µm y han observado que ello puede reducir el contenido en OTA hasta un 80%. Sin embargo, cuando emplearon tamaños de poro de 10 µm la reducción fue muy escasa al igual que ocurre con tratamientos del mosto en placas de calor a 55 °C, método que parece no afectar al nivel de la toxina (Gambutí et al., 2005).

Métodos físicoquímicos. Estos métodos se basan en el uso de adsorbentes que unen e inmovilizan la OTA presente en el mosto o vino. Diferentes autores han ensayado distintos adsorbentes activados con diferentes moléculas adsorbidas en sus poros. Estos complejos se han ensayado a distintas dosis y en diferentes condiciones; la reducción de la toxina en el medio ha variado en función del nivel de contaminación y del tipo y dosis del agente usado.

El carbón activado se ha descrito como un agente capaz de eliminar un alto porcentaje de OTA. Var et al. (2008) ensayaron este adsorbente en vino a diferentes concentraciones (20, 40 y 100 g/hl), tiempos de incubación (0, 4 and 24 h) y niveles de OTA (5, 10 and 20 ng/ml) y encontraron que la capacidad de adsorción del carbón activo variaba ampliamente (entre 13 y 98%) dependiendo de las condiciones. Según la normativa vigente (European Commission, 1999), el uso del carbón activado sólo es autorizado en vinos blancos y en éstos, precisamente, la OTA no constituye un problema. Este tratamiento usando diferentes compuestos, como H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> o ZnCl<sub>2</sub>, unidos al adsorbente disminuye también los compuestos fenólicos que dan color al vino y compuestos del aroma (Castellari et al., 2001; Gambuti et al., 2005).

En otros trabajos se ha encontrado que el carbón activado preparado con semillas de cereza y activado con KOH redujo la OTA en vino en un 54% (Olivares-Marín et al., 2009). Otros autores obtienen los mayores niveles de reducción (80-93%) empleando carbón activado enológico (Visconti et al., 2008).

Otro agente que se ha ensayado y se podría emplear es la bentonita. Kurtbay et al. (2008) ensayaron diferentes bentonitas tratadas con derivados de amonio y llegaron a conseguir reducciones de OTA de hasta 100%, pero también se eliminaban polifenoles y antocianos y eran necesarias dosis de adsorbente muy altas comparadas con las que se permiten en el proceso de vinificación por lo que no se podrían aplicar. Algunos autores (Var et al., 2008) han conseguido la reducción de la OTA en un 33% usando bentonita activada con sodio sin sobrepasar la dosis recomendada en vinificación. Sin embargo, este tratamiento altera parámetros de calidad del vino, especialmente la intensidad del color (Quintela et al., 2012b). Con albúmina de huevo (150 g/hl) se ha conseguido una disminución de OTA del 48 % (Castellari et al., 2001) pero el tratamiento disminuye también los compuestos polifenólicos del color y el aroma del vino. Incluso usando dosis admisibles de este adsorbente (Quintela et al., 2012b), estos parámetros se ven afectados y la reducción de la toxina es tan solo de un 16%. Otros adsorbentes que se han ensayado han sido gelatina activada con  $\text{AlCl}_3$  o microcristales de caseinato potásico (a concentraciones de 25-150 g/hl). Con estos polímeros se elimina entre un 2 y un 24% de la toxina pero también se eliminan los compuestos del color (Castellari et al., 2001). Ensayos con polivinilpirrolidona tampoco han resultado efectivos e igualmente alteran el color del vino (Gambutì et al., 2005).

Por otra parte, algunos de estos agentes pueden causar reacciones adversas o alérgicas en los consumidores de vino susceptibles. Por ello, la Directiva Comunitaria 2007/68/EC (European Commission, 2007c) establece que todos los vinos colocados en el mercado europeo deben indicar en la etiqueta si han sido tratados con coadyuvantes derivados de huevo, pescado o leche. No obstante, para facilitar la transición a los vinos ya etiquetados se autorizó un periodo hasta 31 de diciembre de 2010 para incluir esta información en la etiqueta (European Commission, 2009).

Recientemente, se han ensayados otros agentes, como un complejo formado por polivinilpirrolidona, proteínas de plantas y gel de sílice amorfo (para sustituir a la caseína y al caseinato potásico) y gelatinas de alto peso molecular (como alternativa a la albúmina de huevo) (Quintela et al., 2012b). En ambos casos se consiguió reducir la OTA en un 40% con dosis normales en vinificación. Sin embargo, algunos parámetros de calidad del vino resultaron afectados. A pesar de ello esos adsorbentes han sido una de las mejores opciones para reducir la OTA del vino, causando el mínimo impacto en los parámetros del color y en la concentración de polifenoles.

Otros posibles adsorbentes pueden ser polímeros biodegradables no tóxicos, como quitina, quitosán y derivados. El tratamiento con quitosán (máximo permitido 500 g/hl) fue introducido en el “International Code of Oenological Practices” (ICOP) en 2009 (OIV, 2009; 2013). Varios autores (Bornet y Teissedre, 2008; Kurtbay et al., 2008; Quintela et al., 2012b) han encontrado que la quitina y el quitosán reducen la OTA en vino pero los resultados que obtiene cada uno de ellos difiere ampliamente, quizá debido a que los polímeros que emplean podrían presentar distintos grados de acetilación o diferentes propiedades físico-químicas. Estos autores, sin embargo, coinciden en que dosis de quitina o quitosán superiores a 50 g/hl alteran los parámetros de calidad del vino por lo que la reducción de la OTA usando estos adsorbentes, a esa concentración, sería en torno a un 18%. Concentraciones muy elevadas de quitosán (4000 g/hl) pueden eliminar completamente la toxina (Kurtbay et al., 2008).

Fragmentos de madera en virutas o en polvo pueden ser también efectivas para adsorber OTA. El nivel más alto de reducción que se ha obtenido ha sido 76% usando 8 g/l de polvo y un periodo de 15 días en contacto con el vino (Savino et al., 2007). El uso de virutas de madera de roble en el proceso de vinificación fue autorizado como práctica enológica en Europa en 2005 (European Commission, 2005b; 2006b). A pesar de ello esta práctica no está permitida en vinos de algunas regiones como ocurre en los de la Denominación de Origen Rioja (DOCa Rioja) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2007).

Métodos microbiológicos. Se ha estudiado la capacidad de diferentes microorganismos para reducir el nivel de OTA en medios de cultivo, mostos y vino. La degradación microbiológica de la toxina puede ocurrir por hidrólisis del enlace amida y formación de productos no tóxicos (L- $\beta$ -fenilalanina y OT $\alpha$ ) y por hidrólisis del anillo de lactona. Esta forma abierta presenta una toxicidad en ratas similar a la de la OTA pero es menos tóxica para ratones o *Bacillus brevis* (Abrunhosa et al., 2010).

Se ha descrito que especies fúngicas aisladas de uvas como *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* y *A. japonicus* pueden degradar OTA a su metabolito OT $\alpha$  en zumo sintético de uva (Bejaoui et al., 2005a). Algunos autores han detectado y purificado enzimas proteolíticas producidas por *A. niger* capaces de degradar la OTA (Abrunhosa et al., 2006; Abrunhosa y Venancio, 2007). Del mismo modo, conidios viables y no viables (tratados por calor) de estas *Aspergillus* spp. pueden eliminar OTA en zumos de uva



sintéticos y naturales mediante dos mecanismos: primero por degradación de la toxina y después mediante adsorción (Bejaoui et al., 2005b). Esta capacidad también la presentan diferentes aislados de *Rhizopus* (Varga et al., 2005b).

Varios autores han estudiado la capacidad de diferentes levaduras para eliminar OTA de medios de cultivo, mostos y vinos durante la fermentación alcohólica y han observado que cepas de *Saccharomyces cerevisiae* comerciales y salvajes, aisladas durante la fermentación espontánea tienen capacidad para eliminar la toxina en un rango entre un 25 y un 29% (Bizaj et al., 2009). Esta eliminación fue significativa sólo después de periodos prolongados en contacto con la biomasa de las levaduras pero no durante la fermentación alcohólica. Varios estudios concluyen que la OTA decrece después de la fermentación alcohólica en un rango entre el 1-100% en función de la cepa de levadura empleada en la fermentación (Abrunhosa et al., 2014). Debido a que no se demostró la degradación de la toxina por las levaduras se apuntó a que probablemente la eliminación obedece a un fenómeno de adsorción. La pared celular en levaduras está formada principalmente por  $\beta$ -glucanos y manoproteínas. La de *Saccharomyces*, por ejemplo, está constituida por un 25-50% de manoproteínas con un grado de glicosilación variable. Al pH del vino estas manoproteínas presentan cargas negativas y, por tanto, pueden establecer interacciones polares y no polares con la OTA (Ringot et al., 2005). La porción de glicano de las manoproteínas en las diferentes levaduras es variable y esas diferencias podrían explicar su diferente capacidad para eliminar OTA del medio. En vino las manoproteínas pueden adsorber otros compuestos como compuestos fenólicos que podrían competir con el proceso de detoxificación de OTA (Caridi, 2007).

También se ha descrito que el tipo de mosto podría influir en el proceso de detoxificación. Algunos trabajos (Caridi et al., 2006) en los que se han usado hasta 20 cepas de *Saccharomyces sensu stricto* muestran que, durante microvinificaciones con cada una de esas cepas en mostos naturalmente contaminados con OTA a una concentración de 1,58  $\mu\text{g/l}$ , todas las cepas disminuyen significativamente el contenido en OTA del medio y, además, existen diferencias significativas en la reducción dependientes de la cepa. Sin embargo, las mismas microvinificaciones efectuadas por las mismas cepas y en el mismo mosto fortificado con OTA hasta una concentración de 7,63  $\mu\text{g/l}$  originaron una disminución de la concentración de toxina no dependiente de la cepa.

En cualquier caso, los diferentes trabajos realizados indican que después de la fermentación alcohólica las lías contienen OTA y, en consecuencia, la eliminan del vino (Abrunhosa et al., 2005; García-Moruno et al., 2005; Caridi et al., 2006; Cecchini et al., 2006; Fernandes et al., 2007). Los test que se han realizado usando células de levadura inactivadas por calor o con ácidos eliminan hasta un 73-75% de la toxina en zumo de uva sintético, mientras que las células viables solo alcanzan un 17% (Bejaoui, et al., 2004). Otros autores igualmente encontraron que células de *Saccharomyces cerevisiae* (Lavin Rhône 2056) inactivadas por calor y paredes celulares de levaduras eliminan totalmente concentraciones de OTA de 0,2 g/l y 6,7 g/l en 5 y 15 minutos, respectivamente (Bejaoui et al., 2004). Otros autores (Leong et al., 2006b) describen también porcentajes de reducción de OTA del 43% añadiendo extractos de levaduras muertas (5 g/l) al vino.

Después de la fermentación alcohólica se sabe muy poco sobre el impacto de las bacterias lácticas en la OTA presente en el vino. Algunos autores han descrito que durante la fermentación maloláctica disminuye muy poco el contenido en OTA (Abrunhosa et al., 2005; Fernandes et al., 2007; Lasram et al., 2008) mientras que otros autores indican que durante la misma es cuando se elimina la mayor parte de la toxina (Grazioli et al., 2006). Investigaciones con bacterias que actúan en esta fase del proceso de vinificación son muy necesarias ya que ayudarían a predecir el contenido en OTA del vino listo para el consumo. Esta investigación es importante, no sólo en la tecnología del vino por la posibilidad de conseguir vinos exentos de la toxina sino, además, como herramientas para la descontaminación de micotoxinas en otras bebidas como la cerveza. En los **ARTÍCULOS 6 y 7** de la presente Tesis Doctoral se aborda por vez primera esta investigación usando cepas de bacterias lácticas (*Oenococcus oeni*) aisladas de vinos.

## 8. Principios de un Plan APPCC para la prevención y control de micotoxinas en alimentos

---

El sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) se creó inicialmente como una forma de asegurar la calidad microbiológica de los alimentos en los albores del programa estadounidense de viajes espaciales tripulados, con el fin de garantizar la inocuidad de los

alimentos de los astronautas. Hasta entonces, la mayoría de los sistemas de inocuidad de los alimentos se basaban en el análisis de los productos finales y no podían garantizar de forma absoluta la inocuidad, ya que no era posible analizar la totalidad de los productos. Se necesitaba un sistema dinámico, centrado en los procesos, y así nació el concepto de análisis de peligros y de puntos críticos de control. El sistema original fue concebido por la Pillsbury Company, en colaboración con la NASA y los laboratorios del ejército de los Estados Unidos en Natick (Middlesex County, Massachusetts). Se basó en la técnica de ingeniería conocida como Análisis Modal de Fallos y Efectos (AMFE) que analiza lo que podría ir mal en cada fase del funcionamiento, así como las posibles causas y los probables efectos, antes de aplicar mecanismos de control eficaces.

El sistema de APPCC identifica, evalúa y controla los peligros importantes para la inocuidad de los alimentos. Se trata de un enfoque estructurado y sistemático para controlar la inocuidad de los alimentos en la totalidad del sistema del producto, desde el campo hasta la mesa. Requiere un buen conocimiento de la relación entre causa y efecto, con objeto de actuar de forma más dinámica y es un elemento clave de la Gestión de la Calidad Total (GCT). El sistema de APPCC se basa en la existencia de sistemas de gestión de la calidad sólidamente implantados, como las buenas prácticas agrícolas (BPA), las buenas prácticas de fabricación (BPF), las buenas prácticas de higiene (BPH) y las buenas prácticas de almacenamiento (BPAL). Cada vez más, los organismos de reglamentación han reconocido la utilidad de este instrumento y sus “principios” se han incorporado en las prescripciones legislativas tanto de la UE (Directiva 93/43/EEC sobre higiene de los alimentos) como del Departamento de Agricultura del Gobierno Federal de los Estados Unidos (CPR-123). El Comité Asesor Nacional sobre Criterios Microbiológicos para los Alimentos (NACMCF) de los Estados Unidos proporcionó en 1992 directrices sobre APPCC, en las que se incluían planes genéricos y árboles de decisiones, y la CCA adoptó el sistema de APPCC en 1993.

Los sistemas de APPCC pueden incorporarse en otros sistemas de garantía de la calidad como los de la serie ISO 9000. El concepto APPCC se ha aplicado con éxito en numerosas empresas alimentarias de Europa y los Estados Unidos. En nuestro país este enfoque se está implantando en la actualidad de manera intensiva. Aunque el sistema de APPCC se concibió como un método para asegurar la inocuidad de los alimentos tanto en el sector agrícola como en el de elaboración, hasta ahora se ha aplicado sobre

todo en este último. Esto se debe principalmente a que es mucho más fácil aplicar un sistema de APPCC en una fábrica o instalación transformadora donde existe un único administrador o “propietario” o un número pequeño de personas responsables y en la que es posible prevenir por completo un peligro para la inocuidad de los alimentos, o bien eliminarlo o reducirlo a un nivel aceptable. En el sistema del producto, éste tiene a menudo muchos “propietarios” diferentes en su recorrido desde la granja al consumidor y puede ser imposible conseguir un control completo. A esta dificultad se une el hecho de que el control de los parámetros más influyentes en el peligro como ocurre con las micotoxinas es más difícil en sistemas abiertos, es decir, durante su cultivo en el campo (pre cosecha) que en sistemas cerrados (post cosecha).

El control de micotoxinas en alimentos se enfoca en dos estrategias no excluyentes: por una parte inhibir el crecimiento de hongos en el alimento (prevención de contaminación por micotoxinas) y por otro lado en la destrucción de éstas, si es que ya existen en el alimento (Kabak et al., 2006). Siguiendo las directrices del *Codex Alimentarius*, para la elaboración de un plan de APPCC, en general, y para la prevención y control de micotoxinas en alimentos, en particular (FAO, 2003), son necesarias siete actividades que se denominan los “siete principios” y se requiere la ejecución de doce tareas destinadas a asegurar la correcta aplicación de los siete principios.

**Tareas 1-6.** Identificar y analizar el peligro o peligros (principio 1). El principio 1 exige que se hayan abordado las seis primeras tareas de forma lógica y honesta. En nuestro caso, el peligro es la presencia, la supervivencia y el crecimiento de hongos toxigénicos y/o la producción de micotoxinas a niveles inaceptables para asegurar la salud del consumidor (FAO, 1993; 1997; FIAB, 1997). La identificación del peligro requerirá:

- Tarea 1. Establecer un equipo de APPCC adecuado que deberá determinar si se abarcará la totalidad del sistema (de la granja a la mesa) o sólo algunas etapas seleccionadas.
- Tarea 2: Describir el producto detalladamente. Esta información ayudará al equipo de APPCC a identificar el peligro “real” de la presencia de micotoxinas.
- Tarea 3. Identificar el uso al que ha de destinarse el producto. Si es para consumo directo o no, grupos de consumidores a los que va a ser destinado, particularmente si entre ellos hay grupos vulnerables, como

lactantes, ancianos, personas malnutridas, etc.

- Tarea 4. Elaborar el diagrama de flujo del producto (DFP) para el sistema del producto o para la parte de éste que sea pertinente.
- Tarea 5: Confirmar el diagrama de flujo *in situ*. Los miembros del equipo deberán visitar el sistema del producto (por ejemplo, una explotación agrícola, un almacén o una zona de fabricación) con el fin de comparar la información recogida en el DFP con la situación real. Esto se conoce como “recorrido de la línea de proceso”. Deberá visitarse el mayor número de veces posible el lugar para el que se está elaborando el plan de APPCC a fin de asegurar que se ha recopilado toda la información pertinente.
- Tarea 6: Identificar y analizar el peligro o peligros de manera satisfactoria. En el caso de las micotoxinas se centrará en los hongos (peligro biológico) y las micotoxinas (peligro químico).

Una vez que se ha identificado el peligro para la inocuidad del alimento, deberán estudiarse las medidas de control pertinentes.

**Tarea 7.** Determinar los puntos críticos de control (PCC) (Principio 2). Deberán recorrerse todas las etapas del diagrama de flujo del producto, dentro del ámbito de aplicación del estudio de APPCC. El equipo deberá determinar si puede producirse el peligro en esta fase y, en caso afirmativo, si existen medidas para su control. Si el peligro puede controlarse adecuadamente (y no es preferible realizar ese control en otra fase) y es esencial para la inocuidad del alimento, entonces esta fase es un PCC para dicho peligro. Si se identifica una fase en la que existe un peligro para la inocuidad de los alimentos pero no pueden establecerse medidas de control adecuadas, ya sea en esa fase o más adelante, el producto no es apto para el consumo humano.

**Tarea 8.** Establecer límites críticos para cada PCC (Principio 3). Deberán especificarse y validarse límites críticos para cada PCC. En el caso de las micotoxinas, los criterios pueden incluir, por ejemplo, la temperatura, tiempo, contenido de humedad, pH, actividad de agua y parámetros sensoriales, como el aspecto.

**Tarea 9.** Establecer un procedimiento de vigilancia (Principio 4). La vigilancia puede realizarse mediante observaciones o mediciones de muestras tomadas de conformidad con un plan de muestreo basado en principios

estadísticos. La vigilancia mediante observaciones es simple pero proporciona resultados rápidos y permite, por consiguiente, actuar con rapidez. Las mediciones más frecuentes son las relativas al tiempo, la temperatura y el contenido de humedad.

**Tarea 10.** Establecer medidas correctoras (Principio 5). Si la vigilancia determina que no se cumplen los límites críticos, demostrándose así que el proceso está fuera de control, deberán adoptarse inmediatamente medidas correctoras. Las medidas correctoras deberán tener en cuenta la situación más desfavorable posible, pero también deberán basarse en la evaluación de los peligros, los riesgos y la gravedad, así como en el uso final del producto. Las medidas correctoras deberán asegurar que el PCC vuelve a estar bajo control. Deberán también contemplar la eliminación adecuada de las materias primas o productos afectados.

**Tarea 11.** Verificar el plan de APPCC (Principio 6). Una vez elaborado el plan de APPCC y validados todos los PCC, deberá verificarse el plan en su totalidad y de forma periódica. Se podrá así determinar la idoneidad de los PCC y las medidas de control y verificar la amplitud y eficacia de la vigilancia. Para confirmar que el plan está bajo control y que el producto cumple las especificaciones requeridas, podrán utilizarse pruebas microbiológicas, químicas o de ambos tipos. Un plan oficial de auditoría interna del sistema demostrará también el empeño constante en mantener actualizado el plan de APPCC, además de constituir una actividad esencial de verificación.

**Tarea 12.** Mantener registros (Principio 7). El mantenimiento de registros es una parte esencial del proceso de APPCC. Demuestra que se han seguido los procedimientos correctos, desde el comienzo hasta el final del proceso, lo que permite rastrear el producto. Deja constancia del cumplimiento de los límites críticos fijados y puede utilizarse para identificar aspectos problemáticos.

## 8.1. APPCC en precosecha, postcosecha y procesado tecnológico de los cereales

---

Dentro de los posibles alimentos implicados en la ingesta de micotoxinas por humanos y animales, sin ninguna duda, hay que priorizar a los cereales. En nuestro país se consumen y producen una amplia variedad

de cereales entre los que destacan la cebada, el trigo, el maíz, el arroz y la avena. Hasta el presente, es la cebada, el cereal al que se dedica mayor superficie de cultivo y la avena el que se cultiva en áreas más restringidas y a menor escala. Debido a su climatología, en España, dependiendo del cereal, se pueden obtener una o dos cosechas anuales, aunque generalmente suele ser una, a excepción de la cebada, cereal del que frecuentemente se obtienen dos, la cebada de invierno o de periodo largo y la cebada de primavera o de periodo corto.

En los últimos años el creciente interés por las dietas ricas en fibra y por los alimentos funcionales ha hecho que el uso de la avena en alimentación humana aumente de manera espectacular debido a sus propiedades beneficiosas por su alto contenido en  $\beta$ -glucanos y fibra, por favorecer el crecimiento de microorganismos que residen en el colón como bifidobacterias (Peltonen-Sainio et al., 2004; Flander et al., 2007; Biel et al., 2009; Connolly et al., 2010; Ryan et al., 2011) y como componentes de nuevos alimentos funcionales (Angelov et al., 2006; Gupta et al., 2010). Todo ello se ha traducido en un creciente interés por su cultivo y producción.

Se ha comprobado que el 25% de los cereales a nivel mundial están contaminados con una o más micotoxinas (Charmley et al., 1995). Según la base de datos del RASFF la OTA es la micotoxina que se detecta con mayor frecuencia (Kleter et al., 2009; European Union, 2014).

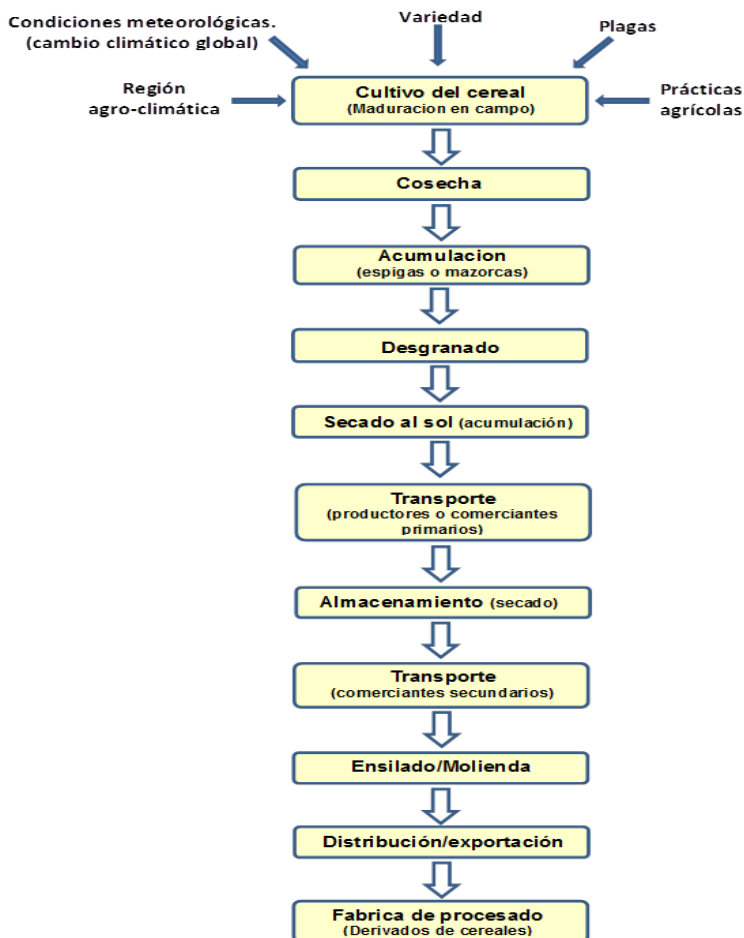
En Europa la conciencia en cuanto al riesgo real de las micotoxinas en cereales es palpable en el ámbito científico y en la actualidad también involucra a productores, funcionarios, autoridades sanitarias y consumidores. Prueba de ello es la actividad legislativa detectada en la última década (apartado 9) y la frecuente colaboración en proyectos multidisciplinares de todos estos colectivos.

En cereales y derivados de cereales, a diferencia de otros productos agrícolas como de la uva y sus derivados, pueden presentarse habitualmente diferentes micotoxinas como OTA, AFLs, tricotecenos A y B, fumonisinas, etc. (apartado 7.1) y, en consecuencia, la presencia de los hongos productores (principalmente *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp.) en el cereal constituyen riesgos potenciales.

La aplicación de un plan APPCC para la prevención y control de hongos y micotoxinas desde precosecha hasta los productos derivados de cereales es una tarea extraordinariamente compleja ya que implica diferentes hongos, diferentes micotoxinas y las etapas de precosecha y postcosecha previas a su

transformación industrial. La Figura 27 ofrece un ejemplo de un posible DFP.

Al igual que en otros productos agrícolas es necesario que estén correctamente implantadas las BPA, BPAL, BPF y BPH y se ha establecido un código de prácticas para la **prevención y reducción** de las más importantes micotoxinas en cereales (Codex Alimentarius, 2003). Como es habitual, una vez descrito el producto, en este caso el cereal, y el uso al que se destina, en un plan APPCC será necesario elaborar el DFP.



**Figura 27.** Diagrama de flujo en los procesos de pre-cosecha y post-cosecha de cereales.



En precosecha los factores que afectan al crecimiento de los hongos y producción de micotoxinas en cereales son similares a los que afectan al cultivo de la vid o cualquier otro cultivo agrícola (apartado 6). Aquí será necesario poner en práctica unas BPA y aplicar medidas de control preventivas (Cleveland et al., 2003).

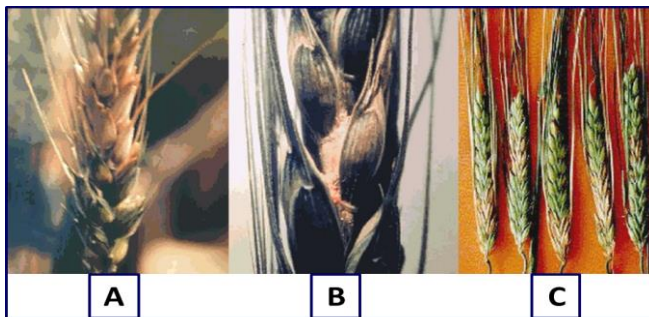
En postcosecha, los cereales son, por excelencia, los productos agrícolas más susceptibles al crecimiento fúngico y acumulación de micotoxinas y esto ocurre antes, incluso, de salir de la propia explotación agrícola. A diferencia de la cosecha de la uva destinada a la elaboración de vino, caso en el que las bayas, una vez cosechadas, son transportadas de inmediato a la bodega donde entran en la cadena de procesado, los cereales, una vez cosechados, permanecen en la explotación agrícola donde se secan, frecuentemente, mediante exposición al sol. Esta operación se realiza para disminuir su contenido en agua antes de su transporte pero hasta que ello se consigue, el cereal está expuesto a factores de riesgo como ataque por microorganismos, insectos, aves, roedores e incluso, lluvias. Este es un importante PCC. En esta etapa la microbiota más exigente en cuanto a actividad de agua es paulatinamente sustituida por especies fúngicas xerófilas, mejor adaptadas a actividad de agua baja (apartado 6). Estos últimos hongos serán los que dominarán en el grano durante su almacenamiento.

La importancia de cada fase depende de la toxina, de la especie fúngica involucrada y del cultivo. Para *Fusarium* spp. un PCC importante es la etapa de precosecha y para *Aspergillus* spp la etapa de almacenamiento, aunque especies de ambos géneros se pueden desarrollar en ambas etapas (Magan y Aldred, 2007a) y por tanto en ambos casos son aplicables medidas de control preventivas.

Tras el desgranado y secado al sol en la explotación agrícola, el cereal es transportado y almacenado en un único silo o en silos sucesivos, dependiendo del proceso de comercialización y de que en él se vean implicados comerciantes primarios, secundarios o, incluso, más. A diferencia de las frutas como la uva de vino, los cereales pueden permanecer ensilados durante periodos de tiempo muy prolongados. En esta etapa se pueden desarrollar en el grano muchas especies fúngicas productoras de micotoxinas lo que se ve influenciado por múltiples factores bióticos y abióticos (apartado 6). Es esta una etapa fundamental en la que sí se puede actuar controlando los agentes físicos y químicos que inciden directamente en el crecimiento de

los hongos y en la producción de micotoxinas. Esta es una etapa clave y un PCC decisivo en el control preventivo de la acumulación de micotoxinas en el grano y, por ello, en la que se ha centrado gran parte de la investigación desarrollada por la comunidad científica. A pesar de ello, la investigación desarrollada hasta la fecha, sigue siendo insuficiente.

Las medidas reductoras pueden comenzar por el reconocimiento visual de las espigas y granos contaminados con hongos productores de micotoxinas (Figura 28) y su segregación. Estas medidas reductoras pueden continuar, paralelamente, al procesado tecnológico de los cereales para la obtención de derivados listos para el consumo (apartado 7.2). Es precisamente durante este procesado cuando se podría conseguir la reducción e incluso la eliminación de las micotoxinas presentes en el cereal sin afectar a la calidad del producto final. Investigaciones en este campo son muy necesarias (Valle-Algarra et al 2009, Terzi et al., 2014).



**Figura 28.** Fusariosis de la espiga: A y B) espigas de trigo, C) espigas de cebada (<http://www.engormix.com/MA-agricultura/trigo/articulos/fusariosis-en-trigo-y-cebada-t480/998-p0.htm>).

## 8.2. APPCC en viticultura y enología

En la literatura científica se ha descrito que en la uva y sus derivados, se pueden encontrar varios tipos de micotoxinas, como ácido bisoclámico, citrinina, patulina y, especialmente, OTA (Delage et al., 2003). Las tres primeras se han identificado sólo de manera ocasional por lo que, en principio, no se considerarían un peligro, en cambio la OTA se detecta de manera habitual, especialmente en vinos tintos.

En la Unión Europea, a partir de la vendimia de 2005, se estableció como límite máximo de OTA en mostos y vinos, el de 2 µg/l, límite que ya había sido propuesto con anterioridad por la OIV. Por tratarse en la actualidad de la única sustancia tóxica de origen microbiano sobre la cual hay una legislación de alcance internacional, explícita para vinos, habría que establecer, aplicar y mantener un plan de APPCC.

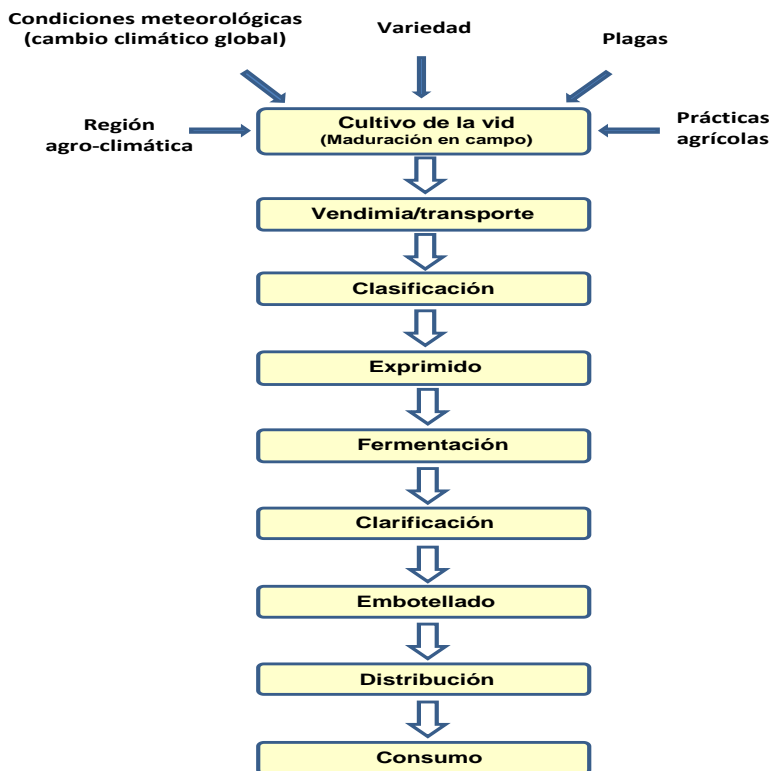
La aplicación del APPCC en viticultura y enología ha sido tratada por diferentes autores desde hace más de dos décadas (Morassut et al., 1999; Briones y Úbeda, 2001; Kourtis y Arvanitoyannis, 2001) y se ha establecido un código de prácticas para la prevención y reducción de OTA en vino (Codex Alimentarius, 2007). Esto supone que estén correctamente implantadas las BPA, BPAL, BPF y BPH. Sin embargo, estas prácticas se han centrado principalmente a nivel de bodega. El buen funcionamiento de estos programas es importante pero no evita la presencia del peligro y, por tanto, no sustituye al sistema APPCC, por lo que no asegura la eliminación de OTA. A grandes rasgos las siguientes consideraciones son básicas para la elaboración de un Plan APPCC para la fabricación del vino. En líneas generales, a modo orientativo, un modelo genérico de diagrama de flujo en la elaboración de vino (DFP) podría ser el que se indica en la Figura 29, aunque habría que ajustarlo a cada caso y vino particular.

Por provenir de mohos aerobios estrictos, la presencia de OTA en el principal derivado de la uva, el vino, está asociada a hongos que se desarrollan en el viñedo. Los principales factores que contribuyen al deterioro biológico por mohos y, en concreto de los productores de OTA, dentro de un ecosistema tal como el viñedo, son los que se indican en el apartado 6. De ellos destacan los factores que afectan a la capacidad de defensa de la uva, disminuyendo la efectividad de la barrera de la piel y son los insectos (avispa, melazo y la mosca de la fruta y del vinagre), los hongos fitopatógenos (oídio, mildiu y yesca), las aves, y las condiciones fisiológico-climatológicas (estrés hídrico y térmico). Todas ellas favorecen la rotura de la piel, lo que permite el acceso a los nutrientes de *A. carbonarius* y la consiguiente producción de OTA.

Concretamente, el ataque de la vid por hongos fitopatógenos puede producirse con mayor facilidad si coinciden unas condiciones climatológicas favorables, que en nuestras latitudes no son otras que las de temperaturas entre 20 y 27 °C, veranos lluviosos y otoños húmedos, que favorecen la

germinación de esporas y entorpecen el efecto de los fungicidas, más eficaces en ambientes secos.

Durante la vendimia, el posible daño de la uva, por manipulación incorrecta o presión por peso acumulado una vez vendimiada, va a tener menor incidencia en la producción de OTA que las causas anteriormente citadas ya que lo más habitual es estrujar la uva inmediatamente después de la vendimia y, en cualquier caso, nunca después de 48 horas desde su recogida, siempre que se hayan conservado a temperatura no superior a 10 °C.



**Figura 29.** Diagrama de flujo en el proceso de elaboración del vino.

Por ello, se puede concluir que la aparición de OTA se produce fundamentalmente antes de la vendimia ya que *A. carbonarius* ha de desarrollarse, y ello se presentará exclusivamente en las fases en las que

exista suficiente aireación. Estas fases corresponden a aquellas durante las cuales la uva no se ha estrujado. Con posterioridad a esta etapa, se evita la aerobiosis para evitar el deterioro sensorial del producto.

Una vez establecido el peligro y los factores que pueden influir en el mismo, habría que considerar las posibles medidas para su control. En el sistema que nos ocupa, las medidas de control a aplicar han de ser de dos tipos: preventivas y reductoras de la contaminación con OTA. Hasta la vendimia las medidas de control serán las **preventivas**, después de la cosecha las **reductoras**.

Las medidas de control preventivas deben estar dirigidas a evitar el desarrollo, principalmente, de *A. carbonarius* y la síntesis de OTA. De entre todos los factores que afectan a la producción de OTA (apartado 6), los que deben controlarse con especial cuidado son los que eviten el daño a la piel de la uva. Para ello, habrá que implementar unas BPA que incluyan la aplicación de planes fitosanitarios que servirán para mantener a la planta en un estado de salud óptima para defenderse de los posibles parásitos. Dichas BPA deberán incluir también la prevención del estrés hídrico, los daños por mohos, insectos, pájaros, etc.

Frente a algunos insectos como las polillas *Lobesia botrana*, *Cryptoblabes gnidiella* y *Eupoecilia ambiguella* se podrán utilizar insecticidas u otro tipo de tratamientos de diversa naturaleza (químicos, biológicos, etc.), siempre que sean compatibles con el medio-ambiente y con la seguridad alimentaria. Frente a pájaros podría llevarse a cabo una estrategia preventiva (eliminación de refugios naturales) y otra directamente ahuyentadora (efectos ópticos, acústicos, etc.).

Frente a hongos fitopatógenos se realizarán tratamientos con fungicidas como azufre, productos cúpricos, fungicidas orgánicos, etc., que impedirán también que la barrera de la piel sea interrumpida por el ataque de estos organismos y la pulpa sea invadida por *A. carbonarius*. Frente a hongos ocratoxigénicos hay que destacar que debido a la especificidad de los agentes antifúngicos será necesario determinar los principios activos efectivos para controlar el crecimiento de las especies productoras de OTA. Esta investigación se aborda en los **ARTÍCULO 6 y 7** de la Tesis Doctoral.

Otro conjunto de medidas preventivas de control sería la implantación de cepas de vid transgénica resistentes al estrés hídrico o al daño por hongos fitopatógenos (Vivier y Pretorius, 2000; Colova-Tsolova et al., 2001; Kikkert et al., 2001). No obstante, debido al tiempo que se ha de invertir en la

transformación de las viñas (de tres a ocho años) y a la dificultad de comercialización que encuentran los alimentos transgénicos, es previsible que este tipo de medidas preventivas tarde tiempo en ser implantado.

Las medidas de control reductoras deben aplicarse cuando a pesar de las medidas preventivas se produce el daño del fruto y el crecimiento de hongos productores de OTA (apartado 7.2). En el caso de la OTA, no puede controlarse en precosecha la temperatura, la pluviometría, la humedad relativa ambiental o el pH de la uva, por lo que los límites críticos habrán de establecerse sobre parámetros que tengan relación directa con el daño en el fruto, la presencia de mohos y la concentración de OTA.

En ciertos alimentos de origen vegetal, hay establecidos criterios para eliminar el fruto dañado con mohos toxicogénicos. Así se reduce, por ejemplo, la presencia de patulina en zumo de manzana y de AFLs en harina de copra o de maíz. Para ello, se propone como medida reductora la eliminación del 99% del fruto dañado con moho (considerando como tal aquel que tiene más de un 10% de su superficie dañada por mohos). Estos frutos se detectan debido a que presentan una coloración particular asociada a la presencia de las especies de mohos en cuestión (FAO, 2003).

Hasta el momento, no se ha desarrollado un método estimativo visual de la presencia de *A. carbonarius* u otras especies ocratoxigénicas en uva, en base al que poder realizar una clasificación del fruto y una eliminación del dañado por este hongo. Y sin embargo, podría ser factible llevarlo a cabo dado el aspecto visual del fruto que alerta sobre su presencia (Figura 30). Para ello se debería recurrir a personal especializado.

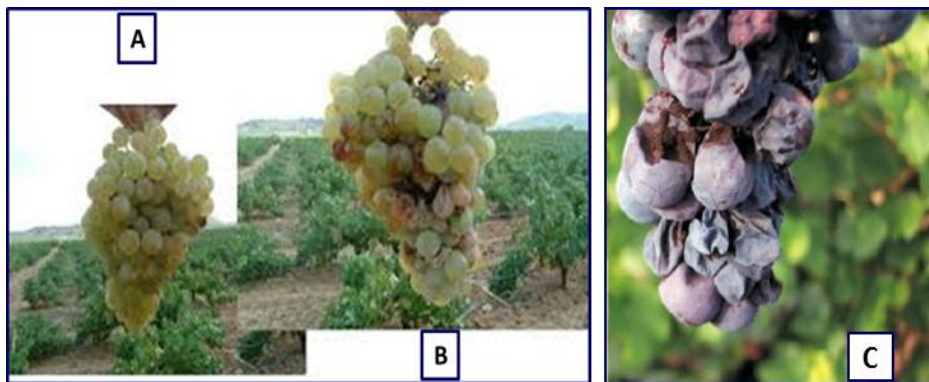
Por otra parte, es necesario realizar estudios para disponer de datos suficientemente documentados sobre la relación entre daño y grado de enmohecimiento de la uva, con la concentración de OTA en la pulpa. De forma que, antes del estrujado de las bayas, debiera ser imprescindible llevar a cabo el análisis de racimos provenientes de parcelas afectadas con *A. carbonarius* y/o OTA. Ello ayudaría, además, en la trazabilidad, en el control del origen de cada lote de uva a estrujar y en la eliminación de aquellas que presumiblemente estén contaminadas con OTA.

Corresponderá a cada explotación agrícola marcar un calendario de inspección visual de viñedos, así como la periodicidad para realizar análisis de presencia de *A. carbonarius* u OTA. Si se detecta que la existencia de OTA en el mosto es inaceptable, lo que deberá realizarse por personal especializado, otras medidas reductoras a aplicar pueden ser la puesta a punto de procesos

de detoxificación. Los métodos de detoxificación deberán, lógicamente, no comprometer la seguridad del producto, ni tampoco disminuir su calidad sensorial. Son muy escasos los métodos efectivos de detoxificación de OTA en vino (apartado 7.1).

Según vayan apareciendo métodos de detoxificación que no afecten a la calidad sensorial del vino deberán aparecer límites críticos para los parámetros de control de los mismos. Por ejemplo, en otras frutas se utiliza el duchado a presión para eliminar zonas dañadas por mohos toxigénicos y así reducir el nivel de la micotoxina que causa el peligro, siendo necesario establecer límites críticos en parámetros tales como la presión del agua para asegurar que se alcanza la presión suficiente y no superior, ya que podría dañar al fruto (FAO, 2003). Este procedimiento del duchado a presión de la uva dañada podría ser una alternativa a la eliminación del fruto dañado, pero faltan estudios prospectivos.

Las concentraciones de OTA en el producto final no deben superar los límites establecidos por la legislación (2 ppm). Si se observa que no es así, el sistema de trazabilidad y los registros existentes deberán permitir la localización del fallo y del lote fuera de control, permitiendo encontrar el PCC que ha quedado fuera de control y proceder a su cambio si fuera necesario (Carrascosa et al., 2005).



**Figura 30.** Racimo de uva blanca afectado por *Aspergillus* de la sección *Nigri*. A: cara del racimo a la que ha llegado el tratamiento fitosanitario, B: cara del mismo racimo a la que no ha llegado el tratamiento. C. Racimo de uva tinta afectado por *Aspergillus* de la sección *Nigri*.

([http://www.acenologia.com/enfoques71\\_02.htm](http://www.acenologia.com/enfoques71_02.htm)).

(<http://vigne.reussir.fr/actualites/oenologie-des-moisissures-encore-trop-mysterieuses-a-l-origine-de-molecules-indesirables:22367.html>).

En los **ARTÍCULOS 3, 4, 5** de la Tesis Doctoral e investigación muy reciente recogida también en el capítulo 2, se describen las medidas preventivas estudiadas (tratamientos con agentes antifúngicos) que puedan ser adoptadas en unas BPA para prevenir el crecimiento fúngico y producción de OTA, de las toxinas T-2 y HT-2 y AFLs en importantes cosechas agrícolas como la cebada o la uva. En los **ARTÍCULOS 6 y 7** se estudian posibles métodos reductores de la OTA en bebidas derivadas de la cebada o la uva como la cerveza y el vino.

## 9. Reglamentación de micotoxinas en alimentos

---

La comprensión de los serios efectos que las micotoxinas pueden tener sobre los seres humanos y los animales ha llevado a muchos países, en las últimas décadas, a fijar reglamentos para el control de estos compuestos tóxicos en los alimentos, como una manera de proteger la salud humana y los intereses económicos de los productores y del comercio. La actividad legislativa detectada en la última década está más que justificada e incluso se puede considerar insuficiente, dado que los alimentos en los que se encuentran las micotoxinas son base de la alimentación humana y animal (Bhat et al., 2010).

Fijar reglamentos para las micotoxinas es una actividad compleja que involucra a diferentes partes interesadas y muchos factores, tanto de naturaleza científica como socioeconómica (Wu, 2004). Entre los factores que determinan los niveles máximos admisibles a fijar para cada micotoxina se destacan los siguientes:

- Disponibilidad de datos toxicológicos.
- Disponibilidad de datos relativos a la presencia de las micotoxinas en productos básicos en la dieta.
- Conocimiento de la distribución de las micotoxinas en un lote.
- Conocimiento de los efectos del procesado de las materias primas en las micotoxinas presentes en ellas y su permanencia en los alimentos derivados.
- Disponibilidad de métodos analíticos fiables, sensibles y reproducibles.
- Legislación de los países con los que existen contactos comerciales.



- Necesidad de un abastecimiento suficiente de alimentos seguros.

Los dos primeros factores proporcionan, respectivamente, la información necesaria para la evaluación de la toxicidad y grado de exposición, elementos principales para una evaluación de riesgos. La evaluación de riesgos es la evaluación científica de la probabilidad de que tengan lugar efectos conocidos o potenciales, adversos a la salud, resultantes de la exposición de los seres humanos a peligros transmitidos por los alimentos y es la base científica primaria para los reglamentos.

Si se retrocede en el tiempo, los primeros límites admisibles para las micotoxinas surgen a finales de la década de 1960, para las AFLs. Estos límites oscilaban dependiendo de los países y en muchos de ellos no existía ningún tipo de reglamentación al respecto.

Los principios generales de la legislación en la UE sobre contaminantes en alimentos fueron considerados en 1993 (European Commission, 1993) y se facultó a la CE (European Commission, EC) para tomar medidas que aseguraran la protección de la salud pública y ello incluía la introducción del concepto “niveles máximos (MLs) admisibles de contaminantes tóxicos en alimentos” (Zmudzki y Wisniewska-Dmytrow, 2004). Como consecuencia de ello, el Comité Científico de la Comisión para alimentos (Commission’s Scientific Committee for Food (SCF) estableció los niveles máximos para AFLs, OTA y patulina en alimentos en 2001 (European Commission, 2001). Esta reglamentación inicial reemplazó a las reglamentaciones que existían a nivel nacional unificando criterios. Después de varias revisiones posteriores, esta reglamentación fue sustituida en 2006 (European Commission, 2006a) y revisada nuevamente en 2007, 2010, 2012 y 2014 (European Commission, 2007b; 2010a; 2010b; 2012a, 2014). Se puede afirmar, por tanto, que en la última década ha sido cuando se ha observado una importante actividad legislativa en materia de micotoxinas.

El perfil de países que ya en 2003 presentaban reglamentaciones para micotoxinas (Figura 31) (FAO, 2004; Egmond et al., 2007), sigue siendo prácticamente el mismo en la actualidad aunque, en general, como se ha indicado anteriormente, las diferentes normativas existentes en esta fecha han sido sucesivamente revisadas para ajustar los límites admisibles de las micotoxinas más importantes y aumentar el número de alimentos y micotoxinas recogidas en los reglamentos.

Para alimentos, en los países miembros de la UE esta revisión se recoge, principalmente, en los reglamentos que han sido publicados en el

periodo 2001-2014 como los Reglamentos No 466/2001 (European Commission, 2001), No 856/2005 (European Commission, 2005a), No 2165/2005 (European Commission, 2005b), No 1881/2006 (European Commission, 2006a), No 1126/2007 (European Commission, 2007b), No 105/2010 (European Commission, 2010a), No 165/2010, (European Commission, 2010b), No 594/2012 (European Commission, 2012a), No 1058/2012 (European Commission, 2012d), No 212/2014 (European Commission, 2014) y diferentes Recomendaciones (European Commission, 2012c y 2013).

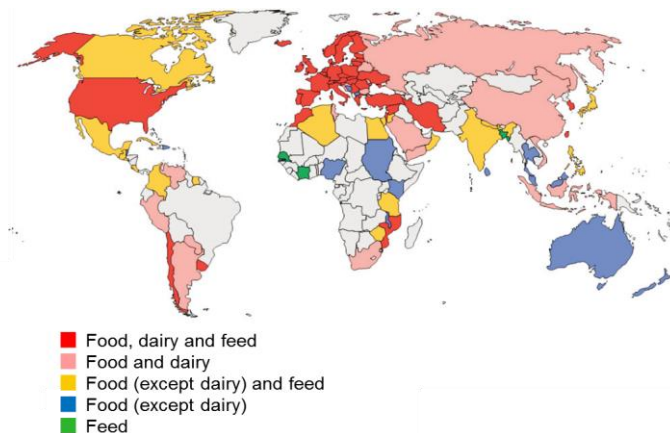
De la extensa variedad (varios cientos) de micotoxinas que se han identificado, alrededor de una veintena han sido particularmente investigadas. En el presente, en la UE las micotoxinas sometidas a regulación en los reglamentos citados son: AFLs (AFLB<sub>1</sub>, la suma de AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub> y AFLM<sub>1</sub>), OTA, deoxinivalenol, (DON, tricoteceno del grupo B), fumonisinas (suma de FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub>), zearalenona (ZEN o F-2), patulina (PAT) y citrinina (CIT). La IARC las ha clasificado en los grupos 1, 2B, 3, 2B, 3, 3 y 3, respectivamente (IARC,1993a).

Entre las micotoxinas incluidas en estos reglamentos de la CE y en los del resto de los países del mundo, sin duda, las que ocupan un lugar muy destacado son las AFLs, hasta el punto de que recientemente se han establecido condiciones específicas para la importación de determinados productos alimenticios de algunos terceros países debido al riesgo de contaminación de dichos productos con AFLs (European Commission, 2012b). A este grupo de toxinas le sigue en importancia la OTA (European Union, 2014).

Aunque está bien establecido que los tricotecenos del grupo A más frecuentes en alimentos y piensos y que presentan un mayor peligro para la salud pública son las toxinas T-2 y HT-2 (EFSA, 2010c), hasta el momento no se han publicado reglamentaciones de la CE para su regulación, aunque ya en la normativa (EC) No 1881/2006 en el párrafo 31 puede leerse *“Las estimaciones de la ingesta indican que la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 puede ser preocupante para la salud pública. Por lo tanto, es necesario y altamente prioritario diseñar un método fiable y sensible, recoger más datos sobre su presencia y estudiar e investigar más los factores que influyen en la aparición de toxinas T-2 y HT-2 en los cereales y los productos a base de cereales, en particular en la avena y los productos a base de avena”*.

Como respuesta a este llamamiento, la actividad investigadora en los últimos años ha sido intensa (EFSA, 2010a; 2010b; 2011) y la regulación de estos compuestos tóxicos en alimentos constituye un objetivo prioritario en seguridad alimentaria. Recientemente, ya se han publicado recomendaciones para los países de la UE sobre los niveles máximos admisibles de T-2 y HT-2 en diversos cereales (European Commission, 2013). Debido a que la toxicidad de ambos compuestos es similar (Edwards et al., 2012), las recomendaciones hacen referencia a niveles máximos admisibles resultantes de la suma de las dos toxinas.

Por otra parte, hay que destacar también que, recientemente, han sido publicadas recomendaciones para el control de esclerocios de cornezuelo de centeno (*Claviceps purpurea*) para los piensos que contengan cereales sin moler (European Commission, 2012c). El término cornezuelo se refiere a estructuras fúngicas del género *Claviceps* que se desarrollan en las espigas de los cereales en lugar del grano y en las espigas de las gramíneas en lugar de las semillas, y que se aprecian a simple vista como grandes esclerocios oscuros. Estos esclerocios contienen distintas clases de alcaloides. La cantidad producida el tipo y la toxicidad de estos compuestos varía entre las diversas cepas de hongos en función de la planta hospedadora y la región geográfica.



**Figura 31:** Países con regulación de micotoxinas en alimentos y piensos (FAO, 2004).

Actualmente, se desconoce el grado de variabilidad de los alcaloides de

cornezuelo en relación con las especies fúngicas, su distribución geográfica y su relación con la planta hospedadora. Se precisan más datos para poder identificar todos los factores que influyen en la variabilidad de los alcaloides de cornezuelo en cada especie vegetal.

Con frecuencia, la determinación física del grado de contaminación de los cereales por el cornezuelo del centeno es inexacto, dado que el tamaño y el peso de los esclerocios pueden variar considerablemente. Además, esta determinación es imposible en piensos y alimentos transformados.

Por tanto, se ha propuesto que, además de los controles por métodos físicos, se apliquen controles por análisis químico, ya que se dispone de diversos métodos cromatográficos capaces de detectar los alcaloides de cornezuelo. Sin embargo, los métodos de que se dispone solo sirven para un cierto número de alcaloides de cornezuelo, por lo que será necesario investigar nuevos métodos. La CE pide más información a los estados miembros sobre la presencia de estos alcaloides de cornezuelo, no solo en los cereales sin moler, sino también en los productos a base de cereales y en los piensos y alimentos compuestos, así como recoger datos fiables sobre los alcaloides de cornezuelo en piensos y alimentos, y poder relacionar su presencia con la cantidad de esclerocios en la planta. Para ello ha propuesto recomendaciones a los estados miembros (European Commission, 2012c).

En lo que se refiere a piensos la situación legal en cuanto a reglamentaciones es bastante diferente ya que solamente la AFLB<sub>1</sub> se encuentra bajo control y únicamente para ella existen niveles máximos que oscilan entre 5 y 20 mg/kg (The European Parliament and the Council, 2002b; European Commission, 2003; European Commission, 2012b). Esta ausencia de legislación para otras micotoxinas obedece al hecho de que a excepción de las AFLs, se considera que la contaminación de piensos con otras micotoxinas no tiene un efecto directo o indirecto en la salud humana por acumulación en tejidos comestibles y que únicamente afectaría a la salud del animal.

Para las materias primas destinadas a la producción de compuestos diferentes a alimentos y piensos como, por ejemplo, bioetanol o biopolímeros de uso industrial no existe ningún tipo de reglamentación. Sin embargo, los niveles máximos admisibles para micotoxinas en alimentos y piensos tienen un cierto impacto en todas las empresas del sector en la UE ya que están abligadas al cumplimiento de la normativa vigente (The European Parliament and the Council, 2002b) en la que se establece que todas las operaciones

relacionadas con los alimentos en todas las etapas de producción, procesado y distribución dentro del ámbito bajo su control deben asegurar que los alimentos y piensos satisfagan los requerimientos exigibles y estas empresas deben verificar que tales requerimientos sean cumplidos.

Las consecuencias económicas derivadas de la violación del límite máximo admisible de una o varias micotoxinas en un determinado producto dependen de cada caso, pero pueden llegar a ser muy elevadas (Wu, 2008), a menos que se pueda modificar su destino, por ejemplo, de alimentación humana a animal. En este sentido, los cereales constituyen un alimento donde existe una especial confusión y son susceptibles de fraudes que atenten a la seguridad alimentaria ya que en la mayor parte de los casos no se puede controlar si se dirigen a la alimentación humana o animal. La homogenización de lotes contaminados con otros libres de contaminación con la finalidad de disminuir la concentración de una determinada toxina hasta niveles admisibles es una práctica ilegal (The European Parliament and the Council, 2002a; 2003) pero igualmente de difícil de control.

## 10. Determinación de micotoxinas en alimentos

---

La distribución de la concentración de las micotoxinas en los productos contaminados es un factor importante a considerar cuando se adoptan criterios reglamentarios de muestreo para tales productos. La distribución de las micotoxinas puede ser muy heterogénea, como ocurre, por ejemplo, en el caso de los cereales. La cantidad de granos contaminados en un lote es habitualmente muy baja, pero el nivel de contaminación dentro del grano puede ser muy alto. De no adoptarse los debidos cuidados para obtener una muestra de laboratorio representativa, la concentración de las micotoxinas en los lotes inspeccionados puede estimarse erróneamente.

Por otra parte, el consumo del cereal contaminado podría llevar a la ingesta de una única dosis accidental alta, de una o varias micotoxinas. Los frutos secos y, sobre todo, las frutas son productos agrícolas en los que la toma adecuada de la muestra es todavía más compleja ya que el tamaño de las piezas individuales es mayor y, por tanto, las micotoxinas presentan una distribución muy heterogénea. En otros casos, como bebidas (cerveza, vino, etc.) la distribución es más homogénea. La toma de la muestra es, por ello,

fundamental para obtener resultados representativos y fiables, evitando los falsos negativos o desviaciones no admisibles.

El diseño de los procedimientos de muestreo ha sido tema de preocupación en la comunidad científica durante mucho tiempo. Para intentar alcanzar un enfoque internacional armonizado la FAO y la CCA organizan grupos de trabajo y discusión. Como fruto de esta actividad se han optimizado protocolos de muestreo y análisis que son actualmente recomendados cuando se pretende la evaluación de micotoxinas en alimentos y piensos (Commission regulation (EC) No. 401/2006).

Una vez obtenida la muestra de laboratorio según la normativa vigente, la adecuada determinación de micotoxinas en la misma es una tarea compleja. Debido a la variabilidad estructural de las diferentes micotoxinas no es posible el uso de una única técnica standard para todas ellas. En general, será necesario emplear diferentes métodos dependiendo de la micotoxina, o grupo de micotoxinas y de la matriz. No cabe duda de que, lo más deseable, es disponer de métodos simples, robustos, económicos, efectivos, rápidos, sensibles, reproducibles y flexibles, aplicables a un amplio rango de micotoxinas, y que no requieran personal especializado, ofreciendo resultados de fácil análisis e interpretación (Turner et al; 2009; Valle-Algarra et al., 2014). Estos condicionantes hacen que continuamente se publiquen métodos optimizados para cada matriz y micotoxina o micotoxinas según se trate de determinaciones de micotoxinas individuales o de métodos de multidetección, lo que dificulta la discusión del estado actual del tema.

El diseño de métodos analíticos para la determinación simultánea de diversas micotoxinas debe ser abordado especialmente en cereales y derivados porque son los productos agrícolas donde crece una mayor variedad de especies fúngicas productoras de micotoxinas, son base de la alimentación en todos los lugares del mundo y tienen una enorme importancia económica. En otros casos como, por ejemplo, en la uva y su principal derivado, el vino, la metodología analítica puede ser más simple ya que un número muy limitado de especies fúngicas potencialmente productoras de micotoxinas afectan a esta fruta, siendo, prácticamente, la OTA la única micotoxina que requiere especial atención.

Para cereales como el trigo y el maíz, se ha publicado algún método capaz de determinar numerosas micotoxinas (Sulyok et al., 2006; Vanheule, et al., 2014; Bolechová, et al., 2015). La mayor parte de ellas nunca se han encontrado en esos cereales ni en ningún otro alimento; sin embargo, no se

ha publicado ningún método que permita la determinación simultánea en un cereal, de todas las micotoxinas para las que existen normativas comunitarias, aunque este sería un buen logro. Por otra parte, para algunos cereales como, por ejemplo, la cebada o la avena son muy escasos los métodos de multidetección y solo son aplicables a un número muy limitado de micotoxinas a pesar de que derivados de estos cereales son cada vez más empleados en alimentación humana como panadería, bollería y elaboración de alimentos ricos en fibra, alimentos funcionales, así como en la fabricación de bebidas (cerveza).

Los métodos analíticos para la determinación de micotoxinas en cereales y derivados de cereales, en general, requieren tres pasos:

- Extracción de la toxina o toxinas de la matriz con un disolvente de extracción adecuado.
- Purificación para eliminar interferencias ajenas a los analitos.
- Detección/determinación de la toxina o toxinas mediante instrumentos analíticos y tecnologías adecuadas.

Para la extracción de micotoxinas a partir del cereal se realiza, habitualmente, una molienda de la muestra seguida de su homogeneización/agitación mecánica, a mayor o menor velocidad, con el disolvente de extracción adecuado, durante un determinado tiempo. Este disolvente puede estar constituido por un único disolvente o por mezclas de varios; generalmente, suele utilizarse agua y otros disolventes como metanol o acetonitrilo evitando, en lo posible, el uso de disolventes clorados como cloroformo (por su mayor peligrosidad). A ello le sigue una filtración y eliminación de la fase sólida. Con frecuencia se añaden otros componentes a la mezcla de extracción como NaCl u otra sal para favorecer la formación de dos capas en la fase líquida y la concentración de la toxina o toxinas en una de ellas, lo que permite descartar la capa sin interés y los compuestos que contiene. En algunas ocasiones se añade ácido cítrico o fosfórico como compuestos que compiten por los sitios de unión de las micotoxinas a las proteínas y ácidos nucleicos de la matriz favoreciendo así su completa extracción.

Otra técnica de extracción de micotoxinas conocida como “Pressurized Liquid Extraction” (PLE) se basa en el empleo de equipos que permiten controlar a valores relativamente altos, la temperatura y presión en la cámara

de extracción lo que favorece la óptima función de la mezcla extractora y la máxima extracción de las micotoxinas del cereal en tiempos muy cortos y de manera mucho más eficiente que a temperatura ambiente y a presión atmosférica (éste ha sido el método empleado en la presente Tesis) en el análisis de las muestras de cebada (capítulo 2). La desventaja de esta metodología es el alto coste del equipo (sistema ASE, Accelerated Solvent Extraction).

Finalmente, una técnica que se ha probado con esta finalidad ha sido la extracción de las micotoxinas con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE) tales como el CO<sub>2</sub>. Sin embargo, los resultados obtenidos para micotoxinas usando esta tecnología han dado rendimientos muy pobres y extractos con altos niveles de impurezas.

La segunda etapa esencial en la determinación de micotoxinas es la purificación (clean-up) de los extractos, especialmente, cuando se encuentran a nivel de trazas. En la determinación de micotoxinas en cereales y derivados de cereales, para la purificación se emplean, generalmente, columnas de extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) como por ejemplo las columnas MycoSep®, que contienen fases multifuncionales, y las columnas de inmovilización (Immunoaffinity Columns, IACs), muy específicas.

Las columnas SPE son de uso muy frecuente y permiten eliminar interferencias en un rápido paso (10-30 segundos). Contienen fases compuestas por carbón activo, Celite, o resinas de intercambio iónico. Los extractos son forzados mediante ligera presión a pasar a través de este lecho empaquetado en el interior del tubo. Los compuestos interferentes de la muestra quedan adsorbidos y el extracto purificado se recoge una vez ha atravesado la columna. Otras veces los analitos quedan adsorbidos y tras un lavado para eliminar las interferencias son eluidos con un disolvente apropiado. Estas columnas son muy útiles para la purificación simultánea de tricotecenos de los tipos A y B, AFLs, OTA y otras micotoxinas, como ZEA y FBs.

En esta Tesis Doctoral se han empleado columnas con fases diseñadas en nuestro laboratorio (Valle-Algarra et al., 2005; 2009) para el análisis de tricotecenos en cebada y avena (capítulos 2 y 3) muy económicas, que superan ampliamente la efectividad de las columnas MycoSep®, de elevado coste.

Las IACs están desplazando, en buena medida, a las columnas SPE clásicas. Se trata de columnas que contienen fases con anticuerpos



monoclonales o policlonales específicos para las diferentes micotoxinas a analizar. Constituyen, por tanto, métodos muy específicos, precisos y sensibles y proporcionan extractos de alta pureza. Se comercializan para la purificación de AFLs, OTA, T-2, HT-2, FBs, ZEA y DON a partir de los extractos de cereales y derivados y de otras matrices. Se han usado para la determinación de la presencia simultánea de esas toxinas con buenos resultados (Pascale y Visconti, 2008; Santos et al., 2011). Para la purificación de AFLs y OTA en las muestras de cebada analizadas en la presente Tesis se ha empleado este procedimiento (capítulo 2).

La determinación de AFLs en alimentos y piensos no es fácil porque se trata de matrices complejas y por la necesidad de su detección a concentraciones extraordinariamente bajas, debido a su elevada toxicidad. En la mayoría de los métodos que se utilizan actualmente se emplea una mezcla de extracción compuesta por metanol y agua seguida de una purificación en columnas SPE o, más comúnmente, en columnas IA que, a pesar de su elevado coste, se usan desde hace casi dos décadas ya que proporcionan mejores resultados (Kussak et al. 1995; Akiyama et al. 1996; 2001; Ghali et al., 2009; Kabak, 2012). También se puede realizar una buena purificación mediante el empleo de una fase sólida polimérica (Ventura et al., 2004). La investigación de métodos de extracción y purificación, alternativos, económicos y eficaces es un objetivo prioritario para la comunidad científica ya que en muchos laboratorios de las regiones más afectadas por la presencia de AFLs en alimentos, la adquisición de columnas de inmunoafinidad no siempre es posible.

La extracción de la OTA, generalmente, se realiza con disolventes orgánicos en medio ácido, debido a que la OTA se presenta en forma disociada cuando se encuentra a pH neutro o básico (Scott, 2002).

Para la determinación de OTA en vino se han utilizado varios procedimientos de extracción y purificación. Por ejemplo, Zimmerli y Dick (1995; 1996), tras una previa acidificación de la muestra, realizan separaciones líquido-líquido usando cloroformo, seguido de una purificación con IAC. La adición de  $\text{NaHCO}_3$  y polietilenglicol 8000 (PEG) a la muestra seguida de purificación mediante IAC también es un método frecuente (Visconti et al., 1999; 2001). También se ha descrito la purificación de la OTA utilizando cartuchos de  $\text{C}_{18}$  (Jornet et al., 2000; Zöllner et al., 2000) o de sílica gel, aunque menos frecuente (Becker et al., 1998; Ospital et al., 1998; Degelmann et al., 1999).

Algunos autores (Siantar et al., 2003) han comparado la eficacia de las columnas IA y las de extracción en fase sólida clásicas y han encontrado que el empleo de las primeras proporciona mayores recuperaciones de la toxina que las columnas C<sub>18</sub> o las construidas con otros polímeros.

Entre los avances más recientes en las técnicas que requieren el empleo de columnas de SPE destaca la aplicación de los llamados polímeros de huella molecular (molecular imprinted polymers, MIP), que se sintetizan usando como precursor N-fenilacrilamida (Maier et al., 2004). Una de las principales ventajas de este método es que el polímero se puede reutilizar varias veces, en contra de lo que ocurre con los métodos en los que se emplean columnas de IA, las cuales están provistas de una fase de uso único y su coste económico es elevado.

En el caso de la cerveza, la extracción de la OTA, con frecuencia, se ha realizado adicionando NaHCO<sub>3</sub> y NaCl a la muestra, previamente desgasificada, seguida de una purificación con IAC (Legarda y Burdaspal, 1998a). En un estudio colaborativo coordinado por Visconti et al. (2001) se añade PEG-NaHCO<sub>3</sub> previamente a la purificación de la OTA con IAC. Esta metodología ha sido adoptada como método oficial por la AOAC. Para el análisis de OTA en cerveza, al igual que en el caso del vino, se han optimizado diferentes métodos de extracción y purificación que implican el uso de columnas de SPE (Sáez et al., 2004; Medina et al., 2005c; 2006b).

En cereales y derivados de cereales, la extracción de la OTA se ha realizado con mezclas de metanol-agua como la constituida por metanol/1% NaHCO<sub>3</sub> en agua (70:30, v/v) (Sugita-Konishi et al., 2006a). Sin embargo, la manera más habitual de extraer la toxina ha sido con disolventes de extracción compuestos por acetonitrilo/agua, generalmente, en la proporción 60:40 v/v (Yazdanpanah et al., 2001; Zinedine et al., 2006). A continuación, al igual que en otras matrices, el método continúa con la purificación mediante IAC.

Para la extracción de T-2 y HT-2 a partir de cereales y derivados de cereales las principales mezclas de extracción están constituidas por metanol/agua o acetonitrilo/agua. El extracto resultante se procesa posteriormente mediante elución a través de columnas de SPE, incluyendo columnas multifuncionales (Haeubl et al., 2007; Cano-Sancho et al., 2010) o bien usando columnas IA (Majerus et al., 2008; Lattanzio et al., 2009). La fase estacionaria de las columnas SPE, generalmente contiene sílica, carbón

activo, Florisil®, Celite, u óxido de aluminio (fase normal), C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub> (fase inversa) (Meneely et al., 2010; 2011a; 2011b).

El análisis cualitativo y cuantitativo de las micotoxinas en matrices líquidas como el vino o la cerveza y sólidas como los cereales y derivados de cereales en los extractos purificados, obtenidos en las etapas anteriores se realiza, normalmente, mediante técnicas cromatográficas. Estas técnicas son, básicamente, cromatografía líquida de alta resolución (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) acoplada a detectores de ultravioleta (ultraviolet detector UVD), red de diodos (diode array detector, DAD), fluorescencia (fluorescence detector, FD) o espectrometría de masas (mass spectrometry, MS). También se emplea la cromatografía de gases (Gas-Chromatography, GC) acoplada a detectores de captura de electrones (electron capture detector, ECD), ionización de llama (flame ionization detector, FID) o detectores MS. La elección de una u otra técnica y del detector depende de las micotoxinas que se desea analizar.

Para el análisis de AFLs y OTA, moléculas fluorescentes, la mejor técnica es HPLC-FD debido al bajo coste del detector, a su selectividad y a su elevada sensibilidad, lo que permite conseguir excelentes límites de detección y cuantificación y la multidetección de la AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub>, AFLG<sub>2</sub> y la OTA en una única inyección. Se trata, además, de un equipo asequible a la mayor parte de los laboratorios. Ésta ha sido la técnica empleada en la presente Doctoral para el análisis de estas micotoxinas en cebada (ARTÍCULO 1). Para mejorar los límites de detección de AFLB<sub>1</sub> y AFLG<sub>1</sub> se suelen formar derivados hemiacetálicos con ácido trifluoroacético mediante una derivatización postcolumna o con bromo o yodo (Shepherd y Gilbert, 1984; Stroka et al., 2000). En esta Tesis se ha realizado una derivatización post-columna con yodo (**ARTÍCULO 1**).

En los últimos años, se está generalizando cada vez más la detección de las AFLs por HPLC-MS/MS para evitar los inconvenientes que genera la derivatización (Ventura et al. 2004; Beltrán et al., 2011). Esta técnica también ha sido utilizada en esta Tesis por sus ventajas en la confirmación de la presencia de las toxinas en el cereal.

Diferentes métodos cromatográficos se recomiendan para el análisis de toxinas producidas por *Fusarium* spp. como FBs (Hinojo et al., 2006; Manova y Mladenova, 2009), ZEA (Visconti y Pascale, 1998; Llorens et al., 2002), tricotecenos A (T-2 y HT-2) (Biselli y Hummert, 2005; Medina et al., 2010b; Pascale et al., 2012) y tricotecenos B (DON, 3 Ac-DON y NIV) (Llorens et al.,

2001; Mateo et al., 2001; Valle-Algarra et al., 2009). Sin embargo, si se desea un análisis simultáneo, la técnica de elección es HPLC-MS/MS (Sulyok et al., 2006). En este caso los resultados en cuanto a límites de detección son frecuentemente más elevados que los que se obtienen usando los métodos para el análisis de las micotoxinas de manera individual o por grupos.

Si a ello se suma el hecho de que los equipos de cromatografía que no están dotados de detectores de MS/MS son extraordinariamente más económicos, el resultado es que la mayor parte de los laboratorios usan técnicas cromatográficas que permiten el análisis de determinadas micotoxinas y, en caso necesario, se realizan varias determinaciones hasta completar el análisis de todas las posibles micotoxinas en la muestra, evitando así la necesidad de disponer de detectores de MS/MS. Si bien es importante destacar que estos detectores son muy fiables y en buena medida insustituibles cuando se desea la confirmación de la identidad de los compuestos.

La GC-ECD es una técnica excelente para el análisis de tricotecenos, especialmente tricotecenos de tipo B. Permite la perfecta separación e identificación de estos compuestos y sus derivados acetilados en una única inyección; se consiguen límites de detección y cuantificación muy bajos y tiempos de análisis cortos. Además, el equipo es más económico que los anteriores. En la presente Tesis para la determinación de tricotecenos en cebada se ha empleado esta técnica cromatográfica (Valle-Algarra et al., 2009) (capítulo 2). La mayor dificultad de esta metodología obedece a la necesidad de la formación de derivados volátiles de los tricotecenos, previamente a la inyección, y a la inestabilidad que presentan estos derivados, lo que obliga a su análisis cromatográfico dentro de las 24-48 horas siguientes a la derivatización. Esto introduce cierta dificultad en el método por lo que, especialmente para el análisis de tricotecenos de tipo A, se acude frecuentemente a la HPLC-DAD (Pascale et al., 2012). Esta técnica ha sido empleada en el capítulo 3 para la determinación de las toxinas T-2 y HT-2 en los cultivos de avena.

El análisis de micotoxinas se puede realizar por métodos diferentes a los cromatográficos como son los métodos inmunométricos comerciales tales como los ensayos inmunoenzimáticos (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, ELISA) o bien los inmunoensayos de membrana. No obstante, estas técnicas se emplean frecuentemente como métodos de “screening” (Meneely et al., 2010) debido a que los límites de detección son generalmente más

elevados que los de los métodos cromatográficos y a la presencia de falsos positivos debido a que se presentan reacciones cruzadas. Son, además, métodos menos versátiles con un campo de aplicación muy limitado ya que la oferta comercial de estos sistemas se reduce a micotoxinas muy concretas.

Recientemente, están surgiendo otros métodos rápidos para el análisis de micotoxinas en diferentes matrices, principalmente, en cereales y derivados de cereales, basados en nuevas tecnologías (inmuncromatografía, espectroscopia de infrarrojos, biosensores, etc.) (Kralj Cigić et al., 2009; Lancova et al., 2009; Zhiling et al., 2015), pero hasta la fecha, sin duda, los mejores métodos se basan en técnicas cromatográficas de alta resolución (Mateo et al., 2001; Sáez et al., 2004; Blesa et al., 2005; Juan et al., 2005; Medina et al., 2006b; Valle-Algarra et al., 2005).

El análisis de micotoxinas en medios de laboratorio, sintéticos o semisintéticos, diseñados para el seguimiento de la producción de una o varias micotoxinas por parte de una especie fúngica en unas condiciones determinadas, es una situación bastante diferente al de su determinación en una muestra natural. Esto obedece a diferentes motivos como el hecho de tratarse, en general, de matrices poco complejas, donde se analiza una o pocas micotoxinas, que suelen estar en concentraciones elevadas o relativamente elevadas y donde el número de determinaciones necesarias para completar la experiencia suele ser muy alto. Estas, entre otras, razones determinan que los métodos de elección para la determinación de las micotoxinas en tales medios y situaciones sean en general simples, rápidos y económicos (Llorens et al., 2006b; Medina et al., 2008a; 2010b). Sin embargo, cuando se emplean medios naturales como, por ejemplo, cereales, los métodos a seguir son más complejos y, generalmente, son los mismos que se seguirían para el análisis de la correspondiente micotoxina o micotoxinas en una muestra naturalmente contaminada.

En los estudios de caracterización de especies y cepas fúngicas productoras y no productoras de una determinada micotoxina, o en los estudios de seguimiento de la producción de micotoxinas en medios naturales, como son los cereales, frente a pequeños cambios climatológicos, es necesario el empleo de métodos optimizados con muy bajo límite de detección ya que las diferencias en la respuesta de cada especie y cepa fúngica, en función de las condiciones en que se encuentra, son a menudo muy sutiles. Estos estudios son especialmente importantes cuando se trata de predecir el comportamiento del hongo en una determinada cosecha. También

es necesario el uso de estos métodos en el estudio y predicción de los efectos del cambio climático global en los niveles de micotoxinas en cultivos agrícolas, hecho que ocurre de forma lenta pero palpable. En estos casos, la detección de la micotoxinas o micotoxinas producidas requiere, igualmente, el uso de técnicas cromatográficas de alta resolución optimizadas y validadas para cada sustrato, que permitan la cuantificación precisa de la toxina, o toxinas, acumuladas en cada cultivo y región (Llorens et al., 2004a; 2004b).

En base a lo expuesto, en el estudio del perfil de micotoxinas presentes en cebada española de diferentes orígenes geográficos, recogido en los **ARTÍCULOS 1 y 2** de esta Tesis, se emplean procedimientos optimizados para la determinación de los diferentes tipos de micotoxinas: OTA, AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub>, AFLG<sub>2</sub>, DON, NIV, ZEA, FB<sub>1</sub> y FB<sub>2</sub> y las toxinas T-2 y HT-2 en el cereal.

Del mismo modo, en los **ARTÍCULOS 3, 6, 7 e investigación complementaria** recogida en el capítulo II se determinan los niveles de OTA en diferentes cultivos fúngicos y medios, y en los **ARTÍCULOS 4 y 5** de las toxinas T-2 y HT-2 en medios y granos de avena. En todos los casos se emplean métodos optimizados para cada matriz.

---

## 11. Predicción de la presencia de hongos y micotoxinas en alimentos

---

Como ya se ha expuesto en los apartados precedentes, las micotoxinas son metabolitos secundarios de origen fúngico y como tales, en su biosíntesis, acumulación, estabilidad, permanencia en los alimentos listos para el consumo e ingestión por el consumidor, se encuentran implicados numerosos factores que inciden en las etapas de pre-cosecha, post-cosecha, transporte, procesado tecnológico y comercialización. Todas estas etapas influyen en el tipo y los niveles de las micotoxinas que se van a encontrar en el alimento listo para el consumo. Se trata por tanto de un conjunto de procesos muy complejos en los que intervienen factores bióticos y abióticos, y sus interacciones, por lo que la predicción del peligro de las micotoxinas en el alimento sólo se puede abordar mediante el empleo de métodos matemáticos predictivos, tanto del crecimiento de los hongos productores como de las micotoxinas producidas. Estos modelos predictivos pueden abordar cada etapa (pre-cosecha, post-cosecha, proceso de fabricación, etc.) de manera

individual o bien en su conjunto (desde la granja a la mesa). En cualquiera de los casos el banco de datos sometido a tratamiento es complejo.

La necesidad de asegurar la calidad y seguridad de los alimentos ha aumentado el interés en el uso de modelos matemáticos para evaluar y predecir el crecimiento microbiano (Lahlali et al., 2005; 2006). Durante dos décadas estos modelos se han aplicado a la predicción del desarrollo de microorganismos patógenos, especialmente bacterias (Dantigny et al., 2005), y en muy pocos casos a hongos (Patriarca et al., 2001). Esto quizá se ha debido al hecho de que medir el crecimiento bacteriano es relativamente simple, ya que se trata de organismos unicelulares que se dividen por fisión binaria y presentan una curva de crecimiento poblacional fácil de obtener mediante diferentes métodos directos e indirectos, dependiendo de la matriz. Los hongos son pluricelulares el micelio se ramifica y las hifas se alargan e inserta en la matriz o alimento en tres dimensiones (Dantigny et al., 2005), por lo que será difícil su cuantificación. La evaluación del crecimiento fúngico con el tiempo se puede realizar en base al peso de la masa fúngica, mediante conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/g o UFC/ml) o mediante medida de la extensión radial o diámetro de la colonia. La primera medida presenta serios inconvenientes y mucho error. Con el segundo método sólo se evalúa el número de las esporas (Vindeløv y Arneborg, 2002), siendo el tercero, probablemente, el más usado por ser un método simple, directo y presentar un incremento lineal con el tiempo (Gibson y Hocking, 1997), aunque no se considera el crecimiento tridimensional del micelio.

En los últimos años la Micología predictiva ha sufrido un mayor auge por constituir una herramienta muy útil para prevenir riesgos en la salud humana y animal (Gorris, 2005; Membré et al., 2007), por su aplicación en la evaluación del éxito de procesos industriales (Membré y Lambert, 2008) o para predecir los niveles finales de mohos y micotoxinas en alimentos y bebidas o en cultivos agrícolas bajo la presión del cambio climático global (Parra y Magan, 2004; García et al., 2009; Mateo et al., 2009; 2011; Battilani et al., 2012).

En Microbiología predictiva los modelos pueden ser clasificados en primarios, secundarios y terciarios (Whiting, 1995; García et al., 2009).

Los modelos primarios describen como cambia el número de microorganismos en una población con el tiempo bajo condiciones específicas y se clasifican en modelos de germinación, de crecimiento y de inactivación. Existen muy pocos estudios sobre la cinética de la germinación de esporas

fúngicas. Básicamente, se han desarrollado dos modelos: el de Gompertz y el logístico. El primero de ellos parece más adecuado para estimar la fase de latencia o adaptación (fase lag) y el segundo para estimar el tiempo de germinación. En cuanto a los modelos de crecimiento, considerado éste como la elongación de las hifas y formación de colonias macroscópicas, se basan habitualmente en el análisis del diámetro de las colonias, si bien el contenido en ergosterol o el recuento de UFC/g o UFC/ml también se ha utilizado. Una vez alcanzada la fase lag, el aumento del diámetro o del radio de las colonias en función del tiempo tiene carácter lineal creciente. La fase lineal creciente termina cuando el crecimiento del hongo tiene lugar bajo condiciones subóptimas o en placa Petri al llegar al límite y se alcanza una fase estacionaria. Este modelo sería de tipo sigmoidal. Los modelos matemáticos más usados para describir el crecimiento son el lineal, la ecuación de Gompertz modificada (función sigmoidal asimétrica) (Zwietering et al., 1990) y el método de Baranyi y Roberts (Baranyi y Roberts, 1994). El primero de ellos permite estimar la fase lag por la intersección de la prolongación de la recta creciente con el eje de abscisas (tiempo). El de Baranyi, muy empleado en bacterias, es trifásico (usa un polinomio de 3 términos) y considera una fase lag inicial sin crecimiento apreciable, una fase de crecimiento exponencial con el tiempo, cuya pendiente máxima es la velocidad máxima de crecimiento (esta fase se linealiza usando logaritmos) y una fase asintótica final. El modelo ha sido simplificado posteriormente para bacterias por Buchanan et al. (1997). Este modelo y el lineal han dado mejores resultados que el de Gompertz modificado. Existen pocos modelos matemáticos que describan la inactivación de las esporas fúngicas por agentes letales siendo la cinética de primer orden la que se utiliza normalmente. Ello implica que existe una relación logarítmica decreciente entre el número de esporas en un momento dado y el tiempo o lo que es igual, una relación lineal decreciente entre el logaritmo de la población de esporas en un momento dado y el tiempo, siendo la ordenada en el origen el logaritmo de la población inicial de esporas.

Los modelos secundarios evalúan la influencia de los factores ambientales como la  $a_w$ , pH, temperatura, concentración de NaCl, % de  $O_2$ , etc., en la germinación de las esporas de los hongos y en su crecimiento. Los modelos más utilizados son el de la raíz cuadrada de Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1983), el modelo lineal de Arrhenius-Davey (Davey, 1989), que evalúa el logaritmo de la velocidad de crecimiento máxima mediante un polinomio que considera la temperatura,  $a_w$  y el pH (Panagou et al., 2003), el cardinal de Rosso (Rosso et al., 1993), que usa de modo empírico los valores máximos,



mínimos y óptimos de la temperatura o de la  $a_w$ , el polinómico de Gibson et al. (1994), que relaciona el logaritmo de la velocidad máxima de crecimiento con  $(1-a_w)$  mediante un polinomio y que, recientemente, ha incorporado la temperatura entre sus términos (Tassou et al., 2007). En Microbiología de alimentos se han usado modelos multilineales con términos cuadráticos para predecir el crecimiento de microorganismos o la producción de metabolitos y cuya representación gráfica da lugar a las superficies de respuesta (SR).

Finalmente, el concepto o modelo gamma (Zwietering et al., 1996) sostiene que el parámetro gamma ( $\gamma$ ) o cociente entre las velocidades de crecimiento máxima y óptima es el producto de funciones gamma mutuamente independientes de las variables relevantes (por ejemplo, T,  $a_w$  y pH). Tales funciones  $\gamma$  consideran los valores máximos y mínimos y, a veces, óptimos de esas variables.

Otro tipo de modelos llamados probabilísticos encaminados a predecir si un hongo puede crecer o no (regresión logística) han sido escasamente empleados.

En cualquier caso, los modelos predictivos desarrollados necesitan ser validados con datos distintos de aquellos usados en el diseño de los mismos para que sean aplicables con confianza a nuevos escenarios. Ross (1996) utilizó unos índices como el factor sesgo y el factor exactitud para validar estos modelos.

Mención aparte merecen las redes neuronales artificiales (RN). Se trata de sistemas de procesamiento de información consistentes en elementos simples de procesado llamado neuronas artificiales o nodos altamente interconectados y dispuestos en capas que llevan a cabo múltiples operaciones computacionales a gran velocidad produciendo a partir de datos de unas variables de entrada (inputs) otros de una o varias variables de salida (outputs) (Najjar et al., 1997; Basheer y Hajmeer, 2000; Hervás et al., 2001). Estos modelos han de ser entrenados suficientemente mediante determinados algoritmos de cálculo para aprender cuales son los valores correctos de la variable de salida y también deben ser validados adecuadamente con datos no usados para su elaboración. En el campo de la microbiología predictiva tales sistemas suelen clasificarse dentro de los modelos secundarios y han sido aplicados principalmente para pronosticar parámetros del crecimiento microbiano (Lou y Nakai, 2001a; García-Gimeno et al., 2002a; 2002b; 2005), la inactivación térmica de bacterias (Lou y Nakai, 2001b; Esnoz et al., 2006) o la producción de metabolitos (Poirazi et al., 2007). La mayor parte de estos

modelos trata de describir de modo empírico el resultado de los efectos combinados de factores ambientales sobre el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. Esta metodología ha superado a los modelos de SR en cuanto a exactitud predictiva de los parámetros del crecimiento bacteriano (Lou y Nakai, 2001a). Algunos modelos han sido aplicados a la predicción de parámetros del crecimiento de ciertos hongos (Panagou y Kodogiannis, 2009).

Todos estos modelos nacen de consideraciones empíricas y solo deben aplicarse dentro de los límites experimentales en que han sido ensayados.

Los modelos terciarios combinan los modelos primarios y secundarios proporcionando una completa herramienta de predicción (Marks, 2007). Por tanto, incluyen la influencia del tiempo junto con las de las demás variables conjuntamente. Precisan de software que saque partido de grandes bases de datos. Éstas existen pero están restringidas a microorganismos muy determinados (PMP, v.7.0; ComBase ([www.combase.cc](http://www.combase.cc))). Hasta el momento solo se han aplicado a bacterias patógenas pero no a hongos o micotoxinas.

Por lo que concierne a la producción de micotoxinas, existen menos modelos que para el crecimiento fúngico. Apenas hay modelos primarios que relacionen concentración con tiempo y solo para determinadas micotoxinas como las AFLs (Molina y Giannuzzi, 2002). Tampoco existen muchos modelos secundarios ya que se ha estudiado la influencia de temperatura,  $a_w$  y otras variables a tiempos determinados sobre la producción de algunas micotoxinas. Entre los modelos secundarios podemos citar los de regresión lineal múltiple (RLM) a veces traducidos en modelos predictivos de SR aplicados a la producción de OTA por *A. carbonarius* y agregado *A. niger* en uva (Bellí et al., 2004c). También la RLM fue utilizada por Medina et al. (2007a) para modelar la acumulación de OTA en cultivos de *A. carbonarius* en cultivos basados en mosto. El modelo sigmoidal de Gompertz fue aplicado también a la producción de OTA por *A. carbonarius* en medio sintético basado en uva señalándose la dificultad para obtener resultados reproducibles debido a la intrínseca variabilidad en la biosíntesis de esta toxina (Marín et al., 2006). Un modelo tipo Arrhenius fue aplicado a la producción de AFLs en función del pH y la temperatura por Pitt (1993) y uno polinómico a la producción de patulina en manzana y medios basados en manzana durante el almacenamiento en el que se consideró la temperatura, el % de O<sub>2</sub> y la superficie de la colonia (Baert et al., 2007).

Otra aproximación es la aplicación de RN al diseño de modelos predictivos, especialmente no lineales para pronosticar niveles de micotoxinas

en alimentos producidos como consecuencia del crecimiento y desarrollo de hongos toxigénicos.

En el campo de la micología de alimentos muy pocos modelos predictivos basados en RN se han estudiado y desarrollado. Las aplicaciones de los mismos se han dirigido a la clasificación de los granos de cereales como enmohecidos o sanos en base a la señal emitida por una nariz electrónica o para identificar hongos o bacterias que deterioran alimentos (Evans et al., 2000) o para describir el impacto de la temperatura o la  $a_w$  sobre la acumulación de tricotecenos en granos de cereales por especies de *Fusarium* (Hope et al., 2005). Mateo et al. (2008b; 2011) describieron y compararon diferentes modelos de RN (perceptrones multicapa y redes neuronales de base radial) para predecir la producción de deoxynivalenol en granos de trigo o cebada por *Fusarium graminearum* y *F. culmorum*, respectivamente, considerando temperatura,  $a_w$ , tamaño del inóculo y tiempo como variables de entrada. Estos sistemas se han aplicado asimismo a la predicción de la producción de OTA en cultivos de *A. carbonarius* basados en mosto teniendo como variables de entrada no solo temperatura,  $a_w$  y tiempo sino también la dosis del fungicida carbendazima (Mateo et al., 2009).

Estas herramientas capaces de predecir el desarrollo de hongos toxigénicos y la producción de sus toxinas en alimentos permitirían la aplicación de acciones preventivas y de control adecuadas. Los resultados obtenidos en la investigación desarrollada en los **ARTÍCULOS 3, 4, 5** e investigación complementaria (pendiente de publicación), recogida en el capítulo II, relativos al crecimiento de las especies fúngicas, y a la producción de las micotoxinas seleccionadas, en diferentes condiciones ambientales, y tratamientos con fungicidas, serán tratados con modelos matemáticos predictivos como redes neuronales artificiales, próximamente.





## **II. OBJETIVOS**



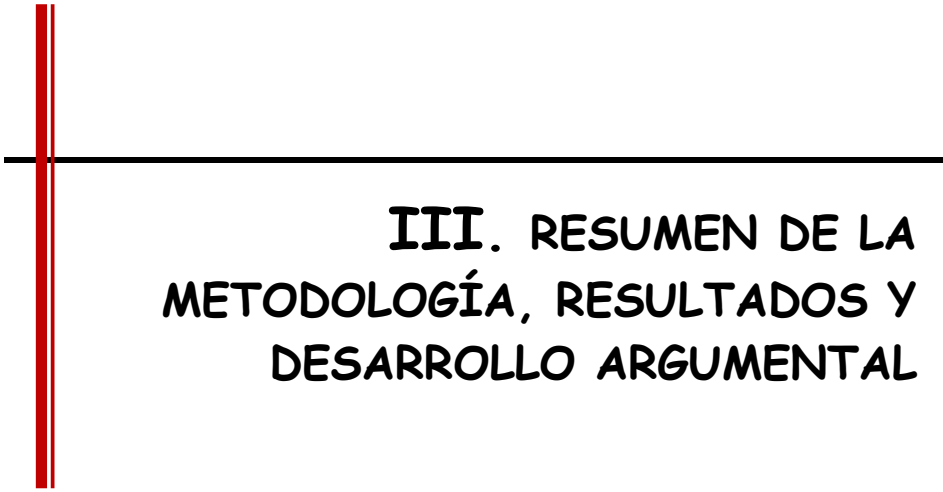
---

En base a lo expuesto en la Introducción, los objetivos de la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Caracterización de la micobiota potencialmente productora de micotoxinas en cebada española, cultivada en las principales regiones agro-climáticas, por técnicas clásicas y técnicas basadas en el DNA y estudio comparativo.
2. Determinación de las micotoxinas presentes en las muestras de cebada estudiadas en el objetivo 1 usando métodos de extracción, purificación y análisis cromatográfico optimizados y estudio de posibles relaciones entre peligro potencial y real de micotoxinas en una misma muestra.
3. Estudio de la eficacia de diferentes fungicidas usados en agricultura ecológica y convencional, en el control del crecimiento de las especies fúngicas (*A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus* y *F. langsethiae*) y producción de las micotoxinas (OTA, AFLs y las toxinas T-2 y HT-2) más relevantes. Diseño de estrategias sostenibles para su prevención.
4. Determinación de la influencia de las condiciones ambientales asociadas al cambio climático y sus interacciones en la eficacia de los fungicidas ensayados.
5. Estudio de la capacidad de *Oenococcus oeni* (bacteria del ácido láctico) para la reducción de OTA en matrices contaminadas con la toxina. Consideración de su posible utilidad con este fin en el procesado tecnológico de cosechas agrícolas contaminadas (cebada, uva, etc.). Diseño de estrategias sostenibles para la eliminación de la toxina en los productos derivados (cerveza, vino, etc).







### **III. RESUMEN DE LA METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**



---

En los diferentes apartados de la Introducción de esta Tesis Doctoral se ha descrito de forma detallada y ampliamente documentada, el estado actual de lo que se conoce sobre el peligro potencial y real de la presencia de las micotoxinas que se consideran más relevantes en cosechas agrícolas, en la actualidad. Se indican los alimentos de mayor riesgo y se describen los principales factores que afectan al desarrollo de los hongos productores y a la producción de las micotoxinas. Asimismo, se describen los intentos realizados en el diseño de estrategias para su prevención y control, las medidas legislativas vigentes para su regulación en los alimentos de mayor riesgo y la posibilidad de su predicción mediante la aplicación de métodos matemáticos. En este marco, en el presente apartado, se realizará una síntesis muy breve de lo allí expuesto con el fin de ubicar la investigación realizada en esta Tesis Doctoral y su aportación al avance del conocimiento en el tema. Los objetivos de la investigación llevada a cabo se han propuesto en base a los conocimientos previos indicados en la Introducción de forma que el trabajo realizado y sus resultados pudieran constituir un verdadero avance científico y dar respuestas a importantes retos de la sociedad relacionados con la calidad, y seguridad alimentarias. Los objetivos de la Tesis, se recogen también como objetivos prioritarios en los Planes de Investigación Nacionales y de la Unión Europea vigentes (Horizon 2020).

Para situar la investigación realizada en esta Tesis Doctoral, en primer lugar hay que recordar que estudios muy recientes indican que el cambio climático regional y global está afectando significativamente a los patrones de distribución de las especies fúngicas en las cosechas agrícolas y, en consecuencia, al tipo y niveles de micotoxinas en las mismas y en los alimentos derivados. Estas investigaciones muestran un incremento de ciertas especies micotoxigénicas e importantes micotoxinas, en cereales y frutas, favorecido por altas temperaturas y cambios en la humedad relativa. Estudios

predictivos sitúan a España como zona de riesgo debido a su situación geográfica y climatología.

Como ya se ha documentado igualmente en la Introducción, recientes informes del RASFF, de la EFSA y de la Comisión Europea han alertado a la comunidad científica y autoridades sanitarias sobre la necesidad de nuevas investigaciones sobre incidencia, prevención y control sostenible de hongos y micotoxinas emergentes, considerando como tales la OTA, las AFLs, y los tricotecenos del tipo A, las toxinas T-2 y HT-2, como posibles peligros que pueden comprometer la calidad y seguridad alimentarias. Los hongos relacionados con este problema son principalmente miembros del género *Aspergillus* de las secciones *Flavi*, *Nigri* y *Circumdati* y del género *Fusarium* de la sección *Sporotrichiella*.

El peligro que implica para la salud humana y animal la ingestión de estas micotoxinas ha llevado a numerosas investigaciones en alimentos, entre los que destacan, los cereales y derivados y la uva y derivados. Sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado, los estudios llevados a cabo en la última década, sumariados en el informe anual de la RASFF de 2013 publicado en 2014 (European Union, 2014) demuestran que las AFLs y la OTA son muy destacables como principales micotoxinas en alimentos en los últimos años, especialmente las primeras. Los estudios llevados a cabo apuntan a que las condiciones ambientales asociadas al cambio climático han sido la causa principal que ha agudizado el problema y su efecto ha convertido a las especies productoras y a estos compuestos en un objetivo prioritario en el marco de la calidad y seguridad alimentaria.

En lo que se refiere a las toxinas T-2 y HT-2, el interés de la Comisión Europea se basa en: (I) los datos disponibles sobre su toxicidad, (II) altos niveles de ambas toxinas encontrados en cereales en el centro y norte de Europa en los últimos años y (III) ausencia de información procedente de los Estados miembros del sur de Europa. En espera de esta información, en abril de 2013 se publicó en el Diario Oficial de la Unión Europea (European Commission, 2013) un conjunto de recomendaciones y medidas que afectan a los niveles provisionales admisibles para la suma de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales y derivados. En este documento se solicita de modo urgente a la comunidad científica de los Estados miembros información sobre diferentes aspectos relacionados con estos compuestos. Así, en el documento se puede leer: "En 2015 debe realizarse una evaluación de la información reunida en el marco de la presente Recomendación. Los datos obtenidos permitirán,

asimismo, comprender mejor la variación de un año a otro y la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en la amplia gama de productos a base de cereales, los factores que conducen a niveles superiores y las medidas que podrían tomarse para evitar o limitar la presencia de las toxinas T-2 y HT-2, incluso a través de factores agronómicos y a través de la transformación”. En el mismo documento se indica: “Los Estados miembros deben recomendar el análisis simultáneo de muestras para detectar la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 y otras toxinas de *Fusarium*, a fin de que pueda evaluarse su nivel de aparición conjunta”.

Se han planteado, por tanto, nuevos retos en investigación sobre estos hongos y micotoxinas emergentes en alimentos en el marco del cambio climático regional y global que será necesario afrontar y resolver en las diferentes regiones agroclimáticas, ya que se trata de compuestos naturales de origen microbiano y, por ello, ligados y dependientes de ese cambio.

Conscientes del estado actual del tema y de los retos prioritarios de la sociedad, en materia de seguridad alimentaria y salud (Horizon, 2020), la OTA, las AFLs, las toxinas T-2 y HT-2 y los hongos productores de las mismas, en cereales, como alimentos de mayor riesgo y, más concretamente, en cebada, han constituido pilares importantes en la investigación de esta Tesis Doctoral. Por otra parte, y adelantándonos a los requerimientos de la Comisión, se han estudiado medidas de control preventivas y medidas de control reductoras de las toxinas y de los hongos productores más relevantes en productos agrícolas claves en la economía española y mundial como son la cebada y sus derivados, y la uva y sus derivados.

Las estrategias de control estudiadas se han diseñado pensando en su posible implementación en unas buenas prácticas agronómicas y unas buenas prácticas de transformación tecnológica y producción de bebidas derivadas de la cebada o la uva. Todo ello ha constituido también importantes pilares en los que se han basado las hipótesis de partida y los objetivos a conseguir en esta Tesis Doctoral.

El trabajo se ha realizado en el seno de dos proyectos del Plan Nacional de I+D+i financiados por el MINECO con el título: “Presencia simultánea de micotoxinas en alimentos. Evaluación del peligro potencial y real” (AGL2007-66416-C05-01/ALI) y “Cambio climático y nuevos hábitos alimentarios: Nuevos escenarios con impacto potencial sobre el riesgo de micotoxinas en España” (AGL2010-22181-C04-03/ALI).

La investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral se recoge en **tres capítulos** compuestos, a su vez, por un total de **siete ARTÍCULOS**, que se incluyen en el ANEXO. En estos artículos se plantea, describe y discute en detalle la investigación realizada por lo que aquí se hace un resumen general breve de la misma. Por otra parte, en esta Tesis se incluyen también investigaciones muy recientes cuyos resultados no han sido publicados. Este trabajo inédito, relacionado con la especie *A. flavus*, AFLs y antifúngicos, requiere por ello, una exposición más amplia y detallada que se realiza en el capítulo II como **investigación complementaria**.

En base a lo expuesto, los capítulos de que se compone la tesis son los siguientes:

- **CAPITULO I** (Artículos 1 y 2). En él se estudia la micobiota y micotoxinas de la cebada cultivada en España.
- **CAPÍTULO II** (Artículos 3, 4, 5 e investigación complementaria pendiente de publicación). En este capítulo se aborda el estudio de estrategias para el control preventivo sostenible de las especies fúngicas y micotoxinas más relevantes, encontradas en la cebada y otros importantes cultivos agrícolas españoles, como la uva.
- **CAPÍTULO III** (Artículos 6 y 7). En él se recoge la investigación sobre estrategias para la reducción o eliminación de la OTA durante la transformación tecnológica de materias primas (cebada, uva, etc.) contaminadas y elaboración de derivados (cerveza o el vino) libres de toxina.

---

## CAPÍTULO I. Artículos 1 y 2

---

Como se explica y analiza en la Introducción, en el caso de los cereales, al contrario de lo que ocurre en otros productos agrícolas como la uva, las investigaciones relacionadas con hongos y micotoxinas, aunque más numerosas, se encuentran, sin embargo, menos actualizadas. Ello se debe al hecho de que a lo largo de la historia, los cereales se han mantenido como alimentos básicos en la dieta humana y animal en todo el mundo. Su ingesta diaria asociada al hecho de que pueden presentar diversas micotoxinas de forma simultánea, les ha convertido en los primeros alimentos asociados a intoxicaciones agudas en humanos y animales y, en consecuencia, los que

han atraído más atención y los más estudiados ya desde los inicios de la micotoxicología en los años sesenta.

Aunque los estudios en todo el mundo sobre la micobiota toxigénica de los cereales han sido muy numerosos, con frecuencia la identificación de las especies se ha realizado con técnicas e instrumentos menos resolutivos que los que se han empleado en el caso de la uva y derivados, cuyos estudios se han desarrollado, en su mayor parte, en la última década. Este hecho explica la existencia de numerosos trabajos en cereales que han quedado obsoletos y frecuentes identificaciones fúngicas y de micotoxinas son erróneas. Ello además, ha provocado discrepancias en la comunidad científica y, como resultado, el conocimiento de las especies fúngicas y micotoxinas contaminantes de cereales presenta una situación más confusa que en el caso de la uva y derivados.

La aplicación de técnicas basadas en el DNA para la identificación de los hongos y de métodos analíticos optimizados para la determinación de las micotoxinas, junto a la disponibilidad de infraestructuras más avanzadas está revelando la existencia de identificaciones incorrectas y nuevas especies fúngicas, así como niveles de micotoxinas en cereales más elevados de lo que se pensaba. A lo largo de la Introducción de la Tesis se realiza una revisión ampliamente documentada del estado actual del tema, que nos ocupa, en todos sus aspectos, por lo que aquí sólo se expondrá una visión general de conjunto muy breve para ubicar la investigación realizada en estos dos primeros artículos de la Tesis Doctoral.

En España el cereal con mayor producción y superficie de cultivo es la cebada y, sorprendentemente, en materia de micotoxinas, es el que menos se ha estudiado. Este cereal, como ya se ha descrito en la Introducción, es fundamental en alimentación humana y animal en todo el mundo. Por otra parte, el cambio climático regional y global está afectando a la distribución de especies fúngicas en las cosechas. Por ello, y tras una exhaustiva revisión bibliográfica, se ha llegado a la conclusión de la necesidad de actualizar el conocimiento sobre la identidad de los hongos productores de micotoxinas que se desarrollan en este cereal aplicando técnicas convencionales y técnicas basadas en el DNA y de evaluar los niveles de las micotoxinas contaminantes del mismo con métodos de extracción purificación y análisis cromatográfico actualizados y optimizados.

Considerando los datos de que se dispone, en cebada merecen especial atención estudios sobre las especies productoras de OTA, por ser los

cereales la primera fuente de la toxina en la dieta humana y animal, las AFLs, por la perfecta adaptación de las especies productoras al estrés hídrico y térmico asociado al cambio climático, y las toxinas T-2 y HT-2, por la urgente necesidad de su conocimiento para su inminente regulación en los países de la UE. También es necesario el estudio de otras especies fúngicas acompañantes posibles productoras de fumonisinas, tricotecenos B y zearalenona.

Con esta finalidad en los **artículos 1 y 2** de la Tesis se han empleado técnicas convencionales y, especialmente, técnicas basadas en el DNA y, más concretamente, en las regiones multicopia IGS e ITS del rDNA. De esta forma se ha resuelto buena parte de los problemas asociados a la subjetividad de la identificación fenotípica y a la variabilidad morfológica y fisiológica debida a las condiciones de cultivo del hongo. Estas técnicas son rápidas, específicas, de fácil aplicación y requieren muy poca cantidad de DNA molde, permitiendo la detección de moléculas diana en mezclas complejas como es el caso de la cebada. Por otra parte, el uso de estos métodos es especialmente útil para detectar la presencia de hongos no viables en la muestra que han podido colonizar previamente la semilla y producido micotoxinas que no será posible detectar mediante técnicas clásicas.

En lo que se refiere a la determinación de las micotoxinas en las muestras de cebada, hay que destacar que ello requiere métodos muy precisos que garanticen su adecuada extracción, purificación y análisis, ya que pueden encontrarse en la muestra a niveles extraordinariamente bajos y, por tanto, si el método no presenta bajos límites de detección podrían detectarse falsos negativos. Por otra parte, al contrario que en otros cultivos agrícolas como la uva, en cebada, con frecuencia, se encuentran diferentes micotoxinas simultáneamente. La particular estructura química de las diferentes micotoxinas requiere el empleo de diferentes disolventes o mezclas de disolventes hasta obtener la polaridad adecuada para una máxima extracción. Del mismo modo las características de la molécula van a afectar a la elección del método de purificación y análisis cromatográfico.

Los métodos cromatográficos diseñados para la multidetección de todas las posibles micotoxinas contaminantes de un cereal, tienen serias limitaciones. Con frecuencia, los límites de detección pueden ser aceptables para algunas micotoxinas pero no así, para otras, llegando a ser inadmisibles. Estos métodos implican el empleo de equipos de cromatografía dotados de detectores de espectrometría de masas lo que encarece en gran medida el



precio del equipo y limita su uso. La optimización de métodos analíticos capaces de determinar una o un grupo de micotoxinas, que sean reproducibles, fiables y presenten bajos límites de detección, es deseable, aunque la determinación, de todas las posibles micotoxinas del cereal, requiera la realización de varios análisis, dependiendo de las micotoxinas que se pretenda analizar en la muestra. Este ha sido el principio que se ha seguido y predominado en la investigación desarrollada en la Tesis.

Por otra parte, es importante considerar que un buen método analítico no debería ser aquel que es capaz de detectar las micotoxinas que se encuentran en la muestra a los niveles admisibles por la legislación vigente, sino el que es capaz de detectar en la muestra micotoxinas y cuantificar las mismas, aunque se encuentren a niveles muy bajos.

En la investigación desarrollada, el límite de detección del método se ha considerado, por tanto, fundamental, ya que las micotoxinas llegan al consumidor a través de diversos alimentos que componen su dieta y es necesario tener en cuenta el efecto sumatorio de cada una de las micotoxinas, que se encuentran en cada uno de ellos. Esta investigación es prioritaria en seguridad alimentaria, ya que la ingesta diaria admisible podría verse seriamente comprometida si no se conoce la cantidad de las diferentes micotoxinas que puede aportar cada alimento. Por otra parte, muchas micotoxinas presentan efectos sinérgicos.

En base a ello, **se plantearon los objetivos primero y segundo** de esta Tesis Doctoral. Los detalles del trabajo desarrollado para la consecución de ambos objetivos se describen en los **ARTÍCULOS 1 Y 2**.

## **ARTÍCULO 1**

En este trabajo, la investigación se centra por una parte, en el estudio de las especies de *Aspergillus*, contaminantes de la cebada cultivada en España, potencialmente productoras de OTA o AFLs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>) y, por otra, a la determinación de esas micotoxinas en las muestras. Las muestras de cebada se recogieron en almacenes o silos pocos días después de su cosecha y, como se detalla en el artículo, procedían de cebada cultivada en las principales regiones agroclimáticas españolas productoras del cereal. Se analizaron muestra de cebada de invierno o periodo de cultivo largo y de primavera o periodo corto.

Para la identificación de *Aspergillus* spp. se emplearon métodos clásicos basados en la morfología, colonial y microscópica, y se cuantificó el número de esporas viables mediante recuentos de UFC/g en medios adecuados. Estos métodos permitieron evaluar el nivel de contaminación de la cebada con *Aspergillus* spp. viables de las secciones *Flavi*, *Circumdati* y *Nigri* que constituían nuestro objetivo. Los hongos fueron paralelamente identificados usando protocolos de PCR específicos para *A. flavus* y *A. parasiticus* (especies de la sección *Flavi*, productoras de AFLs), *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* y *A. steynii* (especies de la sección *Circumdati*, productoras de OTA), *A. carbonarius* y *Aspergillus* del agregado *niger* (especies de la sección *Nigri*, productoras de OTA).

La extracción de OTA y AFLs a partir de la cebada se realizó usando un método optimizado poco usual, a alta temperatura y presión, en un equipo de extracción líquida acelerada (Accelerated Solvent Extraction, ASE), lo que garantizó su óptima extracción. La purificación de las micotoxinas se realizó mediante columnas de inmunoafinidad específicas para estas micotoxinas (AflaOchra immunoaffinity columns) lo que facilitó una perfecta eliminación de impurezas y la obtención de posteriores cromatogramas sin interferencias. El análisis de los extractos purificados se realizó mediante LC con detector de fluorescencia por ser el más sensible para la detección de estas micotoxinas. Además de ello, para aumentar la sensibilidad y optimizar el límite de detección se realizó una derivatización post-columna de AFLB<sub>1</sub> y AFLG<sub>1</sub> con yodo. Los detalles sobre el método, su validación y límites de detección y cuantificación, se muestran y discuten en el primer artículo, de los dos que componen este capítulo de la Tesis. El método de multidetección, propuesto en este trabajo, para el análisis de AFLs y OTA en cebada presenta un LOD de 0,01 ppb para AFB<sub>1</sub> y AFLB<sub>2</sub>, de 0,015 ppb para AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> y de 0,05 ppb para OTA. El LOQ de método fue de 0,035 ppb para AFB<sub>1</sub> y AFLB<sub>2</sub>, de 0,05 ppb para AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> y de 0,17 ppb para OTA. El método optimizado en este trabajo supone una mejora muy significativa de los métodos publicados hasta ahora cuyo resumen se muestra en la Figura 12 de la Introducción.

Entre los resultados sobre la presencia de especies de *Aspergillus* spp productoras de AFLs y OTA en cebada se puede destacar: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, y especies del agregado *A. niger*. De entre ellas, las especies *A. steynii* y *A. carbonarius* no habían sido encontradas en cebada previamente al empleo de métodos de PCR. Por otra parte, de las 105 muestras de cebada estudiadas, en 29 se encontraron micotoxinas, de ellas 21 fueron positivas para OTA y 13, 3, 5 y 3 presentaron

AFLB<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>1</sub> y AFLG<sub>2</sub>, respectivamente. Este es el primer trabajo en el que se describe la presencia de AFLs en cebada y en el que se encuentra porcentajes más elevados de muestras contaminadas con OTA.

En este trabajo se realiza también un estudio crítico comparativo de los resultados obtenidos por técnicas clásicas y técnicas de PCR aplicadas a la identificación de los hongos, directamente en muestras. Se discute asimismo las ventajas de los métodos de PCR basados en regiones multicopia, como las usadas en este trabajo, sobre las de copia única y se analiza la posible correlación entre presencia de especies fúngicas productoras de las toxinas e incidencia de las micotoxinas correspondientes en la muestra.

En base a la bibliografía y a trabajos previos de nuestro grupo, en este trabajo se hace referencia también a la influencia que pueden tener diferentes tratamientos tecnológicos de los cereales en el aumento o disminución de la OTA inicialmente presente en el mismo.

## **ARTÍCULO 2**

En él se realiza un estudio complementario al que se recoge en el primero. Con este segundo trabajo se pretendía completar el estudio de la micobiota productora de micotoxinas en cebada iniciada en el trabajo anterior. En base a ello, en este caso la investigación se centró en la caracterización de las especies de *Fusarium* y micotoxinas producidas en las muestras y en base a los resultados en evaluar la coexistencia de hongos y micotoxinas en una misma muestra.

Al igual que en el primer trabajo, para el análisis fúngico de las muestras de cebada se emplearon métodos clásicos de identificación basados en la morfología y se determinó el número de UFC/g usando dos medios de cultivo especialmente apropiados para el crecimiento de *Fusarium* spp. Paralelamente, para la identificación de las especies de se emplearon protocolos de PCR específicos de especie, diseñados y puestos a punto previamente como se detalla en el artículo.

Para la determinación de las micotoxinas, se usaron protocolos de extracción, a alta temperatura y presión, seguidos de una purificación en columna en fase sólida cuya composición fue variable en función de la micotoxina o micotoxinas a analizar y, finalmente, el análisis cromatográfico de los extractos purificados se realizó mediante LC con detectores de fluorescencia o de red de diodos para la ZEA y las FB1 y FB2 y mediante GC

con detectores de captura de electrones o de espectrometría de masas para los tricotecenos A ( las toxinas T-2 y HT-2 y los tricotecenos B (DON y NIV).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las especies de *Fusarium* más abundantes en cebada cultivada en España, recién cosechada son *F. graminearum* y *F. verticillioides* y las más importantes micotoxinas, DON, ZEA, FUMs, NIV y los tricotecenos de tipo A (HT-2 y T-2). En los cuatro primeros casos se encontró una buena correlación entre micotoxinas y especies productoras. Sin embargo, en el caso de los tricotecenos de tipo A, no se detectaron especies productoras en las muestras positivas para estas toxinas.

Si se consideran los **Artículos 1 y 2** en su conjunto se puede concluir que de las 29 muestras de cebada seleccionadas para este estudio, por su mayor contaminación con hongos, en 4, 8, 6, 9 y 2 de ellas se encontraron respectivamente 1, 2, 3, 4 y 5 micotoxinas, por lo que se puede concluir que en las muestras de cebada estudiadas, aunque a niveles que no superan los límites máximos autorizados, se pueden encontrar hasta 5 micotoxinas simultáneamente en una misma muestra. De entre las micotoxinas encontradas destaca la OTA tanto por número de muestras contaminadas con la toxina como por los niveles encontrados. Por otra parte, destaca también la presencia de AFLs en 13 de las 29 muestras ya que nunca antes habían sido detectadas AFLs en cebada. Los detalles de la investigación, resultados y discusión se describen en los dos artículos a que se ha hecho referencia.

Finalmente, hay que destacar nuevos resultados encontrados en investigaciones posteriores a las recogidas en estos dos trabajos que se encuentran pendientes de publicación. Estas investigaciones han tenido por objeto estudiar otras posibles especies de *Fusarium* que pudieran explicar la presencia de las toxinas HT-2 y T-2 en las tres muestras de cebada en las que no se había detectado ninguna de las especies descritas como productoras de esas toxinas. Estos estudios nos han llevado a la identificación de la especie *F. langsethiae* en esas muestras. Esta especie ha sido detectada anteriormente en cebada, trigo y, especialmente, avena, en países del centro y norte de Europa donde se ha asociado a una elevada incidencia de HT-2 y T-2 pero hasta ahora no se había encontrado en ningún cereal cultivado en España.

Hasta el presente, en España, los cereales que han tenido mayor impacto en la elaboración de derivados para consumo humano han sido la cebada, el trigo, el maíz, y el arroz y, en menor medida, otros cereales como

la avena. En otros países como Reino Unido, Alemania, etc. es más frecuente el empleo de avena en panadería, elaboración de cereales de desayuno, pasta alimenticia, galletas, etc. Sin embargo, en los últimos años la preocupación por una dieta sana y equilibrada ha conducido a que se potencie, también en nuestro país, el uso de la avena en alimentos habituales en la dieta de la población española, bien como integrante de productos más clásicos constituidos por mezclas de cereales como galletas, cereales de desayuno, pan integral, etc. o bien, como ingrediente de alimentos ricos en fibra como, salvados y alimentos funcionales como, prebióticos, por su alto contenido en  $\beta$ -glucanos que potencian el crecimiento de microorganismos beneficiosos que habitan en el colón. Investigaciones en avena consumida en España similares a las realizadas en esta Tesis en cebada son necesarias y ello constituye uno de nuestros objetivos en futuros trabajos.

## CAPÍTULO II. Artículos 3, 4, 5 e investigación complementaria

---

El mayor obstáculo con el que se encuentran los investigadores a la hora de diseñar métodos para la eliminación o reducción de micotoxinas, en una determinada cosecha agrícola contaminada, es el hecho, de que se trata de moléculas muy resistentes a los posibles tratamientos físicos, químicos y biológicos a los que pudiera ser sometido el producto agrícola, sin que ello afecte a la calidad del mismo o a la salud de los consumidores.

El análisis de la literatura científica sobre el tema, realizado en la Introducción de esta Tesis, indica que, en la actualidad, en la comunidad científica existe la convicción de que el mejor método para el control de hongos y micotoxinas en alimentos es su prevención, ya que su eliminación raramente es posible. La investigación de medidas de control preventivas de estos metabolitos fúngicos en alimentos es un objetivo prioritario en el campo de la seguridad alimentaria y, por ello, debe prestarse especial atención al diseño y aplicación de unas BPA que permitan controlar el desarrollo de los hongos toxigénicos en la planta. Esta es la primera puerta de entrada del parásito y, por tanto, del peligro potencial de que se produzcan y acumulen micotoxinas en la cosecha. Esta prevención debe continuar también en post-cosecha de aquellos vegetales que sufren periodos más o menos prolongados de almacenamiento, como es el caso de los cereales.

En el transcurso de la introducción de la Tesis se han analizado y documentado, los principales factores que afectan a la producción de micotoxinas en cosechas agrícolas (apartado 6), lo que nos lleva a la comprensión de que el investigador se enfrenta a un sistema extremadamente complejo de factores bióticos y abióticos e interacciones entre ellos que pueden afectar al desarrollo de los hongos y a la producción de las micotoxinas. En pre-cosecha la incertidumbre asociada a la climatología y condiciones meteorológicas y la imposibilidad de su control por tratarse de un ecosistema abierto, tiene una fuerte influencia en la elección por el agricultor de prácticas ecológicas o tradicionales.

La agricultura ecológica, aunque deseable, debe ser abordada con cautela, ya que su práctica, puede aumentar el nivel de micotoxinas en la cosecha por deficiencias en el control de los hongos productores. Ante los peligros asociados a la presencia de fungicidas o de micotoxinas en la cosecha, todos los investigadores coinciden en la priorización del segundo, sin que ello signifique menosprecio del primero.

La elevada toxicidad de algunas micotoxinas y su resistencia y permanencia en el sustrato, después de los tratamientos tecnológicos de transformación de las materias primas, son argumentos determinantes que apoyan el uso de agentes antifúngicos para el control preventivo de los hongos productores. Esta práctica debe realizarse en su justa medida y respetando los periodos de seguridad de cada producto. Sin duda, la integración, o no, del uso de agentes antifúngicos en unas BPA, requiere un estudio crítico minucioso en cada caso.

El empleo de un determinado agente antifúngico, siempre va precedido de numerosos estudios sobre su mecanismo de acción, toxicidad selectiva y, frecuentemente, sobre su especificidad frente a especies fúngicas concretas, pero estos estudios siempre se han centrado en antifúngicos contra especies fitopatógenas, es decir, especies que producen deterioro de las cosechas o pérdida de las mismas. Sin embargo, es muy necesario investigar y conocer la eficacia de los fungicidas comerciales y, en su caso de nuevos compuestos, contra especies productoras de micotoxinas, afecten, o no, a la integridad de la planta porque, sin duda, afectarán a la salud de los consumidores.

Atendiendo al daño visible que los hongos toxigénicos pueden producir en la planta, se pueden considerar dos grandes grupos, los hongos fitopatógenos y los que no lo son. Para los primeros como es el caso, por ejemplo, de las especies *F. graminearum* o *F. culmorum*, que causan la

conocida “*Fusarium Head Blight*” en trigo y otros cereales, se han realizado diversos estudios que se describen en la Introducción, orientados a la determinación de la eficacia de diferentes tratamientos con agentes antifúngicos para el control del desarrollo del hongo y de la producción de micotoxinas como zearalenona o tricotecenos B, especialmente DON. Por el contrario, a las especies que producen micotoxinas pero no son invasivas o patógenas para el vegetal como ocurre con *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus* y, especialmente, *F. langsethiae*, se ha prestado muy poca atención. Su control no despierta el interés del agricultor y, en consecuencia, tampoco, el de fabricantes y comerciantes de antifúngicos y, sin embargo, su falta de control puede afectar gravemente a la salud de los consumidores.

En base a lo expuesto, en esta Tesis Doctoral se aborda el estudio de la eficacia de diferentes agentes antifúngicos, usados en agricultura ecológica y tradicional frente a las más importantes especies especies fúngicas, productoras de OTA en cebada y uva y de AFLs y tricotecenos A (T-2 y HT-2) en cebada. Las especies seleccionadas fueron *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. flavus* y *F. langsethiae*.

En lo que se refiere a la elección de *A. carbonarius*, los resultados obtenidos en la investigación descrita en el artículo 1 indican que en cebada existe una fuerte presencia de la especie *A. carbonarius*, especie, que no había sido detectada en cereales anteriormente a este estudio, para el que se han empleado técnicas basadas en el DNA. Adicionalmente a los resultados obtenidos en cebada en el artículo 1 de la Tesis, estudios previos a esta Tesis han demostrado que *A. carbonarius* es la principal especie implicada en la presencia de OTA en uva y, por tanto, en vino. Teniendo en cuenta que los cereales y sus derivados y la uva y sus derivados son considerados la primera y segunda fuente de OTA en la dieta, respectivamente, es obvia la necesidad de investigar estrategias que permitan el control preventivo del desarrollo de *A. carbonarius* en las cosechas de cebada y uva.

Es también prioritario el control preventivo de la especie *A. ochraceus* ya que, además de haber sido encontrada en cebada en esta Tesis, esta especie ha sido considerada, tradicionalmente, como responsable de la producción de OTA en cereales en países situados en latitudes similares a la de España. Del mismo modo, *A. flavus* destaca por su elevada incidencia en las muestras de cebada estudiadas y por ser esta Tesis, el primer trabajo en el que se describe la presencia de AFLs en cebada. Todas ellas son especies para las que es necesario el estudio de medidas preventivas que controlen su

desarrollo evitando así la entrada de las más importante micotoxinas en la cadena alimentaria como son la OTA y las AFLs.

Para los ensayos de eficacia de antifúngicos también se ha seleccionado la especie *F. langsethiae*, especie productora de T-2 y HT-2. Este hongo es especialmente interesante porque no produce ninguna sintomatología negativa visible en la cosecha y, por tanto, pasa desapercibida para el propio agricultor. Sin embargo, esta situación ha tenido como consecuencia, la existencia de elevados niveles de HT-2 y T-2 en cereales, sobre todo, en el centro y norte de Europa y, especialmente, en avena. Por otra parte, la similitud morfológica entre *F. langsethiae* y *F. poae*, ambas de la sección *Sporotrichiella*, ha contribuido también a su confusión en el pasado y, por tanto, a la falta de conocimiento que se tiene en la actualidad sobre su distribución geográfica, y en los diferentes cultivos. En España no se ha publicado hasta la fecha ningún estudio sobre esta especie.

La información de que se dispone sobre la alta presencia de HT-2 y T-2 en cereales, en los últimos años, ha sido la que ha potenciado e intensificado la búsqueda de las especies productoras de las toxinas en cereales, y las técnicas basadas en el DNA han sido la herramienta que lo ha hecho posible. Los resultados han permitido determinar que *F. langsethiae* es la principal especie implicada en la producción de HT-2 y T-2 en cereales. Anteriormente a esta Tesis Doctoral no se había estudiado el efecto de ningún agente antifúngico contra *F. langsethiae*.

Los antifúngicos seleccionados en principio para el estudio con *A. carbonarius* y *A. ochraceus* fueron compuestos no selectivos, como azufre y oxiclورو de cobre, autorizados en agricultura ecológica, y un tercero, mancozeb, usado en agricultura convencional. Ante la escasa eficacia de estos antifúngicos frente a *A. flavus* y *F. langsethiae*, en la investigación con estas especies se probaron otros compuestos más selectivos usados en agricultura convencional como fempropimorf, tebuconazol y procloraz.

Finalmente, hay que destacar que en la investigación desarrollada en este apartado de la Tesis, además del tipo de fungicida y la dosis, se ha considerado también la importancia que tienen las condiciones ambientales y, más concretamente, la actividad de agua y la temperatura ya que ambos factores ambientales van asociados siempre a la posible acción que pudiera tener el principio activo. Estos factores y sus interacciones han sido parámetros fundamentales en todos los ensayos realizados, dirigidos a la determinación de la efectividad de los diferentes agentes antifúngicos



estudiados, tanto en lo que se refiere a su capacidad para controlar el crecimiento de las especies fúngicas ensayadas, como a su capacidad para controlar la producción de las diferentes micotoxinas estudiadas.

En base a lo expuesto, **se plantearon los objetivos 3 y 4** de la Tesis. Para su consecución se desarrolló la investigación que se describe en los **ARTÍCULOS 3, 4 y 5** e **investigación complementaria** (datos no publicados). Por tratarse de una investigación inédita se introduce, describe y discute de forma detallada en inglés, con objeto de mantener la misma lengua que en los artículos incluidos en el anexo. En estos trabajos se describe en detalle la importancia de la investigación desarrollada, el material y métodos utilizados, y los resultados, discusión y conclusiones del trabajo realizado en cada caso, por lo que a continuación, solo se realiza un breve resumen.

### **ARTÍCULO 3**

En este trabajo se estudia por vez primera la efectividad de tres fungicidas, azufre, oxiclورو de cobre y mancozeb, en el control del crecimiento y producción de OTA por dos especies ocratoxigénicas seleccionadas. Los dos primeros fungicidas se emplean en agricultura ecológica y el tercero en agricultura convencional. Las especies fúngicas que se eligieron fueron *A. carbonarius* y *A. ochraceus*, por su relevancia en cebada y uva cultivada en España.

Para el estudio, se emplearon medios basados en cebada y otros componentes. Las variables estudiadas fueron: tipo de fungicida, dosis, especie fúngica, temperatura, actividad de agua y tiempo de incubación. Todos estos parámetros fueron seleccionados con el objetivo de que los resultados obtenidos pudieran tener la máxima utilidad y posible implementación en unas BPA. Las dosis de fungicida fueron elegidas en base a experimentos preliminares con el fin de minimizar la concentración a emplear y determinar el rango de concentraciones más adecuado para cada fungicida que pudiera prolongar al máximo la fase lag y disminuir al máximo la velocidad de crecimiento.

Las condiciones de incubación de los cultivos se eligieron en base a las condiciones ambientales que se presentan en diferentes regiones agroclimáticas españolas. Las experiencias se realizaron a 15 y 25 °C, por ser las temperaturas medias que se registran en las regiones de cultivo de cereales de invierno y primavera, respectivamente y de cultivo de la uva. Así

mismo se empleó una  $a_w$  acorde con la humedad relativa media de estas regiones. En todas las condiciones se realizó un seguimiento diario de la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* y *A. ochraceus*, mediante medida del crecimiento radial de la colonia (mm/día) y de la producción de OTA. La determinación de la toxina se realizó usando protocolos optimizados de extracción, purificación y análisis por LC-FLD por ser el sistema más sensible para la detección de OTA. Con el método seleccionado se obtuvo una recuperación de la toxina del 89%.

Entre los resultados obtenidos se puede destacar que *A. ochraceus* presenta una velocidad de crecimiento superior a la de *A. carbonarius* en las mismas condiciones ambientales y las dos especies crecen mejor a 25 °C que a 15°C, tanto en ausencia como en presencia de fungicidas, por tanto *A. ochraceus* es más resistente a los tres fungicidas que *A. carbonarius*. Los niveles de OTA en el medio, generalmente siguieron el mismo patrón que el que se registró para el crecimiento. En consecuencia, los cultivos de cebada de primavera presentan mayor contaminación fúngica y mayor riesgo de contener OTA que los de invierno.

De los fungicidas ensayados, mancozeb fue el más activo; inhibió el crecimiento cuando se empleó a concentraciones de 40 mg/l, seguido de oxiclورو de cobre y de azufre que fue el menos eficaz, llegando a concentraciones de hasta 8 g/litro. En general la efectividad de los fungicidas fue menor a 25 °C que a 15 °C, tanto para la inhibición del crecimiento como para la producción de OTA. Es importante destacar que de los tres fungicidas estudiados, mancozeb es un compuesto que presenta mayor toxicidad que los otros dos y no está autorizado su uso en agricultura ecológica.

En resumen, los factores que influyeron en la producción de OTA fueron: especie fúngica (*A. ochraceus* más productora que *A. carbonarius*), tipo de fungicida y dosis, temperatura y tiempo de incubación. Por otra parte, es destacable que, en condiciones de mediano estrés ambiental y bajas concentraciones de fungicidas, se observó un aumento de los niveles de OTA con respecto a los controles carentes de fungicida.

Los resultados obtenidos son de gran interés, ya que se trata de fungicidas usados ampliamente en cultivos agrícolas, base de la alimentación humana y animal, y no se conoce su efectividad en el control del crecimiento de especies productoras de micotoxinas y en la acumulación de estos metabolitos tóxicos en la cosecha. En el estudio realizado se observa que el fungicida, dosis, condiciones ambientales y sus interacciones son factores

clave en el crecimiento y fisiología de *A. carbonarius* y *A. ochraceus*. Por ello, es necesario realizar estudios complementarios en campo en las diferentes regiones agrícolas para optimizar las dosis de empleo de estos compuestos. Estos estudios son necesarios para minimizar y si es posible evitar la presencia de OTA en alimentos y piensos.

#### **ARTÍCULO 4**

En este trabajo la investigación se centró en la especie *F. langsethiae*, por ser la mayor responsable de la presencia de las toxinas T-2 y HT-2 en cereales en Europa y por el hecho de haber sido detectada por vez primera en España, hecho que se ha producido recientemente y ya en la última etapa de la Tesis. Se ha encontrado en tres muestras de cebada y en cinco muestras de avena recogidas en campos situados en el valle del Ebro (datos pendientes de publicación).

En una primera fase del trabajo, necesaria para determinar las concentraciones de cada fungicida que se debían usar en la investigación, se pudo observar que los fungicidas empleados en el artículo 3 (azufre, oxiclورو de cobre y mancozeb) presentaban escasa actividad frente a *F. langsethiae*. Era necesario el uso de niveles de fungicida excesivamente elevados para inhibir el crecimiento del hongo y la producción de las toxinas. Estos niveles se consideraron poco útiles en la práctica por lo que se decidió descartar estos tratamientos y probar otros fungicidas más selectivos. Por ello se estudió la eficacia de los dos azoles, procloraz y tebuconazol y una morfolina, fempropimorf, en el control del crecimiento de *F. langsethiae* y en la producción de las toxinas T-2 y HT-2, en diferentes condiciones ambientales.

Para los ensayos se empleó un medio elaborado a base de avena, por tratarse de una especie que se encuentra principalmente en este cereal en países del centro y norte de Europa, aunque trabajos muy recientes indican que podría haberse adaptado a temperaturas más elevadas, propias de países del sur. Los valores de temperatura elegidos para el trabajo fueron 15, 20 y 25 °C y los niveles de  $a_w$ , 0,96 y 0,98. Por tanto, las variables a estudiar fueron: cepa fúngica, tipo de fungicida y dosis, temperatura,  $a_w$ , y tiempo. Como en el trabajo anterior, las dosis de fungicida fueron elegidas en base a experimentos preliminares para determinar el rango de concentraciones a ensayar, de modo que proporcionaran un amplio abanico de velocidades de crecimiento, permitiendo así analizar su efecto en la producción de las toxinas. Por otra parte, hay que destacar que se ensayaron numerosos

niveles de fungicida en orden a determinar de forma precisa la ED<sub>50</sub> (dosis que produce una disminución de la velocidad de crecimiento del hongo en un 50%) y ED<sub>90</sub> (dosis que produce una disminución de la velocidad de crecimiento del hongo en un 90%) para cada fungicida y condición ensayada.

Para calcular la tasa o velocidad de crecimiento del hongo y la producción de las toxinas T-2 y HT-2 en las diferentes condiciones, se tomaron medidas diametrales de la colonia, diariamente para calcular la tasa de crecimiento en mm/día, y se determinaron los niveles de las toxinas en todas las condiciones ensayadas y a diferentes tiempos de incubación. Para ello se usó un protocolo optimizado, previamente, para la óptima extracción y detección de las toxinas por LC-PDA.

Los resultados mostraron que los factores que influyen en la velocidad de crecimiento de *F. langsethiae* son: la temperatura (en el orden 25 °C >20 °C >15°C), el tipo de fungicida, (el que tuvo efectos más negativos en el crecimiento fue procloraz seguido de tebuconazol, el cual fue 4-6 veces menos efectivo que procloraz) y fempropimorf (de 100-500 veces menos efectivo que procloraz), y la dosis (en general el crecimiento disminuye a medida que aumenta la dosis de fungicida). Los valores de ED<sub>50</sub> y ED<sub>90</sub> para procloraz oscilaron entre 0,03–0,1 y 0,3–1,5 mg/l, para tebuconazol entre 0,06–0,9 y 1,3–8,2 mg/l y para fempropimorf entre 22–59 y 125–215 mg/l, respectivamente. La eficacia de los fungicidas para controlar el crecimiento del hongo fue siempre mayor a 15 que a 25 °C. La influencia de la  $a_w$  y la cepa en el crecimiento fue variable y dependiente de las condiciones de incubación. La producción de T-2 y HT-2, en general, sigue el mismo patrón que el crecimiento. Sin embargo, hay que destacar que los fungicidas son más eficaces en el control de la producción de las toxinas a  $a_w$  0,98 que a 0,96. El estrés hídrico en el hongo produce un aumento de la producción de las toxinas. Ello indica que los años de sequía pueden ser especialmente conflictivos. Como en trabajos anteriores en condiciones de mediano estrés ambiental y dosis bajas de fungicida se detecta una inducción de la producción de las toxinas. La información detallada se encuentra en el artículo correspondiente.

El hecho de que la  $a_w$  tenga en general poca influencia en el crecimiento de *F. langsethiae* indica que a pesar de ser una especie de *Fusarium*, género que en general requiere valores elevados de  $a_w$  para desarrollarse, es muy resistente a condiciones de escasez de agua. Por otra parte, también hay que destacar que a pesar de ser una especie propia de

climas fríos, los resultados muestran que presenta una perfecta adaptación a temperaturas medias-altas (25 °C). Estas propiedades le convierten en una especie muy competitiva en condiciones de estrés hídrico y térmico en campo en países del sur de Europa. Por tanto, hay que considerarla como un posible riesgo a estudiar y controlar en cereales en los próximos años. Hay que destacar también que se trata de una especie que no produce ninguna sintomatología visible en la cosecha y, además, su identificación, frecuentemente se realiza de forma errónea por su similitud morfológica con *F. poae*, especie poco productora de T-2 y HT-2. Todo ello apunta a la necesidad de una profunda revisión y actualización de la información sobre esta especie y su control en cereales en Europa y, muy especialmente, en países del sur, donde no se dispone de ninguna información.

## **ARTÍCULO 5**

En él se avanza en la investigación realizada en el artículo anterior pasando a estudiar la eficacia de los fungicidas frente a *F. langsethiae* directamente en granos de avena. El planteamiento de la experiencia fue similar al estudio anterior y también aquí, las variables a estudiar fueron; cepa fúngica, tipo de fungicida y dosis, temperatura,  $a_w$ , y tiempo. Para conseguir una mayor aproximación a las condiciones naturales, en grano se ensayó un nivel de  $a_w$  más bajo que en el estudio anterior, 0,95. Otra diferencia importante fue que las dosis de fungicidas empleadas en este estudio, en grano, fueron mucho más elevadas que en el trabajo anterior debido a que en los ensayos previos, para fijar el rango de concentraciones a emplear en la investigación, se observó que las dos cepas de *F. langsethiae* empleadas en el estudio eran mucho más resistentes a los tratamientos cuando los cultivos se efectuaban directamente en grano, que cuando se realizaban en medio elaborado con sólo un 3% de harina del cereal.

Los resultados mostraron que los factores que influyen en la velocidad de crecimiento son la temperatura (25 °C >15 °C), la  $a_w$  (0,98 > 0,95) tipo de fungicida (nuevamente se observa que el más eficaz es procloraz seguido de tebuconazol y fenpropimorph), la dosis (a medida que aumenta la dosis de fungicida disminuye la velocidad de crecimiento). Los valores de ED<sub>50</sub> en mg/kg son: para procloraz 0,25-4,2, para tebuconazol 0,3-14 y para fempropimorf 65-270. Los respectivos valores de ED<sub>90</sub> en mg/kg son: 0,5 - > 10, de 0,5 - > 15 y de 170 - > 800 para los tres fungicidas. El análisis con respecto a la eficacia de los fungicidas mediante el test de Duncan determinó la

existencia de dos grupos: uno agrupa los dos azoles y en el segundo se sitúa sólo fempropimorf. Los tres fungicidas son menos efectivos frente a *F. langsethiae* en granos de avena que en medio elaborado con un 3% de avena empleado en el trabajo anterior.

En lo que se refiere a producción de T-2 y HT-2 hay que destacar que los niveles de la suma de ambas toxinas producidos en granos de avena son superiores a los que se producen en medios elaborados con un 3% de avena. Al contrario de lo que se encontró en el trabajo anterior, en avena los niveles de HT-2 son más elevados que los de T-2. Estos resultados y los publicados recientemente por otros autores indican que en grano existe un rápido metabolismo de la T-2 a HT-2. En base a ello y a que los estudios de toxicidad indican que ambos compuestos presentan una toxicidad similar, la Comisión Europea ha publicado niveles provisionales admisibles para estas toxinas en cereales en los que se contempla un único valor y este corresponde a la suma de los niveles de ambas toxinas en la muestra.

Los factores que influyeron en la producción de las toxinas HT-2 y T-2 por *F. langsethiae* en avena fueron:  $a_w$ , (no se detectó ninguna de las toxinas en los medios con  $a_w$  0,95, suplementados con fungicidas), temperatura (25 °C > 15 °C), tipo de fungicida y dosis (el menos permisivo fue prochloraz seguido de tebuconazol y fenpropimorph) y tiempo de incubación (21 > 14 días). No se observaron diferencias relacionadas con la cepa. Diversas interacciones entre los diferentes factores estudiados que se discuten en detalle en el artículo también afectaron a la producción de las toxinas.

En base a lo expuesto se deduce que el cereal es un medio más adecuado para la producción de toxinas y aumenta la resistencia del hongo a los fungicidas, especialmente a la temperatura más favorable para su crecimiento, 25 °C. Todo ello podría suponer un incremento en los niveles de T-2 y HT-2 en un futuro, especialmente en avena, si confluyen niveles de temperatura y humedad relativa medios-altos y dosis bajas de fungicidas.

### **INVESTIGACIÓN COMPLEMENTARIA**

The aims of this study were to elucidate the effectiveness of prochloraz, tebuconazol, and two mixtures of both azoles, under different regimes of  $a_w$  and temperature on growth rate of *A. flavus* and aflatoxin B<sub>1</sub> (AFLB<sub>1</sub>) and B<sub>2</sub> (AFLB<sub>2</sub>) production *in vitro*.

Aflatoxins (AFLs) are produced by *Aspergillus* section *Flavi* group species and they are the most potent natural carcinogens known. They are recognized as possible human carcinogens (group 1A) by the International Agency of Research of Cancer (IARC, 1993). *A. flavus* and *A. parasiticus*, both belonging to the section *Flavi*, are the two major aflatoxin-producing species (Bennett and Klich, 2003; Horn, 2007). These species contaminate numerous food commodities in warm climates where they may produce AFLs at different points of the food chain in pre- and postharvest. The key environmental determinants for growth of aflatoxin-producing species and for AFL production are water availability and temperature (Magan et al., 2003; Magan and Aldred, 2007). Therefore, climate change with possible extreme drought episodes, desertification and fluctuations in wet-dry cycles will have a strong impact on the life cycle of all microorganisms including toxigenic moulds and mycotoxin production in crops. These new environmental conditions will offer obvious advantages to more xerotolerant fungi over other less competitive species (Magan et al., 2011; Battilani et al., 2012). In the 2003–2004 period, very hot and dry episodes took place in parts of Northern Italy where maize is a key animal feed for cattle in the important cheese production regions. Maize contamination with AFLB<sub>1</sub> was significant, resulting in high levels of aflatoxin M<sub>1</sub> in the milk of animals fed with this maize (Battilani, 2008; 2012). Water and thermal stress could have offered ecologic advantages to aflatoxigenic species over other natural pre-harvest species like *F. verticillioides* in maize in that region (Giorni et al., 2007).

It has been reported that *A. flavus* has a wide range of temperature tolerance (19–35 °C) with about 28 °C optimum for growth and 28–30 °C for AFL production (Sanchis and Magan, 2004). Nevertheless, recently it has been described that isolates of *A. flavus* can grow and produce AFLB<sub>1</sub> in ranges between 20 and 42 °C with optimal growth temperature at 37 °C (Schmidt-Heydt et al., 2009).

The 12<sup>th</sup> annual report of the EU's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), published in 2014 (EC, 2014) shows that the vast majority of notifications concerning mycotoxins in food or feed between 2003 and 2012 are made about AFLs. In the last years, AFLs have been reported, for example, in nuts (Cheraghali et al., 2007; Lutfullah and Hussain, 2011; Atayde et al., 2012; Pietri et al., 2012; Rodrigues et al., 2012; Chala et al., 2013), breakfast cereals (Ibáñez-Vea et al., 2011), beer (Benešová et al., 2012; Burdaspal and Legarda, 2013), other cereal by-products frequent in children's food (Kabak, 2012), chocolate (Copetti et al., 2011), pulses (Lutfullah and

Hussain, 2012), spices (Santos et al., 2011; Ozbey and Kabak, 2012), medicinal herbs and infusions (Romagnoli et al., 2007). Recently, AFLs have been reported for the first time in barley (Mateo et al., 2011a). In this work, molecular techniques were applied to barley samples for the detection of aflatoxigenic fungi from different agro-climatic Spanish regions, and an elevated number of samples contaminated with *Aspergillus* spp. section *Flavi*, especially *A. flavus*, has been found.

Knowledge of the ability of the fungus to activate AFL biosynthesis genes under different ecological conditions may be a good indicator for determining the risk from specific aflatoxigenic species in crops. It has been reported that at least 25 identified genes are clustered within a 70-kb DNA region in the chromosome involved in AFL biosynthesis (Yu et al., 2004).

The ecology and regulation of AFL biosynthesis by *A. flavus* in relation to environmental factors have been revised (Abbas et al., 2009; Georgianna and Payne 2009). Depending on the particular combination of external growth parameters, the biosynthesis of AFLs can either be completely inhibited, albeit normal growth is still possible or the biosynthesis pathway can be fully activated (Schmidt-Heydt et al., 2009). Furthermore, the possible correlation between ecological conditions and toxin production for other toxigenic fungi has been also studied (Geisen, 2004; Jurado et al., 2008; Marín et al., 2013). However, up to date no study has reported the effect of antifungal agents, such as azoles, on control of population growth of *A. flavus* and phenotypic AFL production, although the use of these fungicides is one of the main tools in the control of toxigenic fungi and mycotoxin production in crops. In these studies must also be considered the effect and interactions of ecological variables linked to climate, such as humidity and temperature, on fungal growth and mycotoxin biosynthesis. The suitable selection of fungicides and their doses avoiding the risks related to their usage (poor or excessive) constitutes a priority.

Prochloraz and tebuconazole, two azoles that differ in structure but exhibit the same mode of action, are applied in agriculture to control fungal growth in crops in many European countries. These anti-fungal agents prevent the synthesis of ergosterol, a major component of fungal plasma membranes, by inhibiting the cytochrome P-450-dependent enzyme lanosterol demethylase (also referred to as 14- $\alpha$ -sterol demethylase or P-450DM). When azoles are present, their antifungal efficacy is attributed to their greater affinity for fungal P-450DM. Exposure of fungi to an azole causes depletion of ergosterol and



accumulation of 14 $\alpha$ -methylated sterols. This interferes with the “bulk” functions of ergosterol in fungal membranes and disrupts both the structure of the membrane and several of its functions such as nutrient transport and chitin synthesis. The net effect is inhibition of fungal growth (Shapiro et al., 2011). It has been observed that prochloraz and tebuconazole, at low doses, are effective to control the growth of *F. langsethiae* and the production of T-2 and HT-2 toxins (Mateo et al., 2011b; 2013) but no study has been carried out to examine the effect of these antifungal agents on the growth of *Aspergillus* spp. section *Flavi* and AFL biosynthesis.

Knowledge about these relationships enables an assessment of which parameter combinations can control AFL biosynthesis and which are conducive to phenotypic AFL production. The ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> values (effective doses of the formulation to reduce fungal growth by 50% and 90%, respectively) are usually given to describe the response of fungal strains to fungicides and, additionally, they permit reliable comparisons between similar studies.

## Materials and methods

### 1. Fungicide formulations

The active ingredients, product name, concentration and manufacturers of the fungicide formulations used in this study were the following: prochloraz (Dogma® 400 g a.i./l, Industrias Afrasa S.A., Paterna, Valencia, Spain); tebuconazole (Folicur® 250 g a.i./l, Bayer CropScience, Paterna, Valencia, Spain). Fungicide stocks were prepared in acetone and diluted solutions of the fungicides were prepared by mixing appropriate amounts of each fungicide (based on concentration of the active ingredient) in acetone and used immediately after preparation. A non-significant volatile volume (20  $\mu$ l) of acetone was added to each treatment. Preliminary experiments were performed to choose the range of doses for each fungicide to be added to obtain dose response curves. Based on these assays the studied treatments were: prochloraz (0.01 and 0.1 mg/l), tebuconazole (0.5 and 5.0 mg/l) and two mixtures of prochloraz + tebuconazole (0.01 + 0.005 mg/l and 0.1 + 0.05 mg/l). In addition, with the aim to determine the ED<sub>90</sub>, more elevated doses of fungicides were tested. These doses were 2.0, 10.0, and 3.0 mg/l for prochloraz, tebuconazole, and the mixture of both fungicides (2.0 mg/l prochloraz + 1.0 mg/l tebuconazole), respectively.

## 2. Inoculum preparation

Before carrying out the study of fungicide treatments on growth of *A. flavus* and AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> production, the strain was grown on coconut cream agar medium (CAM). To prepare CAM, 50% coconut cream was homogenized for 5 min with 1000 ml of 100 °C distilled water. The homogenate was filtered through four layers of cheese cloth. Agar was added (20 g/l), and the mixture heated to boiling point and cooled to about 50 °C. The mixture was then autoclaved at 115 °C for 30 min and poured into sterile 9 cm Petri dishes. The strain was inoculated on the center of 9 cm Petri plates and incubated at 25 °C for a week. Spores of these fresh cultures were used to prepare inocula for further experiments with fungicides and two additional plates were used for control of AFLB<sub>s</sub> production based on the observation of fluorescence in cultures under long-wave UV light (365 nm). Spores from non-irradiated fresh cultures were suspended in sterile distilled water containing Tween 80 (0.005%). A suspension of spores containing  $1.0 \times 10^6$  spores/ml was prepared in water modified with glycerol to provide 0.99 and 0.95  $a_w$ .

## 3. Modification of media with fungicides at different $a_w$ and culture conditions

The assays with fungicides were carried out in a conducive YES medium (20 g agar, 20 g Yeast extract, 150 g sucrose, 1 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 l water). The agar medium was modified by adding glycerol to adjust  $a_w$  to 0.99 and 0.95. It was achieved by adding exact glycerol weights using a specific curve for YES medium. The culture medium was autoclaved at 121 °C for 20 minutes. After cooling to about 50 °C, prochloraz, tebuconazole, and two mixtures of both were then added to obtain the previously indicated target doses (see Section 2). Flasks of molten media were thoroughly shaken prior to pouring into 9 cm sterile Petri dishes, to ensure that an evenly dispersion of the fungicide was obtained. The accuracy of the modifications was confirmed using an Aqualab 3TE instrument and found to be within  $\pm 0.005$  of the target  $a_w$ .

All media, were inoculated centrally with 3  $\mu$ l of the previously prepared spore suspension ( $1.0 \times 10^6$  spores/ml). Inoculated Petri dishes of the same  $a_w$  were enclosed in sealed plastic containers together with beakers of a glycerol–water solution matching the same  $a_w$  as the treatment to maintain a constant equilibrium relative humidity inside the boxes. Three replicates per treatment were incubated at 25 and 37 °C for 10 days.

#### 4. Growth monitoring

For measurement of the diametric mycelial growth rate, the diameter of the colony was measured in two directions at right angles to each other. The sum of two diameters was divided by four to calculate the mean radius. These measurements were then averaged over the number of measured dishes. The slope of the line obtained by linear regression of colony radius against time was used to determine the growth rate (mm/day). The fungicide doses necessary for 50 and 90% growth inhibition ( $ED_{50}$  and  $ED_{90}$  values) were also determined. After the incubation period all cultures were conserved at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for AFL determination.

#### 5. Aflatoxin analyses

**Extraction.** Twelve agar culture plugs of biomass were cut out of the agar across the colony using a cork borer. These plugs were placed into a small glass beaker and weighed. AFLs were extracted by adding 5 ml chloroform, capping, and shaking in an orbital shaker (Infors-HT Aerotron, Bottminghen, Switzerland) for 1 hour. Four ml were filtered through a 0.5 g alumina cartridge using a vacuum elution manifold. The cartridge was washed with two ml chloroform, which were joined together with the previous filtrate. The solvent was evaporated to dryness under a slight stream of  $\text{N}_2$  and the residue was re-suspended in 250  $\mu\text{l}$  of water:methanol 80:20, v/v. After centrifugation for 10 min at 14000 rpm, 50  $\mu\text{l}$  of the supernatant was injected into the liquid chromatograph.

**Standard calibration curve of AFLs.** Calibration solutions of  $\text{AFLB}_1$  and  $\text{AFLB}_2$  standards containing 5 to 15000 ng/ml of  $\text{AFLB}_1$  and 0.05 to 150 ng/ml of  $\text{AFLB}_2$  were prepared in water:methanol 80:20, v/v. Then 20  $\mu\text{l}$  of each solution was injected into the liquid chromatograph and the recorded areas were used to obtain the calibration curves for each AFL.

**Sample analysis.** Sample extracts and standards were analyzed by HPLC using a Waters 600E system controller, a 470 fluorescence detector (FD) (Waters, Co., Mass., USA) set at 362 nm (excitation wavelength) and 435 nm (emission wavelength), and a reversed-phase column (Phenomenex Luna ODS2 150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). The system was operated under Waters Millennium 32 software. The mobile phase consisted of a mixture of water (A), acetonitrile (B), and methanol (C) that was gradient programmed as follows: 0.00 min: 70%A, 10%B, 20%C (1 min); 1.01 min: 60%A, 10%B, 30%C; 16.01-

19.50 min: 30%A, 25%B, 45%C; 19.51-28.00 min: 70%A, 10%B, 20%C. The flow-rate was 1.0 ml/min.

## 6. Statistical analysis

Statistical analysis (ANOVA and *post-hoc* Duncan test) of data was performed using Statgraphics Centurion XV version 15.1.02 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA).

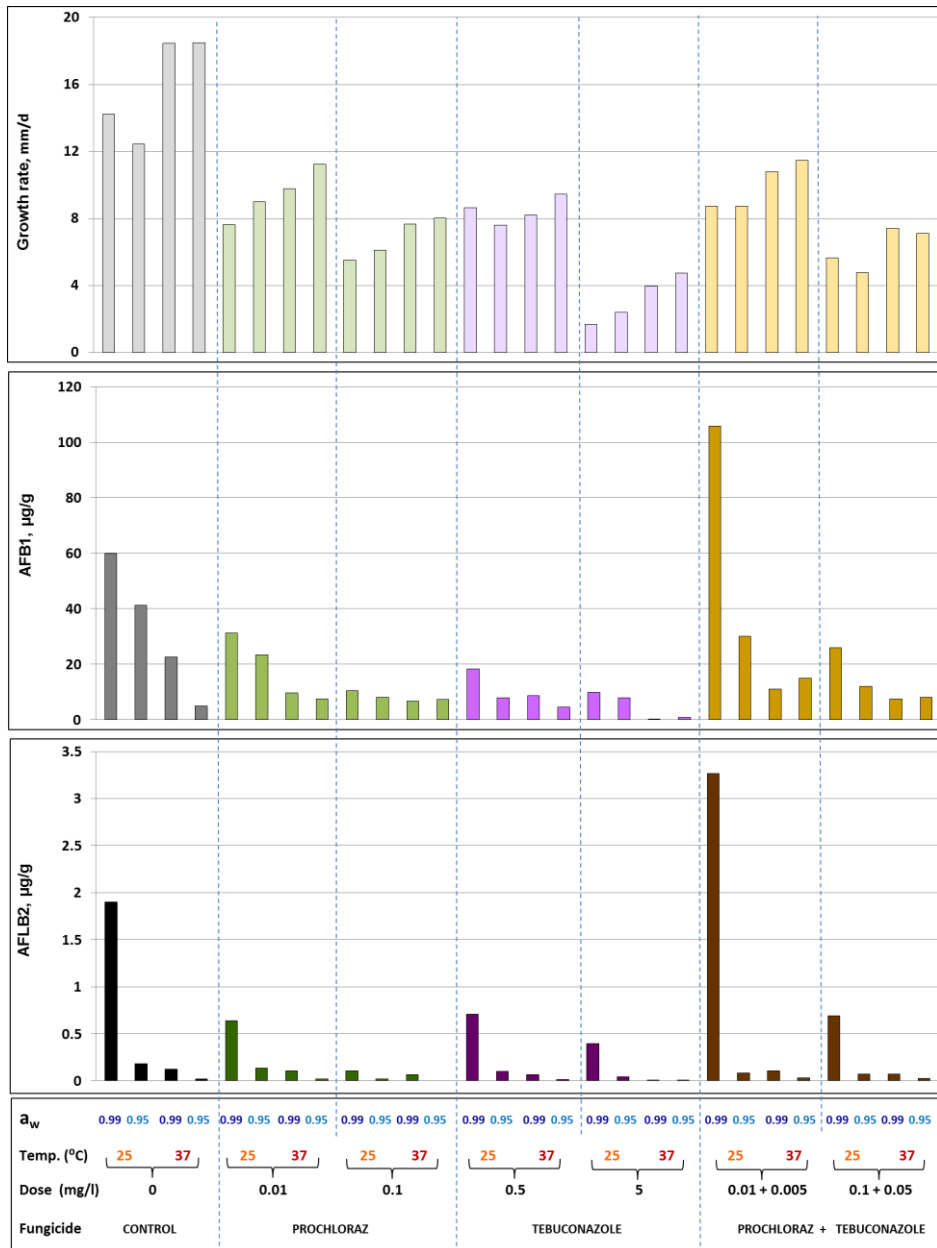
## Results

The results obtained are shown in Figure 32. ANOVA showed that  $a_w$  level did not significantly influence GR ( $P > 0.05$ ) but temperature ( $P < 0.0001$ ) and fungicide treatments ( $P < 0.0000$ ) did. A statistical interaction exists between temperature and treatment factors ( $P < 0.05$ ). GR was always higher at 37 °C than 25 °C regardless of the treatment and conditions assayed. The optimum GR for this strain was recorded in controls incubated at 37 °C. In general, the GR decreased with increasing fungicide dose regardless of  $a_w$  and temperature.

Duncan's test showed four homogeneous non-overlapping groups and one overlapping group depending on the treatment. The highest reduction of growth ( $GR \leq 1$  mm/day) was found in the cultures supplemented with the highest doses of fungicides (2.0, 10.0, and 3.0 mg/l of prochloraz, tebuconazole, and the mixture of both fungicides, respectively) (data not shown) followed by the cultures treated with 5 mg/l of tebuconazole (Fig. 32).

For prochloraz, the mixture of prochloraz and tebuconazole, and tebuconazole, the  $ED_{50}$  values were in the ranges 0.02-0.1 mg/l, 0.05-0.1 mg/l and 0.3-1.7 mg/l, respectively and the  $ED_{90}$  values were in the ranges 0.5-1.8, 0.6-2.0 and 5.0-9.2 mg/l, respectively. All the fungicide treatments assayed were more effective at 37 °C than 25 °C and at 0.99  $a_w$  than 0.95  $a_w$  (Table 13).

AFLB<sub>1</sub> or AFLB<sub>2</sub> were not detected in the cultures treated with the highest doses of fungicides (2.0, 10.0, and 3.0 mg/l of prochloraz, tebuconazole, and the mixture of both fungicides, 2/1, respectively). The effect of  $a_w$ , temperature and fungicide treatment on AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> production on controls and positive treatment cultures of *A. flavus* are also shown in Fig. 32



**Figure 32.** Comparison of growth rate determined by daily colony diametric measurement (mm/day) and aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> biosynthesis (determined by HPLC) of *A. flavus* grown on YES medium agar plates for 10 days. The various combinations of temperature x water activity x fungicide treatments x dosis are indicated at the bottom.

**Table 13.** ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> (mg/l) of three fungicide treatments against *A. flavus* growing on YES medium under different environmental conditions

a <sub>w</sub>	Temperature (°C)	Fungicide					
		Prochloraz		Tebuconazole		Prochloraz + Tebuconazole (2:1)	
		ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>
0.95	25	0.10	1.8	1.7	9.2	0.10	2.0
	37	0.05	1.5	0.7	6.3	0.07	1.7
0.99	25	0.02	0.7	1.3	5.2	0.06	0.8
	37	0.02	0.5	0.3	5.0	0.05	0.6

The results shown in Fig. 32 are the mean of the AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> levels in the three replicates. ANOVA revealed that temperature and fungicide treatment significantly influenced AFLB<sub>1</sub> production ( $P < 0.01$  and  $< 0.05$ , respectively) and no significant differences were found in relation to a<sub>w</sub>. AFLB<sub>1</sub> concentration was always higher at 25 °C than 37 °C. The AFLB<sub>1</sub> level decreased with increasing fungicide dose regardless of the type of fungicide assayed. Induction in the production of AFLB<sub>1</sub> in cultures treated with a mixture of prochloraz + tebuconazole (0.01 + 0.005 mg/l) incubated at 0.99 a<sub>w</sub> and 25 °C was detected (Fig. 32).

AFLB<sub>1</sub> level found in these cultures (105.7 µg/g) was 1.7 times higher than the level in control (60 µg/g) under the same conditions. For the rest of the treatments assayed, no induction of the toxin, or light induction (at 37 °C and 0.95 a<sub>w</sub>) was observed. Duncan's test showed three homogeneous overlapping clusters related to treatment. The treatments that showed lower production of AFLB<sub>1</sub> were tebuconazole (5 mg/l), followed by prochloraz (0.1 mg/l), and they were gathered in the same group. AFLB<sub>2</sub> production, in general, followed a similar pattern that AFLB<sub>1</sub> although its concentration was much lower.

Under certain conditions (0.99 a<sub>w</sub>, 25 °C and low levels of prochloraz + tebuconazole), the fungicide treatments resulted in high levels of phenotypic aflatoxin production. At 37 °C low levels of AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> were registered. The lowest AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> levels were registered in cultures treated with 5 mg/l of tebuconazole.

## Discussion

This is the first study about the effect of azole treatments on the growth of *A. flavus*, and AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> production under different environmental conditions. Azoles belong to the most extensively used antifungal compounds applied in agriculture to control fungal pathogens in cereals and other crops. The effectiveness of azoles in reducing growth of toxigenic fungi has been tested *in vitro* and in field studies (Edwards and Godley, 2010; Haidukowski et al., 2005; Iosif et al., 2005; García-Cela et al., 2012; Ramírez et al., 2004; Mullenborn et al., 2008) and in all these studies reduction of fungal growth and variations in the efficacy of the fungicide were observed depending on the species and environmental conditions. Nevertheless, in few studies the ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> have been determined (Mateo et al., 2011b; 2013; Marin et al., 2013). These parameters are very useful to describe the response of fungal strains to fungicides and, additionally, they permit reliable comparisons between similar studies. The present study is focused on the species *A. flavus*, the major aflatoxin-producing species in crops and it is the first that analyzes all these fungal responses simultaneously in the presence of azoles.

The GR of *A. flavus* in control cultures (without fungicides) was always higher at 37 °C than 25 °C. In general, this agrees with previous studies (Astoreca et al., 2012 and associated references; Schmidt-Heydt et al., 2009). Nevertheless, in the assayed conditions, GR were not affected by a<sub>w</sub> (0.95 and 0.99). This is in agreement with epidemiologic studies showing the association of *A. flavus* with AFLs in maize crops with high aridity index in Italy (Battilani, 2008; 2012; Giorni et al., 2007; Mauro et al., 2013). Therefore, *A. flavus* is a fungal species adapted to a wide range of a<sub>w</sub> levels, particularly at elevated temperatures. This fact would ultimately determine its dominance in the microbiological communities that colonize crops in present and foreseeable climate change scenarios.

The GR of *A. flavus* showed a similar pattern in control cultures and fungicide treated cultures and was significantly influenced by temperature. Prochloraz proved to be the most active in decreasing growth of this species while relatively high doses of tebuconazole were needed to attain similar ED<sub>50</sub> or ED<sub>90</sub> values. The assayed mixture showed a similar pattern than prochloraz, although it was slightly less efficient. As far as we know, there are no previous studies on the ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> of the assayed fungicides on toxigenic *Aspergillus* spp., which complicates the discussion of the obtained results. However, similar results have been found in previous studies performed with

*Fusarium langsethiae* (Mateo et al., 2011b), *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Marín et al., 2013).

Azoles have been found to be less effective in controlling growth of toxigenic fungi on cereal grains than in agar culture media. In previous studies (Mateo et al. (2013) found that ED<sub>50</sub> for prochloraz and tebuconazole against *F. langsethiae* in oat grain ranged between 0.4 and 4.8 mg/l and between 1.1 and 18 mg/l, respectively, and the ED<sub>90</sub> ranged between 1.1 and >10 mg/l and 3 and >20 mg/l, respectively. Ramírez et al. (2004), in studies performed with *F. graminearum*, also found less effectiveness for fungicides in wheat grains than in wheat-based-agar medium.

Others studies have also shown that antifungal compounds are more effective *in vitro* than in field conditions (Edwards and Godley, 2010; Haidukowski et al., 2005; loos et al., 2005; García-Cela et al., 2012; Mullenborn et al., 2008). Treatment doses higher than those shown in Table 13 and those usually recommended by the manufacturers for field application might be required, especially under abnormal climatic conditions (Subhani et al., 2011).

Prevention of growth of mycotoxin-producing fungi is the most effective strategy for controlling the presence of fungi and mycotoxins in crops and the Codex Alimentarius (Codex Alimentarius Commission, 2003) includes application of fungicides in Good Agricultural Practices to reduce contamination in cereals (CAC/RCP 51). However, complementary studies aimed to optimize doses in field should be performed.

AFLB1 and AFLB2 levels found in this study were significantly higher at 25 °C than 37 °C in control cultures, confirming previous studies on AFL production by other *A. flavus* strains (Astoreca et al., 2014; Abdel Hadi et al., 2012; Giorni et al., 2007, 2011; Klich, 2007; Mousa et al., 2011; Schmidt-Heydt et al., 2009). No influence on AFL production was found in relation to a<sub>w</sub> under the assayed conditions.

In other studies, significant differences in AFL production have been observed when wider ranges and extreme levels of a<sub>w</sub> were assayed (Astoreca, 2014 and associated references). Nevertheless, for a<sub>w</sub> levels (0.95 and 0.99) no significant differences were found regarding AFLB<sub>1</sub> production and fungal growth of *A. flavus* (Schmidt-Heydt et al., 2009), which agrees with our results. This suggests that the occurrence of *A. flavus* and AFLs in crops could present particular risks to humans and animals in tropical and subtropical countries.



The pattern of AFL production observed under the different treatments with the fungicides assayed in this study was the same as in controls. The AFLB<sub>1</sub> levels detected in treatment cultures were generally lower than in controls and significantly influenced by the fungicide and its doses. AFL levels decreased with increasing fungicide dose regardless of the type of fungicide assayed. However, induction of AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> production in cultures treated with low doses of prochloraz + tebuconazole (0.01 + 0.005 mg/l) incubated at 25 °C and 0.99 a<sub>w</sub> was observed and slight increase of toxin production was observed at 37 °C and 0.95 a<sub>w</sub> (Fig. 32). Stimulation of AFLB<sub>1</sub> production by *A. flavus* under mild stress environmental conditions in absence of fungicides has been reported (Schmidt-Heydt et al., 2009) and induction of other toxins in cultures of different toxigenic species in response to the presence of sub-inhibitory fungicide doses has also been observed (Marín et al., 2013; Mateo et al., 2011; Medina et al., 2007a; 2007b; Ramírez et al., 2004). Nevertheless, according to our knowledge, no studies have been performed about growth of *A. flavus* and AFL production in the presence of azoles, which makes the discussion of the results difficult.

According to Edwards and Godley (2010), mycotoxin production may be favoured by fungicide applications due to direct stress effect on mycotoxigenic species increasing the activity of enzymes involved in toxin biosynthesis. This might enhance the induction level caused by environmental stress. In the present study combinations of these parameters might result in an increase of AFL production.

In conclusion, *A. flavus* exhibits high growth speed at high temperatures and optimum production of AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> at moderate temperatures over a wide range of a<sub>w</sub> values. Certain combinations of temperature x a<sub>w</sub> x type of fungicide and dose, either enhance production of AFLs. Therefore, the results show that interactions between environmental conditions and azole treatments should be carefully considered for each toxigenic species, mycotoxin, fungicide and dose. Combinations of these two situations might result in an undesirable increase of *A. flavus* and AFL levels in crops.

The interaction of azole treatments with environmental factors on growth of *A. flavus*, and AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> production has not previously been studied. The results obtained in the present study show that *A. flavus* can be a highly competitive species in present and future scenarios associated to climate change. Complementary studies with these and other fungicides should be performed in grain and in field in different agro-climatic regions.

## CAPÍTULO III. Artículos 6 y 7

---

En los últimos años los Programas de Investigación, nacionales e internacionales, han contemplado el problema de la presencia de OTA en cereales y sus derivados como la cerveza, como la primera fuente de la toxina en la dieta humana y los resultados obtenidos en los artículos 1 y 2 de esta Tesis confirman este hecho. Por otro lado, estudios previos indican que la uva y sus derivados, como el vino, son considerados como la segunda fuente más importante de la toxina. Ello ha convertido a la OTA en un objetivo prioritario en el marco de la seguridad alimentaria y, gracias a ello, los estudios sobre niveles de la toxina en cerveza y vino han sido numerosos, multidisciplinarios y de alta calidad científica.

En la Introducción de esta Tesis Doctoral se describe el estado actual de lo que se conoce sobre la identidad de la microbiota de la uva responsable de la presencia de la OTA en las bayas y, en consecuencia, en el vino. Como allí se ilustra, la caracterización de la microbiota ocratoxigénica que afecta al viñedo se ha realizado fundamentalmente en la última década gracias al uso de técnicas basadas en el DNA. Se han investigado las especies productoras de OTA en uva en todas las regiones vitivinícolas del mundo, profundizando en su taxonomía, distribución geográfica y trazabilidad. Actualmente no hay duda de que se trata de especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri*, especialmente *A. carbonarius*.

También, se ha realizado un exhaustivo estudio de los niveles de OTA en bebidas derivadas de la cebada y la uva, especialmente en cerveza y vino, en todos los países productores y consumidores, ampliamente documentado en la Introducción de la Tesis. Para ello, se han empleado técnicas optimizadas entre las que cabe destacar la purificación de la toxina usando columnas de inmunoafinidad y análisis posterior de los extractos purificados mediante cromatografía de líquidos acoplada a detectores de fluorescencia o espectrometría de masas. Los resultados mostrados en la Introducción de esta Tesis indican que un alto porcentaje de muestras de cerveza (Tabla 6) y vino, en particular vino tinto (Tabla 7), contienen OTA. En todos los aspectos de la investigación citados, nuestro grupo ha realizado una importante aportación en el pasado reciente.

Por tanto, en esta fase de la investigación, se disponía de información sobre los hongos productores de OTA en cebada española, y los niveles de la toxina en el cereal, fruto de la investigación recogida en el **artículo 1** de la

Tesis; y se conocía el efecto de diferentes antifúngicos en el control preventivo de estos hongos productores de la toxina, fruto del trabajo realizado en el **artículo 3**. En base a ello, se planteó como siguiente objetivo de la Tesis investigar sobre posibles estrategias de control reductoras de la OTA, en medios contaminados experimentalmente con la toxina, con el objetivo de determinar su posible aplicación en el procesado tecnológico de materias primas contaminadas (como la cebada o la uva) y producción de derivados (como cerveza o vino), libres de OTA. Estas estrategias se plantearon considerando que debían proteger la calidad y salubridad del producto final listo para el consumo.

En la introducción de la Tesis se han recogido los intentos que se han realizado para la eliminación de OTA durante la transformación tecnológica de los cereales, como principal fuente de la toxina en la dieta (apartado 7.1) y durante la transformación tecnológica de la uva, como segunda fuente más importante de la toxina (apartado 7.2). Sin embargo, debido a los numerosos estudios realizados en la última década sobre presencia de OTA en vinos de todo el mundo, ha sido en esta matriz donde más se han estudiado estrategias para la eliminación de la toxina.

A pesar de las investigaciones realizadas, ninguna de las medidas ensayadas se ha implementado en la bodega por alterar en mayor o menor medida las características físico-químicas y organolépticas del vino. Alguno de los métodos propuestos ha sido autorizado para su uso en enología como, por ejemplo, el empleo de virutas de madera de roble capaces de adsorber y retener, al menos, parte de la OTA presente en el vino. Esta actuación fue autorizada como práctica enológica en Europa en 2005 (Council Regulation (EC) N° 2165/2005 (EC, 2005b) (Commission Regulation (EC) N° 1507/2006 (EC, 2006b). A pesar de ello en vinos de algunas regiones como ocurre en los de la Denominación de Origen, Rioja (DOCa Rioja) esta práctica no está autorizada. En el caso de la cerveza tampoco existen protocolos estandarizados de detoxificación.

Si se considera que la cerveza y el vino son bebidas resultantes de un proceso fermentativo en el que intervienen diferentes levaduras durante la fermentación alcohólica y, además, en el caso del vino de bacterias del ácido láctico durante la fermentación maloláctica, la mejor estrategia para reducir el nivel de OTA en estas bebidas podría estar ligada al propio proceso tecnológico. Dependiendo del mecanismo de acción de estos procariontes sobre la toxina, podrían constituir un procedimiento inocuo para su eliminación

sin alterar las características físico-químicas del producto listo para el consumo. En esta línea, como se indica en los apartados de la Introducción citados, se han realizado investigaciones con levaduras, principalmente con levaduras de elevada capacidad fermentativa como *Saccharomyces cerevisiae* pero existen muy pocos trabajos que contemplen el efecto que pudieran tener las levaduras de baja capacidad fermentativa o las bacterias del ácido láctico implicadas en la fermentación maloláctica del vino.

En base a estas hipótesis se fijó el **quinto objetivo** de la Tesis. Para su consecución, se desarrolló la investigación que se describe en detalle en los **artículos 6 y 7** del anexo.

## **ARTÍCULO 6**

En él se se aborda el estudio de la posible capacidad de *Oenococcus oeni*, principal especie bacteriana implicada en la fermentación maloláctica del vino, para eliminar OTA en un medio de cultivo especialmente adecuado para el crecimiento de bacterias del ácido láctico. Este medio fue el MLO que se suplementó con diferentes niveles de la toxina. En esta investigación se emplearon diez cepas de esta especie, aisladas de vinos de las denominaciones de origen Utiel-Requena y la Rioja, nueve de ellas nos fueron suministradas por el grupo “Enolab” del Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia y una por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En una primera fase de la investigación se emplearon bacterias en fase exponencial de crecimiento. En estos cultivos, se realizó un seguimiento de los niveles de OTA en el medio, mediante LC-FD, durante un periodo de dos semanas. Los resultados fueron excelentes ya que se llegaron a registrar niveles de reducción de la toxina, superiores a un 60% con respecto a los controles carentes de bacterias. Se observó que en el nivel de reducción de la OTA existen diferencias significativas dependientes de la cepa de *O. oeni*, del tiempo de incubación y del nivel inicial de OTA en el medio. De forma que se observa mayor reducción en los medios suplementados con 2 ppm que en los suplementados con 5 ppm. Este resultado es interesante ya que, en vino, el nivel de OTA, raramente supera 2 ppm. En este estudio, en función de las condiciones del cultivo, los niveles de reducción de la toxina oscilaron entre 0,9 % y 63% de la OTA, inicialmente presente, en el medio.

Estos resultados fueron la base para una segunda etapa en la investigación y esta fue la que nos llevara a estudiar el mecanismo por el que la bacteria elimina la OTA del medio. En la primera experiencia se habían

empleado bacterias procedentes de cultivos que se encontraban en el punto medio de la fase exponencial de crecimiento por lo que eran células metabólicamente muy activas y, en consecuencia, los resultados no permitían concluir si la eliminación de OTA del medio obedecía a su degradación metabólica por la bacteria o a algún otro mecanismo.

Para clarificar el proceso, se planteó una nueva experiencia en la que se emplearon cultivos de *O. oeni* viables, en la fase de latencia de la población y bacterias no viables, inactivadas por calor. Los ensayos se realizaron en dos medios, uno de ellos, el MLO y un segundo medio constituido únicamente por un tampón acetato donde no era posible el aumento poblacional. Los resultados mostraron que la eliminación de OTA del medio no dependía de si la bacteria estaba viva o muerta pero si era dependiente de la concentración de la toxina en el medio y del número de bacterias presentes en el mismo, independientemente de su estado metabólico.

En consecuencia, se podía concluir que la eliminación de OTA del medio no obedecía a su degradación metabólica por parte de la bacteria sino más bien a una adsorción de la toxina a la superficie celular lo que era compatible con el hecho de que fuera dependiente de la concentración de toxina en el medio (a menor concentración mayor porcentaje de eliminación) y con el número de bacterias (a mayor número de bacterias, mayor porcentaje de retención). Con elevadas concentraciones de toxina y escaso número de bacterias se producía un fenómeno de saturación lo que explicaba la baja efectividad del proceso. La eliminación de OTA del medio obedece por tanto a un mecanismo de adsorción a uno o varios componentes de la pared celular, probablemente a los ácidos teicoicos. Ambas etapas de la investigación se recogen y describen en detalle en el primer artículo de los dos que conforman este tercer capítulo de la Tesis Doctoral.

## **ARTÍCULO 7**

Una vez determinada la capacidad de *O. oeni* para retener y, por tanto, eliminar OTA del medio, en este artículo de la Tesis, la investigación se dirigió a la búsqueda de resultados, en medios suplementados con diferentes niveles de etanol, similares al vino, o a la cerveza para conocer si la bacteria mostraba el mismo comportamiento. Para ello, se plantearon nuevas experiencias que se realizaron en un medio, cuya composición, es similar a la que presenta el vino después de la fermentación alcohólica (synthetic wine-

like basal medium, SWBM). Este medio se suplementó con diferentes concentraciones de etanol y de OTA. Los medios resultantes se inocularon con  $10^6$  UFC/ml de *O. oeni* y se incubaron durante un periodo de 30 días. Durante el periodo de incubación se realizó un seguimiento del crecimiento poblacional de la bacteria, concentración de OTA en el medio (mediante LC-FD), y niveles de ácido málico y ácido láctico (mediante GC-FID y LC-DAD) que permitieron el seguimiento de la fermentación maloláctica.

Los resultados mostraron que la concentración de etanol y el tiempo de incubación afectan significativamente al crecimiento de *O. oeni*. Concentraciones de 5% de etanol favorecen el crecimiento de la bacteria con respecto a los controles carentes de etanol por lo que aumenta el número de células en el medio y, en consecuencia, la eliminación de la OTA debería resultar favorecida. Concentraciones de etanol elevadas, del orden del 15% dificultan el crecimiento de la bacteria y, por lo tanto, tienen un efecto negativo en la eliminación de toxina. Sin embargo, es importante indicar que en el medio que se usa en esta experiencia inciden otros factores que afectan a la adsorción de la OTA a la pared de *O. oeni* y ello produce menor efectividad de la esperada, si únicamente se considera que la eliminación de OTA esta correlacionada positivamente con el número de células de *O. oeni* presentes en el medio, independientemente de que estén vivas o muertas. El factor más negativo es el pH del medio, se trata de un medio con un pH ácido (similar al que presenta el vino después de sufrir la fermentación maloláctica) lo que puede producir una desorción de la OTA de la pared celular y su retorno al medio. La investigación desarrollada en medios de cultivo similares al vino se describe y discute de forma detallada en el artículo 7 de la Tesis.

En base a los resultados obtenidos en los **artículos 6 y 7**, se puede concluir que *O. oeni* presenta capacidad para eliminar OTA a partir del medio y este proceso es independiente de la viabilidad de la bacteria y dependiente de la cepa, concentración de células, niveles de OTA, niveles de etanol y pH del medio. Ello concuerda con el hecho de que la eliminación de la OTA se pueda producir debido a la adsorción de la toxina a uno o más componentes de la pared celular, probablemente a los ácidos teicoicos, y que el pH del medio influiría en la adsorción o liberación de la toxina en el medio y en consecuencia en la efectividad del proceso. La eliminación de OTA de bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza por *O. oeni* sería, por tanto, más eficaz en los casos de baja acidez por lo que el proceso resultaría favorecido en vinos en los que ocurre la fermentación maloláctica ya que el ácido láctico es más débil que el málico y también se vería favorecido en

cerveza y en vinos con menor concentración de alcohol. Por tanto, *O. oeni*, principal bacteria del ácido láctico, es capaz de reducir los niveles de OTA en los medios líquidos ensayados. Nuevas investigaciones directamente en vino y cerveza, con cepas de la bacteria seleccionadas, serán objeto de futuros trabajos.

Las revistas en las que están publicados todos los artículos que componen los tres capítulos de la Tesis se encuentran situadas en el primer cuartil del área “Food Science and Technology” recogida en el “Journal Citation Reports”, más reciente, correspondiente al año 2013 y publicado en 2014.







## **IV. CONCLUSIONES FINALES**



---

**Los resultados obtenidos en la investigación sobre el peligro potencial y real de la presencia de hongos y micotoxinas en cebada cultivada en España permiten concluir que:**

- La microbiota productora de toxinas contaminante de la cebada española, estudiada por métodos clásicos y métodos de PCR, específicos de especie basados en regiones multicopia (IGS e ITS) del rDNA, está constituida por especies de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. Con independencia del origen geográfico de la muestra y en orden decreciente, las especies más frecuentes son:
  - Del género *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. parasiticus*, *A. steynii*, *Aspergillus* del agregado *niger* y *A. ochraceus*. Anteriormente a este estudio, *A. steynii* y *A. carbonarius* no habían sido descritas en cebada.
  - Del género *Fusarium*: *F. verticillioides* y *F. graminearum* seguidas de *F. langsethiae* y *F. equiseti* que se aislaron de forma esporádica y sólo en determinadas regiones. Previamente a este trabajo, *F. langsethiae* no había sido descrita en ningún cultivo de origen español.
- Las micotoxinas contaminantes de la cebada española en orden decreciente son: OTA, DON, AFLB<sub>1</sub>, ZEA, FBs (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub>), NIV, AFLG<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>2</sub> y las toxinas HT-2 y T-2. Previamente a este trabajo no habían sido detectadas AFLs en cebada.
- Las micotoxinas que se encuentran simultáneamente y con mayor frecuencia en una misma muestra de cebada son las combinaciones: OTA y DON (51,7%), AFLB<sub>1</sub> y DON (31%), OTA y FBs (24,1), DON y FBs (24,1%), OTA y AFLB<sub>1</sub> (17,3%), DON y NIV (17,3%), AFLs, OTA,

DON (13,8%). En dos de las muestras estudiadas se detectaron hasta 7 micotoxinas.

- El nivel de hongos y micotoxinas, en las muestras de cebada estudiadas, es independiente del origen geográfico del cereal pero dependiente del tipo de cultivo. Las cosechas de regadío, o de primavera (periodo corto, febrero-julio), presentan mayor contaminación con hongos y micotoxinas que las de secano, o de invierno (periodo largo, octubre/noviembre-julio).
- El análisis estadístico de los datos demuestra que en algunos casos no existe relación entre los niveles de contaminación fúngica encontrados en una muestra, usando técnicas clásicas y técnicas de PCR, o entre presencia de una determinada especie productora y la correspondiente micotoxina. Estas discrepancias demuestran que algunas especies pueden haber disminuido o muerto debido a condiciones ambientales adversas (estrés hídrico y térmico) o tratamientos agronómicos (antifúngicos) después de haber producido la micotoxina. Del mismo modo puede ocurrir que se encuentre la especie productora pero no se hayan dado las condiciones adecuadas para la biosíntesis de la toxina. Los resultados obtenidos alertan sobre la necesidad del uso de técnicas de PCR, medios de cultivo enriquecidos y métodos de análisis de micotoxinas optimizados para la correcta evaluación de lo que se considera “peligro potencial” y “peligro real” de la presencia de una determinada micotoxina en el cereal. Nuevos estudios en otros cereales similares al presente son necesarios.

**Los resultados obtenidos en la investigación de estrategias tanto para la prevención y control de las especies fúngicas más relevantes, productoras de OTA, AFLs o las toxinas T-2 y HT-2, como para la producción de las toxinas, permiten concluir que:**

- Los fungicidas azufre y oxiclورو de cobre, autorizados en agricultura ecológica, y mancozeb, autorizado en agricultura convencional, son medianamente efectivos en el control del desarrollo de *A. carbonarius* y *A. ochraceus*. La efectividad fue: mancozeb > oxiclورو de cobre > azufre, contra *A. ochraceus* > *A. carbonarius* y a 15 °C > 25 °C. Los tres fungicidas presentan muy poca actividad frente a *F. langsethiae* y *A. flavus*.
- La producción de OTA en cultivos de *A. carbonarius* y *A. ochraceus* en presencia de mancozeb, oxiclورو de cobre y azufre aumenta con el

tiempo y la temperatura. A 15 °C la biosíntesis de la toxina resulta prácticamente inhibida con excepción de algunas condiciones (tiempos largos, bajas dosis de antifúngicos) en las que su biosíntesis se potencia significativamente debido a posible estrés fúngico e inactivación del principio activo.

- En ausencia de fungicidas *F. langsethiae* presenta mayor velocidad de crecimiento a mayor actividad de agua ( $0,98 > 0,95$ ) y mayor temperatura ( $25\text{ °C} > 20\text{ °C} > 15\text{ °C}$ ). Ello demuestra su adaptación a temperaturas más elevadas que las existentes en las regiones del centro y norte de Europa que han constituido su hábitat habitual. Este resultado indica que existe peligro de expansión de esta especie a países del sur.
- Procloraz y tebuconazol (azoles) son más efectivos que fempropimorf (morfolina) en el control del crecimiento de *F. langsethiae*. En medio de cultivo agar-avena, la efectividad de los tres antifúngicos disminuye cuando aumenta la temperatura, es dependiente de la cepa, e independiente de la  $a_w$  del medio. Ello indica la necesidad de la investigación de estas toxinas en cereales en el sur de Europa.
- En los cultivos de *F. langsethiae* en granos de cereal la efectividad de procloraz, tebuconazol y fempropimorf fue menor que en medios agar-harina de cereal y no se vio afectada por la temperatura y  $a_w$ . Ello demuestra una excelente adaptación de esta especie en cereales que crecen en amplios rango de temperatura y humedad relativa.
- La producción de T-2 y HT-2 por *F. langsethiae* en granos de cereal fue más restrictiva que en medios elaborados con harina del cereal. La producción fue mayor a mayor temperatura, tiempo,  $a_w$  y menor concentración de fungicida. A  $a_w$  0,95 no se detectó ninguna de las dos toxinas en granos de cereal.
- Los niveles de T-2 que se registraron en los cultivos de *F. langsethiae* en agar-harina de cereal fueron siempre superiores a los de HT-2. Sin embargo, en grano ocurrió lo contrario. Este es el primer trabajo en el que se realiza este estudio comparativo y demuestra que en el cereal se produce una rápida transformación enzimática de la toxina T-2 a su derivado, la toxina HT-2. Considerando que la toxicidad de los dos compuestos es similar, resulta acertada la regulación de la suma de ambos, como se propone en las recomendaciones de la Comisión Europea para su inminente legislación en cereales.

- La velocidad de crecimiento de *A. flavus* fue significativamente mayor a temperatura elevada ( $37\text{ }^{\circ}\text{C} > 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y no se vio afectada por la  $a_w$  (0,99 o 0,95). Esta respuesta es muy poco usual e indica una adaptación de la especie a condiciones extremas de temperatura y humedad, lo que favorece su competitividad en el marco del cambio climático.
- La eficacia de procloraz, mezclas of procloraz+tebuconazol y tebuconazol frente a *A. flavus* fue a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} > 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a  $a_w\ 0,99 > 0,95$ . El hongo es más sensible a los tratamientos cuando se encuentra en condiciones óptimas de crecimiento.
- Contrariamente al crecimiento, la producción de AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> por *A. flavus* fue a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} > 37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e independiente de la  $a_w$ . Los niveles de toxinas en el medio disminuyeron al aumentar la dosis de fungicida.
- En general, ligeras o medianas condiciones de estrés hídrico y/o térmico, bajas dosis de fungicida y sus interacciones, frecuentemente potencian la producción de toxinas en todas las especies estudiadas. Los tratamientos con los antifúngicos ensayados pueden ser muy eficaces pero deben ser cuidadosamente controlados en la práctica agrícola.

**Los resultados obtenidos en la investigación de estrategias para la reducción de la micotoxina más frecuente (OTA) en cebada y otros cultivos, como la uva, durante su procesado tecnológico y fabricación de derivados destinados a consumo humano, como la cerveza o el vino, permiten concluir que:**

- La presencia de *Oenococcus oeni*, bacteria del ácido láctico, en medios contaminados con OTA puede llegar a reducir el nivel de toxina en el medio en más del 60%. El nivel de reducción es dependiente de la cepa (diferente en 10 aislados estudiados), concentración de células en el medio (mayor % de reducción a mayor concentración de células de *O. oeni*), tiempo (mayor % de reducción a mayor tiempo) y concentración de la toxina en el medio (mayor % de reducción a menor concentración de toxina).
- La reducción de OTA por *O. oeni* es independiente de la viabilidad de la bacteria. Ello demuestra que no se debe a una degradación de la toxina sino más bien a procesos de adsorción de la misma a la pared bacteriana, probablemente a los ácidos teicoicos. Por tanto, en procesos

de detoxificación podrían usarse tanto bacterias vivas como muertas como adsorbente de OTA.

- Las experiencias llevadas a cabo *in vitro* en medios suplementados con etanol mostraron que el posible uso de *O. oeni* como adsorbente de la OTA en la fabricación de bebidas como la cerveza o el vino es dependiente del nivel de etanol (mayor efectividad a 5% de etanol), del pH (mayor efectividad cuando aumenta el pH) y del nivel de OTA en el medio (mayor efectividad a niveles bajos de toxina).







**FINAL CONCLUSIONS**



---

**The results obtained from the research on the potential and real risk of the presence of fungi and mycotoxins in barley grown in Spain permit to conclude that:**

- The toxin producing mycobiota found in Spanish barley, studied by classical methods and species-specific PCR methods based on multicopy regions of the rDNA (IGS and ITS), is constituted by species belonging to the genera *Aspergillus* and *Fusarium*. Regardless of the geographic origin of the samples and following a decreasing order the most frequent species were:
  - From the genus *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. carbonarius*, *A. parasiticus*, *A. steynii*, *Aspergillus niger* aggregate and *A. ochraceus*. Before the present study *A. steynii* and *A. carbonarius* have not been reported to occur in barley.
  - From the genus *Fusarium*: *F. verticillioides* and *F. graminearum* followed by *F. langsethiae* and *F. equiseti*, which were isolated sporadically and only in certain regions. Before this study *F. langsethiae* has not been described in any Spanish crop.
- The mycotoxins occurring in Spanish barley were (in decreasing order): OTA, DON, AFLB<sub>1</sub>, ZEA, FBs (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub>), NIV, AFLG<sub>1</sub>, AFLB<sub>2</sub>, AFLG<sub>2</sub> and HT-2/T-2 toxins. AFLs have not been detected in barley prior this study.
- The most frequent mycotoxins co-occurring in barley samples were the following combinations: OTA and DON (51.7%), AFLB1 and DON (31%), OTA and FBs (24.1%), DON and FBs (24.1%), OTA and AFLB1 (17.3%), DON and NIV (17.3%), AFLs, OTA and DON (13.8%). Up to seven mycotoxins co-occurred in two samples.
- Levels of fungi and mycotoxins in the studied barley samples were

independent of the geographic origin but were dependent on the type of crop. Irrigated crops (short cycle, Spring crops, February-July) showed more contamination than dry crops (long cycle, Winter crops, October/November-July).

- The statistical analysis of data shows that in some cases there is no relation between the levels of fungal contamination found in samples using classical and PCR techniques or between the presence of a given mycotoxin producing species and the corresponding mycotoxin. Such discrepancies show that some species can occur at very low levels in the sample or to have decreased or died due to adverse environmental conditions (hydric and thermal stress) or agronomical treatments (antifungal agents) after having produced the mycotoxin. The same way, it can occur that a toxin producing species is found but the proper conditions for toxin biosynthesis did not take place. The obtained results warn about the need of using PCR techniques, enriched culture media and optimized analytical methods for mycotoxins to provide a right assessment of what is considered “potential risk” and “real risk” of the presence of a given mycotoxin in the cereal. Further studies similar to the present one on other cereals are needed.

**The results obtained from the research of strategies aimed at the prevention and control of the more relevant fungal species able to produce OTA, AFLs or T-2 and HT-2 toxins, and production of toxins permit to conclude that:**

- Antifungal agents sulfur and copper oxychloride, authorized in ecological agriculture, and mancozeb, authorized in conventional farming, are moderately effective to control the development of *A. carbonarius* and *A. ochraceus*. The effectiveness order was: mancozeb > copper oxychloride > sulfur, against *A. ochraceus* > *A. carbonarius* and 15 °C > 25 °C. The three antifungal agents showed very low activity against *F. langsethiae* and *A. flavus*.
- Production of OTA in cultures of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* in the presence of mancozeb, copper oxychloride and sulfur, increases with time and temperature. At 15 °C biosynthesis of the toxin is practically inhibited except under some conditions (long time and low antifungal doses), which significantly increases biosynthesis owing to possible fungal stress and de-activation of the active ingredient.

- In absence of fungicides *F. langsethiae* grows faster when water activity is higher ( $0.98 > 0.95$ ) and temperature is higher ( $25\text{ °C} > 20\text{ °C} > 15\text{ °C}$ ). This behavior shows its adaptation to temperatures higher than those found in regions of Central and North Europe, which constitute the natural habitat of *F. langsethiae*. This result indicates that there is a risk of expansion of this species to Southern Europe countries.
- Prochloraz and tebuconazole (azoles) are more effective than fenpropimorph (morpholine) to control growth of *F. langsethiae*. In oat-agar medium, the effectiveness of the three antifungal agents decreases as temperature increases, and is dependent on the strain regardless of the  $a_w$  of the medium. This finding confirms the need of additional research on T-2 and HT-2 toxins in Southern Europe.
- The effectiveness of prochloraz, tebuconazole and fenpropimorph in cereal grain cultures of *F. langsethiae* was lower than in cereal-based medium and was unaffected by temperature and  $a_w$ . This behavior proves an excellent adaptation of this species to cereals growing in a wide range of temperature and relative humidity.
- Production of T-2 and HT-2 by *F. langsethiae* in cereal grains was more restrictive than in cereal based medium. Production increased when temperature, time, and  $a_w$  increased and fungicide dose decreased. At 0.95  $a_w$  none of the two toxins were detected in the cereal grains.
- The levels of T-2 found in oat-agar cultures of *F. langsethiae* were always higher than those of HT-2. However, the contrary was found in oat grain cultures. This is the first comparative study on this topic and shows that a rapid transformation of T-2 toxin into its derivative HT-2 takes place. Considering that toxicity of both is similar, it is appropriate the regulation of the sum of both toxins in agreement with the EU recommendation aimed at its imminent regulation in cereals.
- The growth rate of *A. flavus* was significantly higher at very high temperatures ( $37\text{ °C} > 25\text{ °C}$ ), and was not affected by  $a_w$  (0.99 or 0.95). This response is very unusual and points out to an adaptation of the species to extreme conditions of temperature and humidity, which foster its competitiveness in the frame of the climatic change.
- The efficacy of prochloraz, mixtures of prochloraz + tebuconazole and tebuconazole against *A. flavus* follows the order  $37\text{ °C} > 25\text{ °C}$  and 0.99

$a_w > 0.95 a_w$ . This fungus is more vulnerable to treatments under optimal growth conditions.

- Contrary to the growth, production of AFLB<sub>1</sub> and AFLB<sub>2</sub> by *A. flavus* followed the order 25 °C > 37 °C regardless of  $a_w$ . Toxin levels in the media decreased with increasing dose of antifungal agents.
- In general, mild hydric or thermic stress conditions, low fungicide doses, and their interactions often promote toxin production by all the studied species. Thus, treatments with the assayed fungicides can be very effective but they must be carefully controlled in agricultural practices.

**The results obtained from the research of strategies for reduction of OTA, the most frequent mycotoxin in barley and other crops, like grape, during their technological processing and manufacture of by-products for human consumption, such a beer and wine, permit to conclude that:**

- The presence of *Oenococcus oeni*, lactic acid bacteria, in media contaminated with OTA can reduce the toxin level by more than 60%. The reduction level is dependent on the strain (different in the 10 studied isolates), on the concentration of cells (% reduction increases with increasing concentration of *O. oeni* in the medium), on time (% reduction increases with time) and on starting concentration of the toxin in the medium (% reduction increases with decreasing initial toxin level).
- The reduction level of OTA by *O. oeni* is independent of bacterial viability. This fact shows that reduction is not caused by toxin degradation but by absorption of OTA on the bacterial wall, probably due to the teichoic acids. Thus, in detoxification processes, both alive or death bacteria can be used as OTA adsorbents.
- *In vitro* experiments carried out in media supplemented with ethanol show that the possible use of *O. oeni* as OTA adsorbent in the manufacturing of beverages like beer or wine is dependent on ethanol concentration (effectiveness increases with decreasing ethanol level), on the pH (effectiveness increases with increasing pH) and on OTA level (higher efficacy at low toxin levels).



## V. BIBLIOGRAFÍA





- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2650-2652.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J., Cabañes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black Aspergilli. Antonie Van Leeuwenhoek 86, 33-49.
- Abbas, H.K., Mirocha, C.J., Pawlosky, R.J., Pusch, D.J. 1985. Effect of cleaning, milling, and baking on deoxynivalenol in wheat. Applied and Environmental Microbiology 50, 482-486.
- Abbas, H.K., Zablotowicz, R.M., Locke, M.A. 2004. Spatial variability of *Aspergillus flavus* soil populations under different crops and corn grain colonization and aflatoxins. Canadian Journal of Botany 82, 1768-1775.
- Abbas, H.K., Weaver, M.A., Zablotowicz, R.M., Horn, B.W., Shier, W.T. 2005. Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section *Flavi* from the Mississippi Delta. European Journal of Plant Pathology 112, 283-287.
- Abbas, H.K., Wilkinson, J.R., Zablotowicz, R.M., Accinelli, C., Abel, C.A., Bruns, H.A., Weaver, M.A. 2009. Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. Toxin Reviews 28, 142-153.
- Abdel-Hadi, A., Carter, D., Magan, N. 2011. Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* group contaminating Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques. World Mycotoxin Journal 4, 69-77.
- Abdel-Hadi, A., Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R., Magan, N., 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. Journal of the Royal Society Interface 9, 757-767.
- Abildgren, M.P., Lund, F., Thrane, U., Elmholt, S. 1987. Czapek–Dox agar

- containing iprodione and dichloran as a selective medium for the isolation of *Fusarium* species. *Letters in Applied Microbiology* 5, 83-86.
- Abrunhosa, L., Fernandes, A., Venâncio, A. 2005. Ochratoxin A removal during the main stops of winemaking. 7<sup>o</sup> Encontro de Química dos Alimentos, 13-16 Abril, Viseu, Portugal.
- Abrunhosa, L., Santos, L., Venâncio, A. 2006. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology* 20, 231-242.
- Abrunhosa, L., Venâncio, A. 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. *Biotechnological Letters* 29, 1909-1914.
- Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Venâncio, A. 2010. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. *Toxins* 2, 1078-1099.
- Abrunhosa, L., Inês, A., Rodrigues, A.I., Guimarães, A., Pereira, VL., Parpot, P., Mendes-Faia, A., Venâncio, A. 2014. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology* 188, 45-52.
- Ahmad, I., Iram, S. 2008. Effect of zero and conventional tillage on the soil mycoflora of rice-wheat cropping system. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41, 67-74.
- Aish, J.L., Rippon, E.H., Barlow, T., Hattersley, S.J. 2004. Ochratoxin A. En: Magan, M., Olsen, M. (Eds.). *Mycotoxins in Food: Detection and Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 307-338.
- Akiyama, H., Chen, D., Miyahara, M., Toyoda, M., Saito, Y. 1996. Simple HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in nuts and corn. *Journal of Food Hygienic Society* 37, 195-201.
- Akiyama, H., Y. Goda, T. Tanaka, M. Toyoda. 2001. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. *Journal of Chromatography A* 932, 153-157.
- Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Van Schalkwyk, D.J., Behrend, Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1729-1733.
- Ali, N., Hashim, N.H., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M., Yoshizawa T. 2005. Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1763-1772.

- Alldrick, A.J. 1996. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Additives and Contaminants* 13, 27-28.
- Alperden, I., Aran, N., Topal, S., Eke, D., Kara, M. Karaali, A. 1990. Systematic analysis of mycoflora Turkish foodstuffs. NATO-TU Mycotoxins Project. Joint-Final Report of Mycology and System Analysis Subprojects. Gebze-Kocaeli, Turkey.
- Alptekin, Y., Duman, A.D., Akkaya, M.R. 2009. Identification of fungal genus and detection of aflatoxin level in second crop corn grain. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 1777-1779.
- Altioikka, G., Can, N. O., Atkosar, Z., Aboul-Enein, H. Y. 2009. Determination of ochratoxin A in Turkish Wines. *Journal of Food and Drug Analysis* 17, 467-473.
- Amézqueta, S., González-Peñas, E., Murillo-Arbizu, M., López de Cerain, A. 2009. Ochratoxin A decontamination: A review. *Food Control* 20, 326-333
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., Guiraud, J.P. 2012. OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control* 26, 259-268.
- Anderson, J.A. 2007. Marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119, 51-53.
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., Hristozova, T. 2006. Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology* 112, 75-80.
- Anli, E., Çabuk, B., Vural, N., Baspinar, E. 2005. Ochratoxin A in Turkish wines. *Journal of Food Biochemistry* 29, 611-623.
- Anon, 1966. Alarm about aflatoxin. *Nature* 212, 1512.
- Anselme, M., Tangni, E.K., Pussemier, L., Motte, J.C., Van Hove, F., Schneider, Y.J., Van Peteghem, C., Larondelle, Y. 2006. Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market. *Food Additives and Contaminants* 23, 910-918.
- Antilla, L., Cotty, P.J. 2004. Advances in the utilization of atoxigenic strain technology to manage aflatoxin in commercial cotton. *Mycopathologia* 157, 448.
- Araguás, C., González-Peñas, E., López de Cerain, A., Bello, J. 2003. Acerca de la posible contaminación por ocratoxina A en alimentos. I: cereales cultivados en diversas zonas geográficas de la comunidad foral de Navarra. *Alimentaria* 3, 23-29.

- Araguás, C., González-Peñas, E., López de Cerain, A. 2005. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food Chemistry* 92, 459-464.
- Arroyo, M., Aldred, D., Magan, N. 2005. Environmental factors and weak organic acid interactions have differential effects on control of growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* isolates in bread. *International Journal of Food Microbiology* 98, 223-231.
- Asoa, T., Buchi, G., Abdel-Kader, M.M., Chang, S.B., Wick, E.L., Wogan, G.N. 1963. Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society* 85, 1706-1707.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Ramos, A.J., Marín, S., 2012. Modelling the effect of temperature and water activity of *Aspergillus flavus* isolates from corn. *International Journal of Food Microbiology* 156, 60-67.
- Astoreca, A., Vaamonde, G., Dalcero, A., Marín, S., Ramos, A.J., 2014. Abiotic factors and their interactions influence on the co-production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by *Aspergillus flavus* isolated from corn. *Food Microbiology* 38, 276-283.
- Atayde, D.D., Reis, T.A., Godoy, I.J., Zorzete, P., Reis, G.M., Corrêa, B., 2012. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil *Crop Protection* 33, 7-12.
- Atoui, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using realtime PCR. *International Journal of Food Microbiology* 115, 313-318.
- Atoui, A., El Khoury, A., Kallass, M., Lebrihi, A. 2012. Quantification of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* by real-time PCR system and zearalenone assessment in maize. *International Journal of Food Microbiology* 154, 59-65.
- Austwick, P.K.C. 1978. Mycotoxicoses in poultry. En: Wyllie, T.D., Morehouse, L.G. (Eds.). *Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses: an Encyclopedic Handbook*. Vol. 2: Mycotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry, and aquatic invertebrates and vertebrates. Marcel Dekker, Inc, Nueva York, pp. 279-301.
- Avalos, J., Estrada, A.F. 2010. Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 930-938.
- Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R., Abate, D. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia* 162, 57-63.

- Aziz, N.H., Moussa, L.A.E., 1997. Influence of white light, near-UV irradiation and other environmental conditions on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* and ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Nahrung* 41, 150-154.
- Bacaloni, A., Cavaliere, C., Faberi, A., Pastorini, E., Samperi, R., Laganà, A. 2005. Automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of ochratoxin A in wine and beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5518-5525.
- Badii F., Moss M.O. 1988. The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* Speare. *Letters in Applied Microbiology* 7, 37-39.
- Baert, K., Valero, A., De Meulenaer, B., Samapundo, S., Ahmed, M.M., Li, B., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag phase of *Penicillium expansum* in apples. *International Journal of Food Microbiology* 118, 139-150.
- Bai, G., Shaner, G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight. *Annual Review of Phytopathology* 42, 135-161.
- Baker, S.E., Bennett, J.W. 2008. *The aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3-13.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-294.
- Barkai-Golan, R. 2008a. *Aspergillus* mycotoxins. En: Barkai-Golan, R., Paster, N. (Eds.). *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press (Elsevier), pp 115-151.
- Barkai-Golan, R. 2008b. *Penicillium* mycotoxins En: Barkai-Golan, R., Paster, N. (Eds.). *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press (Elsevier), pp 153-183.
- Barkai-Golan, R. 2008c. *Alternaria* mycotoxins En: Barkai-Golan, R., Paster, N. (Eds.). *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*. Academic Press (Elsevier), pp 185-203.
- Basheer, I.A., Hajmeer, M. 2000. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application. *Journal of Microbiological Methods* 43, 3-31.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Freitas Schwan, R., Wheals, A.E. 2003. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). *International Journal of Food Microbiology* 85, 293-300.

- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Ferreira Silva, C., Cirillo, M., Azevedo Varga, E., Freitas Schwan, R. 2009. Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control* 20, 784-790.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L. Giorni, P., Kozakiewicz, Z. 2003a. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection* 66, 633-636.
- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Formenti, S., Barbano, C., Languasco, L. 2003b. Effect of fungicides on ochratoxin producing black aspergilli. *Journal of Plant Pathology* 85, 285-286.
- Battilani, P., Logrieco, A., Giorni, P., Cozzi, G., Bertuzzi, T., Pietri, A. 2004. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 1736-1740.
- Battilani, P., Scandolara, A., Barbano, C., Pietri, A., Bertuzzi, T., Marocco, A., Berardo, N., Vannozi, G.P., Baldini, M., Miele, S., Salera, E., Maggiore, T. 2005. Monitoraggio de lla contaminazione da micotossine in mais. *L'Informatore agrario* 61, 47-49.
- Battilani, P., Magan, N., Logrieco, A. 2006. European research on ochratozin A in grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology* 111, 2-4.
- Battilani, P., Scandolara, A., Formenti, S., Rossi, V., Pietri, A., Marocco, A., Ramponi, C., 2007. L'acqua nelle cariossidi facilita l'accumulo di fumonisine. *L'Informatore Agrario* 63, 49-52.
- Battilani, P., Barbano, C., Bertuzzi, T., Marocco, A., Pietri, A., Scandolara, A., Scudellari, D. 2008a. Mycotoxins in Emilia-Romagna: encouraging results. *L'Informatore Agrario* 64, 39-41.
- Battilani, P., Barbano, C., Piva, G. 2008b. Aflatoxin B1 contamination in maize related to the aridity index in North Italy. *World Mycotoxin Journal* 1, 449-456.
- Battilani P., Rossi, V., Giorni, P., Pietri, A., Gualla, A., van der Fels-Klerx, H.J., Booij, C.J.H., Moretti, A., Logrieco, A., Miglietta, F., Toscano, P., Miraglia, M., De Santis, B., Brera, C., 2012. SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate Change. Question No EFSA-Q-2009-00812).
- Baudrimont, I., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Dirheimer, G., Creppy, E.E. 1994. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 89, 101-111.

- Baydar, T., Engin, A.B., Girgin, G., Aydin, S., Sahin, G. 2005. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12, 193-197.
- Bayman, P., Baker, J.L., Mahoney, N.E. 2002. *Aspergillus* on tree nuts: incidence and associations. *Mycopathologia* 155, 161-168.
- Becker, M., Degelmann, P., Herderich, M., Schreier, P., Humpf, H.U. 1998. Column liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. *Journal of Chromatography A* 818, 260-264.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1038-1044.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. 2005a. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and must. *FEMS Microbiology Letters*, 255, 203-208.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A. 2005b. Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8224-8229.
- Belajová, E., Rauova, D. 2007. Determination of ochratoxin A and its occurrence in wines of Slovakian retail. *Journal of Food and Nutrition Research*, 46, 68-74.
- Bellí, N., Marín, S., Duaigües, A., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2004a. Ochratoxin A in wines, musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 591-594.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2004b. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 96, 19-27.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2004c. Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38, 72-77.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2006a. Effect of photoperiod and day–night temperatures simulating field conditions on growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* strains isolated from grapes. *Food Microbiology* 23, 622-627.
- Bellí, N., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2006b. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic

- grape-like medium and on grapes. *Food Additives and Contaminants* 23, 1021-1029.
- Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Cortés, M.A., Yusà, V., Hernández, F. 2011. UHPLC–MS/MS highly sensitive determination of aflatoxins, the aflatoxin metabolite M1 and ochratoxin A in baby food and milk. *Food Chemistry* 126, 737-744.
- Benešová, K., Běláková, S., Mikulíková, R., Svoboda, Z. 2012. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. *Food Control* 25, 626-630.
- Bennett, G.A., Richard, J.L., Eckhoff, S.R. 1996. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared from contaminated corn. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 392, 317-322.
- Bennett, J.W., Fernholz, F.A., Lee, L.S. 1978. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia* 70, 104-116.
- Bennett, J.W., Dunn, J.J., Goldsman, C.I. 1981. Influence of white light on production of aflatoxins and anthraquinones in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 488-491.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16, 479-516.
- Bento, J.M.V., Pena, A., Lino, C.M., Pereira, J.A. 2009. Determination of ochratoxin A content in wheat bread samples collected from the Algarve and Bragança regions, Portugal: winter 2007. *Microchemical Journal* 91, 165-169.
- Beretta, B., Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C., Restani, P. 2002. Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food Additives and Contaminants* 19, 70-75.
- Bernhoft, A., Clasen, P-E, Kristoffersen, A.B., Torp, M. 2010. Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than conventional cereals. *Food Additives and Contaminants, Part A* 27, 842-852.
- Beti, J.A., Phillips, T.W., Smalley, E.B. 1995. Effects of maize weevils (Coleoptera: *Curculionidae*) on production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* in stored corn. *Journal of Economic Entomology* 88, 1776-1782.
- Beyer, M., Ferse, I., Mulac, D., Wurthwein, E.U., Humpf, H.U. 2009. Structural elucidation of T-2 toxin thermal degradation products and investigations toward their occurrence in retail food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1867-1875.



- Bhat, R., Rai, R.V., Karim, A.A. 2010. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9, 57-81.
- Biel, W., Bobko, K., Maciorowski, R. 2009. Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. *Journal of Cereal Science* 49, 413-418.
- Bircan, C. 2009. Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1996-2001.
- Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Jramer, J., Dehne, H.W. 2002. Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *European Journal of Plant Pathology* 108, 667-673.
- Biselli, S., Hummert, C. 2005. Development of a multicomponent method for *Fusarium* toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. *Food Additives and Contaminants* 22, 752-760.
- Bizaj, E., Mavri, J., Čuš, F., Raspor, A. 2009. Removal of ochratoxin A in *Saccharomyces cerevisiae* liquid cultures. *South African Journal for Enology and Viticulture* 30, 151-155.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2004. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of Chromatography A* 1054, 397-401.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2005. Analysis of aflatoxins in peeled peanuts by liquid chromatography and fluorescence detection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 115-200.
- Blount, W.P., 1960. Disease of turkey poult. *Veterinary Record* 72, 786.
- Blount, W.P. 1961. Turkey "x" disease. *Journal of British Turkey Federation* 9, 55-58.
- Bolechová, M., Benesova, K., Belakova, S., Caslavsk, J., Pospíchalov, M., Mikulíkov, R. 2015. Determination of seventeen mycotoxins in barley and malt in the Czech Repub. *Food Control* 47, 108-113.
- Bornet, A., Teissedre, P.L. 2008. Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (ochratoxin A) contaminants in wines. *European Food Research and Technology* 226, 681-689.
- Bottalico, A., Perrone, G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 108, 611-624.
- Bouaziz, C., Sharaf el Dein, O., El Golli, E., Abid-Essefi, S., Brenner, C.,

- Lemaire, C., Bacha, H. 2008. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology* 254, 19-28.
- Boudra, H., Le Bars, P., Le Bras, J. 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1156-1158.
- Boutigny, A.-L., Barreau, C., Atanasova-Penichon, V., Verdal-Bonnin, M.-N., Pinson-Gadais, L. Richard Forget, F. 2009. Ferulic acid and efficient inhibitor of type B trichothecene biosynthesis and *Tri* gene expression in *Fusarium* liquid cultures. *Mycological Research* 113, 746-753.
- Bradburn, N., Coker, R.D., Blunden, G. 1994. The aetiology of turkey 'x' disease. *Phytochemistry* 35, 817.
- Braicu, C., Puia, C., Bodoki, E., Socaciu, C. 2008. Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography-densitometry. *Journal of Food Quality* 31, 108-120.
- Brera, C., Debegnach, F., Grossi, S., Miraglia, M. 2004. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B1 in dry milling corn fractions. *Journal of Food Protection* 67, 1261-126.
- Brera, C., Debegnach, F., Minardi, V., Prantera, E., Pannunzi, E., Faleo, S., et al. 2008. Ochratoxin A contamination in Italian wine samples and evaluation of the exposure in the Italian population. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 106-111.
- Brera, C., Debegnach, F., De Santis, B., Iafrate, E., Pannunzi, E., Berdini, C., Prantera, E., Gregori, E., Miraglia, M. 2011. Ochratoxin A in cocoa and chocolate products from the Italian market: Occurrence and exposure assessment. *Food Control* 22, 1663-1667.
- Briones, A.I., Ubeda, J.F. 2001. Elaboración de un plan APPCC en una bodega. *Tecnología del Vino Mayo/Junio*, 89-93.
- Bruns, H.A. 2003. Controlling aflatoxin and fumonisin in maize by crop management. *Aflatoxin and food safety. (Part 1). Journal of Toxicology, Toxin Reviews* 22, 153-173.
- Buchanan, R.L., Jones S.B., Stahl H.G. 1987. Effect of miconazole on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 100, 135-144.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C. 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* 14, 313- 327.

- Bullerman, L.B., Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119, 140-146.
- Bunner, D.L., Morris, E.R. 1988. Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin an important mechanism of action. *Toxicology and Applied Pharmacology* 92, 113-121.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. 1998. Datos sobre la presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria* 35(292), 103–109.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. 1999. Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria* 36, 107-114.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. 2013. Survey on aflatoxins in beers sold in Spain and in other European countries. *World Mycotoxin Journal* 6, 93-101.
- Bushnell, W.R., Hazen, B.E., Pritsch, C. 2003. Histology and physiology of *Fusarium* head blight. En: Leonard, K.J., Bushnell, W.R., (Eds.). *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley*. Chapter 3. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 44-83.
- Cabañas, R., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Cabañas, F.J. 2008. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. *Food Microbiology* 25, 642-647.
- Cairns-Fuller, V. 2004. Dynamics and control of ochratoxigenic strains of *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus* in the stored grain ecosystem. PhD Thesis, Cranfield University, Silsoe, Bedford, UK.
- Cairns-Fuller, V., Aldred, D., Magan, N. 2005. Water, temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1215-1221.
- Caloni, F., Ranzenigo, G., Cremonesi, F., Spicer, L.J. 2009. Effects of a trichothecene, T-2 toxin on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells. *Toxicon* 54, 337-344.
- Canady, R.A., Coker, R.D., Egan, S.K., Krska, R., Olsen, M., Resnik, S., Schlatter, J. 2001. T-2 and HT-2 toxins. Safety evaluation of certain mycotoxins in food, FAO Food and Nutrition Paper 74. En: WHO (Ed.), WHO Food Additives Series 47, Geneve, Switzerland, pp. 557-680.
- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2010. Biomonitoring of *Fusarium* spp. Mycotoxins: Perspectives for an Individual Exposure Assessment Tool. *Food Science and Technology International* 16, 266-276.
- Cano-Sancho, G., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M. Burdaspal, P., Legarda,

- T.M., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2011. Presence of trichothecenes and co-occurrence in cereal-based food from Catalonia (Spain). *Food Control* 22, 490-495.
- Cardwell, K.F., Kling, J.G., Maziya-Dixon, B. Bosque-Pérez, N.A. 2000. Interactions between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in Lowland Africa. *Phytopathology* 90, 276-284.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., Ritieni, A. 2006. Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 122-126.
- Caridi, A. 2007. New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal of Food Microbiology* 120, 167-172.
- Carrascosa, A.V., Muñoz, R., González, R. (Eds.) 2005. *Microbiología del vino*. AMV Ediciones, Madrid.
- Cary, J.W., Ehrlich, K.C. 2006. Aflatoxigenicity in *Aspergillus*: molecular genetics, phylogenetic relationships and evolutionary implications. *Mycopathologia* 162, 167-177.
- Castegnaro, M., McGregor, D. 1998. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Revue de Medecine et Veterinaire* 149, 671-678.
- Castellari, M., Versari, A., Fabiani, A., Parpinello, G.P., Galassi, S. 2001. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 3917-3921.
- Castelo, M.M., Sumner, S.S., Bullerman, L.B., 1998a. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *Journal of Food Protection* 61, 1030-1033.
- Castelo, M.M., Katta, S.K., Sumner, S.S., Hanna, M.A., Bullerman, L.B., 1998b. Extrusion cooking reduces recoverability of Fumonisin B1 from extruded corn grits. *Journal of Food Science* 63, 696-698.
- Castelo, M.M., 1999. Stability of mycotoxins in thermally processed corn products. Section VI. Loss of fumonisin B1 during the corn flake process with and without sugars. PhD Dissertation. University of Nebraska, Lincoln, NE.
- Cavaliere, Ch., Foglia, P., Guarino, Ch., Nazzari, M., Samperi, R., Laganà, A. 2007. Determination of aflatoxins in olive oil by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 596, 141-148.
- Cavret, S., Lecoer, S. 2006. Fusariotoxin transfer in animal. *Food and Chemical Toxicology* 44, 444-453.

- Cazzaniga, D., Basílico, J.C., González, R.J., Torres, R.L., de Greef, D.M. 2001. Mycotoxins inactivation by extrusion cooking of corn flour. *Letters in Applied Microbiology* 33, 144-147.
- Cecchini, F., Morassut, M., García Moruno, E., Di Stefano, R. 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23, 411-417.
- Cengiz, M., Oruç, H.H., Uzunoğlu, I., Sonal, S. 2007. Ochratoxin A levels in different types of bread and flour. *Uludag Univ. Journal of the Faculty of Veterinary Medicine* 26, 7-10.
- Chala A., Mohammed A., Ayalew A., Skinnes H. 2013 Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia. *Food Control* 30, 602-605.
- Charmley, L.L., Trenholm. H.L., Prelusky, D.A., Rosenberg, A. 1995. Economy losses and decontamination. *Natural Toxins* 3, 99-203.
- Chelkowski, J., Golinski, P., Szebiotko, K. 1981. Mycotoxins in cereal grain. Part II. The fate of ochratoxin A after processing of wheat and barley grain. *Die Nahrung* 25, 423-426.
- Cheraghali, A.M., Yazdanpanah, H., Doraki, N., Abouhossain, G., Hassibi, M., Ali-abadi, S., Aliakbarpoor, M., Amirahmadi, M., Askarian, A., Fallah, N., Hashemi, T., Jalali, M., Kalantari, N., Khodadadi, E., Maddah, B., Mohit, R., Mohseny, M., Phaghihy, Z., Rahmani, A., Setoodeh, L., Soleimany, E., Zamanian, F. 2007. Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology* 45, 812-816.
- Chiotta, M.L., Susca, A., Stea, G., Mulè, G., Perrone, G., Logrieco, A., Chulze, S.N. 2011. Phylogenetic characterization and ochratoxin A – Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 149, 171-176.
- Chu, F.S., Chang, C.C., Ashoor, S.H., Prentice, N., 1975. Stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology* 29, 313-316.
- Chulze, S.N., Magnoli, C.E., Dalcerro, A.M. 2006. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *International Journal of Food Microbiology* 111, 5-9.
- Codex Alimentarius (CAC), 2003. Code of practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes. CAC/RCP 51-2003.
- Codex Alimentarius (CAC), 2007. Code of practice for the prevention and reduction of ochratoxin A contamination in wine. CAC/RCP 63-2007.

- Coker, R.B. 2000. Aflatoxins and mycotoxins: Chromatography. En: Wilson, I.D., Adlard, E.R., Cooke, M., Poole, C.F. (Eds.). Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, San Diego, CA, pp. 1873-1888.
- Cole, R.J., Cox. R.H. 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, Nueva York, 987 pp.
- Colova-Tsolova, V., Perl, A., Krastanova, S., Tsvetkov, I., Atanassov, A. 2001. Genetically engineered grape for disease and stress tolerance. En: Roubelakis-Angelakis, K.A. (Ed.). Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, pp. 411-432.
- Connolly, M.L., Lovegrove, J.A., Tuohy, K.M. 2010. *In vitro* evaluation of the microbiota modulation abilities of different sized whole oat grain flakes. *Anaerobe* 16, 483-488.
- Cook, R. 2003. Los archivos de Salem. De Bolsillo. Barcelona.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J.L., Fungaro, M.H., Taniwaki, M.H. 2011. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *International Journal of Food Microbiology* 148, 141-144.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Nester, M.A., Efraim, P., Taniwaki, M.H. 2013. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. *Food Chemistry* 136, 100–104.
- Corcuera, L.A., Arbillaga, L., Vettorazzi, A., Azqueta, A., de Cerain, A.L. 2011. Ochratoxin A reduces aflatoxin B1 induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2883-2889.
- Cotty, P.J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84, 1270-1277.
- Cotty, P.J., Cardwell, K.F. 1999. Divergence of West African and north American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2264-2266.
- Cotty, P.J. 2006. Biocompetitive exclusion of toxigenic fungi. En: Barug, G., Bhatnagar, D., Egmond, H.P. van, Kamp, J.W. van der, Osenbruggen, van, Visconti, A. (Eds.). The mycotoxin factbook. Food and feed topics. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 179-197.
- Cotty, P.J., Jaime-García, R. 2007. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119, 109-115.
- Covarelli, L., Beccari, G., Marini, A., Tosi, L. 2012. A review on the occurrence

- and control of ochratoxigenic fungal species and ochratoxin A in dehydrated grapes, non-fortified dessert wines and dried vine fruit in the Mediterranean area. *Food Control* 26, 347-356.
- Creppy, E.E., Kern, D., Steyn, P.S., Vleggaar, R., Roschenthaler, R., Dirheimer, G. 1983a. Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicology Letters* 19, 217-224.
- Creppy, E.E., Roeschenthaler, R., Dirheimer, G. 1984. Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food and Chemical Toxicology* 22, 883-886.
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127, 19-28.
- Curtui, V., Seidler, C., Schneider, E., Usleber, E. 2004. Mycotoxins in food in Germany. En: An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Logrieco, A., Visconti, A. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 109-121.
- Czerwiecki, L., Czajkowska, D., Witkowska-Gwiazdowska, A. 2002a. On ochratoxin A and fungal flora in polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Additives and Contaminants* 19, 470-477.
- Czerwiecki, L., Czajkowska, D., Witkowska-Gwiazdowska, A. 2002b. On ochratoxin A and fungal flora in polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Food Additives and Contaminants* 19, 1051-1057.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Rottinghaus, G.E., Dondur, V., Mašić, A. 2003. Adsorption of ochratoxin A on octadecyldimethyl benzyl ammonium exchanged-clinoptilolite-heulandite tuff. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 30, 157-165.
- Daković, A., Tomašević-Čanović, M., Dondur, V., Rottinghaus, G. E., Medaković, V., Zarić, S. 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46, 20-25.
- Danielle, D., Atayde, Reis, T.A., Godoy, I.J., Zorzete, P., Reis, G.M., Corrêa, B. 2012. Mycobiota and aflatoxins in a peanut variety grown in different regions in the state of São Paulo, Brazil *Crop Protection* 33, 7-12.
- Dantigny, P., Guilmar, A., Bensoussan, M. 2005. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology* 100, 187-196.
- Dasko, L. 2005. Determination of ochratoxin A in beer. *Czech Journal of Food Science* 23, 69-73.

- Davey, K.R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Bacteriology* 5, 483-488.
- Davis, N.D., Searcy, J.W., Diener, U.L. 1969. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology* 17, 742-744.
- De Carvalho, R.A., Batista, L.R., Prado, G., de Oliveira, B.R., da Silva, D.M. 2010. Incidence of toxigenic fungi and aflatoxins in rice. *Ciencia e Agrotecnologia* 34, 946-952.
- De Kuppler, A.L.M., Steiner, U., Sulyok, M., Krska, R., Oerke, E.-C. 2011. Genotyping and phenotyping of *Fusarium graminearum* isolates from Germany related to their mycotoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 151, 78-86.
- De Girolamo, A., Solfrizzo, M., Visconti, A. 2001. Effect of processing on fumonisin concentration in corn flakes. *Journal of Food Protection* 64, 701-705.
- Degelmann, P., Becker, M., Herderich, M., Humpf, H.U. 1999. Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 49, 543-546.
- Degola, F., Berni, E., Spotti, E., Ferrero, I., Restivo, F.M. 2009. Facing the problem of "false positives": Re-assessment and improvement of a multiplex RT-PCR procedure for the diagnosis of *A. flavus* mycotoxin producers. *International Journal of Food Microbiology* 129, 300-305.
- Del, P.E.M., Fernandes, J.M.C., Bergstrom, G.C. 2007. Influence of growth stage on fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat. *Journal of Phytopathology* 155, 577-581.
- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna Ceccaldi, B., Bompeix, G. 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control* 14, 225-227.
- Demeke, T., Kidane, Y.Y., Wuhib, E. 1979. Ergotism - A report on an epidemic, 1977-78. *Ethiopian Medical Journal* 17, 107-113.
- Dewettinck, K., Van Bockstaele, F., Kühne, B., Van de Walle, D., Courtens, T.M., Gellynck, X. 2008. Nutritional value of bread: influence of processing, food interaction and consumer perception. *Journal of Cereal Science* 48, 243-257.
- Díaz, G.A., Torres, R., Vega, M., Latorre, B.A. 2009. Ochratoxigenic *Aspergillus* species on grapes from Chilean vineyards and *Aspergillus* threshold levels on grapes. *International Journal of Food Microbiology* 133, 195-199.



- Diener, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H., Payne, G.A., Lee, L.S., Klich, M.A. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology 25, 249-270.
- Dirheimer, G., Creppy, E.E. 1991. Mechanisme of action of ochratoxin A. IARC Sci. Publ. 115, 171–186.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology 69, 155-166.
- Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., Kuca, K. 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. Current Drug Metabolism 9, 77-82.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Jurjevic, Z., Ivic, D., Cvjetkovic, B. 2005. Fumonisin B1, fumonisin B2, zearalenone and ochratoxin A contamination of maize in Croatia. Food Additives and Contaminants 22, 677-680.
- Domijan, A.M., Peraica, M. 2010. Carcinogenic Mycotoxins. En: Comprehensive Toxicology, Vol 14, Ch. A. McQueen (Ed.), Elsevier Ltd. Pp. 125-137.
- Doohan, F.M., Weston, G., Rezanoor, H.N., Parry, D.W., Nicholson, P. 1999. Development and use of a reverse transcription-PCR assay to study expression of Tri5 by *Fusarium* species in vitro and in planta. Applied and Environmental Microbiology 65, 3850-3854.
- Doohan, F.M., Brennan, J., Cooke, B.M. 2003. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. European Journal of Plant Pathology 109, 755-768.
- Donner, J.W., Cole, R.J., Wicklow, D.T. 1999. Aflatoxin reduction in corn through field application of competitive fungi. Journal of Food Protection 62, 650-656.
- Dorrenhaus, A., Flieger, A., Golka, K., Schulze, H., Albercht, M., Degen G.H. et al. 2000. Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. Toxicology Science 53, 271-77.
- Dowd, P.F., Miller, J.D., Greenhalgh, R. 1989. Toxicity and interactions of some *Fusarium graminearum* metabolites to caterpillars. Mycologia 81, 646-50.
- Dowd, P.F., Johnson, E.T., Williams, W.P. 2005. Strategies for insect management targeted toward mycotoxin management. En: Abbas, H.K. (Ed.). Aflatoxin and food safety. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 517-541.
- Doyle, M.P., Marth, E.H. 1978. Aflatoxin is degraded by fragmented and intact

- mycelia of *Aspergillus parasiticus* grown 5 to 18 days with and without agitation. *Journal of Food Protection* 41, 549-555.
- Duarte, S.C., Bento, J.M.V., Pena, A., Lino, C.M. 2009. Ochratoxin A exposure assessment of the inhabitants of Lisbon during winter 2007/2008 through bread and urine analysis. *Food Additives and Contaminants* 26, 1411-1420.
- Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M. 2010a. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology* 27, 187–198.
- Duarte, S.C., Tanello, A., Pena, A., Lino, C.M., Matos, C.D., Oliveira, M.B.P.P., Alves, M.R., 2010b. Evaluation of ochratoxin A exposure degree in two Portuguese cities through wheat and maize bread consumption during the Winter 2007. *Food Control* 21, 702-707.
- Duarte, S.C., Alves, M.R., Pena, A., Lino, C.M. 2012. Determinants of ochratoxin A exposure—A one year follow-up study of urine levels. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 215, 360-367.
- Duffy, M.J. Reid, R.S. 1993. Measurement of the stability of T-2 toxin in aqueous-solution. *Chemical Research in Toxicology* 6, 524-529.
- Edwards, S.G., 2007a. Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK barley and oat production. HGCA Project Report No. 415. HGCA, London.
- Edwards, S.G., 2007b. Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK wheat production. HGCA Project Report No. 413. HGCA, London.
- Edwards, S.G., 2009a. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 26, 496-506.
- Edwards, S.G., 2009b. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants* 26, 1063-1069.
- Edwards, S.G., 2009c. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants* 26, 1185-1190.
- Edwards, S.G., Imathiu, S. 2009d. HT-2 and T-2 in oats – what we know and what we need to know. 6th EC *Fusarium* Toxin Forum, held 9-10 February 2009 in Brussels.
- Edwards, S.G., Barrier-Guillot, B., Clasen, P.E., Hietaniemi, V., Pettersson, H. 2009e. Emerging issues of ht-2 and t-2 toxins in European cereal production. *World Mycotoxin Journal* 2, 173-179.
- Edwards, S.G., Godley, N.P., 2010. Reduction of *Fusarium* head blight and deoxynivalenol in wheat with early fungicide applications of prothioconazole. *Food Additives and Contaminants, Part A* 27, 629-635.

- Edwards, S.G., Imathiu, S.M., Ray, R.V., Back, M., Hare M.C. 2012. Molecular studies to identify the *Fusarium* species responsible for HT-2 and T-2 mycotoxins in UK oats. *International Journal of Food Microbiology* 156, 168-175.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2006. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. Question N° EFSA-Q-2005-154. *The EFSA Journal* 365, 1-56.
- EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal* 446, 1-127.
- EFSA, 2010a. Scientific opinion. Statement on recent scientific information on the toxicity of ochratoxin A. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 8 (6), 1626, [7 pp].
- EFSA, 2010b. Scientific/technical report submitted to EFSA. Occurrence data of trichothecene mycotoxins T-2 toxin and HT-2 toxin in food and feed. EFSA-Q-2010-00949. Prepared by H.J. van der Fels-Klerx, RIKILT Institute of Food Safety, PO Box 230, NL-6700 AE, Wageningen. The Netherlands.
- EFSA, 2010c. Scientific report submitted to EFSA. Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. Question No EFSA-Q-2010-0143. CT/EFSA/CONTAM/2010/03 Prepared by Ulrike Schuhmacher-Wolz Karin Heine.
- EFSA, 2011. Scientific opinion. Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal* 9, 2481. [187 pp].
- EFSA, 2012. Scientific report submitted to EFSA. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate Change. Question No EFSA-Q-2009-00812. Prepared by Battilani, P. et al. [172 pp].
- Egmond, H.P. van, Schothorst, R.C., Jonker, M.A. 2007. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 147-157.
- El-Kady, I.A., El-Maraghy, S.S.M., Abdel-Mallek, A.Y., Hasan, H.A.H. 1993. Effect of four pesticides on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* IMI 89717. *Zentralblatt für Mikrobiologie* 148, 549-557.
- Ellis, J., di Paolo, J.A. 1967. Aflatoxin B1: introduction of malformations.

- Achieves of Pathology 83, 53-57.
- Eskola, M., Parikka, P., Rizzo, A. 2001. Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in Finnish cereal samples in 1998. *Food Additives and Contaminants* 8, 707-718.
- Esnoz, A., Periago, P.M., Conesa, R., Palop, A. 2006. Application of artificial neural networks to describe the combined effect of pH and NaCl on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 106, 153-158.
- Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Cabañes, F.J. 2006. Study of the effect of water activity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. *Food Microbiology* 23, 634-640.
- Estrada, A.F., Avalos, J. 2008. The White Collar protein WcoA of *Fusarium fujikuroi* is not essential for photocarotenogenesis, but is involved in the regulation of secondary metabolism and conidiation. *Fungal Genetics and Biology* 45, 705-718.
- European Commission, 1993. Council Regulation (EEC) 315/93 of 8 February 1993 laying down Community procedures for contaminants in food. *Official Journal of the European Communities*, L37, 1-3.
- European Commission 1998. Commission Regulation (EC) No 1525/98. *Official Journal of the European Communities* 201, 43-46.
- European Commission, 1999. Council Regulation (EC) No 1493/320 1999 of 17 May 1999 on the common organisation of the market in wine. *Official Journal of the European Communities* L179, 1-84.
- European Commission, 2001. Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in food. *Official Journal of the European Communities*, L77, 1-13.
- European Commission, 2002. Reports on tasks for scientific cooperation. Report of experts participating in Task 3.2.7. Co-ordinators: Marina Miraglia and Carlo Brera. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. Directorate-General Health and Consumer Protection. [153 pp].
- European Commission, 2003. Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. *Official Journal of the European Union* L285, 33-37.
- European Commission, 2005a. Commission Regulation (EC) No 856/2005 of 6 June 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards *Fusarium* toxins. *Official Journal of the European Union* L146, 3-8.

- European Commission, 2005b. Council Regulation (EC) N° 2165/2005 of 20 December 2005 amending Regulation (EC) N° 1493/1999 on the common organisation of the market in wine. Official Journal of the European Union L345,1-4.
- European Commission, 2006a. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union L364, 5-24.
- European Commission, 2006b. Commission Regulation (EC) No 1507/2006 of 11 October 2006 amending Regulations (EC) No 1622/2000, (EC) No 884/2001 and (EC) No 753/2002 concerning certain detailed rules implementing Regulation (EC) No 1493/1999 on the common organisation of the market in wine, as regards the use of pieces of oak wood in winemaking and the designation and presentation of wine so treated. Official Journal of the European Union L280, 9-11.
- European Commission, 2006c. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Official Journal of the European Union L70, 12-13.
- European Commission, 2007a. Adapting to Climate Change in Europe – Options for EU Action. Green Paper from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee of the Regions, SEC (2007) 849. Brussels, Belgium: European Commission: COM (2007) 354 final.
- European Commission, 2007b. Commission Regulation (EC) 1126/2007 of 28 September 2007. amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. Official Journal of the European Union, L 255, 14-17.
- European Commission, 2007c. Commission Directive 2007/68/EC of 27 November 2007 amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. Official Journal of the European Union L310, 11-14.
- European Commission, 2009. Commission Regulation (EC) No 415/2009 of 20 May, 2009 amending Directive 2007/68/EC amending Annex IIIa to Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain food ingredients. Official Journal of the European Union L125/52-53.
- European Commission, 2010a. Commission Regulation (EU) No 105/2010 of 5 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum

- 
- levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. Official Journal of the European Union L35, 7-8.
- European Commission, 2010b. Commission Regulation (EU) No 165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union L50, 8.
- European Commission, 2012a. Commission Regulation (EU) No 594/2012 of 5 July 2012 amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin A, non dioxin-like PCBs and melamine in foods. Official Journal of the European Union L176, 43-45.
- European Commission, 2012b. Commission implementing regulation (EU) No 274/2012 of 27 March 2012 amending Regulation (EC) No 1152/2009 imposing special conditions governing the import of certain foodstuffs from certain third countries due to contamination risk with aflatoxins. Official Journal of the European Union L90, 14-16.
- European Commission, 2012c. Commission Recommendation 2012/154/EU of 15 March 2012 on the monitoring of the presence of ergot alkaloids in feed and food. Official Journal of the European Union L77, 20-21.
- European Commission, 2012d. Commission regulation (EU) No 1058/2012 of 12 November 2012 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for aflatoxins in dried fig. Official Journal of the European Union, L 313, 14-15.
- European Commission, 2013. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products (2013/165/EU). Official Journal of the European Union L91, 12-15.
- European Commission, 2014. Commission regulation (EU) No 212/2014 of 6 March 2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of the contaminant citrinin in food supplements based on rice fermented with red yeast *Monascus purpureus*. Official Journal of the European Union, L 67, 3-4.
- European Community, 1995. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. Reports on tasks for scientific cooperation. Report of the Scientific Cooperation, Task 3.2.2. Report EUR 17523. Directorate-General, Health and Consumer Protection, European Commission.
- European Community, 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU Member States. Reports on tasks for scientific cooperation. Task 3.2.7. Directorate-General, Health and Consumer Protection, European Commission.
-

- European Union, 2014. RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). 2013 Annual Report. The Health and Consumers Directorate-General of the European Commission. Office for Official Publications of the European Communities. Publications Office of the European Union. Luxembourg. doi:10.2772/56447.
- Evans, P., Persaud, K.C., McNeish, A.S., Sneath, R.W., Hobson, N., Magan, N. 2000. Evaluation of a radial basis function network for the determination of wheat quality from electronic nose data. *Sensors and Actuators B* 69, 348-358.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A., Mulè, G. 2012a. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biology* 116, 241-248.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Geisen, R., Logrieco, A., Mulè, G. 2012b. Influence of light on growth, fumonisin biosynthesis and FUM1 gene expression by *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 153, 148–153.
- FAO, (Food and Agriculture Organization), 1993. Guidelines for the application of the HACCP system. En: Training Considerations for the Application of the HACCP System to Food Processing and Manufacturing, FAO/WHO/FNU/FOS/93.3 11, Ginebra.
- FAO, 1997. HACCP system and guidelines for its application. Annex to CAC/RCP-1 1969, Rev. 3. En: General requirements (food hygiene). Codex Alimentarius (Supplement to Volume 1B) Joint FAO/WHO Food Standards Programme. FAO/WHO, Roma.  
[http://www.fao.org/docrep/w6419e/w6419e03.htm#annex:hazard analysis and critical control point \(haccp\) system and guidelines](http://www.fao.org/docrep/w6419e/w6419e03.htm#annex:hazard_analysis_and_critical_control_point_(haccp)_system_and_guidelines).
- FAO, 1998. Position paper on ochratoxin A. Codex Alimentarius Commission, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Thirty-first session, La Haya, Países Bajos, 22-26 Marzo 1999, CX/FAC 99/14.
- FAO, 1999. Fermented Cereals. A Global Perspective. FAO Agricultural Services Bulletin 138. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Retrieved June 30, 2009.  
<http://www.fao.org/docrep/x2184E/x2184e00.HTM>.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization), 2001. WHO Food Additives Series: 47, Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Deoxynivalenol. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.  
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>.

- FAO, 2003. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Cuaderno FAO N° 73, Roma. [fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s00.htm](http://www.fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s00.htm)
- FAO, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Estudios FAO: Alimentación y Nutrición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. [www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.htm](http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.htm)
- FAO/WHO, 2011. Programa conjunto FAO/WHO sobre normas alimentarias. Comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos. 5ª reunión, La Haya, Países Bajos, 21 – 25 de marzo de 2011. Documento de debate sobre la ocratoxina A en el cacao (Tema 9d) CX/CF 11/5/12 Enero, 2011.
- Fazekas, B., Tar, A., Kovacs, M. 2005. Aflatoxin and ochratoxin A content of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants* 22, 856-863.
- Fernandes A., Ratola N., Cerdeira A., Alves A., Venâncio A. 2007. Changes in ochratoxin A concentration during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 92-96.
- Ferreira, N.P., Pitout, M.J. 1969. The biosynthesis of ochratoxin. *Journal of the South African Chemical Institute* 22, S1.
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuck, C.P. 2003. *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5222-5227.
- Flaherty, J.E., Woloshuck, C.P. 2004. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, *ZFR1*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2653-2659.
- Flajs, D., Domijan, A.M., Ivic, D., Cvjetkovic, B., Peraica, M. 2009. ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia. *Food Control* 20, 590-592.
- Flander, L., Sanmenkallio-Marttila, M., Suortti, T., Autio, K. 2007. Optimization of ingredients and baking process for improved whole meal oat bread quality. *LWT– Food Science and Technology* 40, 860-870.
- FIAB, 1997. Aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos críticos en Vinos. Semana Vitivinícola, Valencia, 1997.
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Creppy, E.E. 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Additives and Contaminants* 18, 565-568.
- Filali, A., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Benayada, A., Soulaymani, R.,



- Creppy, E.E. 2002. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Human and Experimental Toxicology* 21, 241-245.
- Finamore, A., Serena, M., Britti, M.R., Bellovino, D., Gaetani, S., Mengheri, E. 2004. Novel approach for food safety evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7425-7431.
- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., G rault, F., Eychenne, N., Delos, M., Regnault-Roger, C. 2009. Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Protection* 28, 302-308.
- Foroud, N., MacMillan, T., Ellis, B., Eudes, F. 2008. The role of trichothecene-chemotypes in *Fusarium* head blight disease spread in wheat. *Cereal Research Communications* 36, 489-490.
- Foroud, N. A., Eudes, F. 2009. Trichothecenes in cereals grains. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 147-173.
- Fournier, R. 2009. Fusariotoxins on malting barley from field to end products & by-products. 6th EC *Fusarium*-toxin forum, Brussels, 9-10 February 2009. [http://www.micotossine.it/public/pag\\_871.pdf](http://www.micotossine.it/public/pag_871.pdf).
- Francis, J.F. (Ed.), 2000. *Encyclopedia of Food Science and Technology*, 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley and Sons, New York.
- Fredlund, E., Gidlund, A., Pettersson, H., Olsen, M., Borjesson, T. 2010. Real-time PCR detection of *Fusarium* species in Swedish oats and correlation to T-2 and HT-2 toxin content. *World Mycotoxin Journal* 3, 77-88.
- Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2000. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subg. *Circumdati*. *Studies in Mycology (Baarn)* 45, 201-207.
- Frisvad, J.C., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50, 23-43.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P., Samson, R.A. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B<sub>1</sub>, sterigmatocystin and 3-O-methyl sterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 442-453.
- Frisvad, J.C., Larsen, T.O., de Vries, R., Meijer, M., Houbraken, J., Cabanes, F.J., Ehrlich, K., Samson, R.A. 2007a. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology* 59, 31-37.

- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Samson, R.A., Larsen, T.O., Thrane, U. 2007b. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 5, 9727-9732.
- Frisvad, J.C., Andersen, B., Thrane, U. 2008. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research* 112, 231-240.
- Gabal, M.A., Hegazi, S.A., Hassanin, N. 1994. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* field isolates. *Veterinary and Human Toxicology* 36, 519-521.
- Gajdusek, D.C. 1953. Acute infectious hemorrhagic fevers and mycotoxicoses in the Union of Soviet Socialist Republics. Medical Science Publication No. 2. Walter Reed Army Medical Center, Washington.
- Gajera, H.P., Vakharia, D.N. 2010. Molecular and biochemical characterization of *Trichoderma* isolates inhibiting a phytopathogenic fungi *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 74, 274-282.
- Gambutì, A., Stollo, D., Genovese, A., Ugliano, M., Ritieni, A., Moio, L. 2005. Influence of enological practices on ochratoxin A concentration in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 155-162.
- Gams, W., Christensen, M., Onion, A.H.S., Pitt, J.I., Samson, R.A. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.). *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, Nueva York, pp. 55-64.
- García, D., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2009. Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology* 26, 757-769.
- García-Cela, E., Gil-Serna, J., Marín, S., Acevedo, H., Patiño, B., Ramos, A.J. 2012. Effect of preharvest anti-fungal compounds on *Aspergillus steynii* and *A. carbonarius* under fluctuating and extreme environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 159, 167-176.
- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., De Silóniz, M.I. 2002a. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *International Journal of Food Microbiology* 72, 19-30.
- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., Sanz-Tapia, E., Zurera-Cosano, G. 2002b. Estimation of microbial growth parameters by means of artificial neural networks. *Food Science and Technology International* 8, 73-80.
- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., Rodríguez-Pérez, R., Zurera-Cosano, G. 2005. Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by

- artificial neural networks. *International Journal of Food Microbiology* 105, 317-332.
- García-Moruno, E., Sanlorenzo, C., Boccaccino, B., Di Stefano, R. 2005. Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 73-76.
- Gardiner, D.M., Osborne, S., Kazan, K., Manners, J.M. 2009a. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*. *Microbiology* 115, 3149-3156.
- Gardiner, D.M., Kazan, K., Manners, J.M. 2009b. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 46, 604-613.
- Garrido, N.S., Iha, M.H., Santos Ortolani, M.R., Duarte Favaro, R.M. 2003. Occurrence of aflatoxins M 1 and M 2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 20, 70-3.
- Geisen, R., Mayer, Z., Karolewicz, A., Farber, P. 2004. Development of a real time PCR system for detection of *Penicillium nordicum* and for monitoring ochratoxin A production in foods by targeting the ochratoxin polyketide synthase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 501-507.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59, 1-10.
- Geiser, D.M. 2008. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology* 12, 1-6.
- Georgianna, D.R., Payne, G., 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 26, 113–125.
- Gerlach, W., Nirenberg, H.I. 1982. The genus *Fusarium* –a pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem* 209, 1-406.
- Ghali, R., Hmaïssia-khlifa, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili A. 2008. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. *Food Control* 19, 921-924.
- Ghali, R., Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedilli, A. 2009. Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Tunisian sorghum and pistachios. *Journal of Food Composition and Analysis* 22, 751-755.
- Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, I.J., Eyles, M.J., Roberts, T.A. 1994. Predicting

- fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology* 23, 419-431.
- Gibson, A.M., Hocking, A.D. 1997. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. *Trends Food Science and Technology* 8, 353-358.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T., Patiño, B. 2009. Discrimination of the main ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. *International Journal of Food Microbiology* 136, 83-87.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T. 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 Control* 22, 343-345.
- Gilbert, J., Tekauz, A. 1995. Effects of *Fusarium* head blight and seed treatment on germination, emergence, and seedling vigour of spring. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie* 17, 252-259.
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30, 503-512.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, T., Battilani, P. 2007. Studies on *Aspergillus* section *Flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 113, 330-338.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., Magan, N. 2008. Effect of  $a_w$  and  $CO_2$  level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. *International Journal of Food Microbiology* 122, 109-113.
- Giorni, P., Magan, N., Battilani, P. 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *International Journal of Food Microbiology* 130, 213-218.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Battilani, P. 2011. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal* 4, 425-432.
- Giray, B., Atasayar, S., Sahin, G. 2009. Determination of ochratoxin A and total aflatoxin levels in corn samples from Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycotoxin Research* 25, 113-116.
- Godet, M., Munaut, F. 2010. Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section *Flavi*. *FEMS Microbiology Letters* 304, 157-168.

- Gong, Y.Y., Cardwell, K., Hounsa, A., Egal, S., Turner, P.C., Hall, A.J., Wild, C.P. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study. *British Medical Journal, Clinical Research Edition* 325, 20-21.
- González, L., Juan, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2006. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology* 107, 223-227.
- González-Osnaya, L., Castillo, J.M.S., Cortés, J.C.M., Vinuesa, J.M., 2006. Extraction and analysis of ochratoxin A in bread using pressurised liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1113, 32-36.
- González-Osnaya, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2007. Dietary intake of ochratoxin A from conventional and organic bread. *International Journal of Food Microbiology* 118, 87-91.
- González-Osnaya, L., Cortés, C., Soriano, J. M., Moltó, J. C., Mañes, J. 2011. Occurrence of deoxynivalenol and T-2 toxin in bread and pasta commercialised in Spain. *Food Chemistry* 124, 156-161.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C., González Jaén, M.T. 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters* 245, 353-361.
- González-Salgado, A. 2010. Tesis Doctoral. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Gorelick, N.J. 1990. Risk assessment for aflatoxin: I. Metabolism of aflatoxin B1 by different species. *Risk Analysis* 10, 539-559.
- Gorelick, N.J., Bruce, R.D. Hoseyni, M.S. 1993. Human risk assessment based on animal data: inconsistencies and alternatives. En: Eaton, D., Groopman, J.D. (Eds.). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, London, pp. 508-511.
- Gorris, L.G.M. 2005. Food safety objective: an integral part of food chain management. *Food Control* 16, 801-809.
- Goswami, R.S., Kistler, H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5, 515-525.
- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K. 2007. Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 1547-1553.

- Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K. 2009. Simultaneous determination of type A, B and D trichothecenes and their occurrence in cereals and cereal products. *Food Additives and Contaminants, Part A* 26, 1273-1289.
- Grazioli, B., Fumi, M. D., Silva, A. 2006. The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, S93-S96.
- Greene, G. 1998. *El factor humano*. Ed. Edhasa. Barcelona.
- Gregori, R., Meriggi, P., Pietri, A., Formenti, S., Baccarini, G., Battilani, P. 2013. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. *Food Control* 30, 280-287.
- Groopman, J.D. 1993. Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures. En: Eaton, D., Groopman, J.D (Eds.). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, London, pp. 259-279.
- Gross-Steinmeyer, K., Weymann, J., Hege, H.G., Metzler, M. 2002. Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 938-45.
- Guimarães, I.C.O., Souza, A.R.M., Cornélio, V.M.O., Pereira, J., Villela, V.A. 2010. Identification of toxigenic *Aspergillus* spp. in rice. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 30, 60-62.
- Gumus, T., Arici, M., Demirci, M. 2004. A survey of barley, malt and beer contamination with ochratoxin A in Turkey. *Journal of the Institute of Brewing* 110, 146-149.
- Gupta, S., Cox, S., Abu-Ghannam, S. 2010. Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochemical Engineering Journal* 52, 199-204.
- Gursoy, N.P., Bici, M. 2003. Determination of fungal infections on wheat and maize grains and some of their mycotoxins in Cukurova region. En: *I National Mycotoxins Symposium*. Istanbul, Turkey, 68-74.
- Guynot, M.E., Ramos, A.J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., Marin, S. 2003. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology* 94, 893-899.
- Guzev, L., Danshin, A., Ziv, S., Lichter, A. 2006. Occurrence of ochratoxin A producing fungi in wine and table grapes in Israel. *International Journal of Food Microbiology* 111, 67-71.

- Haeubl, G., Berthiller, F., Hametner, C., Rechthaler, J., Jaunecker, G., Freudenschuss, M., Krska, R., Schuhmacher, R. 2007. Characterization of (C-13(24)) T-2 toxin and its use as an internal standard for the quantification of T-2 toxin in cereals with HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 931-940.
- Hägglom, P.E., Ghosh, J. 1985. Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 787-790.
- Haidukowski, M., Pascale, M., Perrone, G., Pancaldi, D., Campagna, C., Visconti, A., 2005. Effect of fungicide in the development of Fusarium head blight, yield and deoxynivalenol accumulation in wheat inoculated under field conditions with *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 191-198.
- Hameed, H.G. 1993. Extrusion and chemical treatments for destruction of aflatoxin in naturally-contaminated corn. PhD thesis, University of Arizona.
- Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman Gilman, A. (Eds.) 1996. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw Hill-Interamericana, Vol. 1, México.
- Harper, J.M. 1992. A comparative analysis of single and twin-screw extruders. En: Kokini, J.L., Ho, C., Karwe, M.V. (Eds.). *Food Extrusion Science and Technology*. Marcel Dekker, New York, pp. 139-148.
- Harris, C.C. 1996. The 1995 Walter Hubert Lecture—molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumour-suppressor gene. *British Journal of Cancer* 73, 261-269.
- Hart, L.P., Pestka, J.J., Liu, M.T. 1984. Effect of kernel development and wet periods on production of deoxynivalenol in wheat infected with *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 74, 1415-1418.
- Hawksworth, D.L., Kirk, P.M., Sutton, B.C., Pegler, D.N. (Eds.) 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi* (8<sup>a</sup> Ed.). CAB International, Wallingford, Reino Unido. p. 616.
- He, J., Zhou, T., Young, J.C., Boland, G.J., Scott, P.M. 2010. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science and Technology* 21, 67-76.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P., Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153, 1677-1692.
- Hervás, C., Zurera, G., García, R.M., Martínez, J.A. 2001. Optimization of

- computational neural networks for its application in the prediction of microbial growth in foods. *Food Science and Technology International* 7, 159-163.
- Hesseltine, C.W., Vandegrift, E.E., Fennell, D.I., Smith, M., Shotwell, O. 1972. Aspergilli as ochratoxin producers. *Mycologia* 64, 539–550.
- Hinojo, M.J., Llorens, A., Mateo, R., Patiño, B., González-Jaén, M.T., Jiménez, M. 2004. Utility of the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms of the intergenic spacer region of the rDNA for characterizing *Gibberella fujikuroi* isolates. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 681-688.
- Hinojo, M.J., Medina, A., Valle Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M., Mateo, R. 2006. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiology* 23,119-127.
- Hmaissia-Khlifa, K., Ghali, R., Aouni, Z., Mazigh, C., Machgoul, S., Hedhili, A. 2010. Estimation of ochratoxin A in human blood of healthy Tunisian population. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62, 539-542.
- Hmaissia Khlifa, K., Ghali, R., Mazigh, C., Aouni, Z., Machgoul, S., Hedhili, A. 2012. Ochratoxin A levels in human serum and foods from nephropathy patients in Tunisia: Where are you now? *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 509-512.
- Höhler, D., Südekum, K.H., Wolfram, S., Frohlich, A.A., Marquardt, R.R. 1999. Metabolism and excretion of ochratoxin A fed to sheep. *Journal of Animal Science* 77, 1217-1223.
- Holmquist, G.U., Walter, H.W., Stahr, H.M. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science* 48, 778-782.
- Hope, R.J., Collete, A., Baxter, E.S., Magan, N. 2002. Interactions between environmental stress and fungicides effect growth and mycotoxin production by *Fusarium culmorum* isolates from wheat grain. *European Journal of Plant Pathology* 108, 685-690.
- Hope, R., Aldred, D., Magan, N. 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. *Letters of Applied Microbiology* 40, 295-300.
- Horie, Y. 1995. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho* 36, 73-76.
- Horizon 2020. EC. The EU Framework Programme for Research and Innovation <http://ec.europa.eu/research/horizon2020>



- Horn, B.W. 2003. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Journal of Toxicology. Toxins Reviews* 22, 355-383.
- Horn, B.W. 2005. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. En: Abbas, H.K. (Ed.). *Aflatoxin and food safety*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 95-116.
- Horn, B.W., 2007. Biodiversity of *Aspergillus* section *Flavi* in the United States: A review. *Food Additives and Contaminants* 24, 1088-1101
- Hoseney, R.C. (Ed.). 1994. *Principles of Cereal Science and Technology*, 2nd edition. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- Hsieh, D.P., Wong, J.J. 1994. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. En: Eaton, D.L., Groopman, J.D. (Eds.). *The toxicology of aflatoxins. Human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, Toronto, pp. 373-88.
- Hsu, I.C., Metcalf, A., Sun, T., Welsh, J.A., Wang, N.J., Harris, C.C. 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350, 427-428.
- Hussaini, A.M., Timothy, A.G., Olufunmilayo, H.A, Ezekiel, A.S. and Godwin, H.O. 2007. Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 6, 99-108.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Vol 56. Lyon, France.
- Ibáñez-Vea, M., Lizarraga, E., González-Peñas, E. 2011a. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS. *Food Control* 22, 1428-1434.
- Ibáñez-Vea, M., Martínez, R., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. 2011b. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from Spanish market. *Food Control* 22, 1949-1955.
- Ibáñez-Vea, M., González-Peñas, E., Lizarraga, E., López de Cerain, A. 2012a. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley from a northern region of Spain. *Food Chemistry* 132, 35-42.
- Ibáñez-Vea, M., Lizarraga, E., González-Peñas, E., López de Cerain, A. 2012b. Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. *Food Control* 25, 81-88.
- Imathiu, S.M. 2008. *Fusarium langsethiae* infection and mycotoxin production

- in oats. PhD Thesis, Harper Adams University College, UK.
- Imathiu, S.M., Hare, M.C., Ray, R.V., Back, M., Edwards, S.G. 2010. Evaluation of pathogenicity and aggressiveness of *F. langsethiae* on oat and wheat seedlings relative to known seedling blight pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 126, 203-216.
- Infantino, A., Pucci, N., Conca, G., Santori, A. 2007. First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy. *Plant Disease* 91, 1362.
- Ioannou-Kakouri, E., Aletrari, M., Christou, E., Ralli, A., Koliou, A., Christofidou M, 2004. Occurrence and control of mycotoxins in foodstuffs in Cyprus. En: Logrieco, A., Visconti. A. (Eds.). *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 51-65.
- Ioos, R., Belhadj, M., Menez, M., Faure, A., 2005. The effects of fungicides on *Fusarium spp.* and *Microdochium nivale* and their associated trichothecene mycotoxins in French naturally-infected cereal grains. *Crop Protection* 24, 894-902.
- Jackson, L.S., Hlywka, J.J., Senthil, K.R., Bullerman, L.B., Musser, S.M., 1996a. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B1 in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 906-912.
- Jackson, L.S., Hlywka, J.J., Senthil, K.R., Bullerman, L.B., 1996b. Effects of thermal processing on the stability of fumonisin B2 in an aqueous system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 1984-1987.
- Jackson, L.S., Katta, S.K., Fingerhut, D.D., De Vries, J.W., Bullerman, L.B. 1997. Effects of baking and frying on the fumonisin B1 content of cornbased foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 4800-4805.
- Jaime-García, R., Cotty, P.J. 2006. Spatial relationships of soil texture and crop rotation to *Aspergillus flavus* community structure in south Texas. *Ecology and Epidemiology* 96, 599-607.
- Jaime-García, R., Cotty, P.J. 2010. Crop rotation and soil temperature influence the community structure of *Aspergillus flavus* in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1842-1847.
- Jalili, M., Jinap, S. 2012. Role of sodium hydrosulphite and pressure on the reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black pepper. *Food Control* 27, 11-15.
- Jaradat, Z.W. 2005. T-2 mycotoxin in the diet and its effects on tissues. En: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.). *Reviews in Food and Nutrition Toxicity*.

- Vol 4. CRC Press, pp. 173-212.
- Jayashree, T., Subramanyam, C. 2000. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 981-985.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). 2001. Fifty-seventh meeting, Rome, 5-14 June 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization.
- Jiménez, M., Rodríguez, S., Mateo, J.J., Gil, J.V., Mateo, R. 2000. Characterization of *Gibberella fujikuroi* complex isolates by fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> analysis and by RAPD and restriction analysis of PCR-Amplified Internal Transcribed spacers of ribosomal DNA. *Systematic and Applied Microbiology* 23, 546-555.
- Jiménez, A.M., López de Cerain, A., González-Peñas, E., Bello, J. 2001. Determination of ochratoxin A in pig liver-derived pates by high-performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants* 18, 559-563.
- Joffe, A.Z., Lisker, N. 1969. Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production *in vitro*. *Applied Microbiology* 18, 517-518.
- Jonsyn, F.E., Maxwell, S.M., Hendrickse, R.G. 1995. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathologia* 131, 121-126.
- Jørgensen, K., Rasmussen, G., Thorup, I. 1996. Ochratoxin A in Danish cereals 1986-1992 and daily intake by the Danish population. *Food Additives and Contaminants* 13, 95-104.
- Jørgensen, K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 15, 550-554.
- Jørgensen, K., Jacobsen, J.S. 2002. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-1999. *Food Additives and Contaminants* 19, 1184-1189.
- Jornet, D., Busto, O., Guasch, J. 2000. Solid-phase extraction applied to the determination of ochratoxin A in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 882, 29-35.
- Juan, C., González, L., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2005. Accelerated solvent extraction of ochratoxin A from rice samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 9348-9351.
- Juan, C., Lino, C.M., Peña, A., Moltó, J.C., Mañes, J., Silveira, I. 2007.

- Determination of ochratoxin A in maize bread samples by LC with fluorescence detection. *Talanta* 73, 246-250.
- Juan, C., Moltó, J.C., Lino, C.M., Mañes, J. 2008a. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chemistry* 107, 525-530.
- Juan, C., Peña, A., Lino, C., Moltó, J.C., Mañes, J. 2008b. Levels of ochratoxin A in wheat and maize bread from the central zone of Portugal. *International Journal of Food Microbiology* 127, 284-289.
- Jurado, M., Vázquez, C., Patino, B., González-Jaén, M.T. 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 562-568.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V., González-Jaén, M.T. 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 681-689.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N., González-Jaén, M.T. 2008. Relationship between solute and matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 2032-2036.
- Jurado, M., Marín, P., Callejas, C., Moretti, A., Vázquez, C., González-Jaén, M.T. 2010. Genetic variability and fumonisin production by *F. proliferatum*. *Food Microbiology* 27, 50-57.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 593-619.
- Kabak, B. 2009. Ochratoxin A in cereal-derived products in Turkey: occurrence and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 47, 348-352.
- Kabak, B. 2012. Determination of aflatoxins and ochratoxin A in retail cereal products from Turkey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food Control* 28, 1-6.
- Kang, Z., Buchenauer, H. 1999. Immunocytochemical localization of *Fusarium* toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55, 275-288.
- Katta, S.K., Cagampang, A.E., Jackson, L.S., Bullerman, L.B. 1997. Distribution of *Fusarium* molds and fumonisins in dry-milled corn fractions. *Cereal Chemistry* 74, 858-863.

- Katta, S.K., Jackson, L.S., Sumner, S.S., Hanna, M.A., Bullerman, L.B., 1999. Effect of temperature and screw speed on stability of fumonisin B1 in extrusion-cooked corn grits. *Cereal Chemistry* 76, 16-20.
- Kazi, B.A., Emmett, R.W., Nancarrow, N., Partington, D.L. 2008. Berry infection and the development of bunch rot in grapes caused by *Aspergillus carbonarius*. *Plant Pathology* 57, 301-307.
- Kelly, J.D., Eaton, D.L., Guengerich, F.P., Coulombe, R.J. 1997. Aflatoxin B1 activation in human lung. *Toxicology and Applied Pharmacology* 144, 88-95.
- Khodadadi, F., Panjehkeh, N., Ahmadinejad, M., Aminae, M.M. 2011. Genetic variability of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by RAPD marker. *Journal of Food Safety* 31, 439-444.
- Kikkert, J.R., Thomas, M.R., Reisch, B.I. 2001. Grapevine genetic engineering. En: Roubelakis-Angelakis K.A. (Ed.). *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine*. Kluwer Academic Publishers, Holanda, pp. 387-404.
- Kim, E.K., Scott, P.M., Lau, B.P.Y. 2003. Hidden fumonisins in corn flakes. *Food Additives and Contaminants* 20, 161-169.
- Kim, D.M., Chung, S.H., Chun, H.S. 2011. Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a Korean fermented soybean food starter *Food Microbiology* 28, 1402-1408.
- Kirincic, S., Skrjanc, B., Kos, N., Kozolc B., Pirnat, N., Tavcar-Kalcher, G. 2015. Mycotoxins in cereals and cereal products in Slovenia e Official control of foods in the years 2008-2012. *Food Control* 50, 157-165.
- Klich, M.A., Arthur, K.S., Lax, A.L., Bland, J.M. 1994. Iturin A: a potential new fungicide for stored grains. *Mycopathologia* 127, 123-127.
- Klich, M.A. 2002. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia* 94, 21-27.
- Klich, M.A. 2007. Review: environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Mycoscience* 48, 71-80.
- Kleter, G.A., Prandini, A., Filippi, L., Marvin, H.J.P. 2009. Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. *Food and Chemical Toxicology* 47, 932-950.
- Knutsen, A.K., Torp, M., Holst-Jensen, A. 2004. Phylogenetic analyses of the

- Fusarium poae*, *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae* species complex based on partial sequences of the translation elongation factor-1 alpha gene. *International Journal of Food Microbiology* 95, 287–295.
- Kohut, G., Ádám, A.L., Fazekas, B., Hornok, L. 2009. N-starvation stress induced *FUM* gene expression and fumonisin production is mediated via the HOG-type MAPK pathway in *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiology* 130, 65-69.
- Königs, M., Mulac, D., Schwerdt, G., Gekle, M., Humpf, H-U. 2009. Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology* 258, 106-115.
- Kourtis, L.K., Arvanitoyannis, I.S. 2001. Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the alcoholic beverages industry. *Food Reviews International* 17, 1-44.
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* 161. CAB International. Wallingford, Oxon, Reino Unido.
- Kradin, R.L., Mark, E.J. 2008. The pathology of pulmonary disorders due to *Aspergillus* spp. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 132, 606-614.
- Kralj Cigić I., Prosen, H. 2009. An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences* 10, 62-115.
- Kraybill, H.F., Shimkin, M.B. 1964. Carcinogens related to foods contaminated by processing and fungal metabolites. *Advances in Cancer Research* 8, 191–248.
- Krishnamachari, K.A., Bhat, R.V., Nagarajan, V., Tilak, T.B. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet*. 1, 1061-1063-
- Kuiper–Goodman, T., Scott, P.M. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences* 2, 179-248.
- Kuiper-Goodman, T. 1991. Risk assessment of ochratoxin A residues in food. *Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumours*. IARC Science Publications, Lyon 115, 307.
- Kuiper-Goodman, T. 1996. Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants* 13 (Suppl.) 53-7.
- Kumagai, S., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Aoyama, K., Fujita, K., Kai, S., Sato, T., Saito, S., Yoshiike, N., Sugita-Konishi, Y. 2008. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. *Food Additives and*

- Contaminants 9, 1101-1106.
- Kumar, V., Basu, M.S., Rajendran, T.P. 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection* 27, 891-905.
- Kumar, R., Ansari, K.M., Saxena, N., Dwivedi, P.D., Jain, S.K., Das, M. 2012. Detection of ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. *Food Control* 26, 63-67.
- Kumeda, Y., Asao, T. 1996. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2947-2952.
- Kurtbay, H.M., Bekçi, Z., Merdivan, M., Yurdakoç, K. 2008. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2541-2545.
- Kussak, A., Andersson, B. Andersson, K. 1995. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and Q1 in urine. *Journal of Chromatography B* 672, 253-259.
- Lacey, J. 1989. Prevention of mold growth and mycotoxin production through control environmental factors. En: Natori, S., Hashimoto, K. y Ueno, Y. (Eds.). *Mycotoxins and Phytotoxins*. Elsevier, Amsterdam, pp. 161-168.
- Lacey, J., Magan, N. 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationship. En: Chelkowski, J. (Ed.). *Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Elsevier, Amsterdam, pp. 77-118.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Jijakli, M.H. 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *Penicillium expansum*. *International Journal of Food Microbiology* 103, 315-322.
- Lahlali, R., Serrhini, M.N., Friel, D., Jijakli, M.H. 2006. *In vitro* effects of water activity, temperature and solutes on the growth rate of *P. italicum* Wehmer and *P. digitatum* Sacc. *Journal of Applied Microbiology* 1364-5072.
- Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostalek, P., Sachambula, L. 2008a. Transfer of *Fusarium* mycotoxins and 'masked' deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives and Contaminants, Part A* 25, 732-744.
- Lancova, K., Hajslova, J., Kostelanska, M., Kohoutkova, J., Nedelnik, J.,

- Moravcova, H., Vanova, M. 2008b. Fate of trichothecene mycotoxins during the processing: milling and baking. *Food Additives and Contaminants, Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 25, 650-659.
- Lancova, K., Bowens, P., Stroka, J., Gmuender, H., Ellinger, T., Naegeli, H. 2009. Transcriptomic-based bioassays for the detection of type A trichothecenes. *World Mycotoxin Journal* 2, 247-257.
- Langseth, W. 1999. Mycotoxins in Norwegian cereals for human consumption (SNC-rapport, mykotoksiner I norsk matkorn). Norwegian Food Authorities, Oslo.
- Langseth, W., Rundberget, T. 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia* 147, 157-165.
- Lasram, S., Bellí, N., Chebil, S., Nahla Z., Ahmed, M., Sanchis, V., Ghorbel, A. 2007. Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in grapes from a Tunisian vineyard. *International Journal of Food Microbiology* 114, 376-379.
- Lasram, S., Mani, A., Zaied, C., Chebil, S., Abid, S., Bacha, H., Mliki, A., Ghorbel, A. 2008. Evolution of ochratoxin A content during red and rose vinification. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1696-1703.
- Lattanzio, V.M., Solfrizzo, M., Visconti, A. 2009. Enzymatic hydrolysis of T-2 toxin for the quantitative determination of total T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1325-1334.
- Lauren, D.R., Ringrose, M.A. 1997. Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins through wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants* 14, 435-443.
- Lebreton, E., Frayssinet, C., Boy, J. 1962. Sur l'apparition d'hepatomes "spontanés" chez le Rat Wistar. Role de la Toxine de l'*Aspergillus flavus*. Interet en Pathologie Humaine et Cancerologie Experimentale. *Comptes Rendue Academie Scientifique (Paris)* 225, 784-786.
- Lee, L.S., Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F. 1980. Aflatoxin distribution in individual corn kernels from intact ears. *Cereal Chemistry* 57, 340-343.
- Legarda, T.M., Burdaspal, P.A. 1998. Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos. *Alimentaria* 291, 115-122.
- Legarda, T.M., Burdaspal, P.A. 2001. Occurrence of ochratoxin A in samples of bread marketed in Spain and twelve other countries. *Alimentaria* 321, 89-96.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S. 2006a. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium.



- International Journal of Food Microbiology 110, 209-216.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S. 2006b. The effect of juice clarification, static or rotary fermentation and fining on ochratoxin A in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 245-251.
- Leong, S.L., Hien, L.T., An, N.T., Trang, N.T., Hocking, A.D., Scott, E.S. 2007a. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology* 45, 301-306.
- Leong, S.L., Hocking, A.D., Scott, E.S. 2007b. *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 102, 124-133.
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Luber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A.M., Misore, A., DeCock, K., Rubin, C. 2005. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives* 113, 1763-1767.
- Li, F.Q., Yoshizawa, T., Kawamura, O., Luo, X.Y., Li, Y.W. 2001. Aflatoxins and fumonisins in corn from the high-incidence area for human hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4122-4126.
- Lillehoj, E.B., Kwolek, W.F., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Josephson, L.M., Franz, A.O., Catalano, A. 1980. Aflatoxin contamination of preharvest corn: role of *Aspergillus flavus* inoculum and insect damage. *Cereal Chemistry* 57, 255-257.
- Link, J.H.F. 1809. *Observationes in Ordines plantarum naturales*. Gesellschaft Naturforschender Freunde Berlin 3, 3-42.
- Linko, P., Linko, Y.Y., Olkku, J. 1984. Extrusion cooking and bioconversions. En: Jowitt, R. (Ed.), *Extrusion Cooking Technology*. Elsevier Applied Science Publishers, London, pp. 143-157.
- Lino, C.M., Baeta, M.L., Henri, M., Dinis, A.M.P., Pena, A.S., Silveira, M.I.N. 2008. Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food and Chemical Toxicology* 46, 879-885.
- Llorens, A., Mateo, J.J., Mateo, R., Jiménez, M. 2001. Critical study and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A* 918, 99-112.
- Llorens, A., Mateo, R., Mateo, J.J., Jiménez M. 2002. Comparison of extraction and cleanup procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with

- photodiode array and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants* 19, 272-281.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Jiménez, M. 2004a. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94, 43-54.
- Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Jiménez, M. 2004b. Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 253-260.
- Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., González-Jaén, M.T., Valle-Algarra, F.M., Logrieco, A., Jiménez, M. 2006a. Characterization of *Fusarium* spp isolates by PCR-RFLPs analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *International Journal of Food Microbiology*, 106, 297-306.
- Llorens, A., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., González-Jaén, M.T., Jiménez, M. 2006b. Variability and characterization of *Fusarium* spp isolates by mycotoxins analysis and PCR-RFLPs of the IGS-rDNA region. *Antonie Van Leeuwenhoek* 89, 465-478.
- Lo Curto, R., Pellicano, T., Vilasi, F., Munafo, P., Dugoa, G. 2004. Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemistry* 84, 71-75.
- Locke, M.A., Zablotowicz, R.M., Weaver, M.A. 2006. Herbicide fate under conservation tillage, cover crop, and edge-of-field management practices. En: Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. (Eds.). *Handbook of sustainable weed management*. The Haworth Press, Inc. Binghamton, New York, pp. 373-392.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulè, G., Moretti, A., Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 645-667.
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Roscoe, V., Mankotia, M., Neil, R., Scott, P.M. 2003. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market. *Food Additives and Contaminants* 20, 494-504.
- López-Errasquín, E., Patiño, B., Jiménez, M., Jurado, M., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C. 2006. Conventional and real-time PCR assays for detection and quantification of the expression of fumonisin biosynthetic gene *fum5* in *Fusarium verticillioides*. *Modern Multidisciplinary Applied Microbiology* 635-639.
- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M., González-Jaén, M.T. 2007.

- Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods* 68, 312-317.
- López de Cerain, A., Jiménez, A.M., Ezpeleta, O., Bello, J. 2000. Efectos tóxicos de la ocratoxina. *Revista de Toxicología* 17, 61-69.
- López de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A.M., Bello, J. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Additives and Contaminants* 19, 1058-1064.
- Lou, W., Nakai, S. 2001a. Artificial neural network-based predictive model for bacterial growth in a simulated medium of modified-atmosphere-packed cooked meat products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49, 1799-1804.
- Lou, W., Nakai, S. 2001b. Application of artificial neural networks for predicting the thermal inactivation of bacteria: a combined effect of temperature, pH and water activity. *Food Research International* 34, 573-579.
- Lu, Z., Dantzer, W.R., Hopmans, E.C., Prisk, V., Cunnick, J.E., Murphy, P.A., Hendrich, S. 1997. Reaction with fructose detoxifies fumonisin B1 while stimulating liver associated natural killer cell activity in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 803-809.
- Lund, F., Frisvad, J.C. 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1117-1123.
- Luque, M.I., Córdoba, J.J., Rodríguez, A., Núñez, F., Andrade, M.J. 2013. Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food Control* 29, 270-278.
- Lutfullah, G., Hussain, A. 2011. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control* 22, 426-429.
- Lutfullah, G., Hussain, A. 2012. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. *Food Control* 23, 32-36.
- Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A.M., Hammammi, M., Ellouz, F., Creppy, E.E., Bacha, H. 1995. Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: Correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Archives of Toxicology* 69, 552-558.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D., 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* 109, 723-730.
- Magan, N., Aldred, D., Sanchis, V., Arora, D.K. 2004. The role of spoilage fungi in seed deterioration. En: Arora, D.K. (Ed.) *Fungal biotechnology in*

- agricultural, food, and environmental applications. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 311-323.
- Magan, N., Aldred, D. 2007a. Environmental fluxes and fungal interactions: Maintaining a competitive edge. En: Van West, P., Avery, S., Stratford, M. (Eds.). Stress in yeast and filamentous fungi. Elsevier Ltd., Amsterdam, Payses Bajos, pp. 19-35.
- Magan, N., Aldred, D. 2007b. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. International Journal of Food Microbiology 119, 131-139.
- Magan, N., Aldred, D. 2007c. Why do fungi produce mycotoxins? En: Dijksterhuis, J., Samson, R.A. (Eds.). Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food. Mycology Series, Vol. 21. CRC Press, Boca Raton, Fl., pp. 121-159.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D. 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. Plant Pathology 60, 150-163.
- Majerus, P., Hain, J., Scheer, M. 2008. T-2 and HT-2 toxin analysis in cereals and cereal products following IAC cleanup and determination via GC-ECD after derivatization. Mycotoxin Research 24, 24-30.
- Malachova, A., Cerkal, R., Ehrenbergerova, J., Dzuman, Z., Vaculova, K., Hajšlova, J. 2010. *Fusarium* mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. Journal of the Science of Food and Agriculture 90, 2495-2505.
- Mandeel, Q.A. 2005. Fungal contamination of some imported spices. Mycopathologia 159, 291-298.
- Manova, R., Mladenova, R. 2009. Incidence of zearalenona and fumonisins in Bulgarian cereal production. Food Control 20,362-365.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Viñas, I., Magan, N. 1998a. Environmental factors, *in vitro* interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species from maize grain. Mycological Research 102, 831-837.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. Journal of Food Protection 67, 1792-1805.
- Marín, S., Bellí, N., Lasram, S., Chebil, S., Ramos, A.J., Ghorbel, A., Sanchis, V. 2006. Kinetics of Ochratoxin A production and accumulation by *Aspergillus carbonarius* on synthetic grape medium at different temperature levels. Journal of Food Science 71, 196-200.

- Marín-García, P. 2010. Tesis Doctoral. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de "*Fusarium*". Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- Marín, S., Mateo, Eva M., Sanchis, V., Valle-Algarra, F.M., Ramos, A.J., Jiménez, M. 2011. Patulin contamination in fruit derivatives including baby food from the Spanish market. *Food Chemistry* 124, 563-568.
- Marín, P., de Ory, A., Cruz, A., Magan, N., González-Jaén, M.T., 2013. Potential effects of environmental conditions on the efficiency of the antifungal tebuconazole controlling *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* growth rate and fumonisin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 165, 251-258.
- Marino, A., Nostro, A., Fiorentino, C. 2009. Ochratoxin A production by *Aspergillus westerdijkiae* in orange fruit and juice. *International Journal of Food Microbiology* 132, 185-189
- Marks, B.P. 2007. Status of microbial modelling in food process models. *Comprehensive Reviews of Food Science and Food Safety* 7, 137-143.
- Marr, J.S., Malloy, C.D. 1996. An epidemiologic analysis of the ten plagues of Egypt. *Caduceus* 12, 7-24.
- Martínez-Larrañaga, M.R., Anadón, A. 2006. Micotoxinas. En: Cameán, A.M., Repetto, M. (Eds.) *Toxicología alimentaria*. Ediciones Díaz de Santos, Madrid, pp. 289-07.
- Mateo, J.J., Llorens, A., Mateo, R., Jiménez, M. 2001. Critical study and improvements in chromatographic methods for the analysis of type B trichothecenes. *Journal of Chromatography A* 918, 99-112.
- Mateo, J.J., Mateo, R., Hinojo, M. J., Llorens, A., Jiménez, M. 2002a. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains. *Journal of Chromatography A* 955, 245-256.
- Mateo, R., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. 2004. An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. En: Logrieco, A., Visconti, A. (Eds.). *An Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Europe*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 219-235.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, E.M., Mateo, F., Jiménez, M. 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* 119, 79-83.
- Mateo, E.M., Medina, A., Mateo, F., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Jiménez, M. 2008a. Occurrence of toxigenic fungi in bee pollen from Spain. XII

- International Congress of Mycology, International Union of Microbiological Societies (IUMS). Estambul, Turquía. Agosto 2008.
- Mateo, F., Gadea, R., Mateo, R., Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Jimenez, M. 2008b. Neural network models for prediction of trichothecene content in wheat. *World Mycotoxin Journal* 1, 349-356.
- Mateo, F., Gadea, R., Medina, A., Mateo, R., Jiménez, M. 2009. Predictive assessment of ochratoxin A accumulation in grape juice based-medium by *Aspergillus carbonarius* using neural networks. *Journal of Applied Microbiology* 107, 915-927.
- Mateo, F., Gadea, R., Mateo, E.M., Jiménez, M. 2011. Multilayer perceptron neural networks and radial-basis function networks as tools to forecast accumulation of deoxynivalenol in barley seeds contaminated with *Fusarium culmorum*. *Food Control* 22, 88-95.
- Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Patiño, B., Jiménez, M., 2011a. 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. *International Journal of Food Microbiology* 149, 118-126.
- Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo-Castro, R., Jiménez, M, Magan, N., 2011b. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 151, 289-298.
- Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., Magan, N., 2013. Impact of three sterol-biosynthesis inhibitors on growth of *Fusarium langsethiae* and on T-2 and HT-2 toxin production in oat grain under different ecological conditions. *Food Control* 34, 521-529.
- Matossian, M.K. 1989. Poisons of the past. Molds, epidemic and history. Yale University Press, New Haven, EE.UU.
- Matrella, R., Monaci, L., Milillo, M.A., Palmisano, F., Tantillo, M.G. 2006. Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food Control* 17, 114-117.
- Mauro, A., Battilani, P., Callicott, K.A., Giorni, P., Pietri, A., Cotty, P.J. 2013. Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 162, 1-7.
- Mayer, C.F. 1953. Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt. I. The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA); a comprehensive review. *Military Surgeon* 113, 173-189.
- McMaster, G.S., White, J.W., Hunt, L.A., Jamieson, P.D., Dhillon, S.S., Ortiz-Monasterio, J.I. 2008. Simulating the influence of vernalization, photoperiod

- and optimum temperature on wheat developmental rates. *Annals of Botany* 102, 561-569.
- McLaughlin, C.S. Vaughn, M.H., Campbell, J.M., Wei, C.M., Stafford, M.E. 1977 En: Rodricks, J.V., Hesseltine, C.W., Mehlman, M.A. (Eds.); *Mycotoxins in Human and Health*; Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois, pp. 263-275.
- Medina, A., González, S.G., Sáez, J.M., Mateo, R., Jiménez, M. 2004. Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 261-267.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M. 2005a. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4696-4702.
- Medina, A., González, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Jiménez, M. 2005b. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology* 105, 1-9.
- Medina, A., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Valle-Algarra, F., Jiménez, M. 2005c. A. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence-detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A* 1083, 7-13.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, F., Jiménez, M. 2006a. Survey of the mycobiota of Spanish malting-barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 108,196-203.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, R., Mateo, F., Jiménez, M. 2006b. New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal Chromatography A* 1121, 178-183.
- Medina, A., Mateo, E.M., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Jiménez, M. 2007a. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 119, 230-235.
- Medina, A., Jiménez, M., Mateo, R., Magan, N. 2007b. Efficacy of natamycin for control of growth and Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains under different environmental conditions. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2234-2239.

- Medina, A., Mateo, Eva M., Valle-Algarra, F.M., Mateo, F., Mateo, R., Jimenez, M. 2008a. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by producing strains of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 122, 93-99.
- Medina, A., Magan, N. 2010. Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology* 142, 365-369.
- Medina, A., Mateo, Eva M., Roig, R.M., Blanquer, A., Jiménez, M. 2010a. Ochratoxin A levels in the plasma of healthy blood donors from Valencia and estimation of exposure degree: comparison with previous national Spanish data. *Food Additives and Contaminants, Part A* 9, 1273-1284.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., Magan, N. 2010b. Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media. *Journal of Chromatography B* 878, 2145-2149.
- Medina, A., Magan, N., 2011. Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology* 28, 392-398.
- Meister, U. 2001. Investigations on the change of fumonisin content of maize during hydrothermal treatment of maize. Analysis by means of HPLC methods and ELISA. *European Food Research and Technology* 213, 187-193.
- Membré, J.M., Bassett, J., Gorris, L.G.M. 2007. Applying the food safety objective and related standards to thermal inactivation of *Salmonella* in poultry meat. *Journal of Food Protection* 70, 2036-2044.
- Membré, J.M., Lambert, R.J.W. 2008. Application of predictive modelling techniques in industry: from food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 128, 10-15.
- Meneely, J.P., Sulyok, M., Baumgartner, S., Krska, R., Elliott, C.T. 2010. A rapid optical immunoassay for the screening of T-2 and HT-2 toxin in cereals and maize-based baby food. *Talanta* 81, 630-636.
- Meneely, J.P., Ricci, F., Vesco, S., Abouzied, M., Sulyok, M., Krska, R., Elliott, C.T. 2011a. A comparative study of qualitative immunochemical screening assays for the combined measurement of T-2/HT-2 in cereals and cereal-based products. *World Mycotoxin Journal* 4, 385-394.
- Meneely, J.P., Ricci, F., Egmond, H.P. van, Elliott, C.T. 2011b. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 192-203.



- Mesterházy, Á. 2002. Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to fusarium head blight. *European Journal of Plant Pathology* 108, 675-684.
- Meyer, R.A., Neugebauer, S. 2000. Bestimmung von Ochratoxin A in Bier mit automatischer Probenreinigung an Immunaффinitätssäulen. *Die Nahrung* 44, 58-59.
- Meyer, V., Wu, B., Ram, A.F.J. 2011. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* 33,469-476.
- Micco, C., Grossi, M., Onori, R., Chirico, M., Brera, C, 1986. Monitoring for aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in Italian maize of the 1982, 1983 and 1984 crops. *Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione* 15, 113-116.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Lauber, U., Schollenberger, M., Geiger, H.H. 2001. Effects of genotype and genotype-environment interaction on deoxynivalenol accumulation and resistance to *Fusarium* head blight in rye, triticale, and wheat. *Plant Breed* 120, 97-105.
- Miller, J.D. 2002. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. En: De Vries, J., Trucksess, M., Jackson, L. (Eds.). *Mycotoxins and Food Safety*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 19-27.
- Minervini, F., Fornelli, F., Flynn, K.M. 2004. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicology in Vitro* 18, 21-28.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2007. Gobierno de España. Orden APA/3332/2007 de 2 de noviembre, por la que se modifica el Reglamento de la Denominación de Origen Calificada «Rioja» y de su Consejo Regulador. *Boletín Oficial del Estado* 275, 47130-47132.
- Miraglia, M., Brera, C. 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7., 69-86. SCOOP Directorate-General Health and Consumer Protection. Rome. //ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7\_en.pdf.
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A. et al. 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology* 47, 1009-21.
- Mogensen, J.M., Frisvad, J.C., Thrane, U., Nielsen, K.F. 2010. Production of fumonisin B2 and B4 by *Aspergillus niger* on grapes and raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 954-958.
- Moir, J.C. 1955. The history and present day use of ergot. *Canadian Medical Association Journal* 72, 727-734.

- Molina, M., Giannuzzi, L. 2002. Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. *Food Research International* 35, 585-594.
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M., Pfohl-Leszkowicz, A. 2005. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry* 92, 391-400.
- Moltó, G., Samar, M.M., Resnik, S., Martínez, E.J., Pacin, A. 2000. Occurrence of trichothecenes in Argentinean beer: a preliminary exposure assessment. *Food Additives and Contaminants* 17, 809-813
- Monbaliu, S., van Pioucke, C., Detavernier, C., Doumoultn, F., van Velde, MDE, Schoeters, E., van Dyck, S., Averkieva, O., van Peteghem, C., de Saeger, S. 2010. Occurrence of mycotoxins in feed analysed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 66-71.
- Mongi, J. 1987. Segunda conferencia internacional conjunta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Tailandia.
- Morassut, M., Cecchini, F. 1999. HACCP in oenological industry: a system of self-control not only for hygienic-sanitary hazards. *International Food and Beverage and Packaging Technology* 16, 8-12.
- Mortimer, R.K., Game, J.C. Bell, M., Contopoulou, C.R. 1990. Use of pulsed-field electrophoresis to study the chromosomes of *Saccharomyces* and other yeasts. *Methods* 1, 169-179.
- Moss, M.O. 2002. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. *International Biodeterioration and Biodegradation* 50, 137-142.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Roger Tondje, P., Guiraud, J.P. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology* 121, 234-241.
- Mühlencoert, E., Mayer, I., Zapf, M.W., Vogel, R.F., Niessen, L. 2004. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 651-659.
- Mulè, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A. 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111, 28-34.
- Munkvold, G.P., Hellmich, R.L., Rice, L.G. 1999. Comparison of fumonisin

- concentrations in kernels of transgenic Bt maize hybrids and non-transgenic hybrids. *Plant Disease* 83, 130-138.
- Munkvold, G.P. 2003. Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology* 41, 99-116
- Muñoz, L., Cardelle, M., Pereiro, M., Reiguera, R. 1990. Occurrence of corn mycotoxins in Galicia (Northwest Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 1004-1006.
- Muri, S.D., Van der Voet, H., Boon, P.E., Van Klaveren, J.D., Brüschweiler, B.J. 2009. Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology* 47, 2963-2974.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M. 2006. Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science* 71, 51-65.
- Murray, P., Drew, W., Kobayashi, G., Thompson, J. 1992. *Microbiología médica*. Mosby Year Book, London.
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., Radu, S., 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology* 111, 1262-1274.
- Müllernborn, C., Steiner, U., Ludwig, M., Oerke, E.C., 2008. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology* 120, 157-166.
- Najjar, Y.M., Basheer, I.A., Hajmeer, M.N. 1997. Computational neural networks for predictive microbiology: I. methodology. *International Journal of Food Microbiology* 34, 27-49.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beer in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 82, 897-902.
- Neal, G.E. 1998. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. *Revue de Medecine et Veterinaire* 149, 555-560.
- Neira, M.S., Pacin, A., Martínez, E.J., Moltó, G., Resnik, S.L. 1997. The effects of bakery processing on natural deoxynivalenol contamination. *International Journal of Food Microbiology* 37, 21-27.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, 193 pp.
- Nielsen, L.K., Cook, D.J., Edwards, S.G., Ray, R.V. 2014. The prevalence and

- impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology* 179, 38-49.
- Ng, W., Mankotia, M., Pantazopoulos, P., Neil, R.J., Scott, P.M. 2004. Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Additives and Contaminants* 21, 971-981.
- Nguyen, M.T., Tozlovanu, M., Tran, T.L., Pfohl-Leszkowicz, A. 2007. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of central region in Vietnam. *Food Chemistry* 105, 42-47.
- Nicolaisen, M., Supronien, S., Nielsen, L.K., Lazzaro, I., Spliid, N.H., Justesen, A.F., 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76, 234-240.
- Nielsen, L.K., Jensen, J.D., Rodríguez, A., Jørgensen, L.N., Justesen, A.F. 2012. TRI12 based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *International Journal of Food Microbiology* 157, 384-392.
- Niessen, L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 119, 38-46.
- Nizamlyodlu, F., Oguz, H. 2003. Occurrence of aflatoxins in layer feed and corn samples in Konya province, Turkey. *Food Additives and Contaminants* 20, 654-658.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2008a. Two novel species of *Aspergillus* section *Nigri* from Thai coffee beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1727-1734.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2008b. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 128, 197-202.
- Noser, J., Wenk, P., Sutter, A., Fankhauser, I., Hirschi, H. 2001. Fumonisin B1 and B2, moniliformin, beauvericin and zearalenone in maize from the Swiss retail market. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 92, 90-103.
- Odhav, B., Naicker, V. 2002. Mycotoxins in South African traditional brewed beers. *Food Additives and Contaminants* 19, 55-61
- Oettle, A.G. 1964. Cancer in Africa, especially in regions south of the Sahara. *Journal of the National Cancer Institute* 33, 383-439.

- OIV, 2009. Resolution OIV/OENO 338A/2009. Wines-Treatment using chitosan. International Organisation of Vine and Wine, Paris.
- OIV, 2011. World statistics. 9th General Assembly of the International Organisation of Vine and Wine. Porto.
- OIV, 2013. International Code of Oenological Practices. 2013 Issue (revised edition) International Organisation of Vine and Wine, Paris, p. II.3.4-17.
- Olivares-Marín, M., Del Prete, V., García-Moruno, E., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. 2009. The development of an activated carbon from cherry stones and its use in the removal of ochratoxin A from red wine. *Food Control* 20, 298-303.
- Oliveira, P.M. Mauch, A. Jacob, F.Waters, D.M. Arendt E.K. 2012. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. *International Journal of Food Microbiology* 156, 32-43.
- OMS (Organizacion Mundial de la Salud) 2002. Evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty-six report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 906. Ginebra, p. 70.
- Ong, T.M. 1975. Aflatoxin mutagenesis. *Mutation Research* 32, 35-53.
- Oruc, H.H., Cengiz, M., Kalkanli, O. 2006. Comparison of aflatoxin and fumonisin levels in maize grown in Turkey and imported from the USA. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 337-341.
- Oruc, H.H., Cengiz, M., Uzunoglu, I. 2007. Occurrence of aflatoxin B1 and T-2 toxin in feed and raw ingredients used for animal feeding stuffs. *Veteriner Fakultesi Dergisi, Uludag Universitesi* 26, 1-5.
- Ospital, M., Cazabeil, J.M., Betbeder, A.M., Tricard, C., Creppy, E., Medina, B. 1998. Ochratoxin A in wines. *Revue Française d'Oenologie* 169, 16-18.
- Ozay, G., Heperkan, D. 1989. Mould and mycotoxin contamination of stored corn in Turkey. *Mycotoxin Research* 5, 81-89.
- Ozbey, F., Kabak, B. 2012. Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control* 28, 354-361.
- Pace, J.G., Watts, M.R., Canterbury, W.J. 1988. T-2 Mycotoxin inhibits mitochondrial protein synthesis. *Toxicon* 26, 77-86.
- Palazzini, J.M., Ramírez, M.L., Alberione, E.J., Torres, A.M., Chulze, S.N. 2009. Osmotic stress adaptation, compatible solutes accumulation and biocontrol efficacy of two potential biocontrol agents on *Fusarium* head blight wheat. *Biological Control* 51, 370-376.

- Palermo, D., Pietrobono, P., Palermo, C., Rotunno, T. 2002. Occurrence of ochratoxin A in cereals from Puglia (Italy). *Italian Journal of Food Science* 14, 447-453.
- Palmero, D., González, M. de C., Iglesias, C., Ruíz, G., Tello, J.C. 2008. Effects of water potential on spore germination and viability of *Fusarium* species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35, 1411-1418.
- Palumbo, J.D., O'Keeffe, T.L., Mahoney, N.E. 2007. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia* 164, 241-248.
- Panagou, E.Z., Skandamis, P.N., Nychas, G.J.-E., 2003. Modelling the combined effect of temperature, pH and  $a_w$  on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat resistant fungus isolated from green table olives. *Journal of Applied Microbiology* 94, 146-156.
- Panagou, E.Z., Kodogiannis, V.S. 2009. Application of neural networks as a nonlinear modelling technique in food mycology. *Expert Systems with Applications* 36, 121-131.
- Papagianni, M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances* 25, 244-263.
- Paradells, S., Rocamonde, B., Llinares, C., Herranz-Pérez, V., Jiménez, M., García-Verdugo, J.M., Zipanci, I., Soria, J.M., García-Esparza, M.A. 2015. Neurotoxic effects of ochratoxin-A on the subventricular zone of adult mouse brain. *Journal of Applied Toxicology* DOI 10.1002/jat.3061.
- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2004a. Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology* 95, 79-88.
- Pardo, E., Marín, S., Solsona, A., Sanchis, V., Ramos, A.J. 2004b. Modelling of germination and growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus ochraceus* as affected by water activity and temperature on a barley-based medium. *Food Microbiology* 21, 267-274.
- Pardo, E., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2005a. Mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* influenced by water activity and temperature on irradiated green coffee beans. *Journal of Food Protection* 68, 133-138.
- Pardo, E., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marín, S. 2005b. Modelling of effects of water activity and temperature on germination and growth of ochratoxigenic

- isolates of *Aspergillus ochraceus* on a green coffee-based medium. *International Journal of Food Microbiology* 98, 1-9.
- Pardo, E., Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2006. Ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum* isolates. Predictive models for fungal spoilage prevention - a review. *Food Additives and Contaminants* 23, 398-410.
- Park, D.L. 2002. Effect of processing on aflatoxin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 173-179.
- Park, J.W., Chung, S., Kim, Y. 2005a. Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4637-4642.
- Park, J.W., Lee, C., Kim, Y.B. 2005b. Fate of aflatoxin B1 during the cooking of Korean polished rice. *Journal of Food Protection* 68, 1431-1434.
- Park, J.W., Kim, Y.B. 2006. Effect of pressure cooking on aflatoxin B1 in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2431-2435.
- Parra, R., Magan, N. 2004. Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *Journal of Applied Microbiology* 97, 429-438.
- Parry, D.W., Nicholson, P. 1996. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45, 383-391.
- Pascale, M., Visconti, A. 2008. Overview of detection methods for mycotoxins. En: Leslie, J.F., Bandyopa dhyay, R., Visconti, A. Eds., *Mycotoxins — Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural*. CAB International, UK, pp. 171-183.
- Pascale, M., Panzarini, G., Visconti, A. 2012. Determination of HT-2 and T-2 toxins in oats and wheat by ultra-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Talanta* 89, 231– 236.
- Pateraki, M., Dekanea, A., Mitchell, D., Lydakis, D., Magan, N. 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on *in vitro* germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest Biology and Technology* 44, 141-149.
- Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 43, 1902-14.
- Patiño, B., Gonzalez-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C. 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food*

- Microbiology 104, 207-214.
- Patiño, B., Mirete, S., Vázquez, C., Jiménez, M., Rodríguez, M.T., González Jaén, M.T. 2006. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rDNA. Journal of the Science of Food and Agricultural 86, 429-435.
- Patiño, B., Medina, A., Doménech, M., González-Jaén, M.T., Jiménez, M., Vázquez, C. 2007. PCR diagnosis for *Penicillium brevicompactum*, a contaminant of grapes and mycophenolic acid producer. Food Additives and Contaminants, Part A 24, 165-172.
- Patriarca, A., Vaamonde, G., Fernández Pinto, V., Comerio, R. 2001. Influence of water activity and temperature on the growth of *Wallemia sebi*: application of a predictive model. International Journal of Food Microbiology 68, 61-67.
- Payne, G.A. 1992. Aflatoxin in maize. Critical Reviews in Plant Sciences 10, 423-440.
- Payne, G.A. 1998. Process of contamination by aflatoxin producing fungi and their impacts on crops. En: Sinha, K.K., Bhatnagar, D. (Eds.). Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 279-306.
- Payne, G.A., Brown, M.P. 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annual Review of Phytopathology 36, 329-362.
- Peltonen-Sainio, P., Kontturi, M., Rajala, A. 2004. Impact dehulling oat grain to improve quality of on-farm produced feed. I. Hullability and associated changes in nutritive value and energy content. Agricultural and Food Science 13, 18-28.
- Pena, A., Cerejo, F., Lino, C., Silveira, I. 2005. Determination of ochratoxin A in Portuguese rice samples by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry 382, 1288-1293.
- Peraica, M., Ralic, B., Lucic, A., Pavlovic, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bull. World Health Organization 77, 754-766.
- Perkowski, J., Basiński, T. 2002. Natural contamination of oat with group a trichothecene mycotoxins in Poland. Food Additives and Contaminants 19, 478-482.
- Perkowski, J., Wiwart, M., Buśko, M., Laskowska, M., Berthiller, F., Kandler, W., Krska, R. 2007. Fusarium toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from north-eastern Poland in 2003. Food Additives and Contaminants 24, 1292-1298.



- Perrone, G., Susca, A., Stea, G., Mule, G. 2004. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology* 110, 641-649.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A., Logrieco, A. 2006. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 680-685.
- Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Samson, R.A. 2007a. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59, 53-66.
- Perrone, G., Nicoletti, I., Pascale, M., De Rossi, A., De Girolamo, A., Visconti, A. 2007b. Positive correlation between high levels of ochratoxin A and resveratrol-related compounds in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 6807-6812
- Perrone, G., Varga, J., Susca, A., Frisvad, J.C., Stea, G., Kocsube, S., Toth, B., Kozakiewicz, Z., Samson, R.A. 2008. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1032-1039.
- Peterson, S.W. 2000. Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. En: Samson, R.A., Pitt, J.I. (Eds.). *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus systematics*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Países Bajos, pp. 323-355.
- Peterson, S.W. 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four *loci*. *Mycologia* 100, 205-226.
- Pettersson, H., Langseth, W. 2002b. Intercomparison of trichothecene analysis and feasibility to produce certified calibrants and reference material. Final report II, Homogeneity and stability studies, Final Intercomparison. BCRInformation, EU Project Report EUR 20285/2 EN 1-145.
- Pettersson, H., Börjesson, T., Persson, L., Lerenius, C., Berg, G., Gustafsson, G. 2008. T-2 and HT-2 toxins in oats grown in northern Europe. *Cereal Research Community* 36, 591-592.
- Pettersson, H. 2009. T-2 and HT-2 toxins in oats and oat products. Update from CEEREAL on the status of the research activities of the European oat milling industry. 6th EC *Fusarium*-toxin Forum, Brussels, 9-10 February 2009. [//www.micotossine.it/public/pag\\_873.pdf](http://www.micotossine.it/public/pag_873.pdf).

- Pettersson, H. 2011. Toxicity and risks with T-2 and HT-2 toxins in cereals. In: Plant breeding and seed science 64, Pp. 65-75.
- Petzinger, E., Weidenbach, A. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. Livestock Production Science 76, 245-250.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Manderville, R.A. 2007. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Molecular Nutrition and Food Research 51, 61-99.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. Food Additives and Contaminants 18, 647-654.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., Piva, G. 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. Food Additives and Contaminants, 21, 479-487.
- Pietri, A., Rastelli, S., Mulazzi, A., Bertuzzi T. 2012. Aflatoxins and ochratoxin A in dried chestnuts and chestnut flour produced in Italy. Food Control 25, 601-606.
- Pildain, M.B., Cabral, D., Vaamonde, G. 2005. *Aspergillus flavus* populations in cultivated peanut from different agroecological zones of Argentina, toxigenic and morphological characterisation. Revista de Investigaciones Agropecuarias 34, 3-19.
- Pildain, M.B., Frisvad, J.C., Vaamonde, G., Cabral, D. Varga, J., Samson, R.A. 2008. Two novel aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Argentinean peanuts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 725-735.
- Pineda-Valdés, G., Bullerman, L.B. 2000. Thermal stability of moniliformin at varying temperature, pH, and time in an aqueous environment. Journal of Food Protection 63, 1598-1601.
- Pitt, J.I. 1996. What are mycotoxins? Australian Mycotoxin Newsletter, 7, p 1.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. 2009a. *Aspergillus* and related teleomorphs. En: Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.). Fungi and food spoilage. Springer Science + Business Media, New York, pp. 275-337.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.). 2009b. Fungi and food spoilage. Springer Science + Business Media, New York, 540 pp.
- Pitt, R.E. 1993. A descriptive model of mold growth and aflatoxin formation as affected by environmental conditions. Journal of Food Protection 2, 139-146.
- Piva, G., Battilani, P. and Pietri, A. 2006. Emerging issues in southern Europe: Aflatoxins in Italy. En: Barug, D., Bhatnagar, D., Egmond, H.P. van, Kamp, J.W. van der, Osenbruggen, W.A. van, Visconti, A. (Eds.). The Mycotoxin

- Factbook: Food and Feed Topics. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp. 139-153.
- Plasencia, J. 2004. Aflatoxins in maize: a Mexican perspective. (Special Issue: Aflatoxin and food safety - Part II). *Journal of Toxicology, Toxin Reviews* 23, 155-177.
- Poirazi, P., Leroy, F., Georgalaki, M.D., Aktypis, A., De Vuyst, L., Tsakalidou, E. 2007. Use of artificial neural networks and a gamma-concept-based approach to model growth of and bacteriocin production by *Streptococcus macedonicus* ACA-DE 198 under simulated conditions of Kasserli cheese production. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 768-776.
- Prado, M.M., Prado-Cabrero, A., Fernández-Martín, R., Avalos, J. 2004. A gene of the opsin family in the carotenoid gene cluster of *Fusarium fujikuroi*. *Current Genetics* 46, 4-58.
- Prado-Cabrero, A., Estrada, A.F., Al-Babili, S., Avalos, J. 2007. Identification and biochemical characterization of a novel carotenoid oxygenase: elucidation of the cleavage step in the *Fusarium* carotenoid pathway. *Molecular Microbiology* 64, 448-460.
- Prickett, A.J., MacDonald, S., Wildey, K.B., 2000. Survey of mycotoxins in stored grain from the 1999 harvest in the U.K. Home-Grown Cereals Authority (HGCA). Project Report No. 230.
- Probst, C., Njapau, H., Cotty, P.J. 2005. The S strain of *Aspergillus flavus* is associated with the highly contaminated maize that resulted in deadly aflatoxicoses in Kenya during 2004. Book of Abstracts of the World Mycotoxin Forum. The 3rd Conference, Paises Bajos.
- Pushvinder, R. Desai, S. 2006. Variability among isolates of *Aspergillus flavus* from groundnut for aflatoxin and cyclopiazonic acid production. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 5, paper 5.
- Quintela, S., Villarán, M.C., López de Armentia, I., Elejalde, E. 2011. Occurrence of ochratoxin A in Rioja Alavesa wines. *Food Chemistry* 126, 302-305.
- Quintela, S., Villarán, M.C., López de Armentia, I., Elejalde, E. 2012a. Ochratoxin A in Spanish exportation wine market. *Food Control*, 25, 501-504.
- Quintela, S., Villarán, M.C., López de Armentia, I., Elejalde, E. 2012b. Ochratoxin A removal in red wine by several oenological fining agents: bentonite, egg albumin, allergen free adsorbents, chitin and chitosan. *Food Additives and Contaminants, Part A* 29, 1168-1174.
- Quintela, S, Villarán, M.C, López de Armentia, I., Elejalde, E. 2013. Ochratoxin

- A removal in wine: A review. *Food Control* 30, 439-445.
- Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M., Lucis, A. 1997. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicology Letters* 91, 105-109.
- Rafai, P., Bata, A., Jakab, L., Ványi, A. 2000. Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary. *Food Additives and Contaminants* 17, 799-808.
- Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23,117-125.
- Ramírez, M.L., Chulze, S., Magan, N. 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology* 106, 291-296.
- Ramos, A. 2011. Micotoxinas y micotoxicosis. 1ª ed. P 484. Ed. Díaz de Santos. España.
- Raper, K.B., Fennell, D.I. 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Ratkowsky, D., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N., Chandler, R.E. 1983. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology* 154, 1222-1226.
- Ratola, N., Martins, L., Alves, A., 2004. Ochratoxin A in wines — assessing global uncertainty associated with the results. *Analytica Chimica Acta* 513, 319-324.
- Ravelo Abreu, A., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A. J., Hardisson de la Torre, A. 2011. La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutricion hospitalaria* 26, 1215-1226.
- Reddy, K.N., Locke, M.A., Koger, C.H., Zablutowicz, R.M., Krutz, L.J. 2006. Cotton and corn rotation under reduced tillage management: impacts on soil properties, weed control, yield, and net return. *Weed Science* 54, 768-774.
- Reddy, K.N., Abbas, H.K., Zablutowicz, R.M., Abel, C.A., Koger, C.H. 2007. Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Additives and Contaminants* 24, 1367-1373.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Muralidharan, K. 2009. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiology* 26, 27-31.

- Reddy, K.R.N., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H.K., Abel, C.A., Shier, W.T. 2010a. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews* 29, 3-26.
- Reddy, K.R.N., Farhana, N.I., Wardah, A.R., Salleh, B. 2010b. Morphological identification of foodborne pathogens colonizing rice grains in South Asia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13, 794- 801.
- Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., Salleh, B. 2010c. Varietal differences in accumulation of aflatoxin B1 in Indian rice cultivars. *World Mycotoxin Journal* 3, 251-256.
- Refai, M.K., Aziz, N.H., El-Far, F., Hassan, A.A. 1996. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by  $\gamma$  radiation. *Applied Radiation and Isotopes: Including Data, Instrumentation and Methods for Use in Agriculture, Industry and Medicine* 47, 617-621.
- Reyneri A, 2006. Mycotoxin alarm in maize grain. *Informatore Agrario*, 62, 117-119.
- Reynoso, M.M., Chulze, S.N., Zeller, K.A., Torres, A.M., Leslie, J.F. 2009. Genetic structure of *Fusarium verticillioides* populations isolated from maize in Argentina. *European Journal of Plant Pathology* 123, 207-215.
- Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N. 2008. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology* 122, 85-92.
- Richard, J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. *International Journal of Food Microbiology* 119, 3-10.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E., Larondelle, Y. 2005. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry* 40, 3008-3016.
- Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F.M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 22, 369-378.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., Lima, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129, 187-193.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Lima, N. 2012. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Research International* 48, 76-90.
- Rodríguez, A., Rodríguez, M., Andrade, M.J., Córdoba, J.J. 2012.

- Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods. *International Journal of Food Microbiology* 155, 10-18.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, J., Yu, J., Georgianna, D.R., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W., Nierman, W.C. 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in genus *Aspergillus*? *Studies in Mycology* 59, 11-17.
- Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., Bergamini, C. 2007. Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control* 18, 697-701.
- Romero, S.M., Patriarca, A., Fernández-Pinto, V., Vaamonde, G. 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *International Journal of Food Microbiology* 115, 140-143.
- Rosa, C.A.R., Fraga, M.E., Santana, D.M.N., Magnoli, C.E., Dalcerro, A.M. 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Additives and Contaminants* 21, 358-364.
- Roscoe, V., Lombaert, G.A., Huzel, V., Neumann, G., Melietio, J., Kitchen, D., et al. 2008. Mycotoxins in breakfast cereals from the Canadian retail market: a 3-year survey. *Food Additives and Contaminants, Part A* 25, 347-355.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. *Journal of Theoretical Biology* 162, 447-463.
- Rousseau, J. 2004. Ochratoxina A en los vinos: estado de los conocimientos. *Wine Internet Technical Journal* 17, 1-5.
- Rusanova, T.Y., Beloglazova, N.V., Goryacheva, I.Y., Lobeau, M., Van Peteghem, C., De Saeger, S. 2009. Non-instrumental immunochemical tests for rapid ochratoxin A detection in red wine. *Analytica Chimica Acta* 653, 97-102.
- Russell, R., Paterson, M. 2006. Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry* 41, 1467-1474.
- Russell, R., Paterson, M., Nelson, L. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International* 43, 1902-1914.

- Ryan, L., Thondre, P.S., Henry, C.J.K. 2011. Oat-based breakfast cereals as rich source of polyphenols and high in antioxidant potential. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 929-934.
- Ryu, D., Hanna, M.A., Bullerman, L.B. 1999. Stability of zearalenone during extrusion of corn grits. *Journal of Food Protection* 62, 1482-1484.
- Ryu, D., Jackson, L.S., Bullerman, L.B. 2002. Effects of processing on zearalenone. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 205-216.
- Ryu, D., Hanna, M.A., Eskridge, K.M., Bullerman, L.B. 2003. Heat stability of zearalenone in an aqueous buffered model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1746-1748.
- Sáez, J.M., Medina, Á., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, R. Jiménez M. 2004. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. *Journal of and Chromatography A* 1029, 125-133.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., De Meulenaer, B., Van Impe, J.F., Debevere, J. 2007a. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in corn. *Food Microbiology* 24, 517-529.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007b. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace carbon dioxide concentration. *International Journal of Food Microbiology* 114, 160-167.
- Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J., Devlieghere, F. 2007c. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part II: The effect of initial headspace oxygen concentration. *International Journal of Food Microbiology* 113, 339-345.
- Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Lamboni, Y., Osei-Nimoh, D., Debevere, J. M. (2007d). Interaction of water activity and bicarbonate salts in the inhibition of growth and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species of importance to corn. *International Journal of Food Microbiology* 116, 266-274.
- Samson, R.A., Houbaken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Frank, J.M., Frisvad, J.C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus*

- section *Nigri*. *Studies in Mycology* 50, 45-61.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C. 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44, 133-148.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology* 59, 129-145.
- Sanchis, V., Magan, N. 2004. Environmental conditions affecting mycotoxins. En: Magan, N., Olsen, M. (Eds.). *Mycotoxins in food. Detection and Control*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 174-189.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, H.J., Betbeder, A.M., Dano, D.S., Creppy, E.E. 2006. Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone in cereals and peanuts from Côte d'Ivoire. *Food Additives and Contaminants* 23, 1000-1007.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J.H., Dano, D.S., Betbeder, A.M., Achour, A., Creppy, E.E. 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Toxicon* 47, 894-900.
- Santos, L., Marín, S., Mateo, E.M., Gil-Serna, J., Valle-Algarra, F.M., Patiño, B., Ramos, A.J. 2011. Mycobiota and co-occurrence of mycotoxins in *Capsicum* powder. *International Journal of Food Microbiology* 151, 270-276.
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T., Patiño, B. 2011. Specific detection and quantification of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR® Green quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 145, 121-125.
- Sargeant, K., O'Kelly, J., Carnaghan, R.B.A., Allcroft, R. 1961. The assay of a toxic principle in certain groundnut meals. *Veterinary Record* 73, 1219.
- Sarigiannis, Y., Kapolos, J., Koliadima, A., Tseggen, T., Karaiska, G. 2014. Ochratoxin A levels in Greek retail wines. *Food Control*, 42: 139-143.
- Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H. 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology* 157, 350-354.
- Savino M., Limosani, P., Garcia-Moruno, E. 2007. Reduction of ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *American Journal of Enology and Viticulture* 58, 97-101.
- SCF (Scientific Committee for Food), 2002. Opinion of the Scientific Committee for Food on *Fusarium* toxins. Part 6: Group evaluation of T-2



- toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol adopted on 26 February 2002. [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf).
- Scheidegger, K.A., Payne, G.A. 2005. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: a review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. En: Abbas, H.K. (Ed.). Aflatoxin and food safety. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 137-165.
- Scherm, B., Palomba, M., Serra, D., Marcello, A., Migheli, Q. 2005. Detection of transcripts of aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Food Microbiology 98, 201-210.
- Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F., Niessen, L. 2004a. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. Journal of Applied Microbiology 97, 899-909.
- Schmidt, H., Niessen, L., Vogel, R.F. 2004b. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*—evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. International Journal of Food Microbiology 95, 297- 304.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N., Geisen, R. 2008. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. FEMS Microbiology Letters 284, 142-149.
- Schmidt-Heydt, M., Rufer, C.E., Abdel-Hadi, A., Magan, N., Geisen, R. 2010. The production of aflatoxin B1 or G1 by *Aspergillus parasiticus* at various combinations of temperature and water activity is related to the ratio of aflS to aflR expression. Mycotoxin Research 26, 241-246.
- Schmidt-Heydt, M., Rüfer, C., Raupp, F., Bruchmann, A., Perrone, G., Geisen, R. 2011. Influence of light on food relevant fungi with emphasis on ochratoxin producing species. International Journal of Food Microbiology 145, 229-237.
- Schollenberger, M., Suchy, S., Jara, H.T., Drochner, W., Müller, H. 1999. A survey of *Fusarium* toxins in cereal-based foods marketed in an area of southwest Germany. Mycopathologia 147, 49-57.
- Schollenberger, M., Müller, H., Rühle, M., Suchy, S., Planck, S., Drochner, W. 2005. Survey of *Fusarium* toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany. International Journal of Food Microbiology 97, 317-326.
- Schothorst, R.C., Egmond, H.P. van. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states" Subtask:

- trichothecenes. *Toxicology Letters* 153, 133-143.
- Schwake-Anduschus, C., Langenkämper, G., Unbehend, G., Dietrich, R., Märtilbauer, E., Münzing, K. 2010. Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 toxins in oats from cultivar studies in Germany and degradation of the toxins during grain cleaning treatment and food processing. *Food Additives and Contaminants, Part A* 27, 1253-1260.
- Schwartz, G.G. 2002. Hypothesis: Does Ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes Control* 13, 91-100.
- SCOOP (Scientific Co-Operation), 2003. SCOOP Task 3.2.10. Reports on tasks for scientific co-operation. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States. Final Report. Scientific Co-Operation on Questions relating to Food. European Commission, Directorate-General Health and Consumer Protection, 609 pp. <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., Dexter, J.E., Brennan, P.W., Trenholm, H.L. 1984. Distribution of DON during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. *Food Additives and Contaminants* 1, 313-323.
- Scott, P.M. 1991. Cereal grains. Mycotoxins. fungi and quality in drying and storage. En: Chelkowski, J. (Ed.). Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grains. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 529-572.
- Scott, P.M., Kanhere, S.R., Lawrence, G.A., Daley, E.F., Farber, J.M. 1995. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B1 and B2. *Food Additives and Contaminants* 12, 31-40.
- Scott, P.M. 2002. Methods of analysis for ochratoxin A. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 117-134.
- Scott, P.M. 2005. Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 22, 99-107.
- Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Chan, H.K., Collins, S. 1997. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Additives and Contaminants* 14, 157-173.
- Scudamore, K.A., Patel, S. 2000. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into United Kingdom. *Food Additives and Contaminants* 17, 407-416.
- Scudamore, K.A., Banks, J., MacDonald, S.J. 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants* 20, 1153-1163.

- Scudamore, K.A., Banks, J.N., Guy, R.C.E. 2004. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grain during extrusion. *Food Additives and Contaminants* 21, 488-497.
- Scudamore, K.A., Baillie, H., Patel, S., Edwards, S.G. 2007. Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Additives and Contaminants* 24, 1374-1385.
- Scudamore, K.A. 2008. Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal industry: Recent UK studies. *World Mycotoxin Journal* 1, 315-323.
- Scudamore, K.A., Patel, S., Edwards, S.G. 2009a. HT-2 toxin and T-2 toxin in commercial cereal processing in the United Kingdom, 2004–2007. *World Mycotoxin Journal* 2, 357-365.
- Scudamore, K.A., Scriven, F., Patel, S. 2009b. *Fusarium* mycotoxins in the food chain: maize-based snack foods. *World Mycotoxin Journal* 2, 441-450.
- Scully, B.T., Krakowsky, M.D., Ni, X., Wilson, J.P., Lee, R.D., Guo, B.Z. 2009. Preharvest aflatoxin contamination of corn and other grain crops grown on the U.S. Southeastern Coastal Plain. (Special issue: Emerging issues in mycotoxin research - Part II). *Toxin Reviews* 28, 169-179.
- Seifert, K.A., Lévesque, C.A. 2004. Phylogeny and molecular diagnosis mycotoxigenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 110, 449-471.
- Sell, S., Hunt, J.M., Dunsford, H.A., Chisari, F.V. 1991. Synergy between hepatitis B virus expression and chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Cancer Research* 51, 1278-1285.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venancio, A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 88, 63-68.
- Serra, R., Cabañes, F.J., Perrone, G., Castellà, G., Venancio, A., Mulè, G., Kozakiewicz, Z. 2006a. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98, 295-306.
- Serra, R., Mendonca, C., Venancio, A. 2006b. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *International Journal of Food Microbiology* 111, 35-39.
- Serrano, A.B., Font, G., Ruiz, M.J., Ferrer, E. 2012. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chemistry* 135, 423-429.
- Shapiro, R., Robbins, N., Cowen, L.E., 2011. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Review* 75, 213-267.

- Shepherd, M.J., Gilbert, J. 1984. An investigation of HPLC post-column iodination conditions for the enhancement of aflatoxin B1 fluorescence. *Food Additives and Contaminants* 1, 325-335.
- Shephard, G.S., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N., Sewram, V. 2003. Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1102-1106.
- Shifrin, V.I., Anderson, P. 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13985-13992.
- Siantar, D.P., Halverson, C.A., Kirmiz, C., Peterson, G.F., Hill, N.R., Dugar, S.M. 2003. Ochratoxin A in wine: Survey by antibody- and polymeric-based SPE columns using HPLC/fluorescent detection. *American Journal of Enology and Viticulture* 54, 170-177.
- Singh, A., Sharma, S. 2002. Composting of a crop residue through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. *Bioresource Technology* 85, 107-111.
- Sinha, K.K., Sinha, A.K. 1992. Impact of stored grain pests on seed deterioration and aflatoxin contamination in maize. *Journal of Stored Products Research* 28, 211-219.
- Skaug, M.A. 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 16, 75-78.
- Škrbić, B., Malachova, A., Živančev, J., Veprikova, Z. and Hajšlova, J. 2011. *Fusarium* mycotoxins in wheat samples harvested in Serbia: A preliminary survey. *Food Control* 22, 1261-1267.
- Škrbić, B., Živančev, J., Đurišić-Mladenović, N., Godula M. 2012. Principal mycotoxins in wheat flour from the Serbian market: Levels and assessment of the exposure by wheat-based products. *Food Control* 25, 389-396.
- Slaiding, I. 2008. T-2 and HT-2 and deoxynivalenol (DON) in malting barley and malt. 5th EC *Fusarium*-Toxin Forum, Brussels, 10-11 January 2008. [http://www.micotossine.it/public/pag\\_548.pdf](http://www.micotossine.it/public/pag_548.pdf).
- Slaiding, I. 2009. T-2 and HT-2 and deoxynivalenol (DON) in malting barley and malt. 6th EC *Fusarium*-toxin forum, Brussels, 9-10 February 2009. [http://www.micotossine.it/public/pag\\_870.pdf](http://www.micotossine.it/public/pag_870.pdf)
- Smith, J.E., Moss, M.O. 1985. *Mycotoxins - Formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido, 148 pp.
- Snijders, C.H.A. 2004. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and

- trichothecene formation. *Toxicology Letters* 153, 37-46.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27, 64-67.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N. 1941. The species concept in *Fusarium* with reference to section *Martiella*. *American Journal of Botany* 28, 738-742.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N. 1945. The species concept in *Fusarium* with reference to *Discolor* and other sections. *American Journal of Botany* 28, 738-742.
- Snyder, W.C., Hansen, H.N., Oswald, J.W. 1956. Cultivars of the fungus, *Fusarium*. *Journal of Madras University B* 27, 185-192.
- Soleimany, F., Jinap, S., Faridah, A., Khatib, A. 2012. A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. *Food Control* 25, 647-653.
- Solfrizzo, M., Avantaggiato, G., Panzarini, G., Visconti, A. 2010. Removal of ochratoxin A from contaminated red wines by repassage over grape pomaces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 317-323.
- Soliman, K.M. 2002. Incidence, level, and behavior of aflatoxins during coffee bean roasting and decaffeination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7477–7481.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L. 2007. Technical summary. En: Solomon, S., Qin, D., Manning, M. et al., (Eds.). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group 1 to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Somarin, Y.M., Bankole, S.A. 2010. Mycoflora of stored "ofada" and "abakaliki" rice in Lagos and Ogun states, southwestern Nigeria. *African Journal of Microbiology Research* 4, 1724-1726.
- Soriano, J.M., Dragacci, S. 2004. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. *Food Research International* 37, 367-374.
- Soriano, J.M. 2007. *Micotoxinas en alimentos*. 1ª ed. Ed. Díaz de Santos. p 24. España.
- Soufleros, E.H., Bouloumpasi, E.C., Tricard, C. 2003. Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 173-179.
- Spadaro, D., Lore, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2010. Occurrence of ochratoxin A before bottling in DOC and DOCG wines produced in

- Piedmont (Northern Italy). Food Control 21, 1294-1297.
- Speijers, G.J.A., Speijers, M.H.M. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicology Letters 153, 91-98.
- Sreemannarayana, O., Frohlich, A.A., Vitti, T.G., Marquardt, R.R., Abramson, D. 1988. Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. Journal of Animal Sciences 66, 1703-1711.
- Stack, R.W. 2003. History of fusarium head blight with emphasis on North America. En: Leonard, K.J., Bushnell, W.R. (Eds.). Fusarium Head Blight of Wheat and Barley. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA, Chapter 1, pp. 1-34.
- Stefanaki, I., Foufa, E., Tsatsou-Dritsa, A., Dais, P. 2003. Ochratoxin A concentrations in Greek domestic wines and dried vine fruits. Food Additives and Contaminants 20, 74-83.
- Steffenson, B.J. 2003. Fusarium head blight of barley: Impact, epidemics, management, and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. En: Leonard, K.J., Bushnell, W.R., (Eds.); Fusarium Head Blight of Wheat and Barley; The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA, Chapter 10, pp. 241-295.
- Steiner, W., Pacciarelli B., Battaglia, R. 1991. Aflatoxin B1, BGY-fluorescence and kojic acid in maize kernels: an investigation on maize of Swiss origin. Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene 82, 457-474.
- Stoloff, L., Trucksess, M.W. 1981. Effect of boiling, frying, and baking on recovery of aflatoxin from naturally contaminated corn grits or cornmeal. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 64, 678-680.
- Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U., Gilbert, J., Barmark, A., Brera, C., Clasen, P.E., Galagher, F., Gardikis, J., Jensen, L.B., Lee, F., Luz, M., Michelet, J.Y., Noutio, K.I., Palvras, L., Pittet, A., Reutter, M., Scholten, J.M., Strassmeier, E., Szymanski, L. 2000. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder. Collaborative study. Journal of AOAC International 83, 320-340.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, C. 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. Archives of Toxicology 74, 499-510.
- Suárez-Quiroz, M.L., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P. 2004. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. Food

- Microbiology 21, 629-634.
- Subhani, M.N., Sahi, S.T., Hussain, S., Ali, A., Iqbal, J., Hameed, K., 2011. Evaluation of various fungicides for the control of gram wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. African Journal of Agricultural Research 6, 4555-4559.
- Subramanian, C.V. 1972. The perfect states of *Aspergillus*. Current Science 41, 755-761.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Kasuga, F., Kumagai, S. 1998. Effect of trichothecenes on host defense against infectious diseases. Mycotoxins 47, 19-23.
- Sugita-Konishi, Y., Tanaka, T., Nakajima, M., Fujita, K., Norizukie, H., Mochizuki, N., Takatori, K. 2006. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column, for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. Talanta 69, 650-655.
- Suhr, K.I., Nielsen, V. 2005. Inhibition of fungal growth on wheat and rye bread by modified atmosphere packaging and active packaging using volatile mustard essential oil. Journal of Food Science 70, 37-44.
- Sulyok, M., Berthiller, F., Krska, R., Schuhmacher, R. 2006. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. Rapid communications in mass spectrometry 20, 2649-2659.
- Suproniene, S., Justesen, A.F., Nicolaisen, M., Mankeviciene, A., Dabkevicius, Z., Semaskiene, R. and Leistrumaite, A. 2010. Distribution of trichothecene and zearalenone producing *Fusarium* species in grain of different cereal species and cultivars grown under organic farming conditions in Lithuania. Annals of Agricultural and Environment Medicine 17, 79-86.
- Surekha, M., Saini, K., Reddy, V.K., Reddy, A.R., Reddy, S.M. 2011. Fungal succession in stored rice (*Oryza sativa* Linn) fodder and mycotoxin production. African Journal of Biotechnology 10, 550-555.
- Susca, A., Stea, G., Mulè, G., Perrone, G. 2007. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. Food Additives and Contaminants 24, 1154-1160.
- Sydenham, E.W., Stockenstrom, S., Thiel, P.G., Shepard, G.S., Koch, K.R., Marasas, W.F.O. 1995. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. Journal of Agriculture and Food Chemistry 43, 1198-1201.
- Tabuc, C., Marin, D., Guerre, P., Sesan, T., Bailly, J.D. 2009. Molds and

- mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. *Journal of Food Protection* 72, 662-665.
- Tangni, E.K., Ponchaut, S., Maudoux, M., Rozenberg, R., Larondelle, Y. 2002. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants* 19, 1169-1179.
- Tangni, E.K., Simonis, J., Larondelle, Y., De Meeus, D.A.L. 2005. Decontaminating and detoxifying liquid food media, especially beer, using insoluble vegetable fibers to adsorb mycotoxins. Patent number: WO2005007794-A1 (2005/01/27).
- Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A., Iamanaka, B.T. 2003. The source of Ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology* 82, 173-179.
- Tassou, C.C., Panagou, E.Z., Natskoulis, P., Magan, N. 2007. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of two ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* from Greek wine grapes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2267-2276.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., Fisher, M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31, 21-32.
- Terken, B., Ayse, B.E., Gozde, G., Sevtap, A., Gonul, S. 2005. Aflatoxin and ochratoxin in various types of commonly consumed retail ground samples in Ankara, Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12, 193-197.
- Terzi, V., Tumino, G., Stanca, A.M. Morcia, C. 2014. Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins. *Journal of Cereal Science* 59, 284-293.
- The European Parliament and the Council. 2002a. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities* L31, 1-24.
- The European Parliament and the Council. 2002b. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement. *Official Journal of the European Communities* L140, 10-22.
- The European Parliament and the Council. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September



- 2003 on additives for use in animal nutrition. Official Journal of the European Union, L 268, 29-43.
- The European Parliament and of the Council. 2003. Directive 2003/100/EC of the European Parliament and of the Council of 31 October 2003 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. Official Journal of the European Union L285, 33-37.
- Thewes, S., Prado-Cabrero, A., Prado, M.M., Tudzynski, B., Avalos, J. 2005. Characterization of a gene in the car cluster of *Fusarium fujikuroi* that codes for a protein of the carotenoid oxygenase family. *Molecular Genetics and Genomics* 274, 217-228.
- Thompson, W.L., Wannemacher, R.W.J. 1986. Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture comparison to whole animal lethality. *Toxicon* 24, 985-994.
- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.E., Galvano, F., Langseth, W., Logrieco, A., Nielsen, K.F., Ritieni, A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology* 95, 257-266.
- Tomašević-Čanović, M., Daković, A., Rottinghaus, G. E., Matijašević, S., Đuričić, M. 2003. Surfactant modified zeolites-new efficient adsorbents for mycotoxins. *Microporous and Mesoporous Materials* 61, 173-180.
- Torp, M., Langseth, W. 1999. Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. *Mycopathologia* 147, 89-96.
- Torp, M., Adler, A. 2004. The European *Sporotrichiella* project: a polyphasic approach to the biology of new *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 95, 257-266.
- Torp, M., Nirenberg, H.I. 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology* 95, 247-256.
- Torres, M.R., Sanchis, V., Ramos, A.J. 1998. Occurrence of fumonisins in Spanish beers analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay method. *International Journal of Food Microbiology* 39, 139-143.
- Torres, P., Guzmán-Ortiz, M., Ramírez-Wong, B. 2001. Revising the role of pH and thermal treatments in aflatoxin content reduction during the tortilla and deep frying processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2825-2829.
- Trenholm, H.L., Charmley, L.L., Prelusky, D.B., Warner, R.M. 1991. Two physical methods for decontamination of four cereals contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry 39, 356-360.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* 632, 168-180.
- Ueno, Y. 1977. Mode of action of trichothecenes. *Annales de la nutrition et de l'alimentation* 31, 885-900.
- Ueno, Y. 1985. The toxicology of mycotoxins. *Critical Reviews in Toxicology* 14, 99-133.
- Ueno, Y., Maki, S., Lin, J., Furuya, M., Sugiura, Y., Kawamura., O. 1998. A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food and Chemical Toxicology* 36, 445-449.
- USDA (United States Department of Agriculture) 2006. Grain fungal diseases and mycotoxin reference. Ed.: United States Department of Agriculture, 36 pp.
- Uysal, Ü.D., Öncü, E.M., Berikten, D., Yilmaz, N., Tuncel, N.B., Kivanc, M., Tuncel, M. 2009. Time and temperature dependent microbiological and mycotoxin (ochratoxin-A) levels in boza. *International Journal of Food Microbiology* 130, 43-48.
- Valenta, H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography A* 815, 75-92.
- Valle-Algarra, F.M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J.V., Llorens, A., Jiménez, M., Mateo, R. 2005. Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD. *Talanta* 66,194-201.
- Valle-Algarra, F.M., Mateo, E.M., Medina, A., Mateo, F., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. 2009. Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. *Food Additives and Contaminants, Part A* 26, 896-906.
- Valle-Algarra, F.M. 2010. Tesis Doctoral. Evaluación del peligro potencial y real de la presencia de ocratoxina A, tricotecenos B y patulina en trigo y manzana mediante técnicas microbiológicas y cromatográficas. Universidad de Valencia.
- Valle-Algarra, F.M., Mateo-Castro, R., Mateo, E.M., Gimeno-Adelantado, J.V., Jimenez, M. 2014. Detection and Analysis by Classical Techniques. *Mycotoxins: Detection and Analysis by Classical Techniques*. En: Batt,

- C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology, vol 2. Elsevier Ltd, Academic Press, pp. 862–868. ISBN: 9780123847300.
- Van der Fels-Klerx, H.J., Stratakou, I. 2010. T-2 toxin and HT-2 toxin in grain and grain-based commodities in Europe - occurrence, factors affecting occurrence, co-occurrence and toxicological effects. *World Mycotoxin Journal* 3, 349-367.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., Fourie, L. 1965a. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxin A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Journal of the Chemical Society* 1965, 7083-7088.
- Van der Merwe K.J., Steyn, P.S., Fourie, L., Scott, De B., Theron, L.L. 1965b. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112-1113.
- Vanheule, A., Audenaert, K., De Boevre, M., Landschoot, S., Bekaert, B., Munaut, F., Eeckhout, M., Höfte, M., De Saeger, S., Haesa, G. 2014. The compositional mosaic of *Fusarium* species and their mycotoxins in unprocessed cereals, food and feed products in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 181, 28-36.
- Var, I., Kabak, B. 2007. Occurrence of ochratoxin A in Turkish wines. *Microchemical Journal* 86, 241.
- Var, I., Kabak, B., Erginkaya, Z. 2008. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. *Food Control* 19, 592-598.
- Varela, E., Martínez, A.T., Martínez, M.J. 2000. Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species *Journal of Biotechnology* 83, 245-251.
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J. Kozakiewicz, Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4461-4464.
- Varga, J., Kevei, E., Toth, B., Kozakiewicz, Z., Hoekstra, R.F. 2000. Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 593-599.
- Varga, J., Kiss, R., Mátrai, T., Mátrai, T., Téren, J. 2005a. Detection of ochratoxin A in Hungarian wines and beers. *Acta Alimentaria* 34, 381-392.
- Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Téren, J., Vagvolgyi, C. 2005b. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. *International Journal of Food Microbiology* 99, 321-328.
- Varga, J., Kozakiewicz, Z. 2006. Ochratoxin A in grapes and grapederived

- products. Trends in Food Science and Technology 17, 72-81.
- Varga, J., Frisvad, J.C., Samson, R.A. 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Studies in Mycology 69, 57-80.
- Vecchio, A., Mineo, V., Planeta, D. 2012. Ochratoxin A in instant coffee in Italy. Food Control 28, 220-223.
- Vega, M., Muñoz, K., Sepúlveda, C., Aranda, M., Campos, V., Villegas, R., Villarroel, O. 2009. Solid-phase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in cereals products on Chilean market. Food Control 20, 631-634.
- Velluti, A., Marín, S., Bettucci, L., Ramos A.J., Sanchis, V. 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and zearalenone formation. International Journal of Food Microbiology 59, 59-66.
- Ventura, M., Gómez, A., Anaya, I., Díaz, J., Brotó, F., Agut, M., Comellas, L. 2004. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1048, 25-29.
- Villa, P., Markaki, P. 2009. Aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment. Food Control 20, 455-461.
- Vindeløv, J., Arneborg, N. 2002. Effects of temperature, water activity, and syrup film composition on the growth of *Wallemia sebi*: development and assessment of model predicting growth lags in syrup agar and crystalline sugar. Applied and Environmental Microbiology 68, 1652-1657.
- Visconti, A., Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Boenke, A. 1996. Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in c-irradiated maize. Food Additives and Contaminants 13, 929-938.
- Visconti, A., Pascale, M. 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A 815, 133-140.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A 864, 89-101.
- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. 2000. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up liquid chromatography. Journal of Chromatography A 888, 321-326.

- Visconti, A., Pascale, M., Centonze, G. 2001. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. *Journal of AOAC International* 84, 1818-1827.
- Visconti, A., Perrone, G., Cozzi, G., Solfrizzo, M. 2008. Managing ochratoxin A risk in the grape-wine food chain. *Food Additives and Contaminants* 25, 193-202.
- Vivier, M.A., Pretorius, I.S. 2000. Genetic improvement of grapevine: tailoring grape varieties for the third millennium. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 5-26.
- Vlastimil, D., Jezkova, A., Daniel, J., Kamil, K. 2008. Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism* 9, 77-82.
- Vonberg, R.P., Gastmeier, P. 2006. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *The Journal of Hospital Infection* 63, 246-254.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, L.T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemen, J., Kuiper, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Wagacha, J.M., Muthomi, J.W. 2008. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124, 1-12.
- Walter, S., Brennan, J.M., Arunachalam, C., Ansari, K.I., Hu, X., Khan, M.R., Trognitz, F., Trognitz, B., Leonard, G., Egan, D., Doohan, F.M. 2008. Components of the gene network associated with genotype-dependent response of wheat to the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. *Functional and Integrative Genomics* 8, 421-427.
- Walter, S., Nicholson, P., Doohan, F.M. 2009. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *New Phytologist* 185, 54-66.
- Warrington, I.J., Kanemasu, E.T. 1983. Corn growth response to temperature and photoperiod. I. Seedling emergence, tassel initiation and anthesis. *Agronomy Journal* 75, 749-754.
- Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., Pitt, J.I. 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 12, 141-150.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Nueva York, pp. 315-322.

- Whiting, R.C. 1995. Microbial modelling in foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition* 6, 467-494.
- WHO/FAO, 2001. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives series 47. FAO food and nutrition paper 74. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva.  
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>.
- Wicklow, D.T., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., Adams, G.L. 1980. Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 70, 761-764.
- Wild, C.P., Gong, Y.Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31, 71-82.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.E., Levak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.C. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6335.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80, 1106-22.
- Wilson, D.M., Widstrom, N.W., Marti, L.R., Evans, B.D. 1981. *Aspergillus flavus* group, aflatoxin, and bright greenish-yellow fluorescence in insect-damaged corn in Georgia. *Cereal Chemistry* 58, 40-42.
- Wilson, D.M., Mubatanhema, W., Jurjevic, Z. 2002. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 3-17.
- Wilson, A., Simpson, D., Chandler, E., Jennings, P., Nicholson, P. 2004. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. *FEMS Microbiology Letters* 233, 69-76.
- Wogan, G.N., Edwards, G.S., Newberne, P.M. 1971. Structure-activity relationship in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Research*, 31, 1936-1942.
- Wollenweber, H.W., Reinking, O.A. 1935. Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin.
- Wong, J.J. and Hsieh, D.P.H. 1976. Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 2241-2244.

- Wosten, H.A.B., Scholtmeijer, K., de Vries, R.P. 2007. Hyperproduction of enzymes by fungi. En: Food Mycology. A multifaceted approach to fungi and food. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 183-196.
- Wright, V.F., De las Casas, E., Harein, P.K. 1976. The response of *Tribolium confusum* to the mycotoxin zearalenone (F-2) and T-2 toxin. Environmental Entomology 5, 371-374.
- Wu, F. 2004. Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards. Environmental Science and Technology 38, 4049-4055.
- Wu, F. 2008. A tale of two commodities: how EU mycotoxin regulations have affected US tree nut industries. World Mycotoxin Journal 1, 95-102.
- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, B.W. 2006. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. Toxicology and Applied Pharmacology 137, 182-92.
- Xu, X.M., Parry, D.W., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Edwards, S.G., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J.M., Moretti, A., Tocco, G., Mule, G., Hornok, L., Giczey, G., Tatnell, J. 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing Fusarium ear blight in wheat in four European countries. European Journal of Plant Pathology 112, 143-154.
- Xu, X.M., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Cooke, B.M., Doohan, F.M., Brennan, J., Monaghan, S., Moretti, A., Mulè, G., Hornok, L., Beki, E., Tatnell, J., Ritini, A. Edwards, S.G. 2008. Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions. Phytopathology 98, 69-78.
- Yagen, B., Joffe, A.Z. 1976. Screening of toxic isolates of *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* involved in causing alimentary toxic aleukia. Applied and Environmental Microbiology 32, 423-427.
- Yan, W.K., Wallace, D.H. 1998. Simulation and prediction of plant phenology for five crops based on photoperiod x temperature interaction. Annals of Botany 81, 705-716.
- Yates, S.G., Tookey, H.L., Ellis, J.J., Burkhardt, H.J. 1968. Mycotoxins produced by *Fusarium nivale* isolated from tall fescue (*Festuca arundinacea* schreb.). Phytochemistry 7, 139-146.
- Yazdanpanah, H., Miraglia, M., Calfapietra, F.R., Brera, C. 2001. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in corn and barley from Mazandaran and Golestan in north provinces of Iran. Mycotoxyn Research 17, 21-30.

- Yazdanpanah, H., Mohammadi, T., Abouhossain, G., Cheraghali, A.M. 2005. Effect of roasting on degradation of aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1135-1139.
- Yin, X. 1996. Quantifying the effects of temperature and photoperiod on phenological development to flowering in rice. Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands. 173 pp.
- Yin, Y., Lou, T., Yan, L., Michailides, T.J., Ma, Z. 2009. Molecular characterization of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* isolates, collected from peanut fields in China. *Journal of Applied Microbiology* 107, 1857-1865.
- Yli-Mattila, T., Paavanen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M., Gagkaeva, T., Sarlin, T., Haikara, A., Laaksonen, S., Rizzo, A. 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland and Russia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 41, 243-260.
- Yli-Mattila, T., Ward, T.J., O'Donnell, K., Proctor, R.H., Burkin, A.A., Kononenko, G.P., Gavrilova, O.P., Aoki, T., McCormick, S.P., Gagkaeva, T.Y. 2011. *Fusarium sibiricum* sp. nov, a novel type A trichothecene-producing *Fusarium* from northern Asia closely related to *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae*. *International Journal of Food Microbiology* 147, 58-68.
- Yu, J., Chang, P.K., Ehrlich, K.C., Cary, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Payne, G.A., Linz, J.E., Woloshuk, C.P., Bennett J.W., 2004. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1253-1262.
- Zablotowicz, R.M., Abbas, H.K., Locke, M.A. 2007. Population ecology of *Aspergillus flavus* associated with Mississippi Delta soils. *Food Additives and Contaminants* 24, 1102-1108.
- Zaied, C., Abid, S., Zorgui, L., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., Bacha, H. 2009. Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control* 20, 218-222.
- Zaied, C., Bouaziz, C. Azizi, I. Bensassi, F. 2011. Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63, 613-618.
- Zain, M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15, 129-144.
- Zanic-Grubisic, T., Zrinski, R., Cepelak, I., Petrik, J., Radic, B., Pepeljnjak, S.



2000. Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 167, 132-139.
- Zepnik, H., Volkell, W., Dekant, W. 2003. Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicology and Applied Pharmacology* 192, 36-44.
- Zheng, N., Sun, P., Wang, J.Q., Zhen, Y.P., Han, R.W., Xu, X.M. 2013. Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk and pasteurized milk in China market. *Food Control* 29, 198-201.
- Zhiling, Z., Mengxue, F., Limin, Zuo., Zhentai, Z., Fengwei, W., Long, Ch., Jinghua, L., Guangzhi, S., Shi-Zhong, L. 2015. An aptamer based surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in wine and peanut oil. *Biosensors and Bioelectronics*.  
[doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.059](https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.10.059)
- Zimmerli, B., Dick, R. 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B* 666, 85-99.
- Zimmerli, B., Dick, R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* 13, 655-668.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V., Miraglia, M. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17, 868-874.
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Juan, C., Mojemmi, B., Moltó, J.C., Bouclouze, A., Cherrah, Y., Idrissi, L., El Aouad, R., Mañes, J. 2007a. Incidence of ochratoxin A in rice and dried fruits from Rabat and Salé area, Morocco. *Food Additives and Contaminants* 24, 285-291.
- Zinedine, A., Juan, C., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Idrissi, L., Mañes J. 2007b. Limited survey for the occurrence of aflatoxins in cereals and poultry feeds from Rabat, Morocco. *International Journal of Food Microbiology* 115, 124-127.
- Zinedine, A., Mañes J. 2009. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control* 20, 334-344.
- Zinedine, A., Blesa, J., Mahnine, N., El Abidi, A., Montesano, D., Mañes J. 2010. Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the

- analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. *Food Control* 21, 132-135.
- Zmudzki, J., Wisniewska-Dmytrow, H. 2004. Limits and regulations for mycotoxins in food and feed. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7, 211-216.
- Zöllner, P., Leitner, A., Lubda, D., Cabrera, K., Lindner, W. 2000. Application of a Chromolith SpeedROD RP-18e HPLC column: determination of ochratoxin A in different wines by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 52, 818-820.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1990. Modelling of bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Notermans, S. 1996. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurised milk at the time of consumption. *International Journal of Food Microbiology* 30, 55-70.



**ANEXO**



# Artículo 1

---

**Mateo, Eva M.**, Gil-Serna, J., Patiño, B., Jiménez, M. 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.* *International Journal of Food Microbiology*, 149: 118-126. 2011.





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)

# 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.

Eva M. Mateo <sup>a</sup>, Jéssica Gil-Serna <sup>b</sup>, Belén Patiño <sup>b</sup>, Misericordia Jiménez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100, Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Microbiology III, Faculty of Biology, University Complutense of Madrid, José Antonio Novais 2, E 28040 Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 February 2011

Received in revised form 28 May 2011

Accepted 15 June 2011

Available online 24 June 2011

## Keywords:

Species-specific PCR assays

*Aspergillus*

Aflatoxins

Ochratoxin A

Barley

Occurrence

## ABSTRACT

Contamination of barley by moulds and mycotoxins results in quality and nutritional losses and represents a significant hazard to the food chain. The presence of aflatoxin B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) and G2 (AFG2) and ochratoxin A (OTA) in stored barley in Spain has been studied. Species-specific PCR assays were used for detection of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. steynii*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius* and *A. niger* aggregate in mycotoxin-positive barley samples at different incubation times (0, 1 and 2 days). Classical enumeration techniques (CFU/g) in different culture media for evaluation of *Aspergillus* in sections *Flavi*, *Circumdati* and *Nigri* were also used. One hundred and five barley kernel samples were collected in Spanish grain stores from 2008 to 2010, and analyzed using a previously optimized method involving accelerated solvent extraction, cleanup by immunoaffinity column, liquid chromatographic separation, post-column derivatization with iodine and fluorescence detection. Twenty-nine samples were contaminated with at least one of the studied mycotoxins. AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, and OTA were detected in 12.4%, 2.9%, 4.8%, 2.9%, and 20% of the samples, respectively. Aflatoxins and OTA co-occurred in 4.8% of the samples. Maximum mycotoxin levels (ng/g) were 0.61 (AFB1), 0.06 (AFB2), 0.26 (AFG1), 0.05 (AFG2), and 2.0 (OTA). The results of PCR assays indicated the presence of all the studied species, except *A. westerdijkiae*. The PCR assays showed high levels of natural contamination of barley with the studied species of *Aspergillus* which do not correspond to the expected number of CFU/g in the cultures. These results suggest that a high number of non-viable spores or hyphae may exist in the samples. This is the first study carried out on the levels of aflatoxins and OTA in barley grain in Spain. Likewise, this is the first report on the presence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. in barley grain naturally contaminated with those mycotoxins using a species-specific PCR approach.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The genus *Aspergillus*, a member of the phylum Ascomycota, includes a wide number of mycotoxin-producing species. *Aspergillus* spp. may occur in different agricultural products such as cereals destined for human and animal consumption, including barley (Logrieco et al., 2003; Medina et al., 2006). Due to the global importance of barley and its by-products in the diet it is important to know and to control the mycobiota occurring in this cereal, its distribution in the different agro-climatic regions worldwide and the environmental conditions that affect mycotoxin production in the cereal, which can furthermore persist in the final products (Araguás et al., 2005; Bullerman and Bianchini, 2007; Duarte et al., 2010; Medina et al., 2005a; Valle-Algarra et al., 2009). In spite of many years

of research and the introduction of good agricultural practices (GAP) in the food production, and good manufacturing practices (GMP) in the storage and distribution chain (Aldred and Magan, 2004; Magan and Aldred, 2007), fungi and mycotoxins continue to be a problem. The impact of these natural toxins in both human and animal health and welfare is wide ranging.

To date, hundreds of mycotoxins have been isolated and described, among them aflatoxins B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) and G2 (AFG2) and ochratoxin A (OTA) have been reported to occur in barley and other cereals and by-products in different countries (Ayalew et al., 2006; Duarte et al., 2010; Ghali et al., 2008; Lee et al., 2005; Park et al., 2002, 2005; Prickett et al., 2000; Zaied et al., 2009; Zinedine et al., 2006).

Aflatoxins (AFs) are a group of structurally related toxic secondary metabolites produced mainly by certain strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In barley, they are perhaps the most important toxigenic species (Maenetje and Dutton, 2007; Medina et al., 2006). *A. flavus* produces AFB1 and AFB2 and *A. parasiticus* produces AFG1 and AFG2, in addition to AFB1 and AFB2 (Bennett and Klich, 2003). AFB1 is

\* Corresponding author. Tel.: +34 963543144; fax: +34 963543202.  
E-mail address: [misericordia.jimenez@uv.es](mailto:misericordia.jimenez@uv.es) (M. Jiménez).

predominant and the most toxic and most potent hepatocarcinogenic natural compound ever characterized (Squire, 1989). Aflatoxins have been the focus of enormous scientific interest and innumerable investigations regarding their toxicity, incidence in food and agricultural products, production conditions, etc. Much of the research is summarized in the outputs of various international meetings and assessments (FAO 2004, 2007; FAO/WHO 2006; IARC, 1993).

Apart from AFs, OTA is one of the most important mycotoxins and the most toxic member of the ochratoxin group. OTA exhibits teratogenic, embryotoxic, genotoxic, neurotoxic, immunosuppressive, carcinogenic (IARC, group 2B), and nephrotoxic effects (JECFA, 2008; Pfohl-Leschkowicz and Manderville, 2007). The most important ochratoxigenic *Aspergillus* spp. are *A. ochraceus* and other mesophilic xerophile kindred species, *A. westerdijkiae* and *A. steynii*, which belong to *Aspergillus* section *Circumdati* (Bayman et al., 2002; Frisvad et al., 2004; Peterson, 2008). The second ochratoxigenic *Aspergillus* group, the black *Aspergillus* species, is classified under *Aspergillus* section *Nigri* (Abarca et al., 1994; Medina et al., 2005b). *Aspergillus* section *Circumdati* and *Aspergillus* section *Nigri* have been isolated from cereals, including barley (Ackermann, 1998; Andersen et al., 1996; JECFA, 2008; Maenette and Dutton, 2007; Magnoli et al., 2007; Medina et al., 2006). It has been reported (Lund and Frisvad, 2003) that in wheat and barley in Northern Europe, *Penicillium verrucosum* is the predominantly isolated OTA-producing species, with the occasional presence of *A. ochraceus* especially in countries of the Mediterranean basin.

The presence of a particular mould does not always indicate that a certain mycotoxin occurs. The contrary situation is also true: since mycotoxins are generally stable, they might be detected long after the producing fungi have died out or have been outgrown by other species (Ayalew et al., 2006; Duarte et al., 2010; Magan and Aldred, 2007). The composition of the fungal populations is important regarding the potential interaction and competition between mycotoxigenic species and other spoilage fungi in cereal grain substrates. Knowledge of this mycobiota is not always possible, especially if competitive processes or treatments that affect fungal viability occur. Traditional methods for identification and detection of possible aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi in foods include culturing in different media and morphological studies. This approach, however, is time-consuming, laborious and often difficult even for expert taxonomists (Edwards et al., 2002). Diagnostic methods based on the polymerase chain reaction (PCR) are rapid, as there is no need to culture organisms prior to their identification. They are specific, as identification of species is made on the basis of genotypic differences, and highly sensitive, being able to detect target DNA molecules in complex mixtures even when the fungi are no longer viable (Borman et al., 2008; Niessen, 2007).

Several PCR assays have been developed to detect AF-producing and OTA-producing *Aspergillus* species using as target constitutive genes or toxin biosynthetic genes (Atoui et al., 2007; Chen et al., 2002; Dao et al., 2005; Färber et al., 1997; Mayer et al., 2003; Morello et al., 2007; Mulé et al., 2006; Passone et al., 2010; Schmidt et al., 2003; Shapira et al., 1996; Somashekar et al., 2004; Sweeney et al., 2000; Zachová et al., 2003). However, the sensitivity of the assay can be considerably improved when multi-copy sequences, such as ribosomal DNA regions, are used. Both ITS1 and ITS2 (Internal Transcribed Spacers or the rDNA) regions are highly variable in *Aspergillus* genus allowing discrimination among closely related species (Edwards et al., 2002; Samson et al., 2006) and they have been successfully used to detect and identify toxigenic *Aspergillus* species using PCR assays (Gilsena et al., 2009a, 2009b; González-Salgado et al., 2005, 2008; Medina et al., 2005b; Sardiñas et al., 2010).

Few studies about the efficacy of these PCR methods for the detection of mycotoxigenic species in naturally contaminated cereals (Jurado et al., 2006) have been performed and very scarce information is also available on the occurrence of AFs and OTA in barley in Spain,

where only one study on OTA presence in five samples of barley has been published (Juan et al., 2008). Studies about this topic are necessary since barley is the most important cereal crop in Spain and many other countries.

The aims of this work were: i) Evaluation of the incidence of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 and OTA in stored barley grain in Spain; ii) Detection of the most important *Aspergillus* spp. that are potential producers of these mycotoxins in contaminated barley samples by application of PCR protocols based on multi-copy sequences (ITS) specific to *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* aggregate, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. steynii* and *A. westerdijkiae*; iii) Comparative analysis of the results obtained using PCR assays and viable counts of *Aspergillus* spp. in different culture media.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

One hundred and five samples of barley grain were collected (European Commission, 2006a) from 2008 to 2010 at 21 grain stores across Spain. Forty three were samples of Winter barley and 62 were Spring barley. Laboratory samples of 0.5 kg were ground to fine powder in a stainless steel blender to obtain consistent homogeneity. Portions of milled samples were used for mycological study, which was performed within 24 h of arrival of samples to laboratory, and for mycotoxin determination. For further study of mycotoxin presence, milled samples were placed in air tight sterile plastic bags and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2.2. Mycotoxin determination

#### 2.2.1. Chemicals, reagents and standard solutions

Methanol, acetonitrile and acetic acid were liquid chromatography grade (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands). Pure water was from Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA). Iodine was obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Alcobendas, Spain). Post-column iodine derivatization reagent (0.3 g/l  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  90/10, v/v) was prepared on the day of the analysis.

Standards of aflatoxins and OTA were from Sigma. Stock solutions of AFB1, AFB2, AFG1, and AFG2, were prepared in acetonitrile and stock solution of OTA was prepared in methanol to give each a concentration of 50 ng/ml. For sample spiking a mixed stock solution of aflatoxins was prepared in acetonitrile at a concentration of 5 ng/ml and a separate solution of 10 ng/ml in methanol was prepared for OTA. The solutions of mycotoxins were stored in freezer ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

#### 2.2.2. Pressurized liquid extraction and cleanup

A Dionex Accelerated Solvent Extraction (ASE 150) system (Dionex Co., Sunnyville, CA) was used for extraction of aflatoxins and OTA from barley samples. Ten grams of ground sample grain was weighed and mixed with 3 g of diatomaceous earth drying matrix (Dionex). The sample was packed into the 22-ml extraction cell, and the void volume on the top was filled with glass beads. A mixture of acetonitrile–water (60:40, v/v) was used for mycotoxin extraction. Temperature was  $100^{\circ}\text{C}$  and pressure was 10.3 MPa. Fifty milliliter of extract ( $2 \times 25$  ml) was collected and let stand overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  to allow for protein precipitation. After filtering through paper filter the clear extract was concentrated in a rotary evaporator to near dryness and re-dissolved with acetonitrile–water (60:40, v/v) to a final volume of 10 ml. Then, 2.5 ml was transferred to a 50-ml measuring flask and diluted with phosphate-buffered saline (PBS) solution (2.5 g sample/50 ml).

Cleanup was carried out using AflaOchra immunoaffinity columns (G1017, Vicam, Watertown, MA). The column was first conditioned with PBS (20 ml). Then, 20 ml of diluted sample extract (1.0 g sample) was placed on the column and made to flow at a rate of no more than



3 ml/min. The column was washed with 10 ml pure water (Milli-Q) and then dried by passing air through the column (approximately 3 ml) to remove any remaining water prior to quantitative elution. Aflatoxins and OTA were eluted with methanol (4 ml). The solvent was carefully evaporated under a slight stream of N<sub>2</sub> at 40 °C. The residue (1.0 g sample) was dissolved in 0.5 ml methanol–2% aqueous acetic acid (1:2), filtered through 0.2 µm filter into a vial and used for liquid chromatographic analysis.

### 2.2.3. Chromatographic conditions

The liquid chromatography (LC) system consisted of a Waters 600 pump, a Waters 717 automatic injector, a Waters 474 scanning fluorescence detector and a Waters post-column reaction module (Waters Co., Milford, MA). Separation was performed on an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (150 × 4.6 mm, 3.5 µm particle size). Millennium 32<sup>®</sup> software version 3.01.05 (Waters) was used to control the LC system and to process signals. Column temperature was 35 °C. Separation was carried out at a flow rate of 1 ml/min using a gradient of mobile phase encompassing four solvents (water, acetonitrile, acetic acid and methanol), according to the program in Table 1.

Post-column derivatization of AFB1 and AFG1 was achieved. The post-column derivatization reagent was added at a flow rate of 0.5 ml/min. The mobile phase and the post-column reagent were filtered through a 0.45-µm filter and degassed before use. Retention times for AFG2, AFG1, AFB2, AFB1 and OTA were 6.3, 7.4, 8.7, 10.1, and 16.9 min, respectively. Detection was performed via fluorescence detector and wavelengths were time-programmed (excitation and emission wavelengths were set at 362 and 450 nm, respectively, up to minute 12, and at 330 and 460 nm, respectively, from 12 min onwards). The temperature of the post-column reactor was 70 °C.

### 2.2.4. Method validation

The method was initially validated by analysis of replicated samples spiked with AFs and OTA (n = 5). Cleanup steps were carried out in the same way as for samples. A total of 10 g blank barley sample (undetectable amounts of AFs and OTA) was spiked with 0.1, 0.5 or 1 ng/g of each AF and 0.25, 1.0 and 2.0 ng/g of OTA. Spiked samples were allowed to equilibrate for 2 h prior to extraction. Calibration curves were made in the 0.03–3.0 ng/ml range for each AF and in the 0.10–6.0 ng/ml range for OTA.

## 2.3. Mycological study of positive samples

### 2.3.1. Determination of the number of CFU of *Aspergillus* spp./g

Ten grams of each milled barley sample was homogenized with 90 ml of 0.1% sterile peptone in pure water solution for 15 min on horizontal shaker. Further tenfold serial dilutions were prepared in sterile pure water. A volume of 0.2 ml of these dilutions was spread (in triplicate) on the surface of Petri dishes containing two culture media: DRYES and DG18 (Lund and Frisvad, 2003). Dishes were incubated at 25 °C in the dark for 2 days, and then under 12 h light and dark cycles for 5 days. *Aspergillus* colonies of sections *Flavi*, *Circumdati* and *Nigri* were recorded (Klich and Pitt, 1988) and the number of CFU/g was calculated.

**Table 1**  
Solvent program for mobile phase gradient used in the separation of aflatoxins and OTA.

Time (min)	%H <sub>2</sub> O	%Acetonitrile	%Acetic acid	%Methanol
0.00–1.00	55	1	1	43
1.01–22.00	35	30	1	34
22.01–28.00	30	45	1	24
28.01–35.00	1	97	1	1
35.01–36.00	55	1	1	43

## 2.3.2. PCR assays

**2.3.2.1. DNA extraction.** DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, Spain) was used according to manufacturer's instructions to obtain genomic DNA starting from 100 mg of milled barley without incubation. Moreover, the samples were analysed after 24 and 48 h of incubation before DNA extraction. One gram of milled barley was cultured in Erlenmeyer flasks containing 50 ml of Sabouraud–Chloramphenicol broth (Pronadisa, Spain) and incubated at 28 ± 1 °C on an orbital shaker (140 rpm). In these cases, DNA extraction was carried out starting from 100 mg of filtered culture frozen with liquid nitrogen and ground using a mortar and pestle. All extractions were carried out in triplicate. Elution was carried out in one step adding 100 µl of elution buffer (TE). DNA concentrations were determined using a NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA).

**2.3.2.2. Specific PCR detection.** The specific PCR assays were performed in an Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). Amplification reactions were carried out in volumes of 25 µl containing 200 ng of template DNA, 1 µl of each primer (20 µM), 2.5 µl of 10× PCR buffer, 1 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.2 µl of dNTPs (100 mM) and 0.15 µl of Taq DNA Polymerase (5 U/µl) supplied by the manufacturer (Biotools, Madrid, Spain).

Presence of fungal DNA in all the samples was tested using universal primers 5.8S1/5.8S2 (Gil-Serna et al., 2009a). Specific PCR protocols previously described were used to detect aflatoxin-producing *Aspergillus* species: *A. flavus* (González-Salgado et al., 2008) and *A. parasiticus* (Sardiñas et al., 2010) and OTA-producing *Aspergillus* species: *A. carbonarius* (Patiño et al., 2005), *A. niger* aggregate (González-Salgado et al., 2005), *A. westerdijkiae*, *A. ochraceus* and *A. steynii* (Gil-Serna et al., 2009b). All the experiments were performed in triplicate.

PCR products were detected in 2% agarose ethidium bromide gels in TAE 1× buffer (Tris-acetate 40 mM and EDTA 1.0 mM). The 100 bp DNA ladder (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) was used as molecular size marker.

## 2.4. Statistics

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and linear or logistic regression using Statgraphics Centurion XV.11 statistical package (StatPoint, Inc., VA, USA). For calculation purposes, detectable mycotoxin levels below the limits of quantification (LOQ) were estimated as 50% of those limits and undetectable levels were assumed to be zero. Linear regression of mycotoxin levels against CFU of each *Aspergillus* section/g sample was performed. Logistic regression of mycotoxin presence (0 = below LOD, 1 = above LOD) against presence of target DNA of *Aspergillus* spp. at 0, 24 or 48 h incubation was carried out by categorizing the DNA variable as 0 = not detected or 1 = detected.

## 3. Results

Table 2 shows a summary of the recovery experiments. The highest recoveries were obtained for AFB1, followed for AFG1, AFB2, and AFG2. Recovery rates were higher in samples spiked with 1.0 ng/g than in those spiked with 0.1 ng/g. Relative standard deviation (RSD) was always lower in samples spiked with the highest mycotoxin levels than in samples spiked with the lowest levels. The limit of detection (LOD) was estimated as the toxin concentration that provides a signal equal to the mean signal of the blank plus 3 × S<sub>b</sub>, where S<sub>b</sub> is the standard deviation of the blank signal after 10 injections. For aflatoxins, LODs were 0.01 ng/g for AFB1 and AFB2, and 0.015 ng/g for AFG1 and AFG2. The limits of quantification (LOQ) were 0.035 ng/g for AFB1 and AFB2, and 0.05 ng/g for AFG1 and AFG2. For OTA, the LOD and LOQ were 0.05 and 0.17 ng/g, respectively.

**Table 2**

Recovery data for barley kernel samples spiked with standards of aflatoxins and OTA.

Mycotoxin	Spiking level (ng/g)	Mean recovery (%) (n=5)	Recovery range (%)	RSD (%)
AFB1	0.1	82	74–87	8.0
	0.5	86	78–93	7.5
	1.0	89	81–95	5.9
AFB2	0.1	71	61–76	7.6
	0.5	77	66–84	8.0
	1.0	82	72–88	6.9
AFG1	0.1	75	64–80	8.1
	0.5	81	71–86	6.6
	1.0	85	78–90	5.3
AFG2	0.1	69	58–75	10.0
	0.5	73	63–79	7.9
	1.0	78	66–84	7.9
OTA	0.25	75	68–82	6.9
	1.0	80	69–84	6.8
	2.0	85	77–89	5.0

Twenty-nine of 105 barley kernel samples were found to be contaminated with at least one of the analyzed mycotoxins above the LOD. The results obtained from the determination of aflatoxins and OTA in the 29 samples appear in Fig. 1 and Table 3. AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 and OTA were detected in 13, 3, 5, 3 and 21 samples, respectively. Their ranges and mean levels in positive samples are shown in Table 3.

**Table 3**

Occurrence of aflatoxins and OTA in stored barley grain in Spain.

Mycotoxin	Analyzed samples	Positive samples <sup>a</sup>	%Positive	Range (ng/g) <sup>b</sup>	Mean for positive samples (ng/g) <sup>b</sup>
AFB1	105	13	12.4	0.017–0.61	0.10
AFB2	105	3	2.9	0.017–0.06	0.031
AFG1	105	5	4.8	0.025–0.26	0.093
AFG2	105	3	2.9	0.025–0.05	0.022
OTA	105	21	20	0.05–1.6	0.47

<sup>a</sup> Mycotoxin concentrations were > LOD for each mycotoxin.

<sup>b</sup> Levels in the interval LOD–LOQ are assigned a value equal to 0.5 × LOQ for mean calculation.

AFB1 and OTA co-occurred in 5 samples while the four Afs and OTA co-occurred in only two samples.

A similar number of CFU of *Aspergillus/g* were recorded for the same sample regardless of the culture medium used (DRYES or DG18). Table 4 shows the average CFU of *Aspergillus* in sections *Flavi*, *Circumdati* and *Nigri/g* (considering the two culture media) in samples that were positive for at least one mycotoxin. Species of *Aspergillus* section *Flavi* were present in the 29 samples (100% contamination), and ranged from 42 to  $1 \times 10^3$  CFU/g. *Aspergillus* section *Circumdati* and *Aspergillus* section *Nigri* were isolated in 14 and 9 samples, respectively and the average number of CFU/g ranged from 50 to

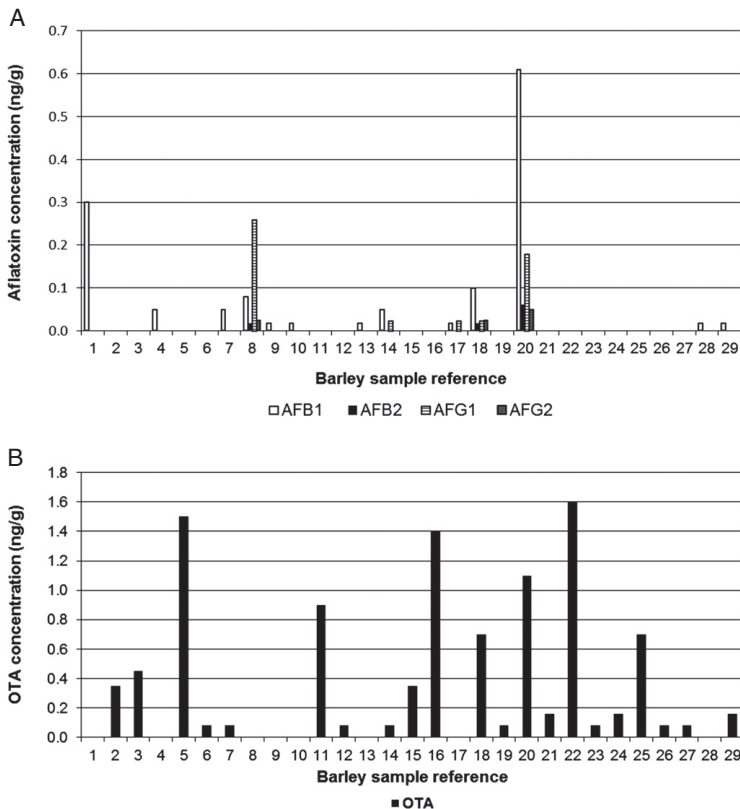


Fig. 1. Levels of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> (A) and OTA (B) detected in 29 out of 105 samples of barley grain collected in stores across Spain.

**Table 4**  
Incidence of viable spores of *Aspergillus* spp. in 29 samples of barley grain containing detectable levels of aflatoxins and/or OTA.

Sample ref.	Geographic origin	Average count (CFU/g) <sup>a</sup>				
		<i>Aspergillus</i> sect. <i>Flavi</i>	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Circumdati</i>	<i>Aspergillus</i> sect. <i>Nigri</i>	Other <i>Aspergillus</i> spp.	Total <i>Aspergillus</i> spp.
1	Valladolid	3 × 10 <sup>2</sup>	–	–	4 × 10 <sup>2</sup>	7 × 10 <sup>2</sup>
2	Toledo	1.5 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>	–	1.9 × 10 <sup>2</sup>	5.4 × 10 <sup>2</sup>
3	Teruel	2.1 × 10 <sup>2</sup>	1 × 10 <sup>2</sup>	–	2 × 10 <sup>2</sup>	5.1 × 10 <sup>2</sup>
4	Valladolid	0.9 × 10 <sup>2</sup>	–	1.5 × 10 <sup>2</sup>	1.2 × 10 <sup>2</sup>	3.6 × 10 <sup>2</sup>
5	Huesca	1.4 × 10 <sup>2</sup>	1.5 × 10 <sup>2</sup>	–	2 × 10 <sup>2</sup>	4.9 × 10 <sup>2</sup>
6	Huesca	3 × 10 <sup>2</sup>	50	–	4.9 × 10 <sup>2</sup>	8.4 × 10 <sup>2</sup>
7	Ciudad Real	1 × 10 <sup>2</sup>	0.9 × 10 <sup>2</sup>	1.1 × 10 <sup>2</sup>	1.5 × 10 <sup>2</sup>	4.5 × 10 <sup>2</sup>
8	Granada	1.1 × 10 <sup>2</sup>	–	–	5 × 10 <sup>2</sup>	6.1 × 10 <sup>2</sup>
9	Palencia	2 × 10 <sup>2</sup>	–	1 × 10 <sup>2</sup>	4 × 10 <sup>2</sup>	7 × 10 <sup>2</sup>
10	Granada	3 × 10 <sup>2</sup>	–	42	3.1 × 10 <sup>2</sup>	6.5 × 10 <sup>2</sup>
11	Teruel	0.9 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>	–	2.1 × 10 <sup>2</sup>	5 × 10 <sup>2</sup>
12	Toledo	1 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>	–	1.1 × 10 <sup>2</sup>	4.1 × 10 <sup>2</sup>
13	Cuenca	2.1 × 10 <sup>2</sup>	–	50	6 × 10 <sup>2</sup>	8.6 × 10 <sup>2</sup>
14	Valladolid	5.1 × 10 <sup>2</sup>	–	–	2 × 10 <sup>2</sup>	7.1 × 10 <sup>2</sup>
15	Toledo	1.1 × 10 <sup>2</sup>	1.4 × 10 <sup>2</sup>	58	1.5 × 10 <sup>2</sup>	4.6 × 10 <sup>2</sup>
16	Valencia	1.5 × 10 <sup>2</sup>	–	–	3.9 × 10 <sup>2</sup>	5.4 × 10 <sup>2</sup>
17	Guadalajara	3.9 × 10 <sup>2</sup>	1.5 × 10 <sup>2</sup>	42	7 × 10 <sup>2</sup>	1.28 × 10 <sup>3</sup>
18	Huesca	1 × 10 <sup>3</sup>	–	–	1.5 × 10 <sup>2</sup>	1.15 × 10 <sup>3</sup>
19	Ciudad Real	1.1 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>	–	50	3.6 × 10 <sup>2</sup>
20	Toledo	5 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>	–	3.1 × 10 <sup>2</sup>	1.01 × 10 <sup>3</sup>
21	Teruel	1 × 10 <sup>2</sup>	–	–	1 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>
22	Madrid	42	1 × 10 <sup>2</sup>	–	58	2 × 10 <sup>2</sup>
23	Valladolid	50	–	1.5 × 10 <sup>2</sup>	2 × 10 <sup>2</sup>	4 × 10 <sup>2</sup>
24	Teruel	1 × 10 <sup>2</sup>	–	–	1.1 × 10 <sup>2</sup>	2.1 × 10 <sup>2</sup>
25	Albacete	1.4 × 10 <sup>2</sup>	2.9 × 10 <sup>2</sup>	–	2.1 × 10 <sup>2</sup>	6.4 × 10 <sup>2</sup>
26	Ciudad Real	1 × 10 <sup>2</sup>	1.6 × 10 <sup>2</sup>	–	3.2 × 10 <sup>2</sup>	5.8 × 10 <sup>2</sup>
27	Guadalajara	0.9 × 10 <sup>2</sup>	–	–	3 × 10 <sup>2</sup>	3.9 × 10 <sup>2</sup>
28	Burgos	1.5 × 10 <sup>2</sup>	–	–	2.9 × 10 <sup>2</sup>	4.4 × 10 <sup>2</sup>
29	Valladolid	1 × 10 <sup>2</sup>	–	50	3.9 × 10 <sup>2</sup>	5.4 × 10 <sup>2</sup>

<sup>a</sup> Average count by dilution plating on DRYES and DG18 media (3 replicates per medium) incubated at 25 °C in the dark for 2 d, and then under 12 h light and dark cycles for 5 d.

2.9 × 10<sup>2</sup> and from 42 to 1.5 × 10<sup>2</sup>, respectively. Counts of total *Aspergillus* in our study ranged from 2 × 10<sup>2</sup> to 1.28 × 10<sup>3</sup> CFU/g.

A PCR assay involving a pair of primers, FLA1 and FLA2, specific to *A. flavus* was used to detect this species in milled barley (Table 5). A single fragment of about 500 bp is only amplified when genomic DNA from *A. flavus* is present. Characterization of *A. parasiticus* by conventional PCR using the primers PAR1 and PAR2 was based on amplification of a single fragment of ca. 430 bp. The design and specificity of these two pairs of primers have been reported previously (González-Salgado et al., 2008; Sardiñas et al., 2010) and no products are observed with genomic DNA from isolates belonging to other species such as *A. tamarii*, *A. nomius*, or *A. bombycis* included in *Aspergillus* section *Flavi*. In the present study, detection of target DNA of *A. flavus* and/or *A. parasiticus* in milled barley grain was achieved without previous incubation in 18 and 4 of the 29 barley samples, respectively. The detection ratio of these species in samples increased at incubation periods of 24 and 48 h (Table 5). Sample 20 shows the highest concentration of AFB1 and the highest level of total aflatoxins but the number of CFU of *Aspergillus* section *Flavi*/g, although relatively high (5 × 10<sup>2</sup>), was not the highest. Both *A. flavus* and *A. parasiticus* were detected by PCR protocols in this sample without previous incubation (Table 5). Except for this sample the levels of AFs in the barley samples were very low.

PCR amplifications of genomic DNA from *A. niger* aggregate using the primer pair ITS1/NIG (González-Salgado et al., 2005), and from *A. carbonarius*, using the primers CAR1/CAR2 (Patiño et al., 2005), were carried out in barley samples. A single fragment of about 420 bp was amplified only when genomic DNA from the *A. niger* aggregate and *A. carbonarius* was present. As shown in Table 5, target DNA from *A. niger* aggregate was detected only after an incubation period of 48 h in 7 out of 29 positive barley samples. However, DNA from *A. carbonarius* was detected in 5, 9 and 16 samples out of the 29 positive samples without previous incubation and after incubation periods of 24 and 48 h, respectively. Control amplifications of the genomic DNA with primers 5.8S1 and 5.8S2 were positive for all the analyzed barley samples.

Identification of species in *Aspergillus* section *Circumdati* from ground barley was performed using STEYF/STEYR primers, which amplified a single fragment of 315 bp only when genomic DNA of *A. steynii* was present in the cereal. Similarly, PCR amplification of genomic DNA from *A. ochraceus* was performed using primers OCRAF/OCRAR. A single fragment of about 430 bp was only obtained when genomic DNA from this species was present (Gil-Serna et al., 2009b). In the present study, the results obtained regarding the detection of target DNA of these species in samples without previous incubation, and after periods of incubation of 24 and 48 h are shown in Table 5. Target DNA from *A. westerdijkiae* was not detected in any sample.

*A. steynii*, *A. ochraceus* or *A. carbonarius* were detected in all the samples contaminated with OTA except sample 14. OTA was detected in all 11 samples where *A. steynii* was present, in 15 out of 16 samples contaminated with *A. carbonarius* and in 4 out of 5 samples contaminated with *A. ochraceus* (Table 5). From the statistical study of the data in Fig. 1 and Table 4 it is concluded that there are significant ( $P < 0.05$ ) though weak positive correlations between the levels of AFB1 or total AFs and the number of CFU/g of *Aspergillus* section *Flavi*. No significant correlation was found between OTA level and the number of CFU of *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* section *Circumdati*, or both combined per gram of sample.

Logistic regression revealed that the presence of AFB1 or total AFs is significantly correlated with presence of *A. parasiticus* in samples at 24 h incubation ( $P < 0.005$ ). No significant correlation was found when the independent variable was presence of *A. flavus*.

Application of logistic regression to presence of OTA as a function of the presence of *Aspergillus niger* aggregate, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* or *A. steynii* in samples at 0, 24 and 48 h incubation indicates that only *A. steynii* significantly influences the presence of the mycotoxin ( $P = 0.012$ ,  $P = 0.004$ , and  $P = 0.0021$ , respectively). Multivariate logistic regression of the presence of OTA as a function of the presence of the potential ochratoxigenic *Aspergillus* spp. at 0, 24 or 48 h incubation time was also carried out. *A. niger* aggregate was

**Table 5**Species of *Aspergillus* in sections *Flavi*, *Nigri* and *Circumdati* detected by specific PCR protocols based on the ITS1 and ITS2 regions in samples of barley grain positive to AFs and/or OTA.

Sample ref.	5.8S	<i>A. flavus</i>			<i>A. parasiticus</i>			<i>A. niger</i> aggregate			<i>A. carbonarius</i>			<i>A. ochraceus</i>			<i>A. steynii</i>			
		Incubation time (h)																		
		0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48	
1	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
8	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+/-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
13	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
16	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
17	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
18	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+
23	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
25	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
26	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
27	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
28	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

All the experiments were performed in triplicate; +: Target DNA detected in the 3 replicates; -: target DNA not detected in any replicate; +/-: target DNA not detected in 1 or 2 replicates. Milled barley (1 g) was cultured in flasks with 50 ml Sabouraud–Chloramphenicol broth at 28 °C in orbital shaker at 140 rpm.

excluded because of lack of variability. The results indicated that there is a statistically significant relationship between the variables at the 95.0% confidence level. However, the presence of *A. ochraceus* is not significant and can be removed from the models. Hence, models involving the presence of only *A. carbonarius* and *A. steynii* are appropriate to explain most of the deviance (*P*-values for models were 0.009, 0.001 and 0.0000 at 0, 24 and 48 h, respectively). The best model can explain more than 63% of the OTA presence variability.

#### 4. Discussion

This is the first study on the occurrence of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 and OTA in stored barley kernels in Spain. Positive samples for at least one of these mycotoxins were examined to study the occurrence of possible aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergilli* using specific diagnostic PCR protocols. Moreover, the number of CFU of *Aspergillus* in sections *Flavi*, *Circumdati* and *Nigri* per gram of sample was also determined in the positive samples.

The combined use of pressurized liquid extraction (Zinedine et al., 2009), immunoaffinity column for simultaneous cleanup (Chan et al., 2004), LC separation with post-column derivatization of AFB1 and AFG1 and fluorescence detection among other factors, produced an optimized, sensitive and reproducible method for determining four aflatoxins and OTA in barley grain. This may be the reason for obtaining a relatively high percentage of positive samples when compared with previous surveys (Duarte et al., 2010; FAO, 2004, 2007; FAO/WHO, 2006; IARC, 1993; Lund and Frisvad, 2003). However, it is remarkable that the mycotoxin levels found in positive samples were lower than those found in barley, other cereals, and by-products reported in previous studies but similar to levels reported, for example, in breakfast and infant cereals (Tam et al., 2006).

Levels of AFs and OTA in unprocessed barley kernels found in the present survey are well within international guidelines (European

Commission, 2006b). Nevertheless, it is worth highlighting that potentially aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi have been found. During cereal processing mycotoxin reduction often occurs; for instance, bread making, dough fermentation and baking can reduce the initial OTA content of wheat flour by more than 50% (Valle-Algarra et al., 2009). However, other processes can have the opposite effect: the high incidence of OTA in beer is remarkable with the percentage of samples with detectable OTA levels ranges from 50% to more than 90% (Mateo et al., 2007; Medina et al., 2005a; Tangny et al., 2002; Visconti et al., 2000). Viable ochratoxigenic fungi can grow when barley grain is remoistened during the germination and malting processes (Maenetje and Dutton, 2007). Aflatoxins, however, are less frequent in beer where the levels found are generally very low (Mably et al., 2005; Nakajima et al., 1999), which infers that isolates of aflatoxigenic species occurring in barley are not strong producers (Ehrlich, 2008). The results from the present study agree with these previous reports. However, as corn is also used in many countries as a highly relevant ingredient in beer production and this cereal can be contaminated with aflatoxins it may be a cause of the presence of aflatoxins in beer (Mably et al., 2005; Pietri et al., 2010).

Fungal identification is very important to provide information about which mycotoxins could be present (Lindblad et al., 2004; Maenetje and Dutton, 2007; Magnoli et al., 2007; Medina et al., 2005b; Medina et al., 2006). For example, Lund and Frisvad (2003) found that samples of wheat/barley grain showing a percentage infestation of *P. verrucosum* higher than 7% indicate OTA presence. Our results show that in some samples where viable spores of *Aspergillus* section *Flavi* were found with counts up to  $3 \times 10^2$  CFU/g (Table 4) no aflatoxin was detected (e.g. samples 2, 3, 5, 6, 11, 12, 15, 16, 19, and 21–27 in Fig. 1A). This may be due (at least in part) to the lack of aflatoxin-producing capacity of isolates. The species-specificity of the assays revealed that *A. flavus* was present in all the 29 examined samples (positive and negative for AFs) whereas *A. parasiticus* was less

frequent. Discrimination between these two species might be of interest since the presence of AFB1 and total AFs is correlated with the presence of target DNA of *A. parasiticus* at 24 h incubation but not with presence of *A. flavus*.

In general, potentially ochratoxigenic *Aspergillus* spp. were found in samples where OTA was detected by conventional and PCR analysis (Tables 4 and 5). *P. verrucosum* was detected only occasionally (data not shown). Despite the fact that the two media used in this study are not optimal for growth of *P. verrucosum* (Lund and Frisvad, 2003), it seems quite improbable that its level in barley samples might have approximated the levels reported by these authors in barley from other countries. Fungi such as *P. verrucosum* and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. are very competitive and able to dominate under conducive environmental conditions in stored grains in cold-temperate and temperate-tropical regions, respectively (Magan and Aldred, 2007). In the present study, all barley kernel samples containing detectable OTA and/or AFs were Spring barley (April to July period), and were harvested and stored during the Summer (July–August). In Spain, short-period barley crops are periodically irrigated and co-exist with other crops such as vineyards in different regions.

The statistical analysis of the data revealed that detection of *A. steynii* or *A. carbonarius* using this PCR-based approach may be considered a good indicator for predicting OTA risk in barley grain. On the contrary, a clear relationship between occurrence of *A. ochraceus* or *A. niger* aggregate and OTA in samples was not seen. It is reported that practically 100% of the isolates of *A. steynii* or *A. carbonarius* are OTA producers (Gil-Serna et al., 2011; Medina et al., 2005b). *A. steynii* and *A. carbonarius* have been detected in barley and wheat seeds (González-Jaén et al., 2008; González-Salgado, 2010; Riba et al., 2008) and reported to produce OTA (Gil-Serna et al., 2011; Mateo et al., 2011). Other authors (Cabañas et al., 2008; Lund and Frisvad, 2003) have indicated that, although *Aspergillus* spp. occur in cereals (wheat, barley), the isolates do not seem to be OTA producers. It is well known that environmental conditions may affect the toxin levels observed in the substrate (Magan and Aldred, 2007; Mateo et al., 2009). Therefore, exhaustive studies are needed to characterize the aflatoxigenic and ochratoxigenic profiles of fungal isolates from barley in different areas.

The PCR-based strategy used in this work, with different incubation times, was aimed to maximize efficiency of detection of the main aflatoxin- and ochratoxin-producing *Aspergillus* species in barley. In previous reports, PCR-based strategies to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in naturally contaminated maize have been used (Jurado et al., 2006). A comparative analysis was carried out to estimate differences in sensitivity when single- and multi-copy sequences are used as target in PCR diagnostics. The efficacy of the PCR assay based on multi-copy IGS sequences to detect the fumonisin-producing species *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* was high compared to the efficacy of single-copy PCR assay based on single-copy gene *fum 1*. The results in the present work point out that a PCR assay based on multi-copy ITS sequences might be able to detect infection levels of barley with *Aspergillus* sections *Flavi*, *Nigri* and *Circumdati* higher than those recorded by enumeration of CFU/g in culture media. In addition, for example, *A. carbonarius* was often detected by PCR protocols in samples where *Aspergillus* section *Nigri* was not detected in culture. This suggests possible contamination of barley with *A. carbonarius* during pre-harvest (González-Salgado, 2010) and that competitive processes or treatments that affect fungal viability may have occurred.

Sabouraud–Chloramphenicol broth was utilized as the medium to inoculate wheat flour in previous PCR studies (González-Salgado et al., 2008) carried out with *A. flavus* (ITEM 4591) to test the functionality of the method used in the present work. In that previous study the primer pair generated for the amplification of *A. flavus* (FLA1 and FLA2) was tested on samples after 8, 16, 24 and 48 h of incubation and two levels of inoculated spores ( $10^2$  and  $10^6$  spores/g) were

assayed. A clear amplification product was observed when wheat flour was inoculated with  $10^2$  or  $10^6$  spores/g after 16, 24 and 48 h of incubation. No amplification products were obtained when DNA was extracted from non-incubated samples or incubated for 8 h. After comparing the previous results with those obtained in the present survey (Table 5), it can be concluded that barley kernels may contain a high number of non-viable spores of *A. flavus* which are not detected by cultural methods. *A. flavus* was detected in 18 of 29 positive barley samples without previous enrichment and incubation. If this situation affects other species, it seems difficult to find acceptable correlations between incidence of toxigenic species and mycotoxin levels in naturally contaminated samples using techniques that permit only the detection of viable molds. A previous report using RT-PCR assays for the detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* on stored peanuts seeds indicated that the RT-PCR data, although correlated with the CFU values obtained with the conventional count methodology ( $r = 0.613$ ), were generally higher than the CFU values (Passone et al., 2010).

In the future, the general application of the specific PCR protocols for diagnostic and quantification of mycotoxigenic species and mycotoxin-producing strains may be a valuable tool for integration into the prevention and control strategies aimed at reducing mycotoxin risk for human and animal health.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for financial support from FEDER and the Spanish Government “Ministerio de Ciencia e Innovación” MICINN (Projects AGL2007-66416-C05-01/02ALI and AGL2010-22181-C04-01/03/ALI). Eva M. Mateo is grateful to the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) for a FPI fellowship. J. Gil-Serna was also supported by an FPU fellowship (MICINN).

#### References

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañas, F.J., 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2650–2652.
- Ackermann, A., 1998. Mycoflora of South African barley and malt. Journal of the American Society of Brewing Chemists 56, 169–176.
- Aldred, D., Magan, N., 2004. Prevention strategies for trichothecenes. Toxicology Letters 153, 165–171.
- Andersen, B., Thrane, U., Svendsen, A., Rasmussen, I.A., 1996. Associated field mycobiota on malt barley. Canadian Journal of Botany 74, 854–858.
- Araguás, C., González-Peñas, E., López de Cerain, A., 2005. Study on ochratoxin A in cereal derived products from Spain. Food Chemistry 92, 459–464.
- Atoui, A., Mathieu, F., Lebrhi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. International Journal of Food Microbiology 115, 313–318.
- Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepshy, J., Beck, R., Abate, D., 2006. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. Mycopathologia 162, 57–63.
- Bayman, P., Baker, J.L., Doster, M.A., Michailides, T.J., Mahoney, N.E., 2002. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. Applied and Environmental Microbiology 68, 2326–2329.
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews 16, 497–516.
- Borman, A.M., Linton, C.J., Miles, S.J., Johnson, E.M., 2008. Molecular identification of pathogenic fungi. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 7–12.
- Bullerman, L.B., Bianchini, A., 2007. Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology 119, 140–146.
- Cabañas, R., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Cabañas, F.J., 2008. Occurrence of *Penicillium verrucosum* in retail wheat flours from the Spanish market. Food Microbiology 25, 642–647.
- Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V., Brereton, P., 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. Journal of Chromatography A 1059, 13–16.
- Chen, R.S., Tsay, J.G., Huang, Y.F., Chiou, R.Y.Y., 2002. Polymerase chain reaction mediated characterization of molds belonging to the *Aspergillus flavus* group and detection of *A. parasiticus* in peanut kernels by multiplex polymerase chain reaction. Journal of Food Protection 65, 840–844.
- Dao, H.P., Mathieu, F., Lebrhi, A., 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. International Journal of Food Microbiology 104, 61–67.
- Duarte, S.C., Pena, A., Lino, C.M., 2010. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived products. Food Microbiology 27, 187–198.

- Edwards, S.G., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W., 2002. PCR based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. *Mycological Research* 106, 1005–1025.
- Ehrlich, K.H., 2008. Genetic diversity in *Aspergillus flavus* and its implications for agriculture. In: Varga, J., Samson, R.A. (Eds.), *Aspergillus* in the Genomic Era. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 233–247.
- European Commission, 2006a. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L70, 12–34.
- European Commission, 2006b. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364, 5–24.
- FAO, 2004. Food and agriculture organization of the United Nations. World wide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. : FAO Food and Nutrition Paper, 81. FAO, Rome.
- FAO, 2007. . Available: Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT <http://faostat.fao.org/>. Accessed: September 28, 2007.
- FAO/WHO, 2006. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Safety Risk Analysis. A guide for national food safety authorities. : FAO Food and Nutrition Paper, 87. FAO, Rome.
- Färber, P., Geisen, R., Holzapfel, W.H., 1997. Detection of aflatoxinogenic fungi in figs by a PCR reaction. *International Journal of Food Microbiology* 36, 215–220.
- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraeken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A., 2004. New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology* 50, 23–43.
- Ghali, R., Hmaissia-Khifia, K., Ghorbel, H., Maaroufi, K., Hedili, A., 2008. Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. *Food Control* 19, 921–924.
- Gil-Serna, J., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., Patiño, B., 2009a. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 131, 162–167.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2009b. Discrimination of the main ochratoxin A-producing species in *Aspergillus* section *Circumdati* by specific PCR assays. *International Journal of Food Microbiology* 136, 83–87.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., Sardiñas, N., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2011. Revision of ochratoxin A capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. *Food Control* 22, 343–345.
- González-Jaén, M.T., Marín, P., González-Salgado, A., Vázquez, C., Aparicio, N., Patiño, B., Fernández-Hevia, C., Esteban, M., 2008. Detección de especies fúngicas productoras de toxinas en cereales españoles. Utilidad de los métodos basados en el ADN para predecir el riesgo de micotoxinas en cereales. *Innovación y Tecnología Agroalimentaria* 3, 36–43.
- González-Salgado, A., 2010. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Ph.D. Thesis, Complutense University of Madrid. Available at: <http://eprints.ucm.es/10545/1/T30977.pdf>.
- González-Salgado, A., Patiño, B., Vázquez, C., González-Jaén, M.T., 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *FEMS Microbiology Letters* 245, 353–361.
- González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., Patiño, B., 2008. Highly sensitive PCR-based detection method specific for *Aspergillus flavus* in wheat flour. *Food Additives and Contaminants* 25, 758–764.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1993. Evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Some naturally-occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Aflatoxins: IARC Monographs, vol. 56, pp. 245–395. Lyon, France.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2008. . Accessed: November 18, 2009 from Safety evaluation of certain mycotoxins in food: WHO Food Additives Series, 59 [http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241660594\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241660594_eng.pdf).
- Juan, C., Moltó, J.C., Lino, C.M., Mañes, J., 2008. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals products from Spain and Portugal. *Food Chemistry* 107, 525–530.
- Jurado, M., Vázquez, C., Marín, S., Sanchis, V., González-Jaén, M.T., 2006. PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 681–689.
- Klich, M.A., Pitt, J.I., 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, North Ryde.
- Lee, J.-O., Oh, K.-S., Sho, Y.-S., Park, S.-S., Suh, J.-H., Choi, W.-J., et al., 2005. A survey of total aflatoxin in foods. The Annual Report of Korea Food and Drug Administration 9, 148.
- Lindblad, M., Johansson, P., Jonsson, N., Lindqvist, R., Olsen, M., 2004. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. *Journal of Applied Microbiology* 97, 609–616.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., Perrone, G., 2003. Epidemiology of crop toxicogenic fungi and their associated mycotoxins in some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology* 109, 645–667.
- Lund, F., Frisvad, J.C., 2003. *Penicillium verrucosum* in wheat and barley indicates presence of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1117–1123.
- Mably, M., Mankotia, M., Cavlovic, P., Tam, J., Wong, L., Pantazopoulos, P., Calway, P., Scott, M., 2005. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. *Food Additives and Contaminants* 22, 1252–1257.
- Maenetje, P.W., Dutton, M.F., 2007. The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products. *Journal of Environmental Science and Health* 42, 229–236.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131–139.
- Magnoli, C.E., Astoreca, A.L., Chiachiera, S.M., Dalcerio, A.M., 2007. Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn based foods and feeds in some South American countries. *Mycopathologia* 163, 249–260.
- Mateo, Eva M., Valle-Algarra, F.M., Mateo-Castro, R., Jiménez, M., 2011. Impact of non-selective fungicides on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* in barley-based medium. *Food Additives and Contaminants, Part A* 28, 86–87.
- Mateo, F., Gadea, R., Medina, A., Mateo, R., Jiménez, M., 2009. Predictive assessment of ochratoxin A accumulation in grape juice-based medium by *Aspergillus carbonarius* using neural networks. *Journal of Applied Microbiology* 107, 915–927.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, F., Mateo, E.M., Jiménez, M., 2007. An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology* 119 (1–2), 79–83.
- Mayer, Z., Färber, P., Geisen, R., 2003. Monitoring the production of aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of *nor-1* mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1154–1158.
- Medina, A., Jiménez, M., Valle-Algarra, F.M., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, R., 2005a. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A* 1083, 7–13.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., 2005b. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingenensis* and other members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 4696–4702.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Mateo, R., Gimeno-Adelantado, J.V., Mateo, F., Jiménez, M., 2006. Survey of mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 108, 196–203.
- Morello, L.G., Sartori, D., De Oliveira Martinez, A.L., Vieira, M.L.C., Taniwaki, M.H., Fungaro, M.H.P., 2007. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of  $\beta$ -tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 119, 270–276.
- Mulé, G., Susca, A., Logrieco, A., Stea, G., Visconti, A., 2006. Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111 (Suppl 1), S28–S34.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Myabe, M., 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunofluorescence and liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 82, 897–902.
- Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology* 119, 38–46.
- Park, J.W., Kim, E.K., Shon, D.H., Kim, Y.B., 2002. Natural cooccurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1 and ochratoxin A in barley and corn food from Korea. *Food Additives and Contaminants* 19, 1073–1080.
- Park, J.W., Chung, S., Kim, Y., 2005. Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4637–4642.
- Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A., Etcheverry, M., 2010. Detection and quantification of *Aspergillus* section *Floa* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology* 138, 276–281.
- Patiño, B., González-Salgado, A., González-Jaén, M.T., Vázquez, C., 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology* 104, 207–214.
- Peterson, S.W., 2008. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100, 205–226.
- Pfohl-Leschkowitz, A., Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: an overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 61–99.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Agosti, B., Donadini, G., 2010. Transfer of aflatoxin B1 and fumonisin B1 from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process. *Food Additives and Contaminants, Part A* 27, 1431–1439.
- Prickett, A.J., MacDonald, S., Wildley, K.B., 2000. Survey of mycotoxins in stored grain from the 1999 harvest in the U.K. Home-Grown Cereals Authority (HGCA). *Project Report* No. 230.
- Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrhi, A., Sabaou, N., 2008. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International Journal of Food Microbiology* 122, 85–92.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C., 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44, S133–S148.
- Sardiñas, N., Vázquez, C., Gil-Serna, J., González-Jaén, M.T., Patiño, B., 2010. Specific detection of *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by a highly sensitive PCR assay. *Food Additives and Contaminants A* 27, 853–858.
- Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R.F., Taniwaki, M.H., Niessen, L., 2003. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 138–146.
- Shapira, R., Paster, N., Eyal, O., Menasherov, M., Mett, A., Salomon, R., 1996. Detection of aflatoxinogenic molds in grains by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3270–3273.
- Somashekar, D., Rati, E.R., Chandrashekar, A., 2004. PCR restriction fragment length analysis of *aflR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International Journal of Food Microbiology* 93, 101–107.

- Squire, R.A., 1989. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science* 214, 887–891.
- Sweeney, M.J., Pàmies, P., Dobson, A.D., 2000. The use of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for monitoring aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* 439. *International Journal of Food Microbiology* 56, 97–103.
- Tam, J., Mankotia, M., Mably, M., Pantazopoulos, P., Neil, R.J., Calway, P., Scott, P.M., 2006. Survey of breakfast and infant cereals for aflatoxins B1, B2, G1 and G2. *Food Additives and Contaminants* 23, 693–699.
- Tangny, E.K., Ponchaut, S., Madoux, M., Rozenberg, R., Larondelle, Y., 2002. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Additives and Contaminants* 19, 1169–1175.
- Valle-Algarra, F., Mateo, E., Medina, A., Mateo, F., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M., 2009. Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. *Food Additives and Contaminants* 26, 896–906.
- Visconti, A., Michelangelo, P., Centonze, G., 2000. Determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 888, 321–326.
- Zachová, I., Vytrasova, J., Pechalova, M., Cervenka, L., Tavcar-Kalcher, G., 2003. Detection of aflatoxigenic fungi in feeds using the PCR method. *Folia Microbiologica* 48, 817–821.
- Zaied, C., Abid, S., Zorgui, L., Bouaziz, C., Chouchane, S., Jomaa, M., Bacha, H., 2009. Natural occurrence of ochratoxin A in Tunisian cereals. *Food Control* 20, 218–222.
- Zinedine, A., Blesa, J., Mahnine, N., El Abidi, A., Montesano, D., Mañes, J., 2009. Pressurized liquid extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of ochratoxin A in breakfast and infants cereals from Morocco. *Food Control* 10, 10–16.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., et al., 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17, 868–874.





## Artículo 2

---

Gil-Serna, J., **Mateo, Eva M.**, González-Jaén, M. T., Jiménez, M., Vázquez, C., Patiño, B. Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach. *Food Additives and Contaminants, part A*. 30:372-380. 2013.



## Contamination of barley seeds with *Fusarium* species and their toxins in Spain: an integrated approach

J. Gil-Serna<sup>a</sup>, E.M. Mateo<sup>b</sup>, M.T. González-Jaén<sup>c</sup>, M. Jiménez<sup>b</sup>, C. Vázquez<sup>a</sup> and B. Patiño<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology III, University Complutense, Madrid, Spain; <sup>b</sup>Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Burjassot, Spain; <sup>c</sup>Department of Genetics, University Complutense, Madrid, Spain

(Received 3 April 2012; final version received 17 October 2012)

*Fusarium* is a globally distributed fungal genus that includes different species pathogenic to cereals among others crops. Some of these *Fusarium* species can also produce toxic compounds towards animals and humans. In this work, the presence of the most important *Fusarium* toxins was determined in barley seeds from Spain, sampled according to European Union requirements. The results obtained were compared with the presence of mycotoxigenic species considered responsible for their synthesis by using species-specific polymerase chain reaction protocols. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>, zearalenone, trichothecenes type A (T-2 and HT-2) and trichothecenes type B (deoxynivalenol and nivalenol) were analysed by using high-performance liquid chromatography. Deoxynivalenol and zearalenone were detected in 72% and 38% of the barley samples, respectively, at levels below European Union limits in all cases. However, the co-occurrence of both toxins in 34% of the samples suggested that synergistic activity of these two mycotoxins should be evaluated. Nivalenol and HT-2/T-2 were detected at low levels in 17% and 10% of the samples, respectively. Fumonisin occurred in 34% of the samples at levels up to 300 µg/kg. This suggested that they might represent a risk in Spanish barley, and to our knowledge, this is the first report on the presence of fumonisins in barley in this country. The species-specific polymerase chain reaction assays to detect mycotoxin-producing *Fusarium* species showed a very consistent correlation between *F. verticillioides* detection and fumonisin contamination as well as *F. graminearum* presence and zearalenone, deoxynivalenol and nivalenol contamination in barley samples. The approach used in this study provided information of mycotoxin contamination of barley together with the identification of the fungal species responsible for their production. Detection of the species with the current polymerase chain reaction assay strategy may be considered predictive of the potential mycotoxin risk in this matrix.

**Keywords:** *Fusarium verticillioides*; *Fusarium graminearum*; barley; PCR detection; *Fusarium* toxins

### Introduction

*Fusarium* is a worldwide distributed fungal genus and includes different phytopathogenic species that are able to infect cereals among other crops (Bottalico and Perrone 2002). Some *Fusarium* species can produce toxic compounds towards animals and humans, and the maximum levels of several *Fusarium* mycotoxins in cereals and derivatives are under regulation in the European Union (European Commission 2006b, 2007). The most important *Fusarium* mycotoxins contaminating cereals are trichothecenes, fumonisins and zearalenone (ZEA) (Miller 2002). Two types of trichothecenes – A and B – have been reported to be produced by *Fusarium* species. T-2 and HT-2 toxins are considered the most relevant mycotoxins included in type A, and deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) are the main type B trichothecenes (Foroud and Eudes 2009). The toxic effects of trichothecenes are usually related to gastrointestinal problems in both animals and humans (Bennett and Klich 2003).

The main producers of type A trichothecenes are *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* (Thrane et al. 2004; Torp and Nirenberg 2004), whereas *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. equiseti* are important species producing type B trichothecenes (Bottalico and Perrone 2002; Liddell 2003; Moss and Thrane 2004).

Several *Fusarium* species are capable of producing fumonisins although the most important are *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, both included in the *Gibberella fujikuroi* species complex (Creppy 2002). Fumonisin consumption has been associated with esophageal cancer in humans and some other tumours in animals (Creppy 2002; Zain 2011).

The toxic effects associated with ZEA are related to its oestrogenic activity, causing hormonal problems mainly in pigs, cattle and sheep (Zinedine et al. 2007). The most significant ZEA producers in cereals are *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. equiseti* (Bennett and Klich 2003).

\*Corresponding author. Email: [belenp@bio.ucm.es](mailto:belenp@bio.ucm.es)

Contamination of cereals with mycotoxigenic *Fusarium* species is a global problem resulting in important economic losses in many countries (Placinta et al. 1999). Barley is one of the most important Spanish crops representing up to 40% of the total cereal production in 2009 (MARM 2010). The presence of *Fusarium* species and their mycotoxins in this crop has been already reported in different countries (Placinta et al. 1999; Bottalico and Perrone 2002; González-Pereyra et al. 2011), but there are few published exhaustive surveys so far regarding mycotoxin-producing species in Spain (Medina et al. 2006; González-Jaén et al. 2008).

The analytical determination of mycotoxins is, to date, the only valid method to certify their presence in food products according to the current regulations, which give mycotoxin limits for various commodities (European Commission 2006a). However, mycotoxin distribution in food products is usually heterogeneous, and it is difficult to obtain a representative sample (Cousin et al. 2005). Several authors have pointed out that the presence of certain mycotoxin-producing fungal species in foodstuffs could be used as a good indicator of mycotoxin contamination; therefore, efficient tools available for the early detection of mycotoxigenic species are helpful to prevent the entry of these toxins into the food chain (Magan 2006; Niessen 2008). Conventional procedures to detect *Fusarium* directly from cereals or derivatives are being replaced by DNA-based detection assays, mainly polymerase chain reaction (PCR), which permits rapid and highly sensitive detection of *Fusarium* species directly in foodstuffs and their discrimination at the species level. Several PCR protocols have been developed and applied successfully to detect mycotoxigenic *Fusarium* species in food products although the most sensitive are based on multicopy target sequences (Bluhm et al. 2002; Mulè et al. 2004; Patiño et al. 2004; Jurado et al. 2006). Furthermore, Jurado et al. (2006) obtained a high correlation between the detection of fumonisin-producing species using specific PCR assays and mycotoxin contamination of maize samples.

In this work, the presence of the most important *Fusarium* toxins (fumonisins, trichothecenes and ZEA) was evaluated in barley seeds from Spain, which were sampled according to European Union requirements. The results obtained were compared with the presence of mycotoxigenic species considered responsible for their synthesis by using species-specific PCR assays and a protocol to obtain genomic DNA from seeds.

## Materials and methods

### Samples

Twenty-nine selected samples of barley grains, collected from 2008 to 2010 from 21 grain stores across

Spain, were used in this study. These samples provided the basis for the preliminary analysis of 105 samples and were selected on the basis of their contamination levels with *Fusarium* species (colony forming unit [CFU]/g). Because of irregular fungal contamination and mycotoxin distribution among the grain, rigorous sampling was ensured according to European Union requirements (European Commission 2006a). Accordingly, laboratory samples of 0.5 kg were ground to a fine powder in a stainless steel blender to obtain consistent homogeneity. Portions of milled samples were used for mycological study, which was performed within 24 h of the arrival of samples to the laboratory. For further study of the presence of mycotoxins, milled samples were placed in hermetic sterile plastic bags and stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### Mycotoxin determination

#### Chemicals, reagents and standard solutions

Chemicals, reagents and standard solutions used were as follows: fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> (FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>), ZEA, trichothecene type A (T-2 and HT-2) and trichothecene type B (DON and NIV) standards, pentafluoropropionic anhydride and 4-dimethylaminopyridine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain), methanol, acetonitrile, toluene and acetic acid liquid chromatography (LC) grade (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands), sodium hydrogen carbonate (Panreac, Barcelona, Spain), standardised 70–230-mesh aluminium oxide 90 (0.063–0.2-mm particle size) (Merck, Darmstadt, Germany), activated charcoal (Norit) (Fluka, Madrid, Spain), glass microfibre filters (GF/A and GF/C) and filter paper (No. 4) (Whatman, Maidstone, UK), C18-silica (Waters, Milford, DE, USA) and immunoaffinity clean-up columns ZearalaTest and FumoniTest (Vicom Science Technology, Watertown, MA, USA). Phosphate-buffered saline was prepared with potassium chloride (0.2 g), potassium dihydrogen phosphate (0.2 g), anhydrous disodium hydrogen phosphate (1.16 g) and sodium chloride (8.0 g) in 1 litre of pure water; the pH was brought to 7.4. Pure water was obtained from a Milli-Q apparatus (Millipore, Billerica, MA, USA) and was used when water was required.

#### Pressurised liquid extraction, clean-up and chromatographic analysis

A Dionex Accelerated Solvent Extraction ASE system (Dionex Co., Sunnyville, CA, USA) was used for the extraction of mycotoxins from barley samples. Ground barley grains (10 g) were weighed and mixed with diatomaceous earth (3 g) drying matrix. The sample was packed into a 22-ml extraction cell, and the void volume on the top was filled with glass beads. The temperature was  $+100^{\circ}\text{C}$ , and the pressure was 10.3 MPa. Two sequential extraction steps using

static mode, each taking 5 min, were applied. Ground grain (30 g) was used for the determination of various *Fusarium* toxins in barley samples (10 g for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub>, 10 g for ZEA and 10 g for trichothecenes).

FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were extracted with 50 ml (2 × 25 ml) methanol:acetonitrile:water (25/25/50 v/v/v). The extract was filtered through a paper filter (Whatman No. 4) and subsequently analysed according to a procedure previously described by Manova and Mladenova (2009). Before LC analysis, FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were derivatised by using *o*-phthalaldehyde according to a procedure previously described by Hinojo et al. (2006).

For ZEA extraction, ground sample (10 g) together with potassium chloride (1 g) was extracted with 50 ml (2 × 25 ml) acetonitrile/water (90:10 v/v). The extract was filtered through a filter paper (Whatman No. 4), and ZEA was determined according to a procedure described by Visconti and Pascale (1998). The LC system conditions were according to Llorens et al. (2002).

Trichothecene extraction was carried out with 50 ml (2 × 25 ml) acetonitrile/water (84:16 v/v). After filtering through a filter paper (Whatman No. 4), trichothecenes were determined in the extract as described by Valle-Algarra et al. (2009). Trichothecene derivatisation in the extract, as well as gas chromatography – electron capture detector (GC-ECD) and gas chromatography mass spectrometry analysis, was carried out according to a procedure described by Valle-Algarra et al. (2009).

#### Equipment

The LC system was composed of a Waters 717 automatic injector, a Waters 600 pump and a Waters 996 photodiode array detector coupled in series with a Waters 474 scanning fluorescence detector. Millennium 32 software, version 3.05.01 (Waters Co., Milford, USA), was used to control the system.

The GC system was composed of an HP-6890 plus gas chromatograph, equipped with a <sup>63</sup>Ni electron capture detector (ECD) (Hewlett-Packard, Avondale, AZ, USA) and an Agilent 7683 Series injector (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Signals were processed by using HP GC ChemStation software, Version A.10.02(1757) (Hewlett-Packard). To confirm the presence of trichothecenes in samples, a GC system, 6890 N-5973, equipped with a mass spectrometer was used.

#### Mycological study of samples

##### Determination of the number of CFU of *Fusarium* species per gram

Each milled barley sample (10 g) was homogenised with 90 ml of 0.1% sterile peptone in pure water

solution for 15 min on a horizontal shaker. Further 10-fold serial dilutions were prepared in sterile pure water. Volumes of 0.2 ml of these dilutions were spread (in triplicate) on the surface of petri dishes containing two culture selective media for detecting *Fusarium* species: Czapek-Dox iprodione dichloran agar and dichloran chloramphenicol peptone agar (Thrane 1996). Dishes were incubated at 25°C under 12 h light-and-dark cycles for 5–7 days. *Fusarium* species colonies were recorded, and the number of CFU/g was calculated.

##### PCR detection of the main mycotoxin-producing *Fusarium* species

**DNA extraction.** All samples obtained and milled as described before were evaluated for the presence of mycotoxigenic *Fusarium* species by using specific PCR-based protocols. Genomic DNA was directly obtained from 200 mg of each sample without prior incubation by using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, Spain).

Two additional analyses were performed after 24 and 48 h of incubation before DNA extraction. Incubation was carried out with 1 g of milled barley in Erlenmeyer flasks containing 50 ml of Sabouraud-Chloramphenicol Broth (Pronadisa, Spain) at 28°C in an orbital shaker (140 rpm). After incubation, the samples were filtered and, subsequently, frozen with liquid nitrogen and grinded by using a mortar and a pestle. Genomic DNA was isolated by using the same kit previously mentioned starting from 200 mg of powdered material.

Three independent DNA extractions were performed from each of the three cases; therefore, nine independent DNA isolations were performed from each sample (three of each condition: non-incubated and incubated either 24 or 48 h before DNA extraction).

DNA concentrations were determined by using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, NC, USA).

**Specific PCR detection.** The specific PCR assays were performed in an Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) by using all the nine genomic DNAs obtained from each of the 29 barley samples. Amplification reactions were carried out in volumes of 25 µl containing 200 ng of sample DNA, 1 µl of each primer (20 µM), 2.5 µl of 10 × PCR buffer, 1 µl of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.2 µl of deoxynucleotides triphosphate (dNTPs) (100 mM) and 0.15 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl) supplied by the manufacturer (Biotools, Madrid, Spain).

The suitability of genomic DNA for PCR amplification and the presence of fungal DNA were tested in all the samples by using universal primers 5.8S1/5.8S2 (Gil-Serna et al. 2009). Subsequently, species-specific

Table 1. Mean levels of *Fusarium* species (CFU/g) and *Fusarium* toxins ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on spring barley samples grown and stored in Spain.

Sample	(CFU/g) <sup>a</sup>	Mycotoxins ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
		FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>	ZEA	DON	NIV	T2 + HT2
1	$2.0 \times 10^2$	–	10.4	–	–	–
2	$3.2 \times 10^2$	–	23.4	68.3	–	–
3	$4.1 \times 10^2$	198.0	–	–	–	–
4	$5.4 \times 10^2$	347.5	22.5	7.4	–	16.3
5	$2.9 \times 10^2$	–	34.1	103.9	4.5	–
6	$2.4 \times 10^2$	–	20.2	95.5	–	–
7	$3.6 \times 10^2$	241.0	–	–	–	–
8	$3.1 \times 10^2$	–	–	6.2	–	–
9	$2.0 \times 10^2$	–	–	89.6	3.9	14.4
10	$2.0 \times 10^2$	–	–	–	–	–
11	$3.2 \times 10^2$	–	–	4.9	–	–
12	$4.1 \times 10^2$	220.7	–	–	–	–
13	$5.6 \times 10^2$	294.8	18.4	112.3	5.8	–
14	$2.1 \times 10^2$	–	–	5.1	–	–
15	$3.6 \times 10^2$	–	18.2	78.4	5.3	–
16	$2.1 \times 10^2$	–	–	8.3	–	–
17	$2.0 \times 10^2$	265.1	–	8.9	–	–
18	$2.5 \times 10^2$	–	13.2	92.1	–	–
19	$4.6 \times 10^2$	215.4	15.4	5.2	–	–
20	$1.5 \times 10^2$	–	–	8.2	–	22.7
21	$1.0 \times 10^2$	–	–	4.6	–	–
22	$2.5 \times 10^2$	301.3	16.3	4.5	–	–
23	$1.5 \times 10^2$	–	–	–	–	–
24	$2.1 \times 10^2$	–	–	5.2	–	–
25	$1.4 \times 10^2$	–	–	–	–	–
26	$3.8 \times 10^2$	186.5	–	6.4	–	–
27	$2.9 \times 10^2$	–	11.4	3.9	3.5	–
28	$1.4 \times 10^2$	–	–	–	–	–
29	$2.4 \times 10^2$	220.8	–	4.1	–	–

Notes: CFU, colony-forming unit; CZID, Czapek-Dox iprodione dichloran agar; DCPA, dichloran chloramphenicol peptone agar; DON, deoxynivalenol; NIV, nivalenol; ZEA, zearalenone.

<sup>a</sup>Average count by dilution plating on CZID and DCPA media (three replicates per medium) incubated at 25°C under 12 h light-and-dark cycles for 5–7 days.

–, not detected or detected below the quantification limit.

PCR assays were applied to detect the main fumonisin-producing *Fusarium* species: *F. verticillioides* and *F. proliferatum* (Patiño et al. 2004; Jurado et al. 2006).

A specific PCR protocol to detect trichothecene producers was carried out by using all DNA samples as described by Jurado et al. (2006). Subsequently, positive samples were evaluated for the presence of *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* and *F. sporotrichioides* by using the species-specific PCR assays described previously (Jurado et al. 2005). Detection of *F. equiseti* was carried out in all the samples by using a specific protocol previously described (Jurado et al. 2005).

#### Statistical analyses

Data were analysed by using Statgraphics 5.1 statistical package (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Logistic regression of mycotoxin presence

(0 = below limit of detection, 1 = above limit of detection) against the presence of target DNA of *Fusarium* species was carried out by categorising the DNA variable as 0 = not detected or 1 = detected.

#### Results

*Fusarium* species colonies could be detected in all 29 barley samples showing similar CFU values regardless of the culture medium used (Czapek-Dox iprodione dichloran agar or dichloran chloramphenicol peptone agar). Table 1 shows the average CFU of *Fusarium* species recorded from each sample considering the two culture media, which ranged from  $1.0 \times 10^2$  to  $5.6 \times 10^2$  CFU/g.

The results obtained from mycotoxin analysis of these samples are indicated in Table 1. A high percentage of samples (86%) were positive for the presence of one or more *Fusarium* toxins.

Table 2. PCR detection of *Fusarium* species in barley samples (1–29) using species-specific PCR assays after 24 or 48 h of incubation.<sup>a</sup>

	<i>F. verticillioides</i>		Trichothecene producers		<i>F. graminearum</i>		<i>F. equiseti</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1	–	–	+	–	–	–	–	–
2	–	–	+	+	+	–	–	–
3	+	+	–	–	–	–	–	–
4	+	+	+	+	+	–	–	–
5	–	–	+	+	+	–	–	–
6	–	–	+	+	+	–	–	–
7	+	+	+	–	–	–	–	–
8	–	–	+	+	–	–	–	–
9	–	–	+	+	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	+	+	–	–	–	–
12	+	+	–	–	–	–	–	–
13	+	+	+	+	+	–	–	–
14	–	–	+	+	–	–	–	–
15	–	–	+	+	+	–	–	–
16	–	–	+	+	–	–	–	–
17	+	+	+	+	–	–	–	–
18	–	–	+	+	–	–	–	–
19	+	+	+	+	–	–	–	–
20	–	–	–	–	–	–	+	+
21	–	–	+	+	–	–	–	–
22	+	+	+	+	+	–	–	–
23	–	–	–	–	–	–	–	–
24	–	–	–	–	–	–	–	–
25	–	–	–	–	–	–	–	–
26	+	+	–	–	–	–	–	–
27	–	–	+	+	+	–	–	–
28	–	–	–	–	–	–	–	–
29	+	+	+	+	–	–	–	–

Notes: PCR, polymerase chain reaction; +, positive amplification. In this case, a specific band of amplification was obtained in all replicates performed for each sample;

–, no amplification.

<sup>a</sup>In all cases, the three independent DNA extractions from each sample showed the same PCR amplification pattern.

Fumonisin, ZEA, DON, NIV and HT2/T2 were detected in 34%, 38%, 72%, 17% and 10% of the samples, respectively. Ten of 29 barley samples were contaminated with only one of these toxins, 7 with two, 6 with three and 2 with four different mycotoxins. Only four samples were negative for the *Fusarium* toxins tested, although they were positive for *Fusarium* species by using conventional counting techniques.

The results obtained from specific PCR assays for toxigenic *Fusarium* species are shown in Table 2. Control PCR amplification with the primer set 5.8S1/5.8S2 was positive for the 29 samples analysed, indicating the suitability of genomic DNA used for PCR assays and detection of fungal DNA in all of them. It is important to note the consistency of the results in the three independent DNA extractions. In all cases, the same PCR results were obtained in the three replicates carried out for each incubation condition.

No positive amplification was achieved without prior incubation in any sample using the specific PCR

protocols applied. The majority of the positive results were obtained both after 24 and 48 h of incubation, except for *F. graminearum*, where positive amplification was obtained only after 24 h of incubation. No amplification for any of the species-specific PCR reactions assayed was observed in 4 of the 29 samples; in three of these four samples, none of the *Fusarium* toxins analysed was detected.

The occurrence of trichothecene-producing species was detected in 65% of the samples. Positive correlation was found between PCR detection of trichothecene producers and trichothecene contamination; 86% of the samples contaminated with at least one of the trichothecenes analysed were also positive for the trichothecene-producing species assay. *F. graminearum* and *F. equiseti* were the only potential trichothecene-producing species present in the samples (28% and 3%, respectively) (Figure 1), whereas *F. culmorum*, *F. sporotrichioides* and *F. poae* were not detected in any of the samples. All samples with positive amplification

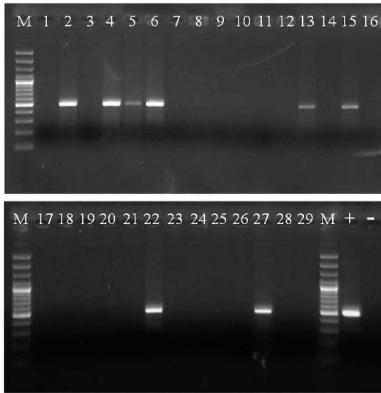


Figure 1. Example of gel electrophoresis representing the results for *F. graminearum*-specific polymerase chain reaction using one DNA extraction of each sample. Each number in the row corresponds to the number of the sample from 1 to 29. The results showed positive amplification in the samples 2, 4, 5, 6, 13, 15, 22 and 27; therefore, *F. graminearum* was detected in these samples. M, 100 bp marker; +, positive control of amplification performed with *F. graminearum* pure DNA; -, negative control.

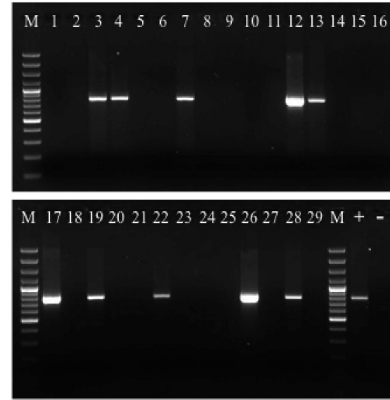


Figure 2. Example of gel electrophoresis representing the results for *F. verticillioides*-specific polymerase chain reaction using one DNA extraction of each sample. Each number in the row corresponds to the number of the sample from 1 to 29. The results showed positive amplification in the samples 3, 4, 7, 12, 13, 17, 19, 22, 26 and 28; therefore, *F. verticillioides* was detected in these samples. M, 100 bp marker; +, positive control of amplification performed with *F. verticillioides* pure DNA; -, negative control.

for *F. graminearum* in the specific PCR assay were also positive for the specific protocol for trichothecene producers. Nine of the 21 samples were contaminated with DON or both DON and NIV and were also positive for *F. graminearum* or *F. equiseti*, although the latter was present only in one sample.

Type A trichothecenes analysed (T2/HT2) were present in 3 of the 29 barley samples although at low levels. However, no contamination by *F. poae* and *F. sporotrichioides* was detected in these samples by using the specific PCR protocols.

Seven of the 11 samples in which ZEA was detected by high-performance LC were also positive for *F. graminearum*. Neither *F. culmorum* nor *F. equiseti* was detected in any of these barley samples contaminated with ZEA.

*F. verticillioides* was the only fumonisin-producing species detected (34% of the samples) (Figure 2), whereas *F. proliferatum* was not detected in any of the barley samples analysed (Table 2). In all samples contaminated with FB<sub>1</sub>/FB<sub>2</sub> (10), the presence of *F. verticillioides* was also demonstrated by the PCR-specific assay used.

## Discussion

This work is a comprehensive study on the occurrence of mycotoxin-producing *Fusarium* species in stored barley in Spain. The presence of these species was

related to mycotoxin contamination in the samples, being fumonisins (B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>), trichothecenes (DON, NIV and T2/HT2) and ZEA, the toxins evaluated by LC analysis. Furthermore, the sampling method used, according to current regulation (European Commission 2006a), ensured that the samples taken were representative.

To date, the only *Fusarium* toxins whose levels are regulated by the European Union in barley are DON and ZEA (European Commission 2006b). Both toxins were detected in a number of barley samples analysed in this survey (38% ZEA and 72% DON), but the levels measured by LC were below European limits in all cases. However, the co-occurrence of these toxins might involve synergic effects, enhancing the risk caused by both toxins considered separately when consumed by animals or humans (Placinta et al. 1999). In this work, the co-occurrence of both toxins was found in 34% of the samples; therefore, it might be necessary to confirm the possible effects of their synergic activity and to revise the regulation of their limits in barley if necessary.

Conventional counting techniques to detect *Fusarium* species indicated the presence of this genus in all the samples analysed although four of them were not contaminated with any of the mycotoxins analysed at detectable levels. This might be explained by the presence of other *Fusarium* species that often contaminate small cereal grains and that are not able to



produce the mycotoxins considered relevant so far (Bottalico and Perrone 2002). However, the relative quantification of contamination with *Fusarium* estimated by CFU values did not result in being informative of significant levels of mycotoxin contamination or of the occurrence of several mycotoxins. Therefore, the total CFU values of *Fusarium* species should not be considered as a reliable indicator of mycotoxin contamination. However, the species-specific PCR assays to detect mycotoxin-producing *Fusarium* species were demonstrated to be useful to predict mycotoxin risk in barley. In all cases, a strong correlation was found between the presence of certain *Fusarium* species and mycotoxin contamination in this matrix. Moreover, all the specific PCR assays gave consistent results in the three independent DNA extractions performed for each sample. These results indicated that the strategy described in this study was successful in detecting the occurrence of toxigenic *Fusarium* species even in dry seeds when conventional methods lose efficiency in recovering *Fusarium* isolates because of their reduced viability at this stage. Incubation of flour samples for 24 h was sufficient to obtain reliable results for the detection of the species tested. Longer incubation times, however, did not improve the results, particularly in the case of *F. graminearum*.

Several authors dispute the relevance of fumonisin contamination in small cereal grains, such as barley, and suggest that they are limited to maize (Bottalico and Perrone 2002; Soriano and Dragacci 2004). However, in this work, fumonisins were detected in 34% of the barley samples, with levels up to 300 µg/kg. This suggests that these mycotoxins might represent a risk in Spanish barley, and this is the first report on the presence of fumonisins in barley. More recent reports suggested that the high temperatures and drought recorded in relation with climate change scenarios could lead to an increasing occurrence of fumonisins in different products in Mediterranean countries (Miraglia et al. 2009). Our results indicated that *F. verticillioides* was the most important fumonisin-producing species in spring barley in Spain. This species has been reported to be the most common species in Southern Europe in maize, but few surveys are available concerning its presence in barley (Miraglia et al. 2009). However, *F. proliferatum* was not detected in any of the barley samples tested, which differed from the results obtained by Medina et al. (2006), who reported this species as one of the most important contaminants in Spanish malting barley varieties. However, in a more recently published survey, González-Jaén et al. (2008) reported that *F. verticillioides* is more frequently found than *F. proliferatum* in barley samples in Spain. These results suggest that a different distribution of the fungal species and a change in the occurrence of potential fumonisin-producing species in barley in

Spain might be happening. Other causes involved in this aspect could be barley variety or environmental conditions for crop year. In the latter years, Mediterranean countries have experienced a change towards drier conditions (Hoerling et al. 2012). According to several ecophysiological studies on *F. verticillioides* strains, these conditions might favour its distribution in relation to other common *Fusarium* species in cereals, including *F. graminearum* and *F. proliferatum*; in addition, water stress conditions positively influence fumonisin biosynthesis (Marín, Jurado, et al. 2010; Marín, Magan, et al. 2010). Therefore, the occurrence of both *F. verticillioides* and fumonisins might result from an increase in temperature and drought, possibly as a consequence of the climate change.

The specific PCR protocol used to detect trichothecene-producing species in this survey proved to be a good method to predict trichothecene contamination in barley. Seventeen of the 21 samples contaminated with these toxins were also positive for the presence of trichothecene producers.

The type A trichothecenes – T-2 and HT-2 – were the less frequently found toxins in barley (10% of positive contaminated samples at very low levels). Different surveys carried out in Northern Europe and the United Kingdom have reported higher levels of these type A trichothecenes in barley samples probably due to the different geographical distribution of producing species or the more appropriate conditions for T-2- and HT-2-producing species (Müller et al. 1997; Edwards 2009; Mankeviciene et al. 2011). T-2 and HT-2 toxins were found in three barley samples, but none of their main producing species was detected in any of them except *F. equiseti* (present in one of these three samples). Although *F. sporotrichioides* and *F. poae* have been reported as the main trichothecene producers for a long time, *F. langsethiae* is now considered the most important producer of type A trichothecenes in cereals, including barley, in Northern and Central Europe (Torp and Nierenberg 2004). However, only a few recent reports detected the presence of this species in small cereal grains in Mediterranean countries (Infantino et al. 2007). Additional studies will need to be performed at the preharvest stage to identify the source of these mycotoxins.

*F. graminearum* is considered the main DON producer that contaminates small cereal grains in warm climate areas, whereas *F. culmorum* is the most common species in cooler regions (Bottalico and Perrone 2002; Miraglia et al. 2009). The results obtained in this work support the importance of *F. graminearum* as the most frequent species producing type B trichothecene in barley in Spain. Several authors have demonstrated the high ability of *F. graminearum* isolates from barley to produce these

mycotoxins (Salas et al. 1999; Medina et al. 2006); therefore, the application of specific PCR protocols to detect *F. graminearum* could be a good tool to predict mycotoxin contamination in stored cereals in southern areas in Europe.

Several authors have pointed out that the presence of some important mycotoxigenic species in small cereal grains could indicate that the product is contaminated by certain toxins (Lindblad et al. 2004; Medina et al. 2006; Maenetje and Dutton 2007). In this work, we have found a very consistent correlation between *F. verticillioides* detection and fumonisins contamination as well as *F. graminearum* presence and ZEA, DON and NIV contamination in barley samples.

The approach used in this study provided information of mycotoxin contamination of barley together with the identification of the fungal species responsible for their production. Both aspects are of importance. Detection of the species with the current PCR assay strategy may be considered predictive of the potential mycotoxin risk in this matrix. Furthermore, given the uncertainty about environmental conditions due to climate change, monitoring fungal species might be necessary in the coming years to provide knowledge about the future evolution of toxigenic fungal population in different climatic areas and crops.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from FEDER, Spanish Government "Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)" (Projects AGL2007-66416-C05-01-02/ALI and AGL2010-22182-C04-01-03/ALI) and Generalitat Valenciana (Project ACOMP/2012/220). Jéssica Gil-Serna is supported by a research grant for young scientist awarded by the Institute DANONE, and Eva M. Mateo is grateful to MICINN for a research grant.

#### References

- Bennett JW, Klich M. 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16:497–516.
- Bluhm BH, Flaherty JE, Cousin MA, Woloshuk CP. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *J Food Protect.* 65: 1955–1961.
- Bottalico A, Perrone G. 2002. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol.* 108: 611–624.
- Cousin MA, Riley RT, James JP. 2005. Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology. In: Fratamico PM, Bhunia AK, Smith JL, editors. *Foodborne mycotoxins: chemistry, biology, ecology and? toxicology.* Wymondham: Caister Academic Press; p. 163–226.
- Creppy EE. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.* 127:19–28.
- Edwards SG. 2009. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional barley. *Food Addit Contam A.* 26:1185–1190.
- European Commission. 2006a. EC No 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off J Eur Union.* 70:12–34.
- European Commission. 2006b. EC No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off J Eur Union.* 364:5–24.
- European Commission. 2007. EC No 1126/2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Off J Eur Union.* 255:14–17.
- Foroud NA, Eudes F. 2009. Trichothecenes in cereal grains. *Int J Mol Sci.* 10:147–173.
- Gil-Serna J, González-Salgado A, González-Jaén MT, Vázquez C, Patiño B. 2009. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and green coffee beans by real-time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol.* 131:162–167.
- González-Jaén MT, Marín P, González-Salgado A, Vázquez C, Aparicio N, Patiño B, Fernández-Hevia C, Esteban-Torres M. 2008. Detección de especies fúngicas productoras de toxinas en cereales españoles. Utilidad de los métodos basados en el ADN para predecir el riesgo de micotoxinas en cereales. *Innovación y Tecnología Agroalimentaria.* 3:36–43.
- González-Pereyra ML, Rosa CAR, Dalcero AM, Cavaglieri LR. 2011. Mycobiota and mycotoxins in malted barley and brewer's spent grain from Argentinean breweries. *Lett Appl Microbiol.* 53:649–655.
- Hinojo MJ, Medina A, Valle-Algarra FM, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M, Mateo R. 2006. Fumonisin production in rice cultures of *Fusarium verticillioides* under different incubation conditions using an optimized analytical method. *Food Microbiol.* 23:119–127.
- Hoerling M, Eischeid J, Perwitz J, Quan XW, Zhang T, Pegion P. 2012. On the increased frequency of Mediterranean drought. *J Climate.* 25:2146–2161.
- Infantino A, Pucci N, Conca G, Santori A. 2007. First report of *Fusarium langsethiae* on durum wheat kernels in Italy. *Plant Dis.* 91:1362.
- Jurado M, Vázquez C, Marín S, Sanchis V, González-Jaén MT. 2006. PCR based strategy to detect contamination with mycotoxigenic *Fusarium* species in maize. *Syst Appl Microbiol.* 29:681–689.
- Jurado M, Vázquez C, Patiño B, González-Jaén MT. 2005. PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. *Syst Appl Microbiol.* 28:562–568.
- Liddell CM. 2003. *Fusarium* head blight of wheat and barley. In: Leonard KJ, Bushnell WR, editors. *Systematics of Fusarium? species and allies associated with Fusarium head blight.* Saint Paul: APS Press; p. 35–43.
- Lindblad M, Johnsson P, Jonsson N, Lindqvist R, Olsen M. 2004. Predicting noncompliant levels of ochratoxin A in

- cereal grain from *Penicillium verrucosum* counts. J Appl Microbiol. 97:609–616.
- Llorens A, Mateo R, Mateo JJ, Jiménez M. 2002. Comparison of extraction and cleanup procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. Food Addit Contam. 19:272–281.
- Maenetje PW, Dutton MF. 2007. The incidence of fungi and mycotoxins in South African barley and barley products. J Environ Sci Health. 42:229–236.
- Magan N. 2006. Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. Mycopathologia. 162:245–253.
- Mankeviciene A, Butkutė B, Gaurilickienė I, Dabkevicius Z. 2011. Risk assessment of *Fusarium* mycotoxins in Lithuanian small cereal grains. Food Control. 22:970–976.
- Manova R, Mladenova R. 2009. Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. Food Control. 20:362–365.
- Marín P, Jurado M, Magan N, Vázquez C, González-Jaén MT. 2010. Effect of solute stress and temperature on growth rate and TRI5 gene expression using real time RT-PCR in *Fusarium graminearum* from Spanish wheat. Int J Food Microbiol. 140:169–174.
- Marín P, Magan N, Vázquez C, González-Jaén MT. 2010. Differential effect of environmental conditions on growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *F. verticillioides* and *F. proliferatum*. FEMS Microbiol Ecol. 73:303–310.
- MARM (Spanish Ministry of Rural, Marine and Natural Environment). 2010. Anuario de estadística 2010 [Internet]; [cited 2012 Nov 6]. Available from: [http://www.marm.es/estadistica/pags/anuario/2010/AE\\_2010\\_A\\_vance.pdf](http://www.marm.es/estadistica/pags/anuario/2010/AE_2010_A_vance.pdf)
- Medina A, Valle-Algarra FM, Mateo R, Gimeno-Adelantado JV, Mateo F, Jiménez M. 2006. Survey of the Mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. Int J Food Microbiol. 108:196–203.
- Miller JD. 2002. Mycotoxins and food safety. In: DeVries JW, Trucksess MW, Jackson LS, editors. Aspects of the ecology of *Fusarium* toxins in cereals. Washington: Kluwer Academic; p. 19–28.
- Miraglia M, Marvin HJP, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Cubadda F, Croci L, De Santis B, Dekkers S, Filippi L, et al. 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. Food Chem Toxicol. 47:1009–1021.
- Moss MO, Thrane U. 2004. *Fusarium* taxonomy with relation to trichothecene formation. Toxicol Lett. 153:23–28.
- Mulè G, Susca A, Stea G, Moretti A. 2004. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. Eur J Plant Pathol. 110:495–502.
- Müller HM, Reimann J, Schumacher U, Schwadorf K. 1997. Natural occurrence of *Fusarium* toxins in barley harvested during five years in an area of southwest Germany. Mycopathologia. 137:185–192.
- Niessen L. 2008. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin-producing fungi. Adv Food Nutr Res. 54:81–138.
- Patiño B, Mirete S, González-Jaén MT, Mulè G, Rodríguez MT, Vázquez C. 2004. PCR detection assay of fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* strains. J Food Protect. 67:1278–1283.
- Placinta CM, D’Mello JPF, Macdonald AMC. 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Anim Feed Sci Tech. 78:21–37.
- Salas B, Steffenson BJ, Casper HH, Tacke B, Prom LK, Fetch TG, Schwarz PB. 1999. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins. Plant Dis. 83:667–674.
- Soriano JM, Dragacci S. 2004. Occurrence of fumonisins in foods. Food Res Int. 37:985–1000.
- Thrane U, Adler A, Clasen PE, Galvano F, Langseth W, Lew H, Logrieco A, Nielsen KF, Ritiien A. 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. Int J Food Microbiol. 95:257–266.
- Torp M, Nierenberg HI. 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. Int J Food Microbiol. 95:247–256.
- Valle-Algarra FM, Mateo EM, Medina A, Mateo F, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M. 2009. Changes in ochratoxin A and type B trichothecenes contained in wheat flour during dough fermentation and bread-baking. Food Addit Contam A. 26:896–906.
- Visconti A, Pascale M. 1998. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J Chromatogr A. 815:133–140.
- Zain ME. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. J Saudi Chem Soc. 15:129–144.
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food Chem Toxicol. 45:1–18.



## Artículo 3

---

**Mateo, Eva M.**, Valle-Algarra, F. M., Mateo-Castro, R., Jiménez, M. Impact of non-selective fungicides on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* in barley-based medium. *Food Additives and Contaminants, part A*, 28: 86-97. 2011.



## Impact of non-selective fungicides on the growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *A. carbonarius* in barley-based medium

Eva M. Mateo, F.M. Valle-Algarra, R. Mateo-Castro and M. Jiménez\*

Dep. de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain

(Received 8 July 2010; final version received 26 September 2010)

The aim of this study was to assess the influence of the non-selective fungicides mancozeb, copper oxychloride, and sulfur on the growth and capability for producing ochratoxin A (OTA) of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus* in barley-based medium. Lag phases and growth rates were determined for each fungicide at different doses, at 15°C and 25°C and at 0.97  $a_{90}$ . Mancozeb at 40 mg l<sup>-1</sup> inhibited fungal growth and provided lag phases >24 days at 10–20 mg l<sup>-1</sup> and 15°C. OTA was observed only at 25°C and doses <10 mg l<sup>-1</sup>. At 15°C, copper oxychloride proved inhibitory at 800 mg l<sup>-1</sup>, while at 25°C growth was not delayed and only high doses decreased OTA levels. Sulfur was inhibitory or provided large lag phases at 5–8 g l<sup>-1</sup> (at 15°C) while at 25°C growth took place even at 8 g l<sup>-1</sup>, although OTA levels were low or undetectable. The antifungal activity decreased in the order mancozeb > copper oxychloride > sulfur, and was lower at 25°C than at 15°C. OTA accumulation was affected by the type of fungicide, dose, temperature and time. The efficacy of these fungicides on the growth of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* and OTA production in barley-based medium is assessed for the first time.

**Keywords:** mycology; microbiology; high-performance liquid chromatography (HPLC); mycotoxins; ochratoxin A; cereals

### Introduction

Barley (*Hordeum vulgare*) constitutes a very nutritious cereal which contains carbohydrates, protein, vitamins and minerals. It represents a good source of fibre and it is known for its significant properties to reduce high blood cholesterol. This cereal is one of the first solid foods given to babies, is a common ingredient used in animal feed and is a key ingredient in the production of beer, whisky and other drinks. There are various types of barley (whole barley, hulled barley, pearled barley as well as barley flakes). Barley flour is good for making unleavened bread, *chapati*, and *pitta* bread. According to the United Nations Food and Agriculture Organization, barley is the fourth largest cultivated cereal crop in the world after wheat, rice and corn. In the 2007/2008 crop the world total production of barley was 133 million Tm and the top producers of barley crops were Russia, Spain, Canada, Germany and France (US Department of Agriculture (USDA) 2009). Barley is the most relevant cereal crop in Spain.

Barley can be contaminated by a wide range of fungi (Andersen et al. 1996; Ackermann 1998; Noots et al. 1998; Gareis 1999). Some of these fungi produce severe grain spoilage but are also capable of producing mycotoxins, which can occur during pre-harvest, harvest/drying and storage, and are determined by

intrinsic nutritional, extrinsic, processing and implicit microbial factors (Sinha 1995; Magan and Aldred 2007). In pre-harvest, control of these factors is complicated because it depends on the weather conditions of crop areas. Spain has a warm climate and barley takes a shorter time to grow and ripen than any other crop, so barley is grown during two seasons, winter and spring, having average temperatures of about 15–25°C, respectively, and a high relative humidity.

The mycobiota contaminating barley grown in Spain has been reported (Mateo et al. 2004; Medina et al. 2006), and *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. were the most important toxigenic fungi isolated.

Ochratoxin A (OTA) is one of the mycotoxins of concern. It is produced by some species of *Penicillium*, such as *P. verrucosum* (Pitt 1987) and *P. nordicum* (Larsen et al. 2001), but also by two *Aspergillus* sections: *Circumdati* (the *Aspergillus ochraceus* group) and *Nigri* (*Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* aggregate) (Varga et al. 1996; Heenan et al. 1998; Medina et al. 2005a). In Spain, *A. ochraceus* and *A. carbonarius* are the most frequently isolated ochratoxigenic species in barley (Medina et al. 2006). However, the latter has been very scarcely described as a species contaminating cereals. OTA is a potent

\*Corresponding author. Email: misericordia.jimenez@uv.es

neurotoxin also known to be teratogenic, immunosuppressive and carcinogenic. It has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC 1993) as a possible human carcinogen (group 2B). OTA has been detected in barley, malting barley (Gareis 1999; Trucksess et al. 1999) and by-products such as beer (Scott and Kanhere 1995; Legarda and Burdaspal 1998; Nakajima et al. 1999; Medina et al. 2005b).

Aldred et al. (2004) and Magan and Aldred (2007) examined some important mycotoxins and the post-harvest control strategies that have been developed for effective management to minimise entry of mycotoxins into the food chain. In some cases, pre-harvest decisions can significantly impact the capability for subsequent post-harvest control. Prevention of the growth of mycotoxin-producing fungi is the most effective strategy for controlling the presence of mycotoxins in foods and feed. This could be achieved by knowing the critical limits of different eco-physiological factors affecting fungal infection and mycotoxin synthesis. Moisture, temperature, the type of substrate and some other factors play a major role in the development of OTA-producing fungal isolates and in mycotoxin production (Bellí et al. 2004; Romero et al. 2007; Astoreca et al. 2009a, 2009b; Kapetanakou et al. 2009). Culture nutrients affect OTA production by *Aspergillus* spp. (Medina et al. 2008) and OTA biosynthetic genes in *A. ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli (O'Callaghan et al. 2006). In many cases, usually during pre-harvest, the use of fungicides is the only efficient, cost-effective and often successful way to prevent mould growth (Munimbazi et al. 1997) thus being an attractive strategy to prevent mycotoxin production (FAO/WHO/UNEP 1999). However, fungicides must be applied carefully since some of them, such as carbendazim, can reduce fungal growth but can also stimulate OTA production (Medina et al. 2007b).

Mancozeb (manganese ethylenebis(dithiocarbamate) (polymeric) complex with zinc salt) is a broad range contact non-selective fungicide used to protect many fruit, vegetable, nut and field crops against many fungal diseases. It is also used for seed treatment of cotton, potatoes, peanuts, and, especially, cereal grains (Extension Toxicology Network (EXTOXNET) 1996). It is one of the most used pesticides around the world. Its wide use in agriculture is due to the reported scarce persistence in the environment (Wauchope et al. 1992; Maroni et al. 2000) and low acute toxicity. It is practically non-toxic via the oral route (Edwards et al. 1991) although some adverse effects have been found in mesencephalic cells (Domico et al. 2007). One of its degradation products, ethylenethiourea (ETU), exerts toxic effects in exposed animals (Houeto et al. 1996). The European Commission has set the maximum residue level (MRL) of whole dithiocarbamates in barley to  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  (expressed as  $\text{CS}_2$ )

(European Commission 2009; European Union Pesticides database 2010).

Copper oxychloride and sulfur are classical non-systemic fungicides, widely used, especially in ecological agriculture. The former is used to treat cereals to get better crops in copper-deficient soils (Brennan 1990) and to control a wide range of diseases on many crops. Sulfur is a contact and protectant fungicide used for control of oidium in cereals, brown rot of peaches, powdery mildew of apples, grapes, strawberries, etc. It is toxic to fish but it is non-toxic to birds and bees and has not been proved to be mutagenic (EXTOXNET 1996). These fungicides as well as mancozeb are not considered to be at risk from resistance. According to European regulations, the MRL of all copper fungicides in cereals is  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  (expressed in copper) while no MRL is required for sulfur (European Union Pesticides database 2010).

Chemical fungicides are widely used to prevent the development of spoilage fungi and mycotoxin production in crops. Thorough studies to know the activity of each fungicide in each crop are necessary, especially for mycotoxin-producing fungi. Studies with some fungicides in grape-like medium (Bellí et al. 2006), dehydrating grapes (Valero et al. 2007), grape berries (Favilla et al. 2008), grape medium (Medina et al. 2007b) or peanut meal extract agar (Barberis et al. 2009) have been performed. Nevertheless, up to date, there are not data on the resistance of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* to mancozeb, copper oxychloride and sulfur in barley or barley-based medium. Moreover, the effect of these fungicides on OTA production by these species on this medium has not been studied.

The aim of this study was to evaluate the effect of mancozeb, copper oxychloride and sulfur on (1) the lag phase to growth, (2) growth rates and (3) ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus* cultured in a barley-based medium.

## Materials and methods

### Fungal isolates

An isolate of each *A. carbonarius* (ref. Ac51) and *A. ochraceus* (ref. Ao23) from malting barley grown in Spain and capable of producing OTA (Medina et al. 2006) were chosen for the study. Stock cultures exist in the fungal collection of the 'Mycology and Mycotoxins' group (Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia, Spain).

### Fungicide formulations

The formulation of mancozeb used was Mancofit (80% active ingredient (a.i), wettable powder (WP)) (Agrofit, Valencia, Spain). It was diluted in water to prepare a stock emulsion containing  $1 \text{ g mancozeb l}^{-1}$ .



The recommended dose is 2.0–3.5 g a.i. l<sup>-1</sup> (3–4 kg ha<sup>-1</sup> on cereal crops).

The formulation of copper oxychloride [Cu<sub>2</sub>Cl(OH)<sub>3</sub>] used was Cuprosan 500 (50% a.i. WP) (Bayer CropScience, S.L., Paterna, Valencia, Spain). It was diluted in water to prepare a stock suspension of 10 g l<sup>-1</sup>. The recommended dose is 2.5 g a.i. l<sup>-1</sup>.

The formulation of sulfur was Quimur (80% a.i. wettable granules (WG)) (Sarabia S.A., Lleida, Spain). The recommended dose is 2.5–7.5 g l<sup>-1</sup> depending on the crop. A stock suspension of 200 g l<sup>-1</sup> in water was prepared. Sulfur is insoluble in water so that continuous shaking is needed during aliquot withdrawal from the containing beaker.

### Culture medium

The culture medium used, barley-meal extract agar (BMEA), was prepared as follows: 30 g of dry ground barley was boiled in 1 L of deionised water for 30 min. The resulting mixture was filtered through a double layer of muslin and the volume was made up to 1 L. The pH of the mixture was 6.5. A level of 0.97 was chosen for water activity (*a<sub>w</sub>*) to carry out the experiments. This value is between 0.96 and 0.98, which favour growth of *A. ochraceus* (Ramos et al. 1998) and *A. carbonarius* (Medina et al. 2007a, 2007b). Glycerol (120 g) was added to provide 0.97 *a<sub>w</sub>* in the medium (after addition of 20 g of agar to 1 L of suspension). Once the agar was added, the medium was autoclaved (115°C, 30 min).

The appropriate volume of each fungicide stock emulsion/suspension was added at around 45°C to a series of flasks to obtain the desired concentrations: 1, 3, 5, 10, 20, 30 and 40 mg l<sup>-1</sup> for mancozeb; 5, 10, 30, 50, 100, 300, 500, 700 and 800 mg l<sup>-1</sup> for copper oxychloride; and 10, 20, 1000, 3000, 5000 and 8000 mg l<sup>-1</sup> for sulfur. All concentrations are referred to the a.i. Flasks were vigorously shaken and poured into Petri dishes (20 ml per dish). Controls having no fungicide added were also prepared. The *a<sub>w</sub>*-value was checked after sterilisation using non-inoculated Petri dishes and a Novasina RTD 502 equipment (Novasina GmbH, Pfäffikon, Switzerland).

### Inoculum preparation

The isolates of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* were grown on BMEA for 7 days at 25°C. Spores were then suspended in sterile distilled water containing Tween 80 (0.005%). From this suspension of spores, another one containing 1 × 10<sup>6</sup> spores ml<sup>-1</sup> was prepared in water modified with glycerol to provide 0.97 *a<sub>w</sub>* for the spore suspension and 3 µl of this one was inoculated at the centre of Petri dishes (previously prepared) under sterile conditions. Incubation was performed at 15°C

and 25°C in closed chambers where there were beakers containing glycerol–water solutions of the same *a<sub>w</sub>* (Llorens et al. 2004). Cultures were checked for *a<sub>w</sub>* at the end of the incubation period. BMEA and incubation conditions were considered suitable for the experiment because of various reasons: the source of the isolates (barley), the mean temperatures recorded in Spanish crop areas (25°C and 15°C during spring and winter crops, respectively), and previous studies on the growth of *A. ochraceus* in fungicide-free barley medium.

### Growth monitoring

Mycelial extension rates were measured over time. Lag phase was considered as the time (days) to reach a colony five mm diameter (Belli et al. 2004; Medina et al. 2007a; Samapundo et al. 2007; Astoreca et al. 2009a, 2009b). For each treatment, 15 plates were prepared and two right-angled diameters of the colonies were randomly chosen and measured every day until the colony filled the dish or the cultures were used for OTA determination. The sum of two diameters was divided by four to calculate the mean radius. These measurements were then averaged over the number of measured dishes. The slope of the line obtained by linear regression of colony radius against time (days elapsed from the lag time) was used to determine growth rates (mm day<sup>-1</sup>).

### Ochratoxin A determination

Calibration solutions containing OTA standard (2–1000 ng ml<sup>-1</sup>) were used to obtain a calibration line by linear regression after injecting 100 µl into the liquid chromatography (LC) system. These solutions were obtained by dissolution of the standard (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain) in chloroform and further dilution in dimethylsulfoxide (DMSO)/water (60:40, v/v).

Recovery studies were performed by adding variable amounts of OTA standard, dissolved in chloroform, at 45°C to Erlenmeyer flasks containing 20 g of autoclaved (115°C, 30 min) BMEA. The concentration range for recovery studies was 5–300 ng g<sup>-1</sup>. After homogenisation, the medium was poured in a Petri dish and let to cool at room temperature. A total of 20 g of solid medium were cut into small pieces and homogenised in a stomacher. A fraction of about 1.5 g of the homogenate was taken and extracted with 5 ml of methanol for 1 h using a rotating plate stirrer (model F-205, FALC Instruments S.R.L., Treviglio, Italy) (Bragulat et al. 2001). A total of 4 ml of extract were filtered through filter paper (Whatman No. 4) containing 5–10 g of Celite 545 (Sigma-Aldrich). The filtrate was dried under an N<sub>2</sub> stream and redissolved

in 0.50 ml of DMSO/water (60:40, v/v). Finally, 100  $\mu$ l of solution were injected into the LC system.

For OTA determination, 20 g of culture (substrate plus fungal biomass) was cut into small pieces, homogenised in a stomacher, extracted with methanol (50 ml) and analysed using the procedure indicated for recovery studies. Once the colony diameter reached 5 mm, the OTA level in the cultures was determined. Samples were taken on days 5, 10, 15 and 20 when incubation temperature was 25°C and on days 20, 30, 40 and 60 when incubation temperature was 15°C because previous experiments had shown that growth was favoured at 25°C. This protocol was performed each time with three dishes from the same treatment. As there were 15 replicates per treatment, the remaining three ones were carried out for safety.

The LC system was a Waters 600E system controller, a Millipore Waters 717 plus autosampler and a Waters 470 scanning fluorescence detector (Waters, Milford, MA, USA). Excitation and emission wavelengths were 330 and 460 nm, respectively. The samples were separated using a C18 Phenomenex Gemini® column (150  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m particle size) (Phenomenex, Macclesfield, UK), with a guard column of the same material. Run time for samples was 20 min with OTA being detected at about 12 min. The flow rate of the mobile phase (acetonitrile/water/acetic acid, 44:55:1, v/v/v) was 1 ml min<sup>-1</sup>. Measurements were processed using the Millennium® 4.0 software (Waters).

The limit of detection was 0.5 ng OTA g<sup>-1</sup> culture, based on a signal-to-noise ratio of 3:1. The average recovery rate for OTA from the agar-based medium was 89%.

### Statistical analysis

Multifactor ANOVA and *post-hoc* analysis were performed using Statgraphics Centurion XV version 15.1.02 (StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA). Logarithmic transformation of data according to Barberis et al. (2009) was performed before statistical treatment to increase variance homogeneity. *Post-hoc* analyses were performed using the Tukey-honestly significant differences (Tukey-HSD) test, except for variables with two distinct values (temperature) or categories (fungi). For statistical purposes undetectable/unquantifiable levels were considered as zero. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### Mancozeb

#### Lag phases

The lag-times observed in BMEA cultures supplemented with mancozeb are shown in Figure 1A.

Lag phases were always longer at 15°C than at 25°C under all the assayed conditions and usually increased with mancozeb dose. A dose of 30 mg l<sup>-1</sup> prevented fungal growth except in the case of *A. ochraceus* at 25°C but growth was always inhibited at 40 mg l<sup>-1</sup>. At 25°C, the lag-times for the cultures of *A. ochraceus* supplemented with mancozeb were about 3 days at 1–10 mg l<sup>-1</sup>, about 6 days at 20 mg l<sup>-1</sup> and about 9 days at 30 mg l<sup>-1</sup>; however, at 15°C, lag phases lasted 25–40 days at 10–20 mg l<sup>-1</sup> (Figure 1A). The lag phase of *A. carbonarius* also increased with mancozeb dose but they were higher than lag phases observed in *A. ochraceus* cultures under the same conditions.

Multifactor ANOVA showed that lag-times were significantly affected ( $p < 0.05$ ) by the factors fungi, temperature and dose, and their mutual interactions. Lag phases that were significantly different from others with regard to mancozeb dose were clustered in different groups by Tukey-HSD test ( $p < 0.05$ ). In this case, seven groups were found (one for each dose including the control).

#### Growth rates

Growth rates were higher at 25°C than at 15°C (Figure 1B), and higher for *A. ochraceus* than for *A. carbonarius* under the same conditions. For both isolates, growth rates at 25°C and 15°C in cultures containing doses <10 mg l<sup>-1</sup> were roughly similar to those observed in controls but they decreased at a dose of 20 mg l<sup>-1</sup>.

Multifactor ANOVA showed that the factors fungi, dose and temperature, and their interactions (except fungal species  $\times$  temperature) significantly affected growth rate ( $p < 0.05$ ). Tukey-HSD test gave rise to four groups with regard to the influence of the dose on the growth rate (control, 1–10, 20 and 30 mg l<sup>-1</sup>). Growth rates were set to zero for calculation purposes when no growth was apparent.

#### OTA levels

OTA levels in cultures carried out at 25°C are shown in Table 1. At 25°C, OTA was detected on day five in all cultures of *A. ochraceus*, except at 40 mg l<sup>-1</sup>, and toxin levels usually increased with time. The maximum OTA level (410 ng g<sup>-1</sup>) was higher than the level found in the control on the same day. However, at 25°C, OTA was hardly detected in cultures of *A. carbonarius* on days 5–10 (Table 1). The isolate of *A. carbonarius* produced less OTA in controls than the isolate of *A. ochraceus* under the same conditions. Mean OTA levels in mancozeb-containing cultures of *A. carbonarius* were <72 ng g<sup>-1</sup> except at 5 mg l<sup>-1</sup>.

At 15°C, OTA was found in controls but not in mancozeb-containing cultures (Table 2). Temperature,

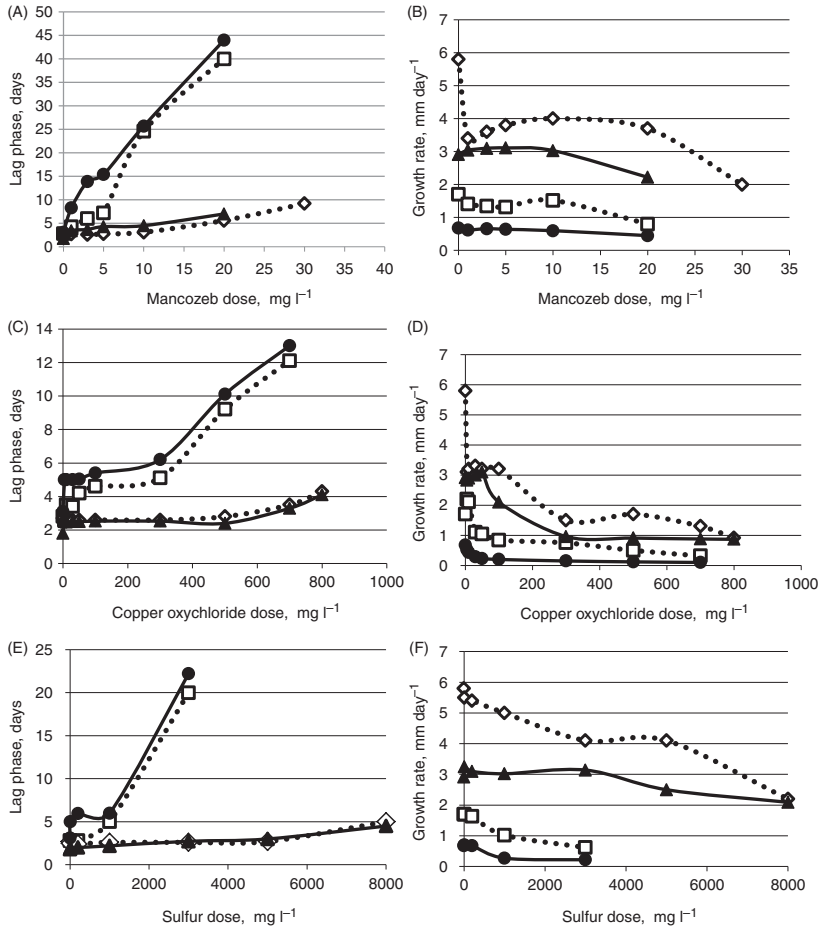


Figure 1. Effect of three fungicides on lag phase and radial growth rate of isolates of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* cultured on BMEA at 0.97 a<sub>v</sub>. Mancozeb (A, B); copper oxychloride (C, D); and sulfur (E, F). Line key: *A. ochraceus*: dotted line with white squares (15°C) or white rhombi (25°C); *A. carbonarius*: solid line with black circles (15°C) or black triangles (25°C).

dose and time significantly influenced OTA production in cultures of both fungi ( $p < 0.05$ ).

Regarding the effect of dose at 25°C the Tukey-HSD test found three homogeneous but highly overlapped groups for *A. ochraceus* (low, medium and high doses) and four homogeneous groups for *A. carbonarius*. As regards the influence of time only two groups were found by the same test for *A. ochraceus* (day five and the remaining days). However, comparisons are biased because time was cross-related with temperature.

### Copper oxychloride

#### Lag phases

Figure 1C shows that at 25°C lag-times for *A. ochraceus* and *A. carbonarius* were practically unaffected (roughly 2.5 days) by copper oxychloride added up to 500 mg l<sup>-1</sup>. At 15°C, however, this fungicide increased lag-times at doses > 10 mg l<sup>-1</sup>. At 15°C, lag phases lasted about 5 days at low doses and increased up to 12–13 days at 700 mg l<sup>-1</sup> but any isolate was able to grow at 800 mg l<sup>-1</sup>. The lag phases significantly

Table 1. Mean concentration  $\pm$  standard deviation of OTA ( $\text{ng g}^{-1}$ ) ( $n=3$ ) found in cultures of isolates of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* carried out at 25°C and 0.97  $a_w$  on BMEA treated with three fungicides.

Fungal species	Fungicide	Dose ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Incubation time (days)				
			5	10	15	20	
<i>A. ochraceus</i>	Control <sup>a</sup>		101 $\pm$ 22	270 $\pm$ 30	320 $\pm$ 30	350 $\pm$ 20	
	Mancozeb	1	98 $\pm$ 25	235 $\pm$ 24	295 $\pm$ 40	340 $\pm$ 30	
		3	100 $\pm$ 26	260 $\pm$ 30	340 $\pm$ 30	320 $\pm$ 20	
		5	130 $\pm$ 29	340 $\pm$ 40	410 $\pm$ 40	340 $\pm$ 22	
		10	105 $\pm$ 24	250 $\pm$ 30	312 $\pm$ 26	360 $\pm$ 30	
		20	–	12 $\pm$ 6	54 $\pm$ 18	153 $\pm$ 22	
		30	–	n.d.	15 $\pm$ 5	46 $\pm$ 13	
		Copper oxychloride	5	89 $\pm$ 15	241 $\pm$ 23	300 $\pm$ 30	310 $\pm$ 25
			10	99 $\pm$ 20	300 $\pm$ 22	340 $\pm$ 23	345 $\pm$ 22
			30	210 $\pm$ 29	400 $\pm$ 25	550 $\pm$ 30	544 $\pm$ 25
			50	82 $\pm$ 15	195 $\pm$ 30	230 $\pm$ 30	233 $\pm$ 25
			100	122 $\pm$ 10	280 $\pm$ 30	372 $\pm$ 23	368 $\pm$ 30
			300	2.2 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 1.9	8.0 $\pm$ 1.7	10 $\pm$ 4
	Sulfur	500	n.d.	3.4 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 2.8	12 $\pm$ 5	
		700	n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	
		800	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		3000	n.d.	500 $\pm$ 30	1100 $\pm$ 40	600 $\pm$ 30	
		5000	n.d.	2.0 $\pm$ 1.4	11 $\pm$ 5	13 $\pm$ 6	
		8000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		<i>A. carbonarius</i>	Control <sup>a</sup>		20 $\pm$ 6	39 $\pm$ 15	64 $\pm$ 24
Mancozeb			1	n.d.	2.1 $\pm$ 1.6	24 $\pm$ 5	30 $\pm$ 10
	3		n.d.	n.d.	n.q.	71 $\pm$ 12	
	5		n.d.	n.d.	3.9 $\pm$ 1.0	300 $\pm$ 20	
	10		n.d.	n.d.	10 $\pm$ 4	24 $\pm$ 8	
	20		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	30		–	–	–	–	
Copper oxychloride	5		3.1 $\pm$ 1.4	6.2 $\pm$ 2.1	38 $\pm$ 8	42 $\pm$ 10	
	10		n.d.	3.2 $\pm$ 1.1	15 $\pm$ 3	9 $\pm$ 3	
	30		n.d.	n.d.	n.q.	n.q.	
	50		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	100		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	300		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	500		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	700		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	800		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	Sulfur		10	n.d.	n.d.	70 $\pm$ 17	53 $\pm$ 12
			200	n.d.	1.8 $\pm$ 0.9	21 $\pm$ 9	30 $\pm$ 7
1000			n.q.	1.5 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 1.6	4.0 $\pm$ 1.9	
3000			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5000			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8000			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

Notes: <sup>a</sup>No fungicide was added.n.d., Not detected; n.q., detected but not quantified ( $<1.5 \text{ ng g}^{-1}$ ).

differed regarding the influence of temperature, fungi, fungicide dose and their interactions. With regard to dose, Tukey-HSD test found eight homogeneous groups with overlapping between the closest means.

#### Growth rates

Growth rates were higher at 25°C than at 15°C (Figure 1D). For *A. ochraceus*, growth rates at 25°C

were roughly 3 mm day<sup>-1</sup> at doses  $<100 \text{ mg l}^{-1}$ , but decreased by 50% at higher doses, which seem to hinder mycelial extension.

For *A. carbonarius*, growth rates at 25°C decreased by 33% in the 300–800  $\text{mg l}^{-1}$  range. At 15°C, growth rates also decreased with increasing doses but changes were smoother than at 25°C. There were significant differences ( $p < 0.05$ ) among growth rates in cultures containing copper oxychloride with regard to the

Table 2. Mean concentration  $\pm$  standard deviation of OTA ( $\text{ng g}^{-1}$ ) ( $n=3$ ) found in cultures of isolates of *A. ochraceus* and *A. carbonarius* carried out at 15°C and 0.97  $a_w$  on BMEA treated with three fungicides.

Fungal species	Fungicide	Dose ( $\text{mg l}^{-1}$ )	Incubation time (days)				
			20	30	40	60	
<i>A. ochraceus</i>	Control <sup>a</sup>		n.d.				
		Mancozeb	1	n.d.	2.1 $\pm$ 1.1	10 $\pm$ 5	14 $\pm$ 6
	Copper oxychloride	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		20	–	–	n.d.	n.d.	
		5	n.d.	n.d.	n.q.	2.4 $\pm$ 1.9	
		10	18 $\pm$ 10	42 $\pm$ 15	59 $\pm$ 21	46 $\pm$ 12	
		30	n.d.	n.d.	10 $\pm$ 4	5 $\pm$ 3	
		50	n.d.	14 $\pm$ 4	18 $\pm$ 5	11 $\pm$ 3	
		100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		Sulfur	10	n.d.	n.q.	7 $\pm$ 4	13 $\pm$ 5
			200	n.d.	100 $\pm$ 22	122 $\pm$ 24	100 $\pm$ 25
			1000	n.d.	n.q.	14 $\pm$ 3	400 $\pm$ 40
			3000	–	n.d.	2.0 $\pm$ 1.1	78 $\pm$ 19
<i>A. carbonarius</i>	Control <sup>a</sup>		n.d.	n.d.	n.q.	3.2 $\pm$ 1.5	
		Mancozeb	1	n.d.	n.d.	n.d.	
	Copper oxychloride	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		20	–	–	–	n.d.	
		5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		30	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		700	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		Sulfur	800	–	–	–	–
			10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
			3000	–	n.d.	n.d.	n.d.
5000	–	–	–	–			
8000	–	–	–	–			

Notes: <sup>a</sup>No fungicide was added.n.d., Not detected; n.q., detected but not quantified ( $<1.5 \text{ ng g}^{-1}$ ).

fungi, temperature, dose and their interactions. Using Tukey-HSD test seven groups appear as regard the dose.

#### OTA levels

As Table 1 shows, at 25°C, the highest OTA level was found in cultures of *A. ochraceus* containing 30 mg fungicide  $\text{l}^{-1}$ . Low toxin levels were found in the 300–500  $\text{mg l}^{-1}$  range and OTA was practically undetectable above 500  $\text{mg l}^{-1}$ . At 25°C, OTA accumulation was negligible in all *A. carbonarius* cultures containing copper oxychloride. At 15°C, OTA maximum level was found in cultures of *A. ochraceus* at a dose of 10  $\text{mg l}^{-1}$

while the mycotoxin was undetectable in cultures of this isolate at 100–700  $\text{mg l}^{-1}$  (Table 2). At 15°C, OTA was undetectable in copper-containing cultures of *A. carbonarius* (Table 2).

Using this fungicide, the factors temperature, dose and fungi significantly influenced accumulation of OTA in cultures of both fungi ( $p < 0.05$ ).

#### Sulfur

##### Lag phases

Sulfur also increased the lag phase more at 15°C than at 25°C (Figure 1E). At 25°C, sulfur had no ability to

significantly delay fungal development up to a dose of  $8 \text{ g l}^{-1}$ . At  $15^\circ\text{C}$ , a dose of  $3 \text{ g l}^{-1}$  resulted in lag phases of about 21 days for both isolates, which were much longer than lag phases attained at doses  $\leq 1 \text{ g l}^{-1}$ , while  $5 \text{ g l}^{-1}$  prevented fungal growth. Temperature, dose and cross interactions, but not the fungi, significantly influenced the lag-times. Tukey-HSD test found six homogeneous groups concerning dose ( $p < 0.05$ ).

#### Growth rates

Growth rates were higher at  $25^\circ\text{C}$  than at  $15^\circ\text{C}$  at the same dose (Figure 1F). At  $25^\circ\text{C}$ , the growth rate of *A. ochraceus* at  $8 \text{ g l}^{-1}$  was lower than rates observed at  $3\text{--}5 \text{ g l}^{-1}$ . At this temperature, in the case of *A. carbonarius*, there were not significant differences concerning growth rate between controls and cultures at  $3 \text{ g l}^{-1}$ . At  $15^\circ\text{C}$ , however, growth rates decreased by 25%. The ANOVA revealed that temperature, fungi and dose and their interactions, except the interaction fungi  $\times$  temperature, were significant ( $p < 0.05$ ). Tukey-HSD test found six homogeneous groups related to sulfur dose ( $p < 0.05$ ).

#### OTA levels

At  $25^\circ\text{C}$ , OTA was not detectable in cultures of *A. ochraceus* at  $< 1 \text{ g l}^{-1}$  or at  $8 \text{ g l}^{-1}$  (Table 1). However, OTA accumulation was high at  $3 \text{ g l}^{-1}$ . At  $15^\circ\text{C}$ , OTA levels were significantly higher than those found in controls in cultures containing  $0.2\text{--}3 \text{ g sulfur l}^{-1}$  (Table 2).

At  $25^\circ\text{C}$  OTA level in cultures of *A. carbonarius* was low at intermediate/high sulfur doses. The highest toxin level was found in control and at the dose of  $10 \text{ mg l}^{-1}$  (Table 1) while at  $15^\circ\text{C}$ , OTA was not detected (Table 2) and was not assayed when growth was negligible. The influence of temperature, dose and time on OTA accumulation was significant for both isolates. Concerning dose and time Tukey-HSD test found three and two homogeneous groups, respectively, for *A. ochraceus*, and three groups for *A. carbonarius*.

#### Discussion

In the present study, two ochratoxigenic isolates, one of *A. carbonarius* and another of *A. ochraceus*, were selected to investigate the effect of three antifungal agents on fungal growth and OTA production when the fungi were cultured on barley-based medium at  $15^\circ\text{C}$  and  $25^\circ\text{C}$  and at  $0.97 a_w$ .

The doses of the fungicides were chosen on the basis of preliminary experiments performed in our laboratory, which had shown that growth of these isolates in BMEA was inhibited at doses above those used in the present study (data not shown).

Sub-inhibitory doses were assayed because mycotoxin production may be stimulated when stressing environmental conditions and low fungicide doses are maintained during growth of mycotoxin-producing fungi (D'Mello et al. 1998; Magan et al. 2002; Nesci et al. 2003; Medina et al. 2007b). This hypothesis is supported by the results obtained in this work.

The lowest assayed temperature ( $15^\circ\text{C}$ ) was less favourable than  $25^\circ\text{C}$  to the growth of the studied isolates. The impact of temperature on growth parameters agrees well with studies performed with other strains of *A. carbonarius* (Belli et al. 2005; Medina et al. 2007b; Romero et al. 2007; Barberis et al. 2009) and *A. ochraceus* (Ramos et al. 1998; Pardo et al. 2005), even though in all these studies the culture media,  $a_w$ -values, presence of fungicides and hosts were different.

OTA accumulation in BMEA was affected by temperature both in fungicide-containing media and controls. Toxin levels were generally higher at  $25^\circ\text{C}$  than at  $15^\circ\text{C}$  at a given fungicide dose. These results agree with those of Kapetanakou et al. (2009), who report that OTA production by *A. carbonarius* and *A. ochraceus* in malt extract agar was higher at  $25^\circ\text{C}$  than at 15, 20 or  $30^\circ\text{C}$ , although fungicides were not used and  $a_w$  conditions were different from those employed in the present study. However, other authors (Barberis et al. 2009) have found that temperature is the factor of minor influence on OTA production by isolates in *Aspergillus* section *Nigri* in media supplemented with butylated hydroxyanisole. In our study, in addition to temperature, the type of fungicide, their dose and incubation time, clearly influenced OTA accumulation in BMEA.

The isolates used in this study were previously obtained from barley grown in Spain and OTA levels produced in an optimised medium for production of this toxin (yeast extract sucrose supplemented with 5% of bee pollen) (Medina et al. 2006) were lower than those found in BMEA in the present report. Then, BMEA is an excellent substrate for OTA production by the assayed isolates.

Among the three antifungal agents tested, mancozeb was the most active (it inhibited fungal growth at  $40 \text{ mg l}^{-1}$ ) while sulfur was the least active against the tested isolates in BMEA; moreover, large lag phases or even inhibitory effects were observed at low mancozeb doses. It has been reported that mancozeb used up to 10% of the dose recommended by the manufacturer did not prevent the growth of *A. carbonarius* isolated from grapes on synthetic grape-like medium (Belli et al. 2006). Therefore, mancozeb seems to be more active in BMEA than in synthetic grape medium to control *A. carbonarius*, although the isolates and other conditions were different. This fact may be due to a different degradation rate of the fungicide. It has been reported that in table grapes, mancozeb degrades rapidly to ETU, which suffers from further degradation to

relatively non-toxic products (Banerjee et al. 2008). Some of these products are ethyleneurea and 2-imidazole (Vonk and Kaars Sijpesteijn 1970) which further degrades to ethyldiamine and CO<sub>2</sub> (International Programme on Chemical Safety (IPCS) 1988).

At 25°C, mancozeb (up to 30 mg l<sup>-1</sup>) did not prevent OTA production in cultures of *A. ochraceus* in BMEA but decreased OTA production during the first 15 days of incubation in cultures of *A. carbonarius*. However, at 15°C, this chemical effectively arrested OTA production even at the lowest dose. This effect was more evident in the case of *A. ochraceus*. It has been reported that a dose of 3 g mancozeb l<sup>-1</sup> inhibited growth and OTA production by isolates of *A. carbonarius* from grape (Bellí et al. 2006). In the present work inhibitory doses are much lower. Assays aimed at the research of frequent treatment of barley with low doses of mancozeb instead of the employment of high doses should be carried out. They can be very useful to control and to prevent the growth of *Aspergilli* and production of OTA but also to minimise the toxic effects of ETU in humans and animals.

None of the assayed doses of copper oxychloride proved inhibitory at 25°C. However, at 15°C fungal growth was inhibited at 0.8 g l<sup>-1</sup>. This fungicide produced shorter lag phases and slower growth rates than mancozeb at the same doses, especially in the case of *A. carbonarius*. At 25°C, OTA levels were undetectable or unquantifiable at doses higher than 500 mg l<sup>-1</sup> in cultures of *A. ochraceus* and higher than 10 mg l<sup>-1</sup> in cultures of *A. carbonarius*. At 15°C OTA production was inhibited at doses higher than 50 mg l<sup>-1</sup> in cultures of *A. ochraceus* and at all the assayed doses in cultures of *A. carbonarius*. This antifungal agent, though not very effective to control the growth of the assayed species, plays a relevant role in the inhibition of OTA production. Other authors have found that this fungicide was scarcely effective to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Nel et al. 2007), that *A. niger* and *Penicillium chrysogenum* were able to grow in a medium containing up to 0.5 g kg<sup>-1</sup> of this antifungal agent (Gharieb et al. 2004) or that 8 g l<sup>-1</sup> are needed to completely inhibit the growth of *A. flavus* (Mishra and Dubey 1994). But up to now its effectiveness for controlling the production of OTA in ochratoxigenic species from barley has not been assessed.

Sulfur was unable to produce inhibition of the assayed fungi and its capacity to delay growth was irrelevant at 25°C. At 15°C, doses equal or higher than 5 g sulfur l<sup>-1</sup> were needed to inhibit mycelial extension of both isolates. Therefore, sulfur does not appear suitable to control these fungi. In addition, the results shown in the present report indicate that sulfur can increase OTA production by the two species at sub-inhibitory doses, mainly in cultures of *A. ochraceus*. It has been reported that sulfur can inhibit the growth of

*A. flavus* at 7 g l<sup>-1</sup> and 75% inhibition took place at 5 g l<sup>-1</sup> (Mishra and Dubey 1994) but little is known (Bellí et al. 2006) about its effect on mycotoxin production by mycotoxigenic fungi at sub-inhibitory doses. Thus, this antifungal agent should be applied with caution.

The assayed fungi showed some differences concerning lag phase, growth rate and OTA production with regard to the fungicide and its dose. Differences in lag phases are higher at the lowest temperature in cultures of the isolates of the two assayed species. In cultures containing any of the three fungicides, at 15°C, *A. ochraceus* showed shorter lag phases and higher growth rates than *A. carbonarius* with the three antifungal agents; at 25°C, the two isolates showed similar lag phases, although growth rates were higher in cultures of *A. ochraceus*, like at 15°C. Concerning OTA production, the isolate of *A. ochraceus* produced more toxin than the isolate of *A. carbonarius* in controls, under the same conditions and, generally, this behaviour was observed in fungicide-containing cultures at 25°C. At 15°C, the stress due to temperature significantly affected to OTA production in controls, mainly in those of *A. carbonarius*. However, it is remarkable that at this temperature, less favourable for fungal growth and toxin production, some doses of copper oxychloride and, especially sulfur, have a positive impact on OTA production by *A. ochraceus*. This effect is also observed in cultures at 25°C supplemented with certain doses of these two fungicides. Unfortunately, scarcity of previous reports about these fungi and fungicides difficult the discussion of the results, although it is generally known that interspecific and intraspecific differences in fungicide susceptibility are frequent in fungi (Pell et al. 2001; Antachopoulos et al. 2007).

The effects of mancozeb, copper oxychloride and sulfur in isolates of *A. carbonarius* and *A. ochraceus* from barley grown in Spain and cultured on BMEA have been studied for the first time. On the basis of the results obtained in this study it seems that risk of barley contamination with OTA might be higher on spring crops than on winter crops treated with these fungicides at sub-inhibitory levels. Low fungicide doses combined with mild temperatures and relatively high humidity might enhance OTA production in the cereal. Taking into account (1) the wide use of these fungicides, (2) their toxicity to animals (especially, in the case of mancozeb) and (3) the scarcity of studies on these chemicals related to the fungal species here considered, studies on barley in field are needed in order to find the optimal dose of active ingredient against *A. ochraceus* and *A. carbonarius* and the way of application to control mycelial development of these fungi in crops and to minimise OTA production.

### Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from FEDER, the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project Number AGL2007-66416-C05-01/ALI and a research grant) and from the Valencian Government 'Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència' (Project Number ACOMP/2009/371).

### References

- Ackermann A. 1998. Mycoflora of South African barley and malt. *J Am Soc Brew Chem*. 56:169–176.
- Aldred D, Olsen M, Magan N. 2004. The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. In: Magan N, Olsen M, editors. *Mycotoxin in food: detection and control*. Chapter 7. Cambridge (UK): Woodhead. p. 139–173.
- Andersen B, Thrane U, Svendsen A, Rasmussen IA. 1996. Associated field mycobiota on malt barley. *Can J Bot*. 74:854–858.
- Antachopoulos C, Meletiadiis J, Sein T, Roilides E, Walsh TJ. 2007. Use of high inoculum for early metabolic signalling and rapid susceptibility testing of *Aspergillus* species. *J. Antimicrobiol Chemother*. 59:230–237.
- Astoreca A, Barberis C, Magnoli C, Combina M, Dalcerro A. 2009a. Influence of ecophysiological factors on growth, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate isolates in irradiated corn grains. *Int J Food Microbiol*. 129:174–179.
- Astoreca A, Barberis C, Magnoli C, Combina M, Dalcerro A. 2009b. Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate isolates on irradiated peanut seeds. *Int J Food Microbiol*. 129:131–135.
- Banerjee K, Oulkar DP, Adsule PG. 2008. Persistence and residue dynamics of mancozeb and its toxic metabolite ethylenethiourea (ETU) in table grapes. *Acta Hort. (ISHS)*. 785:409–412.
- Barberis C, Astoreca A, Asili R, Fernández-Juri G, Chulze S, Magnoli C, Dalcerro A. 2009. In vitro control of growth and ochratoxin A production by butylated hydroxyanisole in *Aspergillus* section *Nigri* species. *Food Contr*. 20:709–715.
- Belli N, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2004. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *Int J Food Microbiol*. 96:19–27.
- Belli N, Marin S, Sanchis V, Ramos AJ. 2006. Impact of fungicides on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on synthetic grape-like medium and on grapes. *Food Addit Contam A*. 23:1021–1029.
- Belli N, Ramos AJ, Coronas I, Sanchis V, Marin S. 2005. *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production on a synthetic grape medium in relation to environmental factors. *J Appl Microbiol*. 98:839–844.
- Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes FJ. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int J Food Microbiol*. 71:139–144.
- Brennan RF. 1990. Effectiveness of some copper compounds applied as foliar sprays in alleviating copper deficiency of 744 wheat grown on copper deficient soils of Western Australia. *Aust J Exp Agric*. 30:687–691.
- D'Mello JPF, Macdonald AMC, Postel D, Dijkstra WTP, Dujardin A, Placinta CM. 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur J Plant Pathol*. 104:741–751.
- Domico LM, Cooper KR, Bernard LP, Zeevalk GD. 2007. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. *Neurotoxicol*. 28:1079–1091.
- Edwards IR, Ferry DG, Temple WA. 1991. Fungicides and related compounds. In: Hayes WJ, Laws ER, editors. *Handbook of pesticide toxicology*. New York (NY): Academic Press. p. 76–78.
- European Commission. 2009. Commission Regulation (EC) No. 822/2009 of 27 August 2009 amending Annexes II, III and IV to Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for azoxystrobin, atrazine, chlormequat, cyprodinil, dithiocarbamates, fludioxonil, fluroxypyr, indoxacarb, mandipropamid, potassium tri-iodide, spiro-tetramat, tetraconazole, and thiram in or on certain products. *Off J Eur Union*. L239:5–45.
- European Union Pesticides database [Internet]. 2010. Brussels (Belgium): Directorate General for Health and Consumers; [cited 2010 Sept 5]. Available from: [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm/](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm/)
- Extension Toxicology Network (EXTOXNET): Pesticide Information Profiles [Internet]. 1996. Cornell University, Oregon State University, University of Idaho, University of California–Davis, Michigan State University and Institute for Environmental Toxicology; [cited 2009 Dec 2]. Available from: <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html/>
- FAO/WHO/UNEP: Mycotoxin prevention and decontamination, corn – a case study. Third Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins (MYC-CONF99/6b) [Internet]. 1999. Tunis, Tunisia: FAO/WHO/UNEP; p. 1–11 [cited 2010 Jan 15]. Available from: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/myco6b.pdf/>
- Favilla M, Pascale M, Ricelli A, Evidente A, Amalfitano C, Altomare C. 2008. Inhibition of species of the *Aspergillus* Section *Nigri* and ochratoxin A production in grapes by fusapyrone. *Appl Environ Microbiol*. 74:2248–2253.
- Gareis M. 1999. Contamination of German malting barley and of malt produced from it with the mycotoxins ochratoxin A and B. *Arch Lebensm Hyg*. 50:83–87.
- Gharieb MI, Ali MI, El-Shoura AA. 2004. Transformation of copper oxychloride fungicide into copper oxalate by tolerant fungi and the effect of nitrogen source on tolerance. *Biodegradation*. 15:49–57.
- Heenan CN, Shaw KJ, Pitt JI. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J Food Mycol*. 1:67–72.
- Houeto P, Bindoula G, Hoffman JR. 1996. Ethylenebisdithiocarbamates and ethylenethiourea: possible human health hazards. *Environ Health Perspect*. 103:568–573.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1993. Ochratoxin A. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic



- amines and mycotoxins. Vol. 56. Lyon (France): IARC; p. 489–521.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental Health Criteria 78, Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and propylenethiourea: a general introduction [Internet]. 1988. Geneva (Switzerland): World Health Organization (WHO); [cited 2010 Sept 2]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc78.htm/>
- Kapetanakov AE, Panagou EZ, Gialitaki M, Drosinos EH, Skandamis PN. 2009. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. *Food Contr.* 20:735–732.
- Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing isolates of the genus *Penicillium*. *Appl Environ Microbiol.* 67:3630–3635.
- Legarda TM, Burdaspal PA. 1998. Ocratoxina A en cerezas elaboradas en España y en otros países europeos. *Alimentaria.* 291:115–122.
- Llorens A, Mateo R, Hinojo MJ, Valle-Algarra FM, Jiménez M. 2004. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int J Food Microbiol.* 94:43–54.
- Magan N, Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol.* 119:131–139.
- Magan R, Hope R, Colleate A, Baxter ES. 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *Eur J Plant Pathol.* 108:685–690.
- Maroni M, Colosio C, Ferioli A, Fait A. 2000. Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Introduction. Toxicology.* 143:1–118.
- Mateo R, Medina A, Gimeno-Adelantado JV, Jiménez M. 2004. An overview on the status of toxigenic fungi and mycotoxins in Spain. In: Logrieco A, Visconti A, editors. *An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe.* Dordrecht (Netherlands): Kluwer. p. 219–235.
- Medina A, Jiménez M, Mateo R, Magan N. 2007a. Efficacy of natamycin for control of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* isolates under different environmental conditions. *J Appl Microbiol.* 103:2234–2239.
- Medina A, Jiménez M, Valle-Algarra FM, Gimeno-Adelantado JV, Mateo R. 2005b. Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *J Chromatogr A.* 1083:7–13.
- Medina A, Mateo EM, Valle-Algarra FM, Mateo F, Mateo R, Jiménez M. 2008. Influence of nitrogen and carbon sources on the production of ochratoxin A by ochratoxigenic isolates of *Aspergillus* spp. isolated from grapes. *Int J Food Microbiol.* 122:93–99.
- Medina A, Mateo R, López-Ocaña L, Valle-Algarra FM, Jiménez M. 2005a. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. *Appl Environ Microbiol.* 71:4696–4702.
- Medina A, Mateo R, Valle-Algarra FM, Mateo EM, Jiménez M. 2007b. Effect of carbendazim and physico-chemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Int J Food Microbiol.* 119:230–235.
- Medina A, Valle-Algarra FM, Mateo R, Gimeno-Adelantado JV, Mateo F, Jiménez M. 2006. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Int J Food Microbiol.* 108:196–203.
- Mishra AK, Dubey NK. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl Environ Microbiol.* 60:1101–1105.
- Munimbazi C, Saxena J, Tsai WJ, Bullerman LB. 1997. Inhibition of production of cyclopiazonic acid and ochratoxin A by the fungicide iprodione. *J Food Protect.* 60:849–852.
- Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M. 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beer in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J AOAC Int.* 82:897–902.
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, Viljoen A. 2007. Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Prot.* 26:697–705.
- Nesci A, Rodriguez M, Etcheverri M. 2003. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. *J Appl Microbiol.* 95:279–287.
- Noots I, Delcour JA, Michiels CW. 1998. From field barley to malt: detection and specification of microbial activity for quality aspects. *Crit Rev Microbiol.* 25:121–153.
- O'Callaghan J, Stapleton PC, Dobson ADW. 2006. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet Biol.* 43:213–221.
- Pardo E, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. 2005. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiol.* 22:383–389.
- Pell JK, Eilenberg J, Hajek AE, Steinkraus AC. 2001. Fungi as biocontrol agents, progress, problems and potential. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N, editors. *Biology, ecology and pest management potential of Entomophthorales.* Chapter 4. Wallingford (UK): CABI Publishing. pp. 71–154.
- Pitt JI. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl Environ Microbiol.* 53:266–269.
- Ramos AJ, Labernia N, Marín S, Sanchis V, Magan N. 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three isolates of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *Int J Food Microbiol.* 44:133–140.
- Romero SM, Patriarca A, Fernández Pinto V, Vaamonde G. 2007. Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic isolates of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. *Int J Food Microbiol.* 115:140–143.

- Samapundo S, Devlieghere F, De Meulenaer B, Lamboni Y, Osei-Nimoh D, Debevere JM. 2007. Interaction of water activity and bicarbonate salts in the inhibition of growth and mycotoxin production by *Fusarium* and *Aspergillus* species of importance to corn. *Int J Food Microbiol.* 116:266–274.
- Scott PM, Kanhere SR. 1995. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit Contam A.* 12:591–598.
- Sinha RN. 1995. The stored grain ecosystems. In: Jayas DS, White NDG, Muir WE, editors. *Stored grain ecosystems.* New York (NY): Marcel Dekker. p. 1–32.
- Trucksess MW, Giler J, Young K, White KD, Page SW. 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee – 1997. *J AOAC Int.* 82:85–89.
- US Department of Agriculture (USDA): World Agricultural Production, Circular series WAP 06-09 [Internet]. 2009. Washington, DC (USA): USDA. Foreign Agricultural Services. [cited 2009 Nov 7]. Available from: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>
- Valero A, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V. 2007. Effect of preharvest fungicides and interacting fungi on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A synthesis in dehydrating grapes. *Lett Appl Microbiol.* 45:194–199.
- Varga J, Kevei E, Rinyu E, Téren J, Kozakiewicz Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl Environ Microbiol.* 62:4461–4464.
- Vonk JW, Kaars Sijpesteijn A. 1970. Studies on the fate in plants of ethylenedithiocarbamate fungicides and their decomposition products. *Ann Appl Biol.* 65:489–496.
- Wauchope RD, Buttler TM, Hornsby AG, Augustijn-Beckers PWM, Burt JP. 1992. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol.* 123:1–157.

## Artículo 4

---

**Mateo, Eva M.**, Valle-Algarra, F. M., Mateo-Castro, R., Jiménez, M., Magan, N. Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 151:289-298. 2011.





## Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium

Eva M. Mateo <sup>a,b</sup>, F.M. Valle-Algarra <sup>b</sup>, R. Mateo <sup>b</sup>, M. Jiménez <sup>b</sup>, N. Magan <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire MK43 0AL, UK

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Ecology, Valencia University, Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 June 2011

Received in revised form 12 September 2011

Accepted 18 September 2011

Available online 2 October 2011

#### Keywords:

*Fusarium langsethiae*

Fungicides

Oat-based medium

Growth rate

T-2 toxin

HT-2 toxin

### ABSTRACT

*Fusarium langsethiae* has been isolated from infected cereals in central and northern Europe where it has been identified in the last decade as the main species involved in the occurrence of high levels of T-2 and HT-2 toxins, mainly in oats. The efficacy of three fungicides (prochloraz, tebuconazole, fenpropimorph) for controlling growth of two strains of *F. langsethiae* isolated from oats was examined at 0.96 and 0.98  $a_w$  at 15, 20 and 25 °C on oat-based media. The concentrations necessary for 50 and 90% growth inhibition (ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> values) were determined. The effect on the trichothecene type A mycotoxins T-2 and HT-2 was also determined. Without fungicides both strains grew faster at 0.98 than at 0.96  $a_w$  and the influence of temperature on growth rates was 25 > 20 > 15 °C. Prochloraz and tebuconazole were more effective than fenpropimorph against *F. langsethiae*. Strain, temperature and type of fungicide significantly influenced the ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> values for growth. The concentration ranges under different environmental conditions were: prochloraz (0.03–0.1 and 0.3–1.5), tebuconazole (0.06–0.9 and 1.3–8.2), and fenpropimorph (22–59 and 125–215 mg l<sup>-1</sup>). Production of T-2 and HT-2 toxins was influenced by temperature,  $a_w$ , type of fungicide and dose. Levels of T-2 were usually higher than those of HT-2 under the same conditions. The biosynthesis of T-2 toxin increased after 10 day incubation, but was reduced with decreasing temperature and increasing fungicide dose. At 0.98  $a_w$  T-2 levels increased in cultures containing fenpropimorph while at 0.96  $a_w$  the toxin concentrations increased in response to the other two fungicides. Low doses of prochloraz or tebuconazole enhanced toxin production when compared with untreated cultures for strain 2004-59 at 0.96  $a_w$  and 20–25 °C. HT-2 was hardly detectable in the treatments with prochloraz or tebuconazole at 0.98  $a_w$ . This is the first study on the effect of these anti-fungal compounds on control of growth of *F. langsethiae* and on production of T-2 and HT-2 toxins in oat-based media.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Fusarium* head blight (FHB) is a wide-spread destructive disease of small-grain cereal crops caused by a wide number of *Fusarium* spp. and some *Microdochium* spp. (Xu et al., 2005). *Fusarium* infection in general reduces grain yield and/or contaminates the grain with a range of toxic metabolites detrimental to human and animal health.

*Fusarium langsethiae* has been isolated from infected oats, wheat and barley in central and northern Europe (Torp and Adler, 2004; Torp and Nirenberg, 2004). This species, with the morphological characteristics of *Fusarium poae* and metabolic profile of *Fusarium sporotrichioides* (Torp and Nirenberg, 2004; Schmidt et al., 2004; Thrane et al., 2004; Wilson et al., 2004; Yli-Mattila et al., 2004, 2008), was identified a decade ago (Torp and Langseth, 1999). However, it does not produce any visible symptoms, which makes colonisation

assessment and effect of fungicides difficult to test in small grains. Although a small percentage of wheat ears with infected 'glume spots' thought to have been caused by *F. langsethiae* in the field have been observed in Austria (Adler and Torp, 2004), *F. langsethiae* can readily be isolated from symptomless oats, wheat and barley grains. The epidemiology of this species is not understood and host plant preference is unknown, though recent results suggest that *F. langsethiae* may have developed some host preference for oats (Imathiu et al., 2009).

*F. langsethiae* has been involved in the production of high levels of T-2 and HT-2 mycotoxins in cereals in Norway (Langseth and Rundberget, 1999; Torp and Langseth, 1999) and in oats in the UK (Edwards, 2007a, b), where recent studies have shown a high incidence of both toxins in wheat, barley and especially in oats (Edwards, 2009a,b,c; Scudamore et al., 2007, 2009). The highly toxic type A trichothecenes T-2 toxin and its deacetylated form HT-2 toxin are of special interest because T-2 toxin has been shown to inhibit DNA, RNA and protein synthesis and to induce DNA fragmentation characteristic of apoptosis (Beasley, 1989; Canady et al., 2001; Prelusky et al., 1994; Schuhmacher-Wolz et

\* Corresponding author. Tel.: +44 1234 758308; fax: +44 1234 758380.  
E-mail address: [n.magan@cranfield.ac.uk](mailto:n.magan@cranfield.ac.uk) (N. Magan).

al., 2010). Legislation is currently being considered in the EU for regulation of T-2 and HT-2 mycotoxins in unprocessed cereals and by products (European Commission, 2006).

The main factors that influence fungal growth and mycotoxin production are temperature, water activity ( $a_w$ ) and presence of anti-fungal substances (Aldred and Magan, 2004; Edwards, 2004; Llorens et al., 2004a,b; Logrieco and Visconti, 2004; Magan and Aldred, 2007; Magan et al., 2002; Medina et al., 2007a,b; Ramírez et al., 2004, 2006). There has been a significant focus on the development and use of fungicides to prevent and control infection of pathogenic *Fusarium* spp. during ripening of small grain cereal crops. Less attention has been paid, in practice, to the effect that such fungicide applications may have on mycotoxin production. This is important as it has been observed that sub-lethal doses of some fungicides may lead to a stimulation of trichothecene production by *Fusarium* species (D'Mello et al., 1997, 1998; Hope et al., 2002; Matthies et al., 1999; Moss and Frank, 1985; Placinta et al., 1996; Ramírez et al., 2004). It is surprising that these previous reports, with the exception of Hope et al. (2002) and Ramírez et al. (2004), took no account of the interactions between the efficacy of the fungicides and key environmental factors, such as  $a_w$  or temperature.

Fungicide applications pre-harvest are a reality whether in intensive or sustainable cereal production systems. *Fusarium* species colonising ripening cereals will thus be exposed to azole fungicides, such as prochloraz (imidazole), or tebuconazole (triazole) and morpholines, such as fenpropimorph, in agricultural environments (Serfling et al., 2007). In describing the response of an isolate to a fungicide, an  $EC_{50}$  (50% effective concentration) or  $ED_{50}$  (50% effective dose) value is usually given. This is the concentration or dose that reduces growth rate to 50% compared with that observed in the absence of fungicide. An  $EC_{90}$  or  $ED_{90}$  value is sometimes also given. It provides additional information about growth over a wider range of fungicide concentrations (Serfling et al., 2007; Tzatzarakis et al., 2001). Thus, these parameters deal with the efficacy to control fungal growth but their impact or relationship to the level of mycotoxin accumulation in the substrate has not been studied in detail (Pateraki et al., 2007). Prochloraz, tebuconazole and fenpropimorph are extensively applied in agriculture to control fungal growth in cereals and other crops in many European countries. So far, no study has been carried out to examine the effect of these anti-fungal agents on the growth of *F. langsethiae* strains or their ability to produce T-2 and HT-2 toxins.

Therefore, the objectives of this study were to assess the efficacy of prochloraz, tebuconazole, and fenpropimorph in an oat-based medium, under different  $a_w$ /temperature regimens on the control of (i) growth of two strains of *F. langsethiae* isolated from oats from different countries and (ii) T-2 and HT-2 production by these strains. The  $ED_{50}$  and  $ED_{90}$  values for fungicides in relation to growth and toxin production under different  $a_w \times$  temperature conditions were determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungal strains and growth conditions

Two strains of *F. langsethiae*, 2004-59 and M562, isolated from oats in UK and Sweden, respectively, were used. These strains are held in the Applied Mycology Group Culture Collection (Cranfield University, UK). They were kindly provided by Prof. S. Edwards, Harper Adams University College, U.K. and Dr M. Olsen, Swedish Food Authority, Sweden. Cultures were preserved in 15% glycerol at  $-20^\circ\text{C}$ . Before carrying out the study of ecological factors on growth and T-2 and HT-2 accumulation, the strains were grown on 3% oat agar. The culture medium was prepared by boiling 30 g of oat kernels in pure water for 1 h. After filtration, the liquid was brought to 1 l and 2% w/v of agar was added. The mixture was autoclaved at  $115^\circ\text{C}$  for 30 min and poured into Petri dishes. The strains were inoculated on the centre of 9 cm Petri plates and incubated at

$25^\circ\text{C}$  for 7 days. These fresh cultures were used to prepare inocula for further experiments on efficacy of fungicides on fungal growth and toxin production.

### 2.2. Modification of media with fungicides at different $a_w$ conditions

The active ingredient, product name, concentration and company of the fungicides used in this study were the following: fenpropimorph (Funbas®, EC 750 g a.i./l, BASF Crop Protection, Spain); prochloraz (Dogma® 400 g a.i./l, Industrias Afrasa S.A., Paterna, Valencia, Spain); tebuconazole (Folicur® 250 g a.i./l, Bayer CropScience, Paterna, Valencia, Spain). Diluted solutions of the fungicides were prepared by mixing appropriate amounts of each fungicide (based on concentration of the active ingredient) in sterile deionised water and used immediately after preparation.

A solid medium containing oat extract was prepared as indicated in Section 2.1. The water activity of the media was adjusted to 0.98 and 0.96 with glycerol and, after autoclaving ( $115^\circ\text{C}$ , 20 min), was allowed to cool to about  $50^\circ\text{C}$  (Medina and Magan, 2010). The fungicides were then added to obtain the target concentrations. Flasks of molten media were thoroughly shaken prior to pouring into 9 cm sterile Petri dishes, to ensure that an even dispersion of the fungicide treatment was obtained. Preliminary experiments were performed to choose the range of concentrations for each fungicide to be added to obtain dose response curves. Based on these assays the doses used were: prochloraz (0.01, 0.1, 0.3, 0.7, 0.9, 1.5 mg/l), tebuconazole (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.5, and 2 mg/l; additionally, 4, 8 and 12 mg/l were tested for 0.96  $a_w$ ) and fenpropimorph (10, 20, 25, 30, 50, 90, 150 and 180 mg/l; additionally, 40 and 70 were assayed at 0.98  $a_w$ , and 200 and 230 mg/l were tested for strain M562 at 0.98  $a_w$ ).

All media, with and without fungicides, were inoculated centrally with a 3-mm diameter agar disk taken from the margin of a 5–7-day-old growing colonies. Inoculated Petri plates of the same  $a_w$  were enclosed in sealed plastic containers together with beakers of a glycerol–water solution matching the same  $a_w$  as the treatment to maintain a constant equilibrium relative humidity (ERH) inside the boxes. The experiments were carried out in triplicate. Treatments were incubated  $15^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$  and  $25^\circ\text{C}$  for 10 days.

#### 2.2.1. Growth evaluation

Assessment of growth was made every day during the incubation period by measurement of two diameters of the growing colonies at right angles to each other until the colony reached the edge of the plate. The radii of the colonies were plotted against time, and linear regression applied in order to obtain the growth rate (mm/day) as the slope of the line. The growth rates were plotted and the  $ED_{50}$  and  $ED_{90}$  concentrations calculated by comparison with the controls at each temperature and  $a_w$  level.

#### 2.2.2. Chemical analysis

**2.2.2.1. Reagents and standards.** Standards of T-2 and HT-2 toxins were supplied by Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain). Acetonitrile and methanol were supplied from J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Pure water was obtained from a Milli-Q system (Millipore Co., Billerica, MA, USA). All solvents were of HPLC grade.

**2.2.2.2. Extraction of T-2 and HT-2 toxins from the *F. langsethiae* cultures.** Approx. 5–6 agar discs were taken from the replicates and treatment agar plates using a cork borer and placed in previously weighed 2 ml Eppendorf safe-lock tubes and then reweighed. This provided about 0.75 g agar/culture for extraction. A total of 3 replicates per treatment and controls, respectively, were collected and analysed for T-2 and HT-2 toxins as described by Medina et al. (2010).

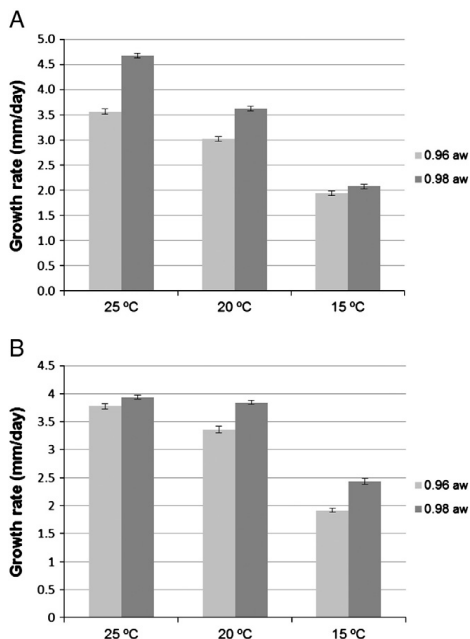


Fig. 1. Growth rates (GR) of two strains of *F. langsethiae* cultured on oat-based medium at different water activities and temperatures. Error bars mean standard errors. A) Strain 2004-59; B) strain M562.

2.2.2.3. *Chromatographic analysis.* The LC system consisted of a Waters 600E system controller, a Millipore Waters 717 Plus autosampler and a Waters 996 Photodiode array detector (DAD) (Waters, Milford, MA, USA).

A volume of 50  $\mu$ l of the extract was injected into the LC system. T-2 and HT-2 toxins were separated using a C18 Zorbax Eclipse Plus® (150  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu$ m) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), with a guard column of the same material. Analysis was performed in the gradient mode using two solvents (Medina et al., 2010).

2.2.2.4. *Statistical analysis.* Statistical analysis was performed using Statgraphics Centurion XV.2.11 (Statpoint Inc., VA, USA). Multifactor ANOVA and *post hoc* analysis of factors with more than two levels (Duncan's test of multiple comparisons) were applied to data. A 95% confidence level was used to assess influence of individual and interacting treatments.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of fungicides on growth of the two strains of *F. langsethiae* used in this study

The relative growth of the two strains was initially examined in relation to the treatment conditions of  $a_w \times$  temperature (Fig. 1). This shows that growth was favoured by temperature (growth rates increase in the order 25 > 20 > 15 °C) and was faster at 0.98 than 0.96  $a_w$ , regardless of temperature. The statistical analyses using ANOVA showed that single factors of  $a_w$  and temperature were significant ( $P < 0.05$ ) while strain differences and interacting factors were not. Duncan's test showed three homogeneous non-overlapping groups with regard to temperature.

Figs. 2 and 3 show the effects of fenpropimorph and the two azoles (prochloraz and tebuconazole), respectively, on the growth rate (GR, mm/day) of the two strains of *F. langsethiae* on oat-based media under the all the treatment conditions assayed. In general, there was a decrease of the RGR as the fungicide dose was increased regardless of  $a_w$ , temperature and strain. These data were used to calculate the  $ED_{50}$  and  $ED_{90}$  of each fungicide, which are shown in Table 1.

For fenpropimorph, the  $ED_{50}$  and  $ED_{90}$  values were in the ranges 22–59 and 125–215 mg/l, respectively (Table 1). Both indices increased with temperature so that this fungicide was more effective at 15 than 25 °C. ANOVA revealed that the  $ED_{50}$  was significantly affected ( $P < 0.05$ ) by temperature but not by  $a_w$  or the strain. However, the  $ED_{90}$  was significantly affected by all single factors as well as by

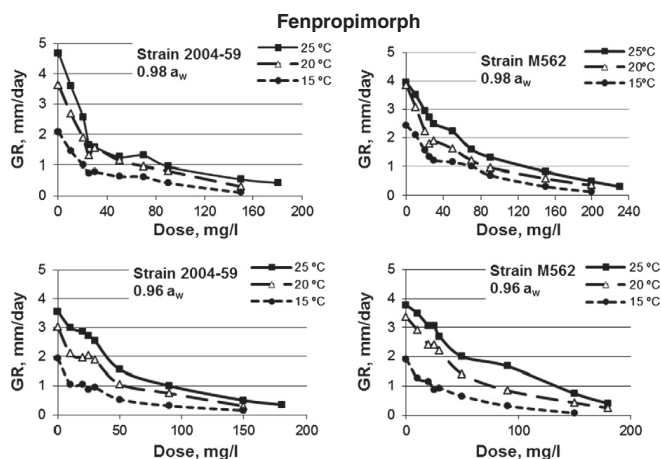


Fig. 2. Growth rates (GR, mm/day) of two strains of *F. langsethiae* on oat-based medium supplemented with different doses of fenpropimorph.

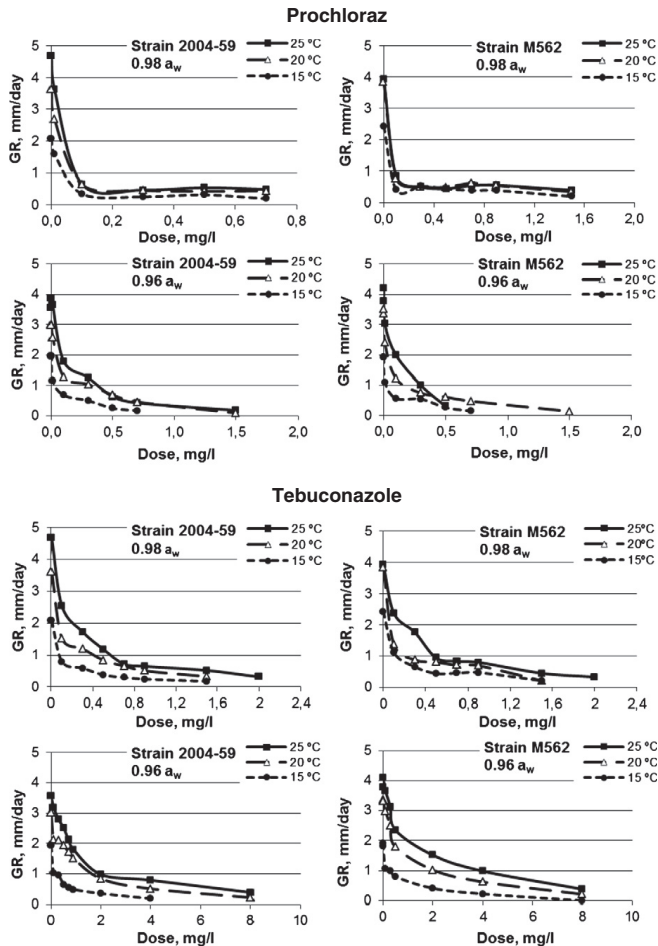


Fig. 3. Growth rates (GR, mm/day) of two strains of *F. langsethiae* on oat-based medium supplemented with different doses of prochloraz and tebuconazole.

the interaction  $a_w \times$  strain and the Duncan's test placed each temperature in a separate homogeneous group.

For prochloraz, Table 1 shows the ranges of  $ED_{50}$  (0.03–0.1 mg/l) and  $ED_{90}$  (0.3–1.5 mg/l). There were significant differences ( $P < 0.05$ ) among the  $ED_{50}$  related to  $a_w$ , temperature and the interaction temperature  $\times a_w$ . Temperature originates three homogeneous, non-overlapping groups (Duncan's test).  $ED_{90}$  was influenced by temperature,  $a_w$  and strain but there were interactions between  $a_w$  and strain or temperature. Efficacy was higher at 15 than 20–25 °C.

For tebuconazole, the  $ED_{50}$  and  $ED_{90}$  values were in the ranges 0.06–0.9 and 1.3–8.2 mg/l, respectively (Table 1). The  $ED_{50}$  was significantly affected only by  $a_w$  ( $P < 0.05$ ). The fungicide was more effective at 0.98  $a_w$ . However, the  $ED_{90}$  was significantly influenced by temperature,  $a_w$  and the interaction  $a_w \times$  temperature. The Duncan's test applied to  $ED_{90}$  shows that control of growth was better at 15 than 20–25 °C.

ANOVA of all the data including class of fungicide,  $a_w$ , strain and temperature revealed that these factors (except for  $a_w$ ) significantly

influenced ( $P < 0.05$ ) the  $ED_{50}$  values. The interactions between type of fungicide and temperature or type of fungicide and strain were also significant. The average  $ED_{50}$  of fenpropimorph was higher than that for the azole fungicides (Table 1), which clustered together in a single homogeneous group (Duncan's test). With regard to temperature effects on the  $ED_{50}$ , the Duncan's test showed two homogeneous groups (15 °C and 20–25 °C). With regard to the  $ED_{90}$ , the four single factors and their interactions were also statistically significant ( $P < 0.05$ ). There were differences between efficacy of the fungicides ( $P < 0.001$ ). The Duncan's test placed each fungicide and each temperature in a separate non-overlapping group.

To summarise, overall prochloraz was the most active antifungal agent to control growth of *F. langsethiae*. Tebuconazole was about 4–6 times less effective than prochloraz, but differences are significant only regarding the  $ED_{90}$ . Fenpropimorph was by far the least active fungicide (100–500 times less effective than prochloraz). Influence of  $a_w$  and strain was not conclusive as it was generally



**Table 1**

Values of effective doses to inhibit growth ( $\text{mm day}^{-1}$ ) by 50 or 90% ( $\text{ED}_{50}$ ,  $\text{ED}_{90}$ ; mg/l) for the three fungicides in oat-based cultures of two strains of *F. langsethiae* at two water activity ( $a_w$ ) values and three temperatures.

Strain	$a_w$	Temperature (°C)	Fungicides					
			Fenpropimorph		Prochloraz		Tebuconazole	
			$\text{ED}_{50}$	$\text{ED}_{90}$	$\text{ED}_{50}$	$\text{ED}_{90}$	$\text{ED}_{50}$	$\text{ED}_{90}$
2004-59	0.96	25	46	180	0.1	0.95	0.90	8.2
		20	40	150	0.06	1.05	0.90	6.7
		15	23	132	0.03	0.60	0.29	3.9
	0.98	25	24	175	0.04	0.30	0.12	1.6
		20	23	140	0.04	0.90	0.08	1.5
		15	22	130	0.04	0.60	0.07	1.3
M562	0.96	25	52	185	0.1	0.48	0.52	8.0
		20	43	165	0.05	1.05	0.50	6.8
		15	23	125	0.03	0.62	0.29	4.5
	0.98	25	59	215	0.05	1.50	0.20	1.8
		20	40	195	0.05	1.50	0.06	1.3
		15	28	170	0.05	1.40	0.09	1.4
Mean			35.3	163.5	0.10	0.9	0.30	3.9
SD			13.0	28.4	0.02	0.41	0.31	2.81
Range			22–59	125–215	0.03–0.1	0.3–1.5	0.06–0.9	1.3–8.2

affected by interactions. However, efficacy of fungicides was always higher at 15 °C than 25 °C.

### 3.2. Effect of fungicides on T-2 and HT-2 mycotoxin production by *F. langsethiae* strains

Fig. 4 shows the effect of  $a_w$  and temperature on T-2 and HT-2 production by both strains of *F. langsethiae* at different  $a_w$ /temperature regimens in control cultures. This shows that T-2 toxin was predominantly produced by the strains with significantly less HT-2 toxin produced regardless of environmental conditions. Overall, strain M562 produced more T-2 than strain 2004-59 under the same conditions. The maximum T-2 level (11.6  $\mu\text{g/g}$ ) was found in control cultures of strain M562 incubated at 0.98  $a_w$  and 25 °C (see Fig. 4). Overall, T-2 concentration was always lower at 15 °C than at 20 or 25 °C. Levels of HT-2 were <1.5  $\mu\text{g/g}$  and this toxin was sometimes undetectable in cultures of strain M562.

The hypothesis of a normal distribution of mycotoxin data cannot be rejected with 95% confidence level according to the Shapiro–Wilk test. However, transformation of data using the expression  $\log(x+1)$ , where  $x$  is toxin concentration was carried out to improve normality. Multifactor ANOVA (without interaction, as interaction was not significant) revealed that T-2 concentration in control cultures is significantly affected ( $P \leq 0.05$ ) by  $a_w$  (less concentration at 0.96  $a_w$ ) and temperature (less concentration at 15 °C than at 25 °C) but not by the strain. Duncan's test showed two homogeneous overlapping groups with regard to the influence of temperature (15–20 °C and 20–25 °C). HT-2 production was not significantly affected ( $P > 0.05$ ) by any of the factors.

#### 3.2.1. Fenpropimorph

Fig. 5 shows the levels of T-2 and HT-2 in cultures of both strains in oat-based medium after 10 incubation days in the presence of fenpropimorph. The highest level of T-2 (6.6  $\mu\text{g/g}$ ) was produced by strain M562 at 10 mg fenpropimorph/l, 0.98  $a_w$  and 25 °C. Overall, production of both toxins decreased when fungicide dose increased. T-2 production was reduced compared with untreated controls carried out under the same conditions at all doses. However, under some conditions (0.96  $a_w$ ) a slight increase of T-2 toxin level when fungicide dose increased (from 10 to 25 mg/l) was found.

#### 3.2.2. Prochloraz

Fig. 6 shows toxin accumulation data in the presence of prochloraz. The maximum T-2 toxin level (3.7  $\mu\text{g/g}$ ) was found in cultures of strain M562 supplemented with 0.01 mg/l at 0.96  $a_w$  and 25 °C. In general, toxin levels were higher at 0.96  $a_w$  than at 0.98  $a_w$ ,

and higher in cultures of strain M562 than strain 2004-59. These levels decreased with decreasing temperature and increasing dose. No toxin was detected at doses >0.7 mg/l. At 0.98  $a_w$  detectable levels were found only at the two lowest doses. Interestingly, the 0.01 mg/l dose at 0.96  $a_w$  and 20–25 °C seemed to promote T-2 production compared with untreated cultures of strain 2004-59.

#### 3.2.3. Tebuconazole

The effect of tebuconazole on accumulation of these mycotoxins in oat-based medium is shown in Fig. 7. The maximum concentration of

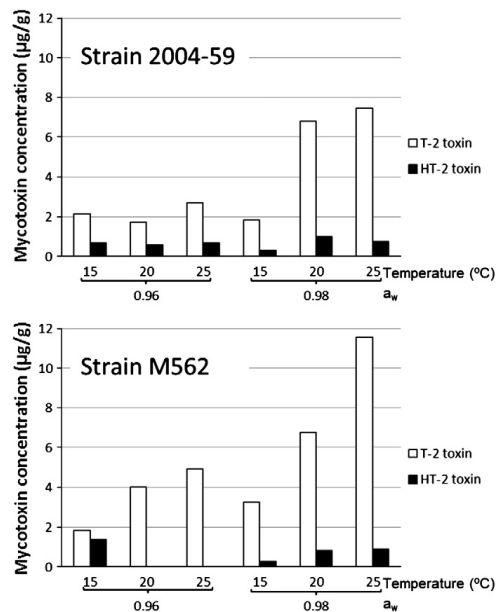


Fig. 4. Accumulation of T-2 and HT-2 toxins in (control) cultures of two strains of *F. langsethiae* in oat-based medium after 10 day incubation at 0.96 and 0.98  $a_w$  and at 15, 20 and 25 °C.

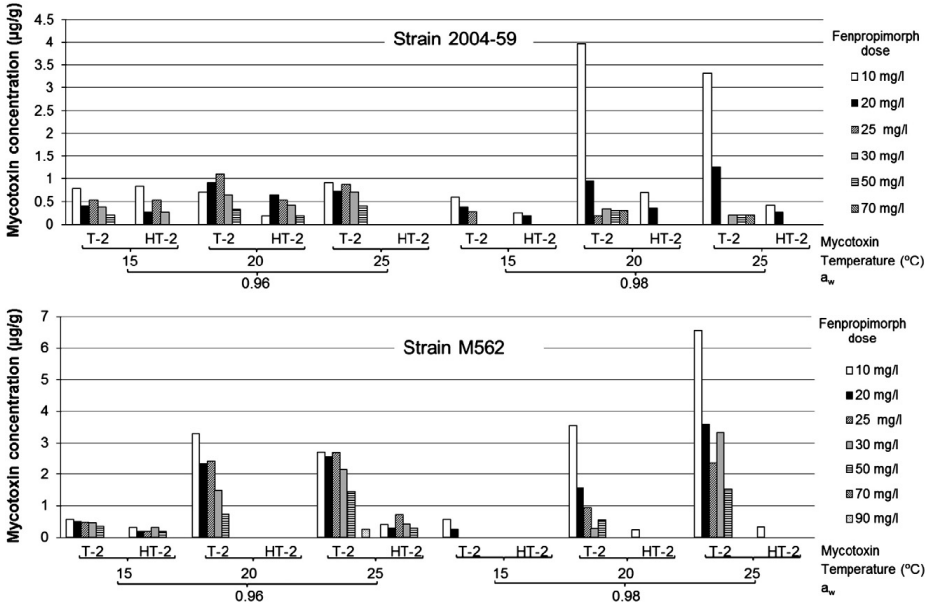


Fig. 5. Change of levels of T-2 and HT-2 toxins in oat-based medium cultures of two strains of *F. langsethiae* with different doses of fenpropimorph at 0.98 and 0.96  $a_w$  and 15, 20 and 25 °C. Incubation time was 10 days. Please refer to Fig. 4 for control data.

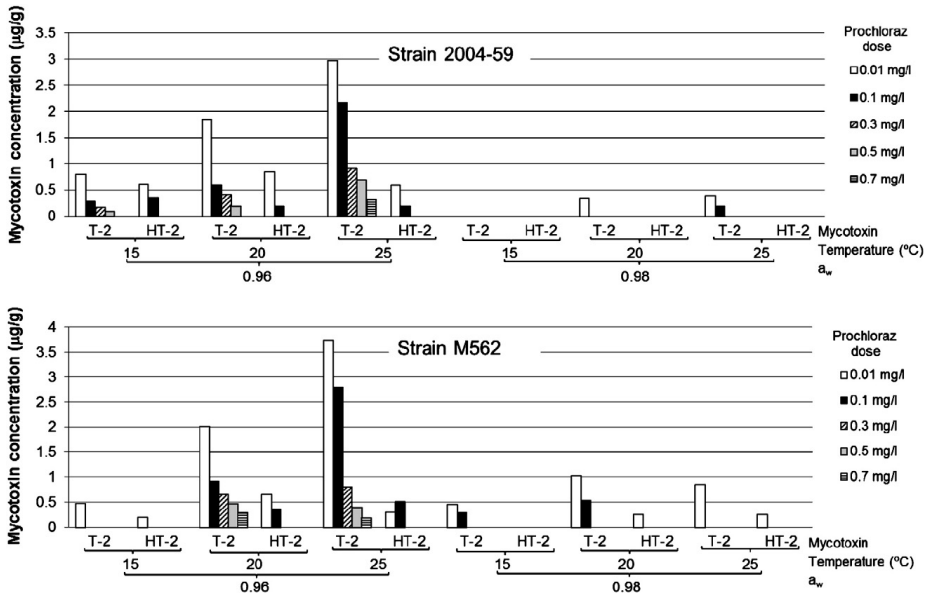


Fig. 6. Change of levels of T-2 and HT-2 toxins in oat-based medium cultures of two strains of *F. langsethiae* with different doses of prochloraz at 0.98 and 0.96  $a_w$  and 15, 20 and 25 °C. Incubation time was 10 days. Please refer to Fig. 4 for control data.

T-2 (4.4 µg/g) was recorded in cultures of strain 2004-59 at 0.96  $a_w$ , 25 °C, and 0.1 mg tebuconazole/l. Toxin levels were higher at 0.96  $a_w$  than at 0.98  $a_w$  (as happened with prochloraz) and both toxins were undetected in cultures supplemented with >2.0 mg/l. HT-2 was not usually detected at 0.98  $a_w$ . As in the case of prochloraz and unlike fenpropimorph, at low doses of tebuconazole T-2 production increased compared with untreated cultures of strain 2004-59 at 0.96  $a_w$  and 20–25 °C.

ANOVA of T-2 production data in the presence of fenpropimorph indicated that strain, temperature, and fungicide dose significantly influenced T-2 production ( $P < 0.05$ ) although the interactions  $a_w \times$  dose,  $a_w \times$  temperature and strain  $\times$  temperature were also significant. Strain M562 significantly produced more T-2 toxin than strain 2004-59. Overall, increasing temperature favoured toxin production and increasing fungicide dose caused a decrease in toxin accumulation. Duncan's test showed three homogeneous non-overlapping clusters related to temperature. HT-2 toxin production was significantly influenced by dose and  $a_w$ . The interactions strain  $\times$  temperature and  $a_w \times$  strain  $\times$  temperature were also significant.

ANOVA of T-2 production data in the presence of prochloraz showed that fungal strain did not significantly influence T-2 level but the remaining single factors did. The interactions  $a_w \times$  dose,  $a_w \times$  temperature, and temperature  $\times$  dose were also significant. Duncan's test classified the tested temperatures and doses into three different non-overlapping clusters (for dose, 0.01, 0.1 and the remaining ones). HT-2 toxin production was influenced by  $a_w$ , dose and the interactions  $a_w \times$  dose and  $a_w \times$  dose  $\times$  strain.

ANOVA and Duncan's test of T-2 production data in the presence of tebuconazole gave similar results to those obtained in media amended with prochloraz. However, in the case of HT-2 toxin all factors significantly influenced HT-2 production: its level increased with temperature and strain M562 produced less toxin than strain 2004-59.

To summarise, prochloraz and tebuconazole were more effective than fenpropimorph with regard to the reduction of T-2 toxin production. Effectiveness increased with the concentration of each antifungal agent and with decreasing temperature in the order 15 > 20 > 25 °C. Prochloraz and tebuconazole were more effective at 0.98  $a_w$  than at 0.96  $a_w$  while fenpropimorph was on average equally effective at both values. Fungal strain influenced T-2 level only in the case of fenpropimorph. Concerning reduction of HT-2 toxin production, effectiveness also increased with the concentration of each fungicide and was higher at 0.98  $a_w$  but did not change with temperature or strain, except for tebuconazole. The existence of interactions between the variables revealed by ANOVA enables the assumption that there are complex relationships that govern the production of these mycotoxins in oat-based medium amended with any of the three fungicides tested.

#### 4. Discussion

Some anti-fungal agents used in small grain cereals have been examined in detail for efficacy against strains of *F. langsethiae* in relation to both growth and production of T-2 and HT-2 toxins under different environmental conditions. This study has shown that there are complex interactions between abiotic factors, fungicides and toxin production. There are differential effects on both growth and toxin which were clearly shown by the ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> values for the three fungicides tested. This study has provided new data that suggest that relevant changes in the response of the fungi to  $a_w$  and temperature take place in the presence of sub-inhibitory concentrations of the assayed fungicides. Consequently, treatments with these antifungal substances might affect the natural presence and distribution of *F. langsethiae* and production of T-2 and HT-2 in cereals.

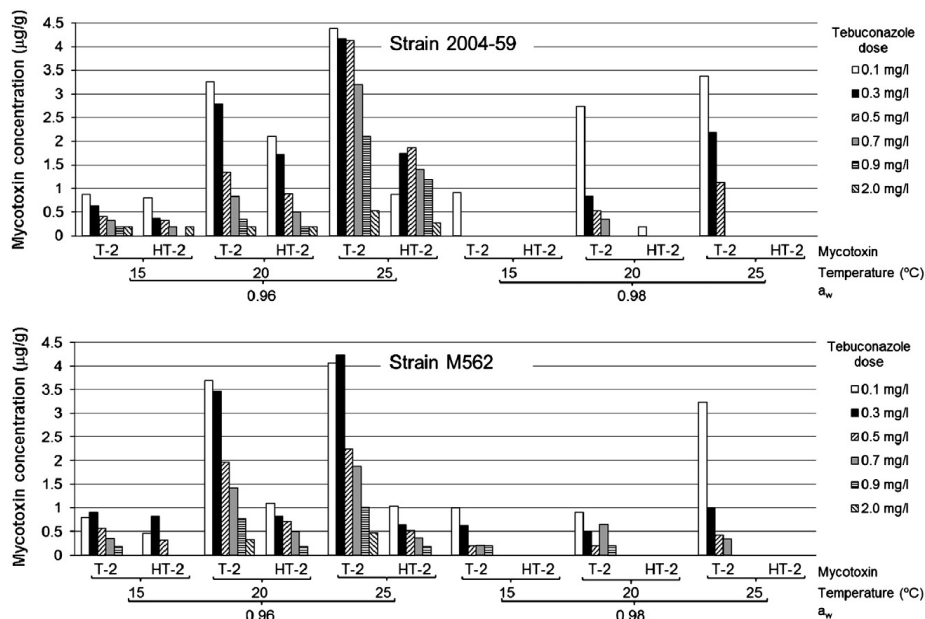


Fig. 7. Change of levels of T-2 and HT-2 toxins in oat-based medium cultures of two strains of *F. langsethiae* with different doses of tebuconazole at 0.98 and 0.96  $a_w$  and 15, 20 and 25 °C. Incubation time was 10 days. Please refer to Fig. 4 for control data.

In the absence of fungicides (controls) and under the experimental conditions, both strains grow faster at 0.98  $a_w$  than at 0.96  $a_w$  and the order of growth rate is  $25 > 20 > 15$  °C. These results agree with the recent data on the influence of these parameters on growth profiles of 8 strains of *F. langsethiae* from northern Europe (Magan et al., 2011; Medina and Magan, 2010). Production of T-2 and HT-2 in the absence of fungicides was also higher in the media where the values of  $a_w$  and temperature were higher. These results also agree with previous reports (Kokkonen et al., 2010; Medina and Magan, 2011) and might explain differences in T-2/HT-2 contamination of cereals depending on the country of origin. Scudamore et al. (2009) have found higher contamination in samples from the UK and Ireland than in samples from Scandinavia.

Even when the studied fungicides were effective in controlling growth and production of T-2 and HT-2, overall, fenpropimorph was the least effective of the three fungicides examined with higher concentrations required to inhibit growth (high ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> values). This chemical was more effective against other species, such as *Microdochium nivale* (ED<sub>50</sub> = 0.13 mg/l) (Debieu et al., 2000), although the assay conditions were different. This anti-fungal agent belongs to the morpholine group of sterol biosynthesis inhibitors (Campagnac et al., 2009; Debieu et al., 1992; Marcireau et al., 1990) and is widely used to control pathogens, such as powdery mildew, rusts and leaf blotch diseases of cereals (Leroux, 2003). The results of the present study show that the ED<sub>50</sub> of fenpropimorph against *F. langsethiae* is not significantly affected ( $P > 0.05$ ) by the factors  $a_w$ , strain and temperature or their mutual interactions. However, the ED<sub>90</sub> is significantly affected by the three single factors and the interaction  $a_w \times$  strain. These results provide interesting information that can be very useful to control *F. langsethiae* and other toxigenic fungi in cereals.

Like fenpropimorph, in general the azole-based compounds, prochloraz and tebuconazole, were more effective at 15 than at 20–25 °C. This may be important as this *Fusarium* species is known to cause problems in cooler climatic regions such as the UK, Ireland or Scandinavia, where ripening and slow drying can result in conditions conducive for this species to colonise oats. The ED<sub>50</sub> concentrations required to control growth were very similar for these two azoles. However, the ED<sub>90</sub> value for prochloraz was lower than for tebuconazole suggesting better efficacy overall in controlling growth of *F. langsethiae*. Previous studies with the efficacy of these fungicides against *Fusarium graminearum* also suggested that prochloraz was more effective *in vitro* than *in situ* (Ramírez et al., 2004). However, this was on wheat. The ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> of prochloraz and tebuconazole were determined against the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* (Serfling et al., 2007) and also showed that this pathogen was more sensitive to prochloraz than to tebuconazole. Moreover, this behaviour was similar in non-adapted and adapted strains to these fungicides. Thus, ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> of prochloraz against a non-adapted strain of *C. graminicola* was 0.004 mg/l and 0.087 mg/l, respectively, while in the adapted strain these concentrations were 0.011 and 0.720 mg/l, respectively. Against other *Fusarium* species on PDA the range was 0.24–6.5 mg/l (the less sensitive was *Fusarium crookwellense* and the most sensitive was *F. sporotrichioides*) (Mullenborn et al., 2008). All these reports and the results obtained in the present study indicate that the efficacy of these fungicides is dependent on the fungal species, strain, ecological conditions and the interactions amongst all these factors. Azoles differing in structure but exhibiting the same mode of action are used to treat fungal diseases of both plants and medical mycoses. These anti-fungal agents interfere with the metabolism of fungal pathogens, mainly by inhibition of ergosterol biosynthesis (Hewitt, 1998). Studies on the efficacy of azoles on the growth of phytopathogenic and mycotoxigenic fungi on cereals are needed to find the optimal doses for a suitable control of these fungi and to minimise the risk of resistant strain build-up.

It is concluded that, in the presence of fenpropimorph, the highest levels of T-2 and HT-2 were obtained at 0.98  $a_w$ , which was also the most favourable value for fungal growth, both in controls and in the

presence of the fungicide. Similar results were obtained in previous reports (Kokkonen et al., 2010; Medina and Magan, 2011) with *F. langsethiae* in the absence of fungicides. The results obtained in the present study show that fenpropimorph added in the range 10–70 mg/l decreases production of T-2 and HT-2 with regard to controls but does not prevent their biosynthesis under the assayed conditions.

It is worth emphasising that T-2 and HT-2 production by *F. langsethiae* in media amended with the two examined azoles was higher at 0.96  $a_w$  than at 0.98  $a_w$ . These results suggest that fungal sensitivity to these fungicides increases and toxin production is reduced in media with 0.98  $a_w$ , which is more favourable to growth. In cereals, even during pre-harvest,  $a_w$  rarely reaches values higher than 0.96. Hence, special attention should be paid to the effect that sub-inhibitory concentrations of these fungicides have on the production of T-2 and HT-2 toxins by *F. langsethiae* in crops. In the assays performed in the media amended with low doses of the two azoles the levels of T-2 and HT-2 increased under some conditions. Studied carried out with strains of different fungal species, from diverse geographical origin and isolated from different hosts also aimed to show that mycotoxin production in the presence of sub-inhibitory concentrations of some fungicides can be boosted under water or thermal stress conditions (Medina et al., 2007a,b; Ramírez et al., 2004). However, ED<sub>50</sub> or ED<sub>90</sub> was not determined or the species *F. langsethiae* was not included in these studies.

Unfortunately, as far as we know, there are no previous studies on EDs 50 and 90 of the assayed fungicides on mycotoxigenic fungi, which makes the discussion of the obtained results difficult.

Production of T-2 and HT-2 toxins was dependent on the type of fungicide and its dose, temperature,  $a_w$  and strain. The presence of any of the three fungicides produced a general decrease in the accumulation of the two toxins in cultures even at the lower doses taking the controls as references. In fungicide-containing cultures, toxin concentration generally decreased with temperature at a given dose but some exceptions were found; for example, with tebuconazole and prochloraz, HT-2 level was higher at 20 °C than at 25 °C if  $a_w$  was 0.96. At 0.96  $a_w$ , especially at 15 °C, comparable levels of T-2 and HT-2 toxin were produced by strain 2004-59. Some authors have suggested that a biotransformation of T-2 into HT-2 might occur (Lattanzio et al., 2009) and this could be boosted under conditions of physicochemical stress. This may explain, at least in part, the fact that natural oat samples contaminated with levels of HT-2 higher than T-2 have been found (Edwards, 2009a,b,c; Langseth and Rundberget, 1999).

Studies on the efficacy of fenpropimorph and azoles against phytopathogenic and mycotoxigenic fungi are very necessary not only for the control of these fungi and mycotoxins in crops but also because, especially, the azoles are extensively applied in agriculture and medicine. A relationship between the development of azole resistance in agriculture and the development of azole resistance in clinical practice may exist. It has been reported that treatment of the maize pathogen *C. graminicola* with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and boosts caspofungin, amphotericin B, and nystatin efficacy (Serfling et al., 2007). Moreover, it has been reported that tebuconazole increased T-2 toxin levels in rye and winter triticales infested with *Fusarium* spp. compared with untreated cereals (Mankeviciene et al., 2008). Deoxynivalenol (DON) production was also increased in barley crops treated with this fungicide (Malachova et al., 2010). Prothioconazole, another triazole fungicide, was found to trigger DON biosynthesis when added at sub lethal doses in cultures of *F. graminearum* (Audenaert et al., 2010). Therefore, it is very necessary to perform additional studies on the influence that ecological factors and sub-inhibitory doses of the most commonly used agricultural antifungal agents have not only on the development of fungal resistance but also on mycotoxin production. So far, the last aspect has been very scarcely investigated and no study has been published regarding *F. langsethiae* and production of T-2 and HT-2.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the financial support from FEDER and Spanish Government "Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)" (Projects AGL2007-66416-C05-01/ALI and AGL2010-22182-C04-03/ALI). Eva M. Mateo is also grateful to MICINN for a grant to perform a research visit in the Applied Mycology Group, Cranfield University (UK) and for a PhD grant. Bayer CropScience, BASF Crop Protection and Industrias Afrasa, S.A. are acknowledged for gifts of the fungicide formulations used in the present study.

## References

- Adler, A., Torp, M., 2004. The European *Sporotrichiella* project: a polyphasic approach to the biology of a new *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 95, 241–245.
- Aldred, D., Magan, N., 2004. Prevention strategies for trichothecenes. *Toxicology Letters* 153, 165–171.
- Audenaert, K., Callewaert, E., Höfte, M., De Saeger, S., Haesaert, G., 2010. Hydrogen peroxide induced by the fungicide prothioconazole triggers deoxynivalenol (DON) production by *Fusarium graminearum*. *BMC Microbiology* 10, 112.
- Beasley, V.R. (Ed.), 1989. Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological Effects, Vols. 1 and 2. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Campagna, E., Fontaine, J., Louñès-Hadj Sahraoui, A., Lanuelle, F., Durand, R., Grandmougin-Ferjani, A., 2009. Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* 19, 365–374.
- Canady, R.A., Coker, R.D., Egan, S.K., Kraska, R., Olsen, M., Resnik, S., Schlatter, J., 2001. T-2 and HT-2 toxins. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO Food and Nutrition Paper* 74. In: WHO (Ed.), WHO Food Additives Series 47, Geneva, Switzerland, pp. 557–680.
- Debieu, D., Gall, C., Gredt, M., Bach, J., Malosse, C., Leroux, P., 1992. Ergosterol biosynthesis and its inhibition by fenpropimorph in *Fusarium* species. *Phytochemistry* 3, 1223–1233.
- Debieu, D., Bach, J., Lasseron, A., Arnold, A., Brousset, S., Gredt, M., Taton, M., Rahier, A., Malosse, C., Leroux, P., 2000. Inhibition of ergosterol biosynthesis by morpholine, piperidine, and spiroketalamine fungicides in *Microdochium nivale*: effect on sterol composition and sterol  $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ -isomerase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 67, 85–94.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Bonte, L., 1997. The effects of difenoconazole on 3-acetyldeoxynivalenol synthesis by *Fusarium culmorum*: implications for cereal quality. *Crop Protection and Food Quality: Meeting Customers Needs, Proceedings of BPCP and ANPP Conference*, Kent, UK, pp. 463–466.
- D'Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., Postel, D., Dijkstra, W.T.P., Dujardin, A., Placinta, C.M., 1998. Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology* 104, 741–751.
- Edwards, S.G., 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters* 153, 29–35.
- Edwards, S.G., 2007a. Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK barley and oat production. HGCA Project Report No. 415. HGCA, London.
- Edwards, S.G., 2007b. Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK wheat production. HGCA Project Report No. 413. HGCA, London.
- Edwards, S.G., 2009a. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants* 26, 496–506.
- Edwards, S.G., 2009b. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants* 26, 1063–1069.
- Edwards, S.G., 2009c. *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants* 26, 1185–1190.
- Commission, European, 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December, 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L364, 5.
- Hewitt, A.F., 1998. Fungicides in Plant Protection. CAB International, Wallingford.
- Hope, R.J., Colleate, A., Baxter, E.S., Magan, N., 2002. Interactions between environmental stress and fungicides effect growth and mycotoxin production by *Fusarium culmorum* isolates from wheat grain. *European Journal of Plant Pathology* 108, 685–690.
- Imathiu, S.M., Ray, R.V., Back, M., Hare, M.C., Edwards, S.G., 2009. *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded *in vitro* detached leaf assays. *European Journal of Plant Pathology* 124, 117–126.
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P., Jestoi, M., 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* 143, 17–25.
- Langseth, W., Rundberget, T., 1999. The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia* 147, 157–165.
- Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M., Visconti, A., 2009. Enzymatic hydrolysis of T-2 toxin for the quantitative determination of total T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395, 1325–1334.
- Leroux, P., 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies* 326, 9–21.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Logrieco, A., Jiménez, M., 2004a. Influence of the interactions among ecological variables in the characterization of zearalenone producing isolates of *Fusarium* spp. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 253–260.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M.J., Jiménez, M., 2004b. Influence of environmental factors on the biosynthesis of the type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology* 94, 43–54.
- Logrieco, A., Visconti, A. (Eds.), 2004. An Overview on Toxicogenic Fungi and Mycotoxins in Europe. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 252 pp.
- Magan, N., Aldred, D., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119, 131–139.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A., Baxter, E.S., 2002. Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology* 108, 685–690.
- Magan, N., Medina, A., Aldred, D., 2011. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology* 60, 150–163.
- Malachova, A., Cerkal, R., Ehrenbergerova, J., Dzman, Z., Vaculova, K., Hajslova, J., 2010. *Fusarium* mycotoxins in various barley cultivars and their transfer into malt. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2495–2505.
- Mankevičienė, A., Gaurickienė, I., Supronienė, S., 2008. The infestation of winter rye and triticale grain with *Fusarium* as affected by fungicide. *Proc. of the 3rd Int. FHB Symposium, Szeged, Hungary: Cereal Research Communications*, 36, Suppl. B6, pp. 683–688.
- Marcireau, C., Guilloton, M., Karst, F., 1990. *In vivo* effects of fenpropimorph on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and determination of the molecular basis of the antifungal property. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 34, 989–993.
- Matthies, A., Walker, F., Buchenauer, H., 1999. Interference of selected fungicides, plant growth retardants as well as piperonyl butoxide and 1-aminobenzotriazole in trichothecene production of *Fusarium graminearum* (strain 4528) *in vitro*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106, 198–212.
- Medina, A., Mateo, R., Valle-Algarra, F.M., Mateo, E., Jiménez, M., 2007a. Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 119, 230–235.
- Medina, A., Jiménez, M., Mateo, R., Magan, N., 2007b. Natamycin efficacy for control of growth and ochratoxin production by *Aspergillus carbonarius* isolates under different environmental regimes. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2234–2239.
- Medina, A., Valle-Algarra, F.M., Jiménez, M., Magan, N., 2010. Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media. *Journal of Chromatography B* 878, 2145–2149.
- Medina, A., Magan, N., 2010. Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology* 142, 365–369.
- Medina, A., Magan, N., 2011. Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology* 28, 392–398.
- Moss, M.O., Frank, J.M., 1985. Influence of the fungicide tridemorph on T-2 toxin production by *Fusarium sporotrichioides*. *Transactions of the British Mycological Society* 84, 585–590.
- Mullenborn, C., Steiner, U., Ludwig, M., Oerke, U.-C., 2008. Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology* 120, 157–166.
- Pateraki, M., Dekanea, A., Mitchell, D., Lydakis, D., Magan, N., 2007. Influence of sulphur dioxide, controlled atmospheres and water availability on *in vitro* germination, growth and ochratoxin A production by strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. *Postharvest Biology and Technology* 44, 141–149.
- Placinta, C.M., Macdonald, A.M.C., D'Mello, J.P.F., Harling, R., 1996. The influence of carbendazim on mycotoxin production in *Fusarium sporotrichioides*. *Proceedings of The Brighton Crop Protection Conference British Crop Protection Council, Farnham, UK*, pp. 415–416.
- Prelusky, D.B., Rotter, B.A., Rotter, R.G., 1994. Toxicology of mycotoxins. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), *Mycotoxins in Grain: Compounds Other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, pp. 359–404.
- Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23, 117–125.
- Ramirez, M.L., Chulze, S., Magan, N., 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology* 106, 291–296.
- Schmidt, H., Niessen, L., Vogel, R.F., 2004. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*-evidence for *F. langsethiae* as a new species. *International Journal of Food Microbiology* 95, 305–319.
- Schuhmacher-Wolz, U., Heine, K., Schneider, K., 2010. Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins. CT/EFSA/CONTAM/2010/03. Available online: [http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/656.htm?WT.mc\\_id=4EFSALD1&emf41](http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/656.htm?WT.mc_id=4EFSALD1&emf41).
- Scudamore, K.A., Baillie, H., Patel, S., Edwards, S.G., 2007. Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Additives and Contaminants* 24, 1374–1385.
- Scudamore, K.A., Patel, S., Edwards, S.G., 2009. HT-2 toxin and T-2 toxin in commercial cereal processing in the United Kingdom, 2004–2007. *World Mycotoxin Journal* 2, 357–365.
- Serfling, A., Wöhrab, J., Deising, H.B., 2007. Treatment of a clinically relevant plant-pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 3672–3676.

- Thrane, U., Adler, A., Clasen, P.-E., Galvano, F., Langseth, W., Lew, H., Logrieco, A., Nielsen, K.F., Ritieni, A., 2004. Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides*. International Journal of Food Microbiology 95, 257–266.
- Torp, M., Adler, A., 2004. The European *Sporotrichiella* project: a polyphasic approach to the biology of new *Fusarium* species. International Journal of Food Microbiology 95, 257–266.
- Torp, M., Langseth, W., 1999. Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. Mycopathologia 147, 89–96.
- Torp, M., Nirenberg, H.I., 2004. *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. International Journal of Food Microbiology 95, 247–256.
- Tzatzarakis, M.N., Tsatsakis, A.M., Charvalos, E., Vakalounakis, D., 2001. Activities of amphotericin, clotrimazole, econazole, miconazole and nystatin against *Fusarium oxysporum*. Journal of Environmental Science and Health. Part. B 36, 331–340.
- Wilson, A., Simpson, D., Chandler, E., Jennings, P., Nicholson, P., 2004. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. FEMS Microbiology Letters 233, 69–76.
- Xu, X.M., Parry, D.W., Nicholson, P., Thomsett, M.A., Simpson, D., Edwards, S.G., et al., 2005. Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. European Journal of Plant Pathology 112, 143–154.
- Yli-Mattila, T., Mach, R.L., Alekhina, I.A., Bulat, S.A., Koskinen, S., Kullnig-Gradinger, C.M., Kubicek, C.P., Klemsdal, S.S., 2004. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *F. poae* and *F. sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS and  $\beta$ -tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. International Journal of Food Microbiology 95, 267–285.
- Yli-Mattila, T., Paavainen-Huhtala, S., Parikka, P., Hietaniemi, V., Jestoi, M., Gagkaeva, T., Sarlin, T., Haikara, A., Laaksonen, S., Rizzo, A., 2008. Real-time PCR detection and quantification of *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae* as compared to mycotoxin production in grains in Finland and Russia. Archives of Phytopathology and Plant Protection 41, 243–260.

## Artículo 5

---

**Mateo, Eva M.**, Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., Magan, N. Impact of three sterol-biosynthesis inhibitors on growth of *Fusarium langsethiae* and on T-2 and HT-2 toxin production in oat grain under different ecological conditions. *Food Control*, 34: 521-529. 2013.







## Impact of three sterol-biosynthesis inhibitors on growth of *Fusarium langsethiae* and on T-2 and HT-2 toxin production in oat grain under different ecological conditions

E.M. Mateo<sup>a,b</sup>, F.M. Valle-Algarra<sup>b</sup>, M. Jiménez<sup>b</sup>, N. Magan<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Applied Mycology Group, Cranfield Health, Cranfield University, Cranfield, Bedfordshire MK43 0AL, UK

<sup>b</sup> Department of Microbiology and Ecology, Valencia University, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 February 2013

Received in revised form

1 May 2013

Accepted 7 May 2013

#### Keywords:

*Fusarium langsethiae*  
Trichotheceus type A  
Oat grain  
Fenpropimorph  
Prochloraz  
Tebuconazole

### ABSTRACT

The health-beneficial properties of oats have led to an increase in the consumption of oats and oat-based food products in recent years. *Fusarium langsethiae* grows on small grain cereals, especially oats and can result in contamination with type A trichotheceus (T-2 toxin (T-2) and HT-2 toxin (HT-2)) in crops pre- and post-harvest. The aim of this work was to assess the efficacy of three fungicides (fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole) on temporal growth of two *F. langsethiae* strains and the accumulation of T-2 and HT-2 in oat grains, under different water activities ( $a_w$ : 0.95 and 0.98) and temperatures (15 and 25 °C). All the antifungal agents reduced growth rates when compared to controls, and this increased with increasing fungicide dose. The ranges of ED<sub>50</sub> values (mg/kg) were 65–270 for fenpropimorph, 0.25–4.2 for prochloraz, and 0.3–14 for tebuconazole. The ED<sub>90</sub> values (mg/kg) ranged from 170 to > 800, 0.5 to > 10 and 0.5 to > 15 for these three fungicides respectively. The ED<sub>50</sub> values were not statistically significantly affected by the factors  $a_w$ , temperature or strain. However, there were significant differences among the fungicides. Fenpropimorph proved less efficient than the two azoles, which do not differ significantly. In general, levels of HT-2 were higher than T-2 in all cultures regardless of environmental conditions. Overall, HT-2 concentration was always higher at 25 than 15 °C and increased from day 14 to day 21. Levels of both toxins generally decreased with increasing fungicide dose regardless of fungicide type, strain and incubation time. No toxins were detected in cultures at 0.95  $a_w$  in the presence of any of the three fungicides. Also under wetter conditions at 0.98  $a_w$  neither mycotoxin was found in cultures treated with prochloraz at doses > 1 mg/kg (15 °C) or > 3 mg/kg (25 °C) or tebuconazole at doses > 6 mg/kg (15 or 25 °C). ANOVA showed that in treatments with each fungicide the factors dose, time and temperature significantly affected toxin production while there was no difference between the strains.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

There has been increased consumer awareness of the health-promoting properties of oats and its by-products characterized by good taste, dietetic properties, high beta-glucan content and anti-carcinogenic effects (Gallaher, 2000; Salminen et al., 1998). Beta-glucan is known as a prebiotic, stimulating the growth of some beneficial residential colon microorganisms such as bifidobacteria (Connolly Lovegrove, & Tuohy, 2010; Jaskari et al., 1998; Wood & Beer, 1998). Because of these benefits, oats are becoming popular as part of a healthy diet for both humans and animals (Biel, Bobko, & Maciorowski 2009; Flander, Sanmenkallio-Marttila, Suortti, &

Autio, 2007; Peltonen-Sainio, Kontturi, & Rajala, 2004; Ryan, Thondre, & Henry, 2011) and new oat-based functional food products have been developed (Angelov, Gotcheva, Kuncheva, & Hristozova, 2006; Gupta, Cox, & Abu-Ghannam, 2010).

*Fusarium langsethiae* has been isolated from infected oats, wheat and barley in central and northern Europe (Torp & Adler, 2004; Torp & Langseth, 1999; Torp & Nirenberg, 2004). This species has been implicated in the production of high levels of T-2 and HT-2 toxins in cereals, especially in oats (Edwards, 2007, 2009a, 2009b, 2009c; Langseth & Rundberget, 1999; Scudamore, Baillie, Patel, & Edwards, 2007; Scudamore, Patel, & Edwards, 2009; Torp & Langseth, 1999). This mycotoxigenic species is difficult to detect because it does not produce any visible symptoms on the oat grains. *F. langsethiae* is closely related to *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium sibiricum*, a novel type A trichothece producing *Fusarium* species recently identified by Yli-Mattila et al. (2011) and isolated from cereals

\* Corresponding author. Tel.: +44 1234 758308; fax: +44 1234 758380.  
E-mail address: [n.magan@cranfield.ac.uk](mailto:n.magan@cranfield.ac.uk) (N. Magan).

grains in Siberia and the Russian Far East (Burkin, Soboleva, & Kononenko, 2008).

T-2 toxin (T-2) is a potent inhibitor of DNA, RNA, protein synthesis and mitochondrial function. It shows immunosuppressive and cytotoxic effects both *in vivo* and *in vitro* and induces DNA fragmentation characteristic of apoptosis (Bouaziz et al., 2008; Caloni Ranzenigo, Cremonesi, & Spicer, 2009; Schuhmacher-Wolz, Heine, & Schneider, 2010). T-2 is readily metabolized to HT-2 toxin (HT-2) *in vivo* and *in vitro* (Dohnal, Jezkova, Jun & Kuca, 2008; Königs, Mulac, Schwerdt, Gekle, & Humpf, 2009). The few comparative data available on T-2 and HT-2 indicate that they induce adverse effects with similar potency (WHO, 2001; Schuhmacher-Wolz et al., 2010).

The interest in the area of food safety is increasing. Risk managers may face the problem that reducing the risk of one compound may increase the risk of another compound (Muri, Van der Voet, Boon, Van Klaveren, & Brüscheweiler, 2009). An example is the potential increase in mycotoxin levels due to a reduced use of fungicides in crop production (Finamore et al., 2004; Juan, Moltó, Lino, & Mañes, 2008). Other studies have found a higher extent of contamination in conventional than in organic food (Birzele, Meier, Hindorf, Jramer, & Dehne, 2002; Edwards, 2009b, 2009c). Overall, from a food safety point of view, the health risks associated with fungicide residues in foods are considered a lower risk than the potential impacts of mycotoxins on public health (Muri et al., 2009).

However, studies are needed to determinate the sensitivity of the most relevant mycotoxigenic species to fungicides commonly used in cereal production systems and the influence these treatments have on mycotoxin production (Magan, Hope, Colleate, & Baxter, 2002). These studies should concurrently cover the influence and interactions of ecological variables linked to climate, such as humidity and temperature, on mycotoxigenic fungal growth and on biosynthesis of mycotoxins. This is important, for example, in predictive studies on the occurrence of different mycotoxins in various agro-climatic regions and under the pressure of regional and global climate change (Magan, Medina, & Aldred 2011). The suitable selection of fungicides and their doses avoiding the risks related to their usage (poor or excessive) constitutes a priority.

Fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole are antifungal agents extensively applied in agriculture to control fungal growth in cereals and other crops in many European countries. However, little is known about the impact of sub-lethal doses of these fungicides on the accumulation of mycotoxins in cereal grain (Ramírez, Chulze, & Magan, 2004). To our knowledge, the only previous study which compared the *in vitro* efficacy of these fungicides against *F. langsethiae* was reported by Mateo, Valle-Algarra, Mateo-Castro, Jiménez, & Magan (2011). Fenpropimorph belongs to the morpholine group of sterol biosynthesis inhibitors (Campagnac et al., 2009) and is widely used to control pathogens, such as powdery mildew, rusts and leaf blotch diseases of cereals (Leroux, 2003). Prochloraz and tebuconazole, two azoles that differ in structure but exhibit the same mode of action, are used to treat both fungal diseases of plants and medical mycoses. These antifungal agents interfere with the metabolism of fungal pathogens, mainly by inhibition of ergosterol biosynthesis (Hewitt, 1998). No studies have been carried out to examine the effect of these antifungal agents on growth of *F. langsethiae* strains or their ability to produce T-2 and HT-2 in oat grain.

The aims of the present study were: (i) to assess the efficacy (ED<sub>50</sub>, 50% effective dose and ED<sub>90</sub>, 90% effective dose) of fenpropimorph, prochloraz, and tebuconazole under different ecological conditions (temperature,  $a_w$  and their possible interactions), on growth of two strains of *F. langsethiae* in oat grain; (ii) to determine the effect of each variable and its interactions on T-2 and HT-2 production in oats.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Fungal strains and growth conditions

Two strains of *F. langsethiae*, 2004/59 and M562, isolated from oats in the UK and Sweden, respectively, were used. These strains are held in the Applied Mycology Group Culture Collection (Cranfield University, UK). They were kindly provided by Prof. S. Edwards, Harper Adams University College, U.K. and Dr. M. Olsen, Swedish Food Authority, Sweden. Strains were preserved in 15% glycerol at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Before carrying out the study about efficacy of fungicides and influence of ecological factors on growth and mycotoxin accumulation, the strains were grown on 3% oat agar. Milled oat was prepared by homogenization for 5 min in a Waring laboratory science homogenizer model 7009G (Waring Laboratory Science, CT, USA). A mixture of 3% (w/v) oat flour in water was prepared and 2% (w/v) agar was added. The culture medium was autoclaved for 20 min at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The medium was poured into 9-cm diameter Petri dishes. The two strains of *F. langsethiae* were inoculated and incubated for 7 days at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . These fresh cultures were used to prepare inocula for further experiments on efficacy of fungicides on fungal growth and toxin production in oat grains.

### 2.2. Effect of environmental conditions and fungicides on growth. Growth evaluation in oat grain cultures

The active ingredient, product name, concentration and company of the fungicides used in this study were the following: fenpropimorph (Funbas<sup>®</sup>, EC 750 g a.i./l, BASF Crop Protection, Spain), prochloraz (Dogma<sup>®</sup> 400 g a.i./l, Industrias Afrasa S.A., Paterna, Valencia, Spain) and tebuconazole (Folicur<sup>®</sup> 250 g a.i./l, Bayer CropScience, Paterna, Valencia, Spain). Diluted solutions of the fungicides were prepared by mixing appropriate amounts of each fungicide (based on concentration of the a.i.) in sterile deionized water and used immediately after preparation.

Oat grains (15 g), previously analysed to ensure they had undetectable levels of T-2 and HT-2, were placed in Erlenmeyer flasks and autoclaved for 20 min at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Then, the water activity was adjusted to 0.95 and 0.98 by addition of sterile distilled water using a moisture adsorption curve. An appropriate aliquot of water was replaced by solution of a suitable fungicide treatment (prochloraz, tebuconazole or fenpropimorph) to obtain the final target concentrations of each fungicide. Preliminary experiments were performed to choose the range of concentrations for each fungicide to be added to obtain dose–response curves. Based on these assays the doses used were: fenpropimorph (100, 200, 300 and 800 mg/kg), prochloraz (0.1, 1.0, 3.0 and 10.0 mg/kg) and tebuconazole (0.5, 2.0, 6.0 and 15.0 mg/kg). Controls containing only water were also prepared.

Flasks with oats, with and without fungicides, were refrigerated at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 48 h with periodic shaking to allow adsorption and equilibration and a good distribution of the fungicides. At the end of this period,  $a_w$ -values were checked with an Aqualab Series 3 (Labcell Ltd., Basingstoke, Hants, UK). The hydrated oat grains were placed in sterile 9-cm Petri dishes to form a layer of grains (15 g). All treatments were inoculated centrally with a 3-mm diameter agar disk taken from the margin of a 5–7-day-old growing colonies. Inoculated Petri plates of same  $a_w$  were enclosed in sealed plastic containers together with beakers of a glycerol-water solution matching the same  $a_w$  as the treatments to maintain a constant equilibrium relative humidity inside the boxes. The experiments were carried out in triplicate and repeated once. Treatments were incubated at 15 and  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  and two sampling-time periods used (14 and 21 days).

Assessment of growth was made every day during the incubation period by measurement of two diameters of the growing colonies at right angles to each other until the colony reached the edge of the plate. The radii of the colonies were plotted against time, and linear regression applied in order to obtain the growth rate (mm/day) as the slope of the line. The growth rates (GR) of each strain under the different assayed conditions was plotted against fungicide doses to calculate the ED<sub>50</sub> (50% effective dose: concentration or dose that reduces growth rate to 50% compared with that observed in the absence of fungicide) and ED<sub>90</sub> values at each temperature and  $a_w$  level. After 14 and 21 days incubation, three replicates per treatment were dried at 50 °C for 24 h, milled, and stored at –20 °C until T-2 and HT-2 determination was carried out.

### 2.3. Chemical analysis

#### 2.3.1. Preparation of standard solutions

Standards of T-2 and HT-2 were supplied by Sigma (Sigma–Aldrich, Alcobendas, Spain). Each standard of T-2 and HT-2 was dissolved in acetonitrile at a concentration of 1.0 mg/ml and stored at –20 °C in a sealed vial until use. Working standards (10, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 and 0.02 mg/l) were prepared by appropriate dilution of known values of the stock solution with acetonitrile and used to obtain calibration curves.

#### 2.3.2. Extraction and clean-up of T-2 and HT-2 from oat grains

Under natural conditions fungal growth and mycotoxin production in cereals usually occur from specific sites, which may be constituted by one or a few seeds infected by the fungus and infection expands radially due to contact with the surrounding seeds. Hence, it is necessary to follow suitable practices for sampling and homogenizing the samples before mycotoxin analysis (Commission Regulation, 2006). In the present experiment, 15 oat grains, distributed as a homogenous layer on a Petri dish, were taken for all assays. To determinate toxin concentration in the cultures all the oats were used regardless of the colony diameter reached after 14 and 21 days incubation. Grains were milled and homogenised.

Two g of milled oat grain from each treatment was placed into a 50-ml screw-capped tube for trichothecene extraction. Fifteen ml of solvent mixture (acetonitrile–water, 84:16, v/v) was added and the tube was shaken in an orbital shaker (Infors-HT Aerotron, Bottmingen, Switzerland) for 90 min. The extract was filtered through Whatman No. 4 filter paper. The filtrate was kept at –20 °C until used. Solid-phase extraction cartridges containing alumina, charcoal and C18 were prepared as described by Valle-Algarra et al. (2005). Three ml of filtrate sample extract was passed through the cartridge using a manifold and collected into a vial. The cartridge was washed with 2 ml of the same extraction solvent. The eluate was collected in the same vial and the extract was dried at 45 °C, under a gentle stream of nitrogen. The dried extract was redissolved in 250 µl of Milli-Q pure water with help of a vortex mixer. Fifty µl of re-dissolved extract was injected into the chromatographic system.

#### 2.3.3. Chromatographic analysis

The LC system consisted of a Waters 600E system controller, a Waters 717 Plus autosampler and a Waters 996 UV diode array detector (DAD) (Waters, Milford, MA, USA). T-2 and HT-2 were separated using a C18 Zorbax Eclipse Plus<sup>®</sup> (150 × 4.6 mm, 3.5 µm) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), with a guard column of the same material.

Analysis was performed in the gradient mode using water (A) and acetonitrile (B) solvents. Gradient conditions were initiated by holding the mobile phase composition for 3 min with 30% B. After

that, it was linearly changed to 55% B during 18 min. The composition was then changed to 99% B in 1 min and maintained for 5 min as a cleaning step to improve results. After cleaning, the eluent composition was returned to the initial 30% B. The flow-rate of the mobile phase was 1 ml/min (Medina, Valle-Algarra, Jiménez, & Magan 2010).

#### 2.3.4. Validation of the analytical method

The analytical method used for T-2 and HT-2 was assessed for selectivity, linearity, and precision. Selectivity was checked by injecting three times 50 µl of T-2 and HT-2 standard solutions before injecting extracted samples and comparing the peak retention times and the UV spectra of the substances that produce these peaks. Linearity was assessed by performing triplicate injections of standard solutions whose concentrations were in the 0.02–10 mg/l range for both mycotoxins. Standard curves were generated by linear regression of peak areas against concentrations. Table 1 shows some data related to analytical method validation. Precision and recovery were established by determination of T-2 and HT-2 in oat grain, covering the range of the method. Recovery was determined by comparing the levels found in spiked oat grain samples with the amount of standards added (Table 1). Recovery ratios between 60% and 135% and RSD <30% for precision were considered as acceptable (Commission Regulation, 2006).

The limit of detections (LOD) were considered as the T-2 and HT-2 concentrations that provide a signal equal to  $b + 3S_b$ , where  $b$  is the intercept of the respective calibration curves and  $S_b$  is the standard error of the estimate assuming to be the blank. The limit of quantification (LOQ) was considered equal to  $3 \times LOD$  (Miller & Miller, 2000, p. 36).

#### 2.3.5. Statistical analysis

The data were treated by multifactor ANOVA and Duncan's test of multiple comparisons using Statgraphics Centurion XV.2.11 software (Statpoint Inc., VA, USA). A 95% confidence level was used to assess influence of individual and interacting treatments.

## 3. Results

The growth rates (GR) of the two strains of *F. langsethiae* on oats under all the treatment conditions assayed are shown in Figs. 1 and 2. In general, growth was faster at 25 than 15 °C, regardless of  $a_w$  and at 0.98 than 0.95  $a_w$ , regardless of temperature. The GR also decreased with increasing fungicide dose regardless of  $a_w$ , temperature and strain. However, different response profiles were observed for the different fungicides. The results on the efficacy of the three assayed fungicides against growth of the two isolates of *F. langsethiae* were used to calculate the ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> of each fungicide under all the assayed conditions. These are shown in Table 2.

The ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> values for fenpropimorph were in the ranges 65–270 mg/kg and 170 to more than 800 mg/kg, respectively (Table 2). At 0.98  $a_w$  the ED<sub>50</sub> values were lower at 15 °C than at 25 °C but at 0.95  $a_w$  differences are unclear. However, ANOVA

**Table 1**  
Validation of the analytical method for determination of T-2 and HT-2 toxins.

Mycotoxin	Spiking level (mg/kg)	Recovery (%)	RSD (%)	LOD (mg/kg)
T-2	1.00	107.5	3.1	0.008
	0.25	113.2	5.4	
	0.05	105.3	12.6	
HT-2	2.00	104.3	3.4	0.018
	0.50	99.7	10.9	
	0.10	112.5	27.4	

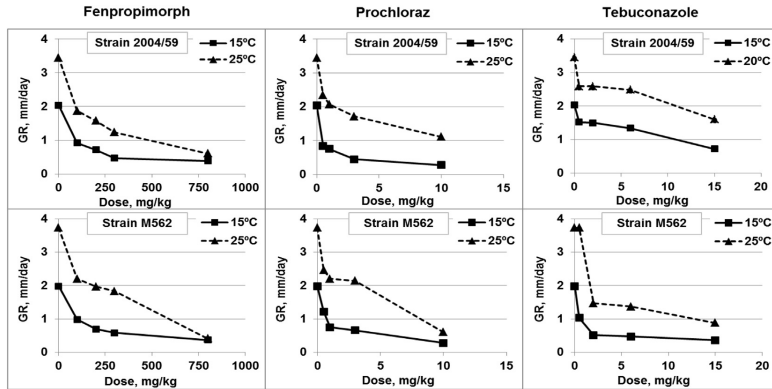


Fig. 1. *In vitro* efficacy of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole against two *F. langsethiae* strains at 15 and 25 °C at 0.98  $a_w$  in oat grains.

revealed that the ED<sub>50</sub> of this fungicide was not significantly affected ( $P < 0.05$ ) by temperature,  $a_w$  or the strain used. The assayed doses of fenpropimorph were unable to reach an ED<sub>90</sub> under all the experimental conditions.

The ED<sub>50</sub> values for the two azoles (prochloraz and tebuconazole) were lower than for fenpropimorph. The ranges of ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> for prochloraz were 0.25–4.2 mg/kg and 0.5 to more than 10 mg/kg, respectively. For tebuconazole the ED<sub>50</sub> range was 0.3–14 mg/kg and the ED<sub>90</sub> range was 0.5 to more than 15 mg/kg (Table 2). In the experiments carried out at 0.98  $a_w$  the ED<sub>50</sub> values of both azoles were lower at 15 °C than at 25 °C, especially in the case of prochloraz. However, ANOVA revealed that the ED<sub>50</sub> values were not significantly affected ( $P < 0.05$ ) by any of the three factors studied ( $a_w$ , temperature and strain). As for fenpropimorph, the efficacy of the azoles meant that ED<sub>90</sub> values could not be calculated at 0.98  $a_w$  regardless of the temperature.

The efficacy of the three fungicides to inhibit growth of the two isolates of *F. langsethiae* was in the order prochloraz > tebuconazole > fenpropimorph (Figs. 1 and 2). ANOVA analyses

showed that there were significant differences among the fungicides. The Duncan's test showed that fenpropimorph is less efficient than the two azoles, which form a homogeneous group ( $P < 0.05$ ).

All oat grain cultures of the two *F. langsethiae* strains under all the assayed conditions were analysed to find the levels of T-2 and HT-2. Figs. 3 and 4 show the effect of temperature, incubation time, class of fungicide and their dose on T-2 and HT-2 concentration in colonised oats at 0.98  $a_w$ . The conditions under which fungal growth occurred but at which no mycotoxin was detected have been omitted in these Figs. 3 and 4. No T-2 or HT-2 was detected in colonised oats at 0.95  $a_w$ , except in the controls (without fungicides) incubated at 25 °C for 21 days. In the controls of strain 2004/59 levels of T-2 and HT-2 were 9.0 and 38.5 mg/kg while in controls of strain M562 levels of T-2 and HT-2 were 3.5 and 10.3 mg/kg. Ranges of temperature,  $a_w$  and fungicide dose were narrower for toxin production than for fungal growth.

In general, concentrations of HT-2 were higher than those of T-2 in oats regardless of environmental conditions. Overall, HT-2 concentration was always higher at 25 °C than at 15 °C and levels of

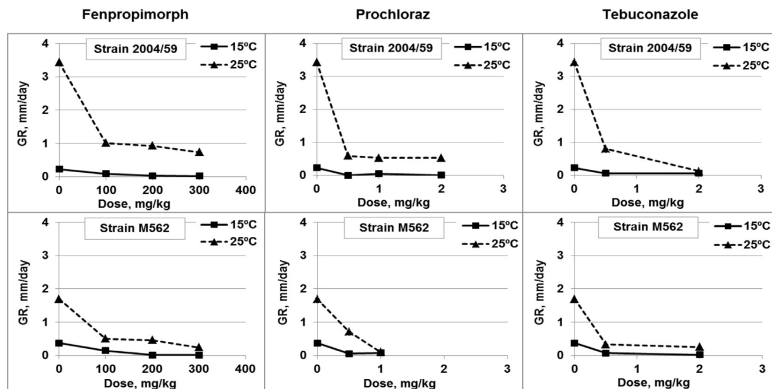


Fig. 2. *In vitro* efficacy of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole against two *F. langsethiae* strains at 15 and 25 °C at 0.95  $a_w$  in oat grains.

**Table 2**  
ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub> (mg/kg) of three fungicides against two strains of *Fusarium langsethiae* growing on autoclaved oat grain.

Strain	$a_w$	Temperature (°C)	Fungicide					
			Fenpropimorph		Prochloraz		Tebuconazole	
			ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>
2004/59	0.95	25	65	>300	0.5	1.1	1.2	3
		15	75	300	0.43	1.8	1.2	>4
	25	120	>800	2.8	>10	18	>20	
M562	0.95	25	90	>800	0.8	>10	14	>20
		15	60	>200	0.7	1.5	1.1	>4
	25	80	180	0.4	>1.6	1.1	4.5	
0.98	25	280	810	4.8	>10	4	>20	
	15	100	>800	1.8	>10	4	>20	

both toxins increased from day 14 to day 21. Levels of both toxins generally decreased with increasing fungicide dose regardless of fungicide type, strain and incubation day.

In control cultures (without fungicide), and under the experimental conditions, the maximum HT-2 level (66.6 mg/kg) was detected in oats colonised by strain 2004/59 at 25 °C after 21 days. The highest T-2 level (24.9 mg/kg) was found in oats colonised by strain M562 at 25 °C, after 21 days.

In treatment cultures of strain 2004/59 (Fig. 3), the maximum HT-2 level was found with 0.5 mg tebuconazole/kg at 25 °C, on day 21. The highest T-2 concentration was found with prochloraz at 0.1 mg/kg, at 25 °C on day 21. T-2 was undetectable in cultures supplied with high doses of fenpropimorph (15 °C, 14 days).

In treatment cultures of strain M562 (Fig. 4) the highest HT-2 level was found with 0.1 mg prochloraz/kg at 25 °C on day 21. The lowest level was found in cultures treated with 200 mg

fenpropimorph/kg or 3 mg prochloraz/kg. The highest T-2 level was found with prochloraz at 0.1 mg/kg at 25 °C on day 21.

Both toxins were undetectable at fenpropimorph doses >200 mg/kg (15 °C) or >300 mg/kg (25 °C) or at prochloraz doses >1 mg/kg (15 °C) or >3 mg/kg (25 °C) or tebuconazole at doses >6 mg/kg (15 °C and 25 °C).

Water activity was not considered for statistical treatments because its influence on toxin production is clear: no toxin was detected at 0.95  $a_w$  in the presence of any of the three fungicides.

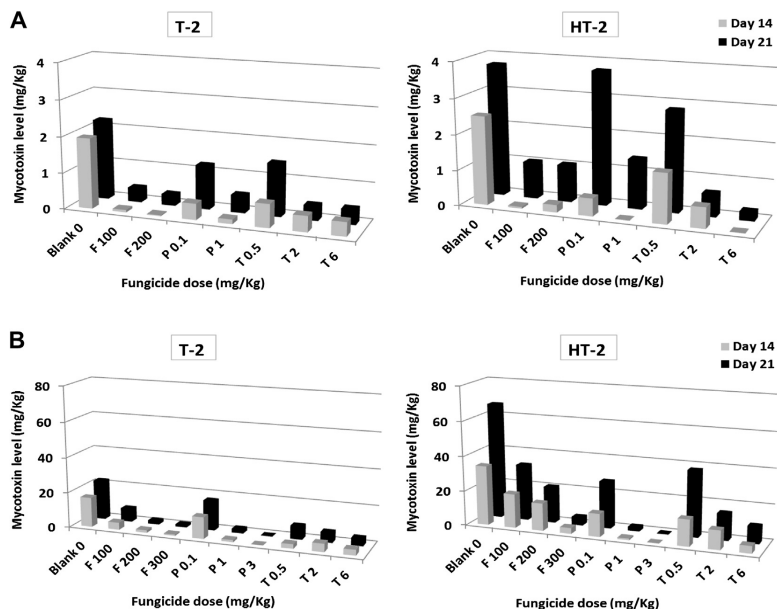
ANOVA showed that in treatments with fungicides the factors dose, day and temperature significantly affected toxin production. The influence of strain was not significant ( $P < 0.05$ ). There were also significant interactions between temperature and fungicide dose, and between temperature and time. The interaction time  $\times$  strain was significant for HT-2 with tebuconazole.

With regard to the influence of the dose, the Duncan's test showed three homogeneous overlapping groups ( $P < 0.05$ ) for T-2 and HT-2 with fenpropimorph (0, 100–200 and 200–300 mg/kg). In prochloraz treatments the same test found three homogeneous groups for HT-2 (0, 0.1, and 1–3 mg/kg) but two groups for T-2 (0–0.1 and 1–3 mg/kg). Finally, in tebuconazole treatments, this test found three groups for HT-2 (0, 0.5 and 2–6 mg/kg) and T-2 (0, 0.5–2 and 2–6 mg/kg). Only temperature significantly influenced production of T-2 or HT-2 in blanks at 0.98  $a_w$ .

The influence of the variables time, dose and temperature was similar for T-2 and HT-2. Consequently, the ANOVA of the sum of both toxins also provides the same results.

#### 4. Discussion

No previous studies have examined the impact that interacting environmental conditions and fungicides have on *F. langsethiae*



**Fig. 3.** Effect of fenpropimorph (F), prochloraz (P) and tebuconazole (T) at different concentrations (on the X axis) on production of T-2 and HT-2 by *F. langsethiae* (strain 2004/59) on oat grain at (A) 15 and (B) 25 °C and 0.98  $a_w$ .

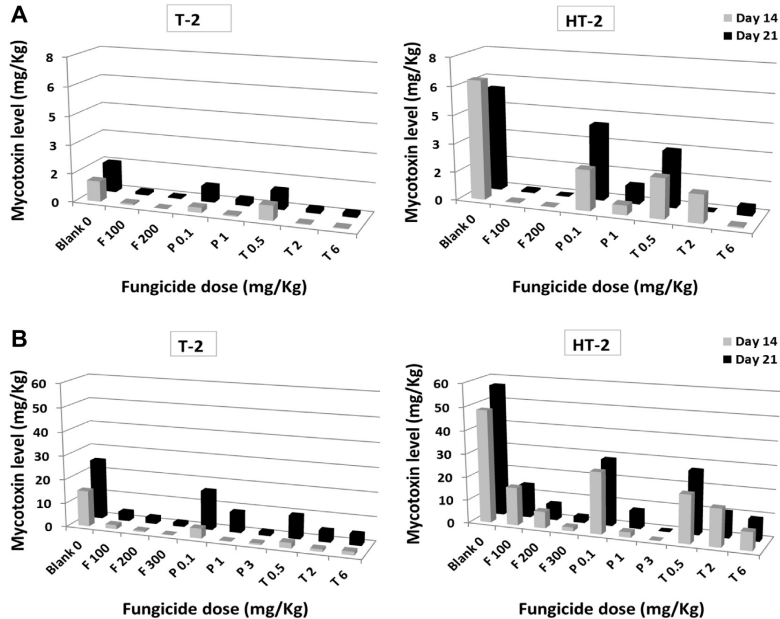


Fig. 4. Effect of fenpropimorph (F), prochloraz (P) and tebuconazole (T) at different concentration (on the X axis) on production of T-2 and HT-2 by *F. langsethiae* (strain M562) on oat grain at (A) 15 and (B) 25 °C and 0.98  $a_w$ .

growth and T-2 and HT-2 production on cereals, especially oats. *Fusarium* mycotoxins are produced within and on the grains and it is important to understand how agricultural practices and environmental conditions can affect mycotoxin contamination of crops. We have looked at conditions that can be interesting within guidelines on "Good Agricultural Practice" (GAP) to minimise contamination of oats with T-2 and HT-2 toxins produced by *F. langsethiae*. Only in a previous and recent study (Mateo, Valle-Algarra, et al., 2011) the interaction between fungicides, environmental conditions, growth and T-2 and HT-2 production in cultures of *F. langsethiae* in 3% milled oat media was studied. The three fungicides were less efficient to control growth of *F. langsethiae* in oats than in the oat-based agar media. For example, in oat grains the  $ED_{50}$  of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole, against strain 2004/59 in cultures with 0.98  $a_w$  at 25 °C were 150, 2.9 and 14 mg/kg (Fig. 1) while on oat-based agar media they were 24, 0.04 and 0.12 mg/l of medium, respectively. In addition, usually the  $ED_{90}$  values of the fungicides were not reached in oats for this strain (see Table 2). However, concentrations of fenpropimorph higher than those employed in this study surpass the solubility of the active ingredient in the amount of water needed to reach the target  $a_w$ -value in the grain (0.95, 0.98  $a_w$ ). This would also represent very high concentration which would be uneconomic to use practically. Similar results concerning the  $ED_5$  were found for strain M562 on oats. However, on oat-based agar media the  $ED_{90}$  was estimated to be in the range 28.4–215 mg/l for fenpropimorph, 0.3–1.5 mg/l for prochloraz and 1.3–8.2 mg/l for tebuconazole, depending of the culture conditions (Mateo, Valle-Algarra, et al., 2011) These results related to the efficacy of the fungicides are similar to those reported by Ramírez et al. (2004) for *Fusarium graminearum* strains on

wheat. They found that prochloraz, propiconazole, epoxiconazole, tebuconazole and azoxystrobin are less effective in controlling growth of *F. graminearum* on wheat grain than in wheat-based media although the  $ED_5$  values were not determined. Müllenborn, Steiner, Ludwig, & Oerke (2008) tested isolates of *Fusarium* spp. and other fungal species isolated from wheat kernels for their sensitivity to triazoles and strobilurins on PDA.  $ED_{50}$  values for the triazoles prothioconazole and tebuconazole varied from 0.1 to 3.2 mg/l and from 1.1 to 5.5 mg/l respectively. The effect of azoxystrobin on *in vitro* growth of *Fusarium* spp was very low; only the  $ED_{50}$  value of *Fusarium avenaceum* was <100 mg/l. No comparative studies in wheat kernels allowing for more discussion of the results have been reported.

Variability in sensitivity of *Fusarium* spp and saprophytic fungi to the different fungicides and discrepancies between the results obtained previously in oat-based media (Mateo, Valle-Algarra, et al., 2011) and, in the present study, on layers of oats indicate that complementary studies would be useful to help determine efficacy of such fungicides and control of T-2 and HT-2 in cereals, particularly in oats. The information obtained in these previous studies is required to understand efficacy in the field. Although there are no reported studies with *F. langsethiae*, a wide range of chemicals has been tested against *Fusarium* spp., specially, *Fusarium* head blight (FHB) pathogens under field conditions and the results have been variable and dependent on the fungal species, mycotoxin, environmental conditions and agricultural practices (Edwards, 2004). Studies in field in *Fusarium* spp. have showed that tebuconazole selectively controls *Fusarium culmorum* and *F. avenaceum* in wheat and reduces levels of DON in the grains but does not control *Microdochium nivale* this species also producing

FHB symptoms but apparently does not produce mycotoxins (Xu et al., 2005). In contrast, application of azoxystrobin selectively controls *M. nivale* in wheat and increases colonisation by toxigenic *Fusarium* spp. and levels of DON in the grains (D'Mello, Macdonald, & Rinna, 2001; Simpson, Weston, Turner, Jennings, & Nicholson, 2001). Other studies (Edwards, Pirgozliev, Hare, & Jenkinson, 2001) have also reported that the triazole fungicides metconazole and tebuconazole are active against trichothecene-producing *Fusarium* and their use results in a reduction of DON contamination. (Pirgozliev, Edwards, Hare, & Jenkinson, 2002) (Pirgozliev, Edwards, Hare, & Jenkinson, 2003) concluded, from field experiments, that strobilurin fungicides, by preferentially controlling the FHB pathogen *Microdochium* spp., also eliminate its antagonistic activity against mycotoxin-producing *Fusarium* spp. Mycotoxin production may be favoured by fungicide applications by eliminating fungal species competitive, affecting the balance between fungal species differing in fungicide sensitivity, and by a direct stress effect on mycotoxigenic species increasing the activity of enzymes involved in toxin biosynthesis (Edwards et al., 2001; Müllenborn et al., 2008). Use of fungicides to control FHB could have special relevance in the development of *F. langsethiae*, a less competitive species, not involved in FHB but associated to cereals showing high levels of T-2 and HT-2.

Of particular interest in this study is that the ANOVA of the data revealed that, of the factors included (class of fungicide,  $a_w$ , strain and temperature), only the first significantly influenced the ED<sub>50</sub> values. A comparison of these results with those obtained on oat-based agar (Mateo, Valle-Algarra, et al., 2011), shows that these factors (except for  $a_w$  in fungicide-containing cultures) and their interactions significantly influenced ( $P < 0.05$ ) the ED<sub>50</sub> values.

Some ecological studies of the effect of environmental conditions on growth and T-2 and HT-2 toxin production by *F. langsethiae* strains from England, Finland, Norway and Sweden have been carried out (Medina & Magan, 2010, 2011; Medina, Valle-Algarra, et al., 2010). Mateo, Valle-Algarra, et al. (2011) obtained similar results in the absence of fungicides. These studies carried out on oat-based media suggest that there is little difference between *F. langsethiae* strains from different European countries in terms of ability to grow under interacting extrinsic environmental factors but there are differences related to  $a_w$  and temperature. In the absence of fungicides, the overall growth profiles of *F. langsethiae* in relation with  $a_w$  and temperature in oat-based media are relatively similar to those reported for *F. culmorum* and *F. graminearum* (Magan & Lacey, 1984; Ramírez, Chulze, & Magan, 2006), but differ to those found here in oats.

Therefore, it can be concluded that *F. langsethiae* appears to be less sensitive to the variables  $a_w$ , temperature and fungicide dose (fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole) in oats than in oat-based media.

Another relevant aspect to highlight in the present study is that levels of T-2 were lower than HT-2 for both strains on oats. Studies on oat-based media suggest the opposite, regardless of culture environmental conditions (Mateo, Valle-Algarra, et al., 2011; Medina & Magan, 2011). There are few reports on this aspect of the change in the T-2:HT-2 ratio. However, it has been reported that T-2 is rapidly metabolised to HT-2. Studies on the metabolism of T-2 suggested that the liver is the major organ for this transformation in HT-2 (Dohnal et al., 2008; Königs, Mulac, Schwerdt, Gekle, & Humpf, 2009). Hepatic carboxylesterases have been shown to be responsible for the deacetylation of T-2 giving HT-2 as the major metabolite (Johnsen, Odden, Johnsen, Beyum, & Amundsen, 1988; Matsumoto, Ito & Ueno, 1978). The ability of plant carboxylesterases to control secondary metabolites has been reviewed (Gershater & Edwards, 2007). In cereals, detailed studies have been carried out leading to the identification of esterases, which are active in

pesticide metabolism (Gershater, Sharples, & Edwards, 2006). Lattanzio, Solfrizzo, & Visconti (2009) studied carboxylesterase activities in oats and other cereals. An enriched protein fraction with esterase activity toward T-2 was used to increase the activity of the carboxylesterases naturally present in wheat and oats. These authors found that in maize, the initial T-2 content was completely converted into HT-2 after 90-min incubation. Lower conversion rates (89%, 42% and 35%) were observed in wheat, oats and barley, respectively, after 120 min.

Although T-2 can be readily metabolised to HT-2, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) has evaluated the safety of different mycotoxins in food and has concluded that the toxic effects of T-2 and its metabolite HT-2 could not be differentiated, and that research into the factors involved in the presence of T-2 and HT-2 in cereals and cereal products, in particular oats and oat products, is necessary and of a high priority. In the present study in oats at 0.98  $a_w$  the ANOVA shows that all factors (except for strain) and their interactions were significant to both T-2 and HT-2 production. However, at 0.95  $a_w$  even when growth of *F. langsethiae* was observed, no T-2 or HT-2 was detected on oats, except in controls at 25 °C after 21 days.

In summary, very few studies have examined the impact that interacting environmental conditions and fungicides might have on fungal pathogen growth and mycotoxin production in cereal grains and none of them has been reported up to now with *F. langsethiae*. The present study has shown, for the first time, data on the impact of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole under the influence of interacting ecological factors on growth of *F. langsethiae* (ED<sub>50</sub> and ED<sub>90</sub>) and on T-2 and HT-2 accumulation in oat grains. All factors, especially type de fungicide and water availability appears to be very important in determining accumulation levels of these toxins in this cereal. In contrast, only the type of fungicide and dose affected fungal growth rate and no differences were observed at different  $a_w$  values (0.98 and 0.95) and temperatures (15 °C and 25 °C) in treatment cultures. The epidemiology of infections by this species is not understood, although *F. langsethiae* does not seem to be involved in FHB (Imathiu, Hare, Ray, Back, & Edwards, 2010) and has been isolated from symptomless oats, wheat and barley grains. This study supplies useful information to the understanding that the geographical distribution of *F. langsethiae* in cereals might be wider than what is currently known (Central and Northern Europe) and hence this mould could affect crops in regions with hotter and drier climates. This study also shows how environmental conditions and fungicides might affect infection of oats by *F. langsethiae*. A suitable control of  $a_w$  and treatments with antifungal agents could minimise T-2 and HT-2 contamination of oats and oat products. Practically, knowledge of the ability of fungicides to reduce both fungal growth and mycotoxin production combined with climate data in different regions and the use of predictive models (Mateo, Gadea, Mateo, & Jiménez, 2011; Mateo, Gadea, Medina, Mateo, & Jiménez, 2009; Pardo, Marin, Sanchis, & Ramos, 2004) may be useful to determine guidelines on GAP to minimise the T-2 and HT-2 contamination of cereals and cereal products.

## Acknowledgements

The authors wish to thank financial support from FEDER and Spanish Government "Ministerio de Economía y Competitividad" (MINECO) (Project AGL2010–22182-C04-03/ALI) and from "Generalitat Valenciana" (Project ACOMP/2012/220). Eva M. Mateo is also grateful to Ministerio de Ciencia e Innovación MICINN for a grant to perform a research visit in Cranfield University (UK) and for a PhD grant. Bayer CropScience, BASF Crop Protection and Industrias Afrasa, S.A. are acknowledged for gifts of the fungicide formulations used in the present study.

## References

- Angelov, A., Gotcheva, V., Kuncheva, R., & Hristozova, T. (2006). Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 75–80.
- Biel, W., Bobko, K., & Maciorowski, R. (2009). Chemical composition and nutritive value of husked and naked oats grain. *Journal of Cereal Science*, 49, 413–418.
- Birzele, B., Meier, A., Hindorf, H., Jramer, J., & Dehne, H. W. (2002). Epidemiology of *Fusarium* infection and deoxynivalenol content in winter wheat in the Rhineland, Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 667–673.
- Bouaziz, C., Sharaf el dein, O., El Gholli, E., Abid-Essefi, S., Brenner, C., Lemaire, C., et al. (2008). Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology*, 254, 19–28.
- Burkin, A. A., Soboleva, N. A., & Konozenko, G. P. (2008). T-2 toxin production by *Fusarium poae* from cereal grain in Siberia and Far East regions. *Mycology and Phytopathology*, 42, 354–358.
- Caloni, F., Ranzenigo, G., Cremonesi, F., & Spicer, L. J. (2009). Effects of a trichothecene, T-2 toxin on proliferation and steroid production by porcine granulosa cells. *Toxicol. 54*, 337–344.
- Campagnac, E., Fontaine, J., Louhès-Hadi Sahaoui, A., Laruelle, F., Durand, R., & Grandmougin-Perjani, A. (2009). Fenpropimorph slows down the sterol pathway and the development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza*, 19, 365–374.
- Commission Regulation. (2006). Commission regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L 70, 12–34.
- Connolly, M. L., Lovegrove, J. A., & Tuohy, K. M. (2010). In vitro evaluation of the microbiota modulation abilities of different sized whole oat grain flakes. *Anaerobe*, 16, 483–488.
- Dohnal, V., Jezkova, A., Jun, D., & Kuca, K. (2008). Metabolic pathways of T-2 toxin. *Current Drug Metabolism*, 9, 77–82.
- D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C., & Rinna, R. (2001). Effects of azoxystrobin on mycotoxin production in a carbendazim-resistant strain of *Fusarium sporotrichioides*. *Phytoparasitica*, 29, 431–440.
- Edwards, S. G. (2004). Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153, 29–35.
- Edwards, S. G. (2007). Investigation of *Fusarium* mycotoxins in UK barley and oat production. HGCA Project Report No. 415. London: HGCA.
- Edwards, S. G. (2009a). *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional wheat. *Food Additives and Contaminants*, 26, 496–506.
- Edwards, S. G. (2009b). *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants*, 26, 1063–1069.
- Edwards, S. G. (2009c). *Fusarium* mycotoxin content in UK organic and conventional barley. *Food Additives and Contaminants*, 26, 1185–1190.
- Edwards, S. G., Pirgozliev, S. R., Hare, M. C., & Jenkinson, P. (2001). Quantification of trichothecene-producing *Fusarium* species in harvested grain by competitive PCR to determine the efficacy of fungicides against fusarium head blight of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1575–1580.
- Finamore, A., Serena, M., Britti, M. R., Bellovino, D., Gaetani, S., & Mengheri, E. (2004). Novel approach for food safety evaluation. Results of a pilot experiment to evaluate organic and conventional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7425–7431.
- Flander, L., Sanmenkallio-Marttila, M., Suortti, T., & Autio, K. (2007). Optimization of ingredients and baking process for improved whole meal oat bread quality. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 860–870.
- Gallaher, D. D. (2000). Dietary fiber and its physiological effects. In M. Schmidt, & T. P. Labuza (Eds.), *Essentials of functional foods*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc.
- Gershater, M. C., & Edwards, R. (2007). Regulating biological activity in plants with carboxylesterases. *Plant Science*, 173, 579–588.
- Gershater, M., Sharples, K., & Edwards, R. (2006). Carboxylesterase activities toward pesticide esters in crops and weeds. *Phytochemistry*, 67, 2561–2567.
- Gupta, S., Cox, S., & Abu-Ghannam, S. (2010). Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochemical Engineering Journal*, 52, 199–204.
- Hewitt, A. F. (1998). *Fungicides in plant protection*. Wallingford: CAB International.
- Imathiu, S. M., Hare, M. C., Ray, R. V., Back, M., & Edwards, S. G. (2010). Evaluation of pathogenicity and aggressiveness of *F. langsethiae* on oat and wheat seedlings relative to known seedling blight pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 126, 203–216.
- Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., & Poutanen, K. (1998). Oat beta-glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 175–181.
- Johnsen, H., Odden, E., Johnsen, B. A., Beyum, A., & Amundsen, E. (1988). Cytotoxicity and effects of T-2-toxin on plasma proteins involved in coagulation, fibrinolysis and kallikrein-kinin system. *Archives of Toxicology*, 61, 237–240.
- Juan, C., Moltó, J. C., Lino, C. M., & Mañes, J. (2008). Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chemistry*, 107, 525–530.
- Königs, M., Mulac, D., Schwerdt, G., Gekle, M., & Humpf, H.-U. (2009). Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology*, 258, 106–115.
- Langseth, W., & Rundberget, T. (1999). The occurrence of HT-2 toxin and other trichothecenes in Norwegian cereals. *Mycopathologia*, 147, 157–165.
- Lattanzio, V. M. T., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2009). Enzymatic hydrolysis of T-2 toxin for the quantitative determination of total T-2 and HT-2 toxins in cereals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1325–1334.
- Leroux, P. (2003). Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 9–21.
- Magan, N., Hope, R., Colleate, A., & Baxter, E. S. (2002). Relationship between growth and mycotoxin production by *Fusarium* species, biocides and environment. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 685–690.
- Magan, N., & Lacey, J. (1984). Water relations of some *Fusarium* species from infected wheat ears and grain. *Transactions of the British Mycological Society*, 83, 281–285.
- Magan, N., Medina, A., & Aldred, D. (2011). Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathology*, 60, 150–163.
- Mateo, F., Gadea, R., Mateo, E. M., & Jiménez, M. (2011). Multilayer perceptron neural networks and radial-basis function networks as tools to forecast accumulation of deoxynivalenol in barley seeds contaminated with *Fusarium culmorum*. *Food Control*, 22, 88–95.
- Mateo, F., Gadea, R., Medina, A., Mateo, R., & Jiménez, M. (2009). Predictive assessment of ochratoxin A accumulation in grape juice-based medium by *Aspergillus carbonarius* using neural networks. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 915–927.
- Mateo, E. M., Valle-Algarra, F. M., Mateo-Castro, R., Jiménez, M., & Magan, N. (2011). Effect of fenpropimorph, prochloraz and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat-based medium. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 289–298.
- Matsumoto, H., Ito, T., & Ueno, Y. (1978). Toxicological approaches to the metabolites of fusaria. XII. Fate and distribution of T-2 toxin in mice. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 48, 393–399.
- Medina, A., & Magan, N. (2010). Comparisons of water activity and temperature impacts on growth of *Fusarium langsethiae* strains from northern Europe on oat-based media. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 365–369.
- Medina, A., & Magan, N. (2011). Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries. *Food Microbiology*, 28, 392–398.
- Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Jiménez, M., & Magan, N. (2010). Different sample treatment approaches for the analysis of T-2 and HT-2 toxins from oats-based media. *Journal of Chromatography B*, 878, 2145–2149.
- Miller, N., & Miller, C. (2000). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry* (4th ed.). Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice Hall.
- Müllernborn, C., Steiner, U., Ludwig, M., & Oerke, E. C. (2008). Effect of fungicides on the complex of *Fusarium* species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 157–166.
- Muri, S. D., Van der Voet, H., Boon, P. E., Van Klaveren, J. D., & Brüschweiler, B. J. (2009). Comparison of human health risks resulting from exposure to fungicides and mycotoxins via food. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2963–2974.
- Pardo, E., Marin, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 79–88.
- Peltonen-Sainio, P., Kontturi, M., & Rajala, A. (2004). Impact dehulling oat grain to improve quality of on-farm produced feed. I. Hullability and associated changes in nutritive value and energy content. *Agricultural and Food Science*, 13, 18–28.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C., & Jenkinson, P. (2002). Effect of dose rate of azoxystrobin and metconazole on the development of fusarium head blight and the accumulation of deoxynivalenol (DON) in wheat grain. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 469–478.
- Pirgozliev, S. R., Edwards, S. G., Hare, M. C., & Jenkinson, P. (2003). Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 731–742.
- Ramírez, M. L., Chulze, S., & Magan, N. (2004). Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection*, 23, 117–125.
- Ramírez, M. L., Chulze, S., & Magan, N. (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinian strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 291–296.
- Ryan, L., Thondre, P. S., & Henry, C. J. K. (2011). Oat-based breakfast cereals as rich source of polyphenols and high in antioxidant potential. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 929–934.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M. C., Cummings, J. H., Franck, A., Gibson, G. R., et al. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80, 147–171.
- Schuhmacher-Wolz, U., Heine, K., & Schneider, K. (2010). Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HF-2 and T-2 toxins. CT/EFS/CONTAM/2010/03. Available online: [http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/65e.htm?WT.mc\\_id=EFSAHL01&mt=1](http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/65e.htm?WT.mc_id=EFSAHL01&mt=1)
- Scudamore, K. A., Baillie, H., Patel, S., & Edwards, S. G. (2007). Occurrence and fate of *Fusarium* mycotoxins during commercial processing of oats in the UK. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1374–1385.
- Scudamore, K. A., Patel, S., & Edwards, S. G. (2009). HT-2 toxin and T-2 toxin in commercial cereal processing in the United Kingdom, 2004–2007. *World Mycotoxin Journal*, 2, 357–365.



- Simpson, D. R., Weston, G. E., Turner, J. A., Jennings, P., & Nicholson, P. (2001). Differential control of head blight pathogens of wheat by fungicides and consequences for mycotoxin contamination of grain. *European Journal of Plant Pathology*, *107*, 421–431.
- Torp, M., & Adler, A. (2004). The European *Sporotrichiella* Project: a polyphasic approach to the biology of new *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology*, *95*, 257–266.
- Torp, M., & Langseth, W. (1999). Production of T-2 toxin by a *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. *Mycopathologia*, *147*, 89–96.
- Torp, M., & Nirenberg, H. I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, *95*, 247–256.
- Valle-Algarra, F. M., Medina, A., Gimeno-Adelantado, J. V., Llorens, A., Jiménez, M., & Mateo, R. (2005). Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD. *Talanta*, *66*, 194–201.
- WHO/FAO. (2001). *Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Prepared by the fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. In *WHO food additives series 47*. Geneva: International Programme on Chemical Safety, World Health Organization. FAO food and nutrition paper 74.
- Wood, P. J., & Beer, M. U. (1998). Functional oat products. In G. Mazza (Ed.), *Functional foods: Biochemical and processing aspect* (pp. 1–29). Lancaster: Technomic Publishing Co., Inc.
- Xu, X. M., Parry, D. W., Nicholson, P., Thomsett, M. A., Simpson, D., Edwards, S. G., et al. (2005). Predominance and association of pathogenic fungi causing *Fusarium* ear blight in wheat in four European countries. *European Journal of Plant Pathology*, *112*, 143–154.
- Yli-Mattila, T., Ward, T. J., O'Donnell, K., Proctor, R. H., Burkin, A. A., Kononenko, G. P., et al. (2011). *Fusarium sibiricum* sp. nov. a novel type A trichothecene-producing *Fusarium* from northern Asia closely related to *F. sporotrichioides* and *F. langsethiae*. *International Journal of Food Microbiology*, *147*, 58–68.

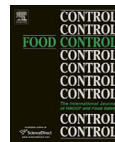


## Artículo 6

---

**Mateo, Eva M.**, Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Mateo, F., Pardo, I., Jiménez, M. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wine. *Food Control*, 21: 23-28. 2010.





## Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines

Eva M. Mateo<sup>a</sup>, Ángel Medina<sup>a</sup>, Fernando Mateo<sup>b</sup>, Francisco M. Valle-Algarra<sup>a</sup>, Isabel Pardo<sup>a</sup>, Misericordia Jiménez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Valencia, Spain

<sup>b</sup>ITACA, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, 14, 46022 Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 January 2009

Received in revised form 17 March 2009

Accepted 24 March 2009

#### Keywords:

Ochratoxin A removal

*Oenococcus oeni*

Food safety

### ABSTRACT

The capacity of *Oenococcus oeni* to eliminate ochratoxin A (OTA) from synthetic media in different conditions was studied. Ten tested *O. oeni* strains removed OTA from the medium but with significant differences depending on the strain, incubation period, and initial OTA level in the medium. Mycotoxin reductions higher than 60% were recorded in 14-day cultures spiked with 2 µg OTA/l. Toxin removal was independent of bacterial viability and culture medium composition. This is the first study carried out to study OTA removal dynamics by living and heat-inactivated cells of *O. oeni*. The results aim that this bacterium may be a very useful tool to control OTA in food and beverages.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ochratoxin A (OTA) is a naturally occurring secondary metabolite produced by some species of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA affects agricultural products all over the world and causes harmful effects on human and animal health because of its highly toxic properties. It has been reported as having mutagenic, teratogenic, and carcinogenic activities (JECFA, 2001).

OTA has been detected in food and beverages (Jørgensen, 1998; Medina, Jiménez, Gimeno-Adelantado, Valle-Algarra, & Mateo, 2005; Medina et al., 2006; Trucksess, Giler, Young, White, & Page, 1999; Valente & Rodríguez-Amaya, 1985) including grape juice and wine, where it was first reported by Zimmerli and Dick (1995). Since then, surveys conducted in different countries have revealed the presence of OTA in wine where its concentration usually follows the order white < rose < red < dessert wines. OTA concentration in grape products and wine usually range from 0.01 to 3.5 µg/l and are higher in products from southern regions than from northern regions of Europe (Battilani et al., 2003; Burdaspal & Legarda, 1999; Mateo, Medina, Mateo, Mateo, & Jiménez, 2007; Ospital et al., 1998; Otteneder & Majerus, 2000; Ratola, Martins, & Alves, 2004).

According to the Codex Alimentarius, 15% of the total OTA intake is due to wine, which is considered as the second major source of OTA intake after cereals (Codex Alimentarius Commission,

1998). Grape seems to contain more OTA than some wines and thus contribute to the intake of this toxin by children (Zimmerli & Dick, 1996).

The Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives discussed the imposition of a maximum tolerable weekly intake of 100 ng of OTA/kg of body weight (JECFA, 2001). A limit of OTA in wine (2 µg/kg) has been regulated in the European Union, and a recommendation to keep concentration of this mycotoxin to the lowest technologically feasible level has been made (Commission Regulation, 2006).

Decontamination methods for mycotoxins involving physical and chemical treatments have been proposed at laboratory scale. Some of these methodologies have promising results (Fouler, Trivedi, & Kitabatake, 1994; McKenzie et al., 1997; Refai, Aziz, El-Far, & Hassan, 1996) but others are not recommended for practical decontamination (Boudra, Le Bars, & Le Bars, 1995). New opportunities involving microbiological removal of mycotoxins have been created. The ability to eliminate OTA has been observed for *Acinetobacter calcoaceticus* (Hwang & Draughon, 1994), *Phenylobacterium immobile* (Wegst & Lingens, 1983), some *Lactobacillus* (Fuchs et al., 2008; Piotrowska & Zakowska, 2005), *Saccharomyces cerevisiae* (Bejaoui, Mathieu, Taillandier, & Lebrhi, 2004), and some *Aspergillus* species (Bejaoui, Mathieu, Taillandier, & Lebrhi, 2006; Varga, Rigó, & Téren, 2000).

*Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) (Kunkee, 1967; Wibowo, Eschenbruch, Davis, & Lee, 1985) is a lactic acid bacterium considered as the main responsible of driving the malolactic

\* Corresponding author. Tel.: +34 963543144; fax: +34 963543202.  
E-mail address: [misericordia.jimenez@uv.es](mailto:misericordia.jimenez@uv.es) (M. Jiménez).

fermentation (MLF) in wines, which improves the quality of this beverage (Maicas, Ferrer, & Pardo, 2002). It is the most tolerant species to the unfavourable wine conditions (nutrient starvation, low pH, ethanol, etc.).

Knowledge about the capacity of *O. oeni* to remove OTA from the medium is very scarce. Del Prete et al. (2007) determined the ability of *O. oeni* in the exponential growth phase and of extracts that were cell-free (obtained by disrupting *O. oeni* cells) to eliminate OTA in medium spiked with 5 µg of toxin/l. The ability of *O. oeni* to remove OTA has been studied in a small number of strains and it is not known the influence of the strains, physiological states of the bacteria, incubation time, OTA concentration in the medium or the medium itself on the toxin removal process.

At the beginning of the MLF, OTA levels usually not higher than 2 µg/l are present in wine. During wine fermentation *O. oeni* resides in this medium for a long time during which different physiological states of the bacterium follow one to another. This period varies depending on the type of wine. Although different malolactic starters are employed, selected strains that are native of each wine are desirable to be used during wine maturation.

The aim of this work was to assess the potential capability of wine strains of *O. oeni* to remove OTA from culture media under different conditions. Tests were done considering four factors: the strain, incubation period, concentration of the toxin in the medium, and cell viability. To perform this aim, 10 selected *O. oeni* strains isolated from Spanish wines of well-known origin were used. Special attention was paid to the dynamics of OTA elimination produced by living and heat-inactivated cells of *O. oeni* in culture media.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial origin and growth conditions

Ten selected strains of *O. oeni* isolated from Spanish wines were used. Six strains (N171, N172, 6G, 124 M, 228AM, 255 M) from "Utiel-Requena" wines and three strains (S1, eb927/2, MV1) from "Rioja" wines were supplied by ENOLAB research group (Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia). Another strain (4100 CECT) from "Rioja" wine was supplied by the Spanish Collection of Type Cultures (CECT, University of Valencia). Before each experiment the bacterial strains were cultured in Petri dishes containing medium for *L. oenos* (Caspritz & Radler, 1983) supplemented with 10% tomato juice (MLO) at 28 °C for 7 days. The pH was adjusted to 4.8 using 1 mol/l NaOH solution.

### 2.2. OTA standard

A standard of OTA was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Alcobendas, Spain). It was solved and diluted in acetonitrile–water–acetic acid (49.5:49.5:1 v/v/v) under sterile conditions to prepare a stock solution containing 100 µg/l. The appropriate volume of this solution was added to the culture media to reach the desired concentrations.

### 2.3. Change of OTA level in *O. oeni* cultures

*O. oeni* strains were grown in liquid MLO at 28 °C without stirring until mid-log phase. At this point, the number of colony forming units per millilitre of culture medium (cfu/ml) was  $8 \times 10^8$  (absorbance = 0.50, measured at 600 nm).

Nine ml of MLO was poured in 10-ml plastic screw-cap sterile tubes, inoculated with 100 µl of each *O. oeni* culture ( $8 \times 10^7$  cfu) and supplemented with 5 or 2 µg OTA/l. Controls with the same amount of inoculum added to MLO but without OTA addition as

well as controls consisting of non-inoculated MLO spiked with OTA at the two levels were also run. Tubes were incubated at 28 °C and aliquots were removed at 1, 5, 10, and 14 incubation days later to quantify OTA.

An assay involving strains 124 M and 6G was performed to evaluate if changes in OTA levels of *O. oeni* cultures were caused by metabolic degradation of the toxin or by other kind of interactions. Stationary phase cultures of both strains were used to maintain constant the number of bacteria during this test. Ten 9-ml aliquots were taken from this culture and poured in 10 screw-cap sterile tubes. Five tubes were stored at 4 °C and the remaining five tubes were heated at 60 °C for 35 min to inactivate the bacteria. Once the heat treatment finished these tubes were also kept at 4 °C for 30 min. Then, the 10 tubes were processed as follows:

Two tubes, with living bacteria were supplemented with 5 and 2 µg OTA/l, respectively, and two tubes with heat-treated bacteria were also supplemented with 5 and 2 µg OTA/l, respectively.

When acetate buffer medium was used, two MLO tubes containing living bacteria were centrifuged at 6000 rpm and the supernatant was discarded to eliminate the nutrients. Bacterial pellet was washed with 9 ml of 0.5 mol/l acetate buffer (pH 4.8) and re-suspended again in 9 ml acetate buffer. A tube was fortified with 5 µg OTA/l and the other with 2 µg OTA/l. The same protocol was followed using the two tubes containing heat-inactivated bacteria.

The remaining two tubes, one containing living bacteria and the other containing heat-inactivated bacteria, both without OTA, were used as controls.

Two additional controls consisting of acetate buffer without bacteria but supplemented with 5 and 2 µg OTA/l were also used.

All tubes were incubated at 28 °C and OTA was determined in the cultures at 0.5, 1.5, 3, 5, and 26 h. All assays were carried out in triplicate.

### 2.4. Ochratoxin A determination

Tubes with cultures were shaken, 0.6 ml sample of each tube was collected in sterile conditions and poured in Eppendorf centrifuge tubes. After centrifugation at 4000 rpm for 6 min 0.5 ml of supernatant was collected for OTA determination.

The suitable volume of 0.1 mol/l  $H_3PO_4$  solution was added to each sample to keep the pH in the range 2.5–3. Then, 2 ml of ethyl acetate was added. After shaking, the organic phase was loaded in an amber vial. This procedure was repeated once more time. After solvent evaporation under  $N_2$  stream at 50 °C, the residue was dissolved in 0.250 ml mobile phase. One hundred µl was injected into the LC system.

The LC system used consisted of a Waters 600E system controller, a Millipore-Waters 717 Plus autosampler and a Waters 470 scanning fluorescence detector (Waters, Milford, MA, USA). Excitation and emission wavelengths were 330 and 460 nm, respectively. The samples were separated using a  $C_{18}$  Phenomenex Gemini<sup>®</sup> (150 × 4.6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Macclesfield, UK), with a guard column of the same material. Retention time of OTA was about 12 min. The flow rate of the mobile phase (acetonitrile–water–acetic acid; 40:58:2, v/v/v) was 1 ml/min.

Calibration lines were constructed using culture medium spiked with the proper amount of OTA standard in the range 0.2–5 ng OTA/ml. OTA determination was made in triplicate. Analysis of the results was carried out on a computer by Millennium<sup>®</sup> 4.0 software (Waters).

### 2.5. Statistical analysis

The statistical analysis of the data was performed using Statgraphics Centurion XV version 15.1.02 (StatPoint, VA, USA). For

analysis of variance (ANOVA) significant differences in mean values were reported at  $p$ -value  $< 0.01$ . Tukey-honestly significant difference (Tukey-HSD) multiple range test at 99% confidence level was used to group the cases into homogeneous groups with regard to the different parameters used.

### 3. Results

Figs. 1 and 2 show the percentage of toxin reduction in the culture medium for the different *O. oeni* strains throughout the incubation period. Both figures show that toxin level in the culture medium was reduced in all the cultures.

All data were studied by multifactor ANOVA to find out what factors significantly influence OTA reduction. The factors were OTA level added to the culture medium, *O. oeni* strain, and incubation time. The ANOVA showed that the three factors significantly affected OTA removal percentage ( $p$ -values  $< 0.01$ ). There is also one significant first-order interaction (strain  $\times$  time).

The Tukey-HSD multiple range test at 99% confidence level grouped the cases into homogeneous groups with regard to the different parameters used.

The OTA level factor split the cases into two non-overlapping clusters. This means that the OTA level in the medium has a significant effect ( $p < 0.01$ ) on OTA removal percentage. Average OTA reduction percentage was significantly higher in the cultures spiked with  $2 \mu\text{g}$  OTA/l ( $30\%$ ) than in those spiked with  $5 \mu\text{g}$  OTA/l ( $23\%$ ).

The bacterial strain factor led to three overlapping homogeneous clusters. The highest OTA removal percentages were found in MLO culture media inoculated with strains 4100T, Eb927/2, 228AM, N171, 124 M, and 6G, which were included in the same group. Average OTA reduction in culture media of these strains were 26%, 28%, 28%, 29%, 30%, and 33%, respectively.

Incubation time split the cases into four non-overlapping homogenous groups, which corresponded to days 1, 5, 10, and 14. The respective ranges of OTA reduction percentages in cultures spiked with  $2 \mu\text{g}$  OTA/l were 0.9–34%, 17–48%, 34–56%, and 50–63%, while in cultures initially containing  $5 \mu\text{g}$  OTA/l these ranges were 2–20%, 14–42%, 28–58%, and 36–54%. Variability was dependent on the strain. Shifts in OTA levels were noticeable in the culture medium of some strains over the incubation period (Figs. 1 and 2).

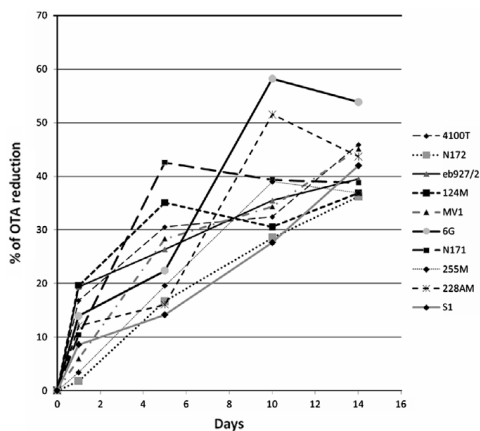


Fig. 1. Variation of OTA reduction rate in MLO culture medium inoculated with 10 strains of *O. oeni* isolated from grape, spiked with  $5 \mu\text{g}$  OTA/l and incubated at  $28^\circ\text{C}$ .  $N = 3$ .

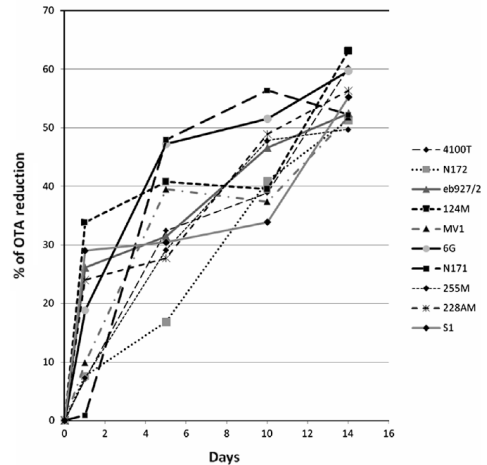


Fig. 2. Variation of OTA reduction rate in MLO culture medium inoculated with 10 strains of *O. oeni* isolated from grape, spiked with  $2 \mu\text{g}$  OTA/l and incubated at  $28^\circ\text{C}$ .  $N = 3$ .

dent on the strain. Shifts in OTA levels were noticeable in the culture medium of some strains over the incubation period (Figs. 1 and 2).

The next step was to assess if OTA reduction in the medium was influenced by the bacterial viability, and if the matrix had some effect on this reduction. An experiment was designed to keep the number of cells in the culture constant and two media were used, MLO and acetate buffer. To maintain the number of bacteria constant during the test, stationary phase cultures of strains 6G and 124 M were chosen because in previous experiment they had shown greater toxin removal capability. Cultures with living bacteria (LB) in the stationary phase and cultures with heat-treated (dead) bacteria (HTB) were used. The number of bacteria in LB and HTB cultures was the same and remained constant throughout the test period (26 h), which was checked by measuring absor-

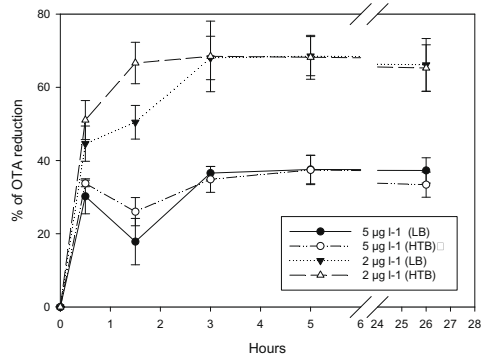


Fig. 3. Variation of OTA level in MLO culture medium spiked with 5 or  $2 \mu\text{g}$  OTA/l and inoculated with living or death cells of *O. oeni* (strain 6G) in stationary phase. Incubation temperature:  $28^\circ\text{C}$ .  $N = 3$ .

bance at 600 nm in the cultures and, additionally to absorbance measurement, CFU were tested in the non-heated samples.

Figs. 3 and 4 show the percentages of OTA reduction in MLO spiked with the two toxin levels over 26 h after OTA addition for both LB and HTB. Figs. 5 and 6 show these percentages when using acetate buffer also for both LB and HTB.

In the culture of strain 6G in MLO spiked with 2 µg OTA/l, the toxin level dramatically decreased during the first 30 min, with a reduction in this period of 45% and 51% in LB and HTB cultures, respectively (Fig. 3). At 3 h of incubation 68% of the initial OTA content had been eliminated in both cultures and from 3 to 26 h a slight release of toxin to the medium was observed. In culture medium fortified with 5 µg toxin/l, OTA reductions during the first 30 min in LB and HTB cultures were 30% and 34%, respectively. After that time, OTA level remained roughly stable with few changes over the incubation period. Finally, the toxin reduction percentages in LB and HTB cultures were 38% and 33%, respectively.

Similar OTA reduction dynamics was observed in MLO for strain 124 M (Fig. 4). Reductions of about 58% were observed in LB and HTB cultures spiked with 2 µg toxin/l during the first 3 h. Toxin reduction rates in LB and HTB cultures of this strain at the end of the incubation period were 68% and 67%, respectively. In the cultures spiked with 5 µg OTA/l there was also a reduction of toxin. At the end of the assay, OTA level in LB cultures decreased by 41% and in HTB cultures by 34%.

These results were treated by multifactor ANOVA. Factors analysed in order to elucidate their effect on OTA reduction were bacterial viability (living or dead bacteria), initial OTA level, and incubation time. No significant difference were found in OTA reduction levels between LB and HTB cultures, which suggests that OTA reduction by *O. oeni* does not depend on bacterial viability. However, incubation time and initial OTA level in the medium significantly affected OTA removal. During the first 3 h toxin reduction was high. Later (between 3 and 26 h) there were slight variations in toxin levels in the medium. Toxin reduction percentage was greater in tests with 2 µg/l than in tests with 5 µg/l.

In acetate buffer (Figs. 5 and 6), the two *O. oeni* strains reduced OTA levels following the same pattern shown in MLO medium. The amount of OTA decreased continuously in the culture of strain 6G (Fig. 5) spiked with 2 µg toxin/l and no toxin release was observed over the incubation period. The final reduction rates were 65% and 57% in LB and HTB cultures, respectively. When 5 µg OTA/l was

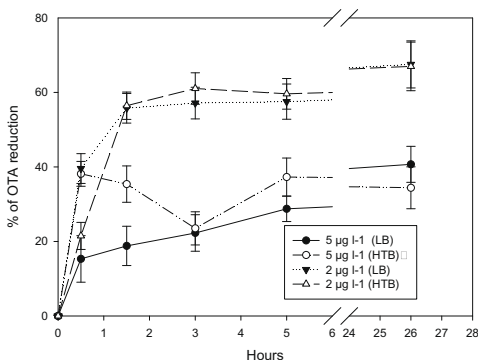


Fig. 4. Variation of OTA level in MLO culture medium spiked with 5 or 2 µg OTA/l and inoculated with living or death cells of *O. oeni* (strain 124 M) in stationary phase. Incubation temperature: 28 °C. N = 3.

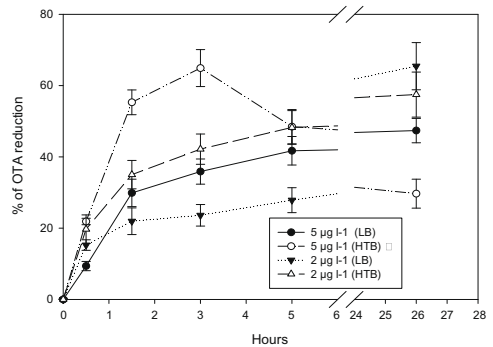


Fig. 5. Variation of OTA level in acetate buffer (pH 4.8) spiked with 5 or 2 µg OTA/l and inoculated with living or death cells of *O. oeni* (strain 6G) in stationary phase. Incubation temperature: 28 °C. N = 3.

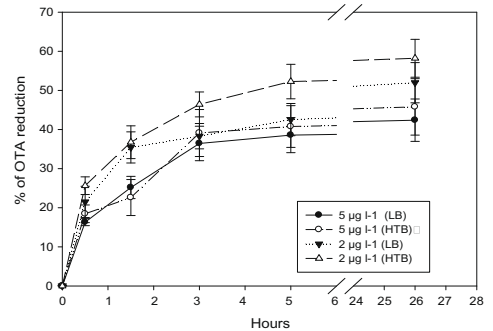


Fig. 6. Variation of OTA level in acetate buffer (pH 4.8) spiked with 5 or 2 µg OTA/l and inoculated with living or death cells of *O. oeni* (strain 124 M) in stationary phase. Incubation temperature: 28 °C. N = 3.

added, toxin level in the medium decreased continuously but in HTB cultures this level increased after 3 h of incubation. At the end of the incubation period, OTA reduction percentages were 47% and 30% in LB and HTB cultures, respectively.

Strain 124 M (Fig. 6) showed similar behaviour to 6G. OTA reduction was continuous up to 3 h of incubation and changes in toxin levels in the medium were observed between 3 and 26 h. The data obtained in acetate buffer were also treated by multifactor ANOVA. As with MLO medium, there were no significant differences in OTA removal between LB and HTB cultures.

#### 4. Discussion

The interest in OTA detoxification in different matrices has increased over recent years, especially since it has been reported that the toxin is frequently present in food and beverages common in the diet, such as cereals, coffee, wine, and beer. Recent studies stress OTA reduction during the winemaking process (Grazioli, Fumi, & Silva, 2006; Savino, Limosani, & García-Moruno, 2007). Some studies report the effect of some bacteria (Del Prete et al., 2007; Fuchs et al., 2008), fungi (Abrunhosa, Serra, & Venâncio, 2002; Bejaoui et al., 2006), and yeasts (Bejaoui et al., 2004; Caridi,



2006; Cecchini, Morassut, García-Moruno, & Di Stefano, 2006; Ringot et al., 2005) on OTA reduction, but until now there has been no study about OTA removal by living and head-inactivated cells of *O. oeni*, the main species involved in MLF in wine.

The results of this study show that the 10 tested strains of *O. oeni* from Spanish wines are capable of eliminating OTA from liquid media. These results agree with previous reports describing the ability of other bacteria to remove OTA from different matrices (Hwang & Draughon, 1994; Piotrowska & Zakowska, 2005; Wegst & Lingens, 1983), although in those studies higher toxin concentrations, which are unusual in naturally contaminated matrices, were used. Two OTA levels (2 and 5 µg/l) are used in this study. The first one was chosen by its oenological interest as it is the maximum level permitted by the European regulation (Commission Regulation, 2006); the second one was chosen with comparative aims, to study whether different toxin levels affect OTA reduction rate by the selected strains. Both concentrations were tested using two matrices and our study extended longer time than previous. That is important because *O. oeni* is the main species responsible for MLF, which lasts between 7 and 30 days. The reductions detected in this study at the end of the incubation period (14 days) varied between 36% and 63% depending on the strain and initial OTA level, which represents a very important removal of the toxin. It is remarkable that significant differences depending on the initial toxin concentration were found. Mycotoxin reduction in the liquid medium was significantly higher in cultures spiked with the lowest initial OTA level. This result is interesting in wine technology because wine usually show low OTA levels (0.01–3.5 µg/l) (Battilani et al., 2003; Burdaspal & Legarda, 1999; Ospital et al., 1998; Otteneder & Majerus, 2000; Ratola et al., 2004).

Del Prete et al. (2007) have reported much shorter reductions of OTA content by *O. oeni* (10.99–28.09%). On the basis of the results here reported, disagreement can be due, among other factors, to the fact that those authors studied only the most unfavourable OTA level (5 µg/l), a very short incubation period (only one control for OTA was performed in the late exponential growth phase) and other strains of *O. oeni*.

The dynamics of OTA reduction studied in the present paper show that reduction goes on increasing after cultures reach the exponential growth phase and as the incubation period proceeds. OTA reduction levels are dependent on the strain of *O. oeni*, time spent by bacteria in the medium and initial OTA level. These are very relevant findings because in oenology the use of selected *O. oeni* strains for MLF is common practice and hence careful selection of the strain is fundamental for determining final OTA levels in wine. Grazioli et al. (2006) described OTA reduction in a range of 38–82.2% during MLF in red wine winemaking using naturally contaminated grapes. Our results explain that *O. oeni* is directly involved in this high OTA reduction rate and support the decontaminating effect of these bacteria during winemaking.

Experiments were done with living and dead bacteria to study more deeply the mechanism by which *O. oeni* eliminates OTA from the medium. Two strains were used. The number of cells in the media remained constant and two very different media were used: MLO, a nutrient-rich medium (pH 4.8), and acetate buffer (pH 4.8), a nutrient-poor medium where there is no population increase and cell integrity is maintained by avoiding cell lysis during the test period. The results for all the cultures showed very significant toxin reduction especially during the first 3 h of incubation and no differences in OTA removal were found between cultures inoculated with living and dead bacteria. Nor were any medium-related differences found. Some of these results agree with previous report that described toxin elimination by *O. oeni* as a cell-binding phenomenon (Del Prete et al., 2007) but our results show that this binding is unrelated to bacterial viability. These authors report that cell-free extracts of *O. oeni* where the cells had been disrupted,

were not able to degrade OTA. On the basis of their results and ours it seems that cellular integrity but not cell viability of *O. oeni* is needed for OTA removal.

Heat-inactivated bacteria, different from *O. oeni*, can remove aflatoxin B1 and zearalenone (El-Nezami, Kankaanpää, Salminen, & Ahokas, 1998; El-Nezami, Polychronaki, Salminen, & Mykkänen, 2002; El-Nezami et al., 2004; Haskard, Binnion, & Ahokas, 2000; Lee et al., 2003; Pierides, El-Nezami, Peltonen, Salminen, & Ahokas, 2000). However, the chemistry and the molecular basis of mycotoxin binding remain unknown. In the present study, heat-treated bacteria removed OTA equally well or even more effectively than viable cells, although significant differences were not found. Reduction of OTA and other mycotoxins by yeasts is due to mycotoxin binding with parietal yeast mannoproteins (Devegowda, Raju, & Swamy, 1998; Ringot et al., 2005). *O. oeni* may act in a similar way and the mycotoxin could be adsorbed by the cell wall.

The data in this study show that the OTA removal process is partly reversible in some of the cultures and upon culture prolongation a small part of the toxin is released back into the medium (Figs. 3–6). These results agree with those found for aflatoxin B<sub>1</sub> reduction using *Lactobacillus rhamnosus* GG by El-Nezami, Salminen, and Ahokas (1996) and El-Nezami, Mykkänen, Kankaanpää, Salminen, and Ahokas (2000). These authors report the ability of this species to eliminate 80% of the toxin from the medium through physical binding to the cell wall components and that part of the toxin could be released back into the medium.

To promote the growth of *O. oeni*, the pH value of the culture media was set to 4.8. Fuchs et al. (2008) have described that optimal removal of OTA by some lactic acid bacteria different from *O. oeni* takes place at low pH values (pH 5.0) and report a 50% reduction of OTA level by *Lactobacillus acidophilus* at pH values between 7 and 8. Differences in pH could likely have a great influence on the ability of *O. oeni* cells to bind OTA.

The ability of *O. oeni* to eliminate OTA from the medium and the fact that this elimination is independent of bacteria viability and dependent on the strain opens up a route for the possible use of this species as a tool for OTA removal from food and beverages and, especially, from wine.

## 5. Conclusions

*O. oeni*, the most important bacterium involved in the conduction of MLF of wine, can remove OTA from MLO medium and acetate buffer. Removal rate depended on the strain, incubation time, and OTA concentration in the medium but no significant differences were observed in OTA removal with regard to the type of culture medium and strain viability. The reduction mechanism may consist of physical binding of the toxin to the cell wall, although bacterial integrity appears to be necessary to this binding. Therefore, application of selected strains of *O. oeni* as starters of MLF or the use of heat-treated *O. oeni* cells in the winemaking and other processes might be a promising tool to reduce OTA contamination in some wines and others beverages and food.

## Acknowledgements

This work was supported by the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia” (Projects AGL2004-07549-C05-02/ALI, AGL2007-66416-C05-01/ALI, and two research grants) and the Valencian Government (Project ACOMP/2007/155).

## References

- Abrunhosa, L., Serra, R., & Venâncio, A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7493–7496.

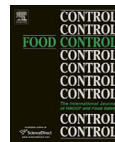
- Battilani, P., Pietro, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., & Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, *66*, 633–636.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrhihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic medium and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, *97*, 1038–1044.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrhihi, A. (2006). Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: a potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiological Letters*, *255*, 203–208.
- Boudra, H., Le Bars, P., & Le Bars, J. (1995). Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*, 1156–1158.
- Burdaspal, P. A., & Legarda, T. M. (1999). Ochratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, *299*, 107–113.
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek*, *89*, 417–422.
- Caspritz, G., & Radler, F. (1983). Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum* purification, properties and distribution among bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, *258*, 4907–4910.
- Cecchini, F., Morassut, M., García-Moruno, E., & Di Stefano, R. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*, *23*, 411–417.
- Codex Alimentarius Commission. (1998). Position paper on ochratoxin A. Codex Committee on Food Additives and Contaminants thirty-first session, 22–26 March, CX/FAC 99/14, The Hague, The Netherlands.
- Commission Regulation (EC) (2006). 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, *364*, 5–24.
- Del Prete, V., Rodríguez, H., Carrascosa, A. V., De Las Rivas, A., García-Moruno, E., & Muñoz, R. (2007). In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, *9*, 2155–2160.
- Devegonda, G., Raju, M. V. L. N., & Swamy, H. V. L. N. (1998). Mycotoxins: novel solutions for their counteraction. *Feedstuffs*, *70*, 12–15.
- El-Nezami, H., Salminen, S., & Ahokas, J. (1996). Biological control of food carcinogens with use of *Lactobacillus GG*. *Nutrition Today*, *531*, 41–42.
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., & Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, *36*, 321–326.
- El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., & Ahokas, J. (2000). Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from chicken duodenum. *Journal of Food Protection*, *63*, 549–552.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Salminen, S., & Mykkänen, H. (2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-grade *Lactobacillus* strains with zearalenone and its derivative  $\alpha$ -zearalenol. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*, 3545–3549.
- El-Nezami, H., Polychronaki, N., Lee, Y. K., Haskard, C. A., Juvenon, R., Salminen, S., et al. (2004). Chemical moieties and interactions involved in the binding of zearalenone to the surface of *Lactobacillus rhamnosus* strains GG. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4577–4581.
- Fouler, S. G., Trivedi, A. B., & Kitabatake, N. (1994). Detoxification of citrinin and ochratoxin A by hydrogen peroxide. *Journal of AOAC International*, *77*, 631–637.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M., & Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 1398–1407.
- Grazioli, B., Fumi, M. D., & Silva, A. (2006). The role of processing on ochratoxin A content in Italian must and wine: a study on naturally contaminated grapes. *International Journal of Food Microbiology*, *111*, S93–S96.
- Haskard, C. A., Binnion, C., & Ahokas, J. (2000). Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Chemico-Biological Interactions*, *128*, 39–49.
- Hwang, C. A., & Draughon, F. A. (1994). Degradation of ochratoxin A by *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Food Protection*, *57*, 410–414.
- JECFA, Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives series 47; FAO food and nutrition paper 74. <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>>
- Jørgensen, K. (1998). Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, *15*, 550–554.
- Kunkee, R. E. (1967). Malo-lactic fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, *9*, 235–279.
- Lee, Y. K., El-Nezami, H., Haskard, C. A., Gratz, S., Puong, K. Y., Salminen, S., et al. (2003). Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. *Journal of Food Protection*, *66*, 426–430.
- Mateo, R., Medina, A., Mateo, F., Mateo, E. M., & Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, *119*, 79–83.
- Maicas, S., Ferrer, S., & Pardo, I. (2002). NAD(P)H regeneration in *Oenococcus oeni* during heterolactic fermentation of hexoses. *Microbiology*, *148*, 325–332.
- McKenzie, K. S., Sarr, A. B., Mayura, K., Bailey, R. H., Miller, D. R., Rogers, T. D., et al. (1997). Oxidative degradation and detoxification of mycotoxins using a novel source of ozone. *Food and Chemical Toxicology*, *35*, 807–820.
- Medina, A., Jiménez, M., Gimeno-Adelantado, J. V., Valle-Algarra, F. M., & Mateo, R. (2005). Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A*, *1083*, 7–13.
- Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Mateo, F., & Jiménez, M. (2006). New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal of Chromatography A*, *1121*, 178–183.
- Ospital, M., Cazabeil, J. M., Betbeder, A. M., Tricard, C., Creppy, E. E., & Medina, B. (1998). L'ochratoxine A dans les vins. *Enologie*, *169*, 16–19.
- Otteneider, H., & Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, *17*, 793–798.
- Pierides, M., El-Nezami, H., Peltonen, K., Salminen, S., & Ahokas, J. (2000). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal of Food Protection*, *63*, 645–650.
- Piotrowska, M., & Zakowska, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*, *4*, 279–286.
- Ratola, N., Martins, L., & Alves, A. (2004). Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results. *Analytica Chimica Acta*, *513*, 319–324.
- Refai, M. K., Aziz, N. H., El-Far, F., & Hassan, A. A. (1996). Detection of ochratoxin produced by *Aspergillus ochraceus* in feedstuffs and its control by  $\gamma$ -radiation. *Applied Radiation and Isotopes*, *47*, 617–621.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J. P., Auclair, E., Oriol, E., & Larondelle, Y. (2005). Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell derivatives. *Process Biochemistry*, *40*, 3008–3016.
- Savino, M., Limosani, P., & García-Moruno, E. (2007). Reduction of ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *American Journal of Enology and Viticulture*, *58*, 97–101.
- Trucksess, M. W., Giler, J., Young, K., White, K. D., & Page, S. W. (1999). Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. *Journal of AOAC International*, *82*, 85–89.
- Valente, L. M., & Rodríguez-Amaya, D. B. (1985). Screening and quantitation of ochratoxin A in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, *68*, 1128–1130.
- Varga, J., Rigó, K., & Téren, J. (2000). Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, *59*, 1–7.
- Wegst, W., & Lingsens, F. (1983). Bacterial degradation of ochratoxin A. *FEMS Letters*, *17*, 341–344.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *36*, 302–313.
- Zimmerli, B., & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunofluorescence column cleanup: methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*, *666*, 85–99.
- Zimmerli, B., & Dick, R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, *13*, 655–668.

## Artículo 7

---

**Mateo, Eva M.**, Medina, A., Mateo, R., Jiménez, M. Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media. *Food Control*, 21: 935-941. 2010.





## Effect of ethanol on the ability of *Oenococcus oeni* to remove ochratoxin A in synthetic wine-like media

Eva M. Mateo, Ángel Medina, Rufino Mateo, Misericordia Jiménez\*

Dep. de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Dr. Moliner 50, E-46100, Burjassot, Valencia, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 October 2009

Received in revised form 11 December 2009

Accepted 19 December 2009

#### Keywords:

Ochratoxin A removal

*Oenococcus oeni*

Food safety

### ABSTRACT

The study focused on the changes in bacterial population, malolactic fermentation and ochratoxin A (OTA) levels in cultures of *Oenococcus oeni* performed in synthetic medium supplemented with ethanol and OTA. Growth was better in cultures containing 5% ethanol and was not observed in cultures containing 15% ethanol. The OTA removal ability of *O. oeni* depended on ethanol and initial OTA levels. The highest toxin removal percentage was observed in cultures containing 5% ethanol and 2 µg OTA/l. In ethanol-containing medium part of OTA was not sorbed by *O. oeni* and remained in the liquid medium. Thus, it cannot efficiently eliminate OTA in acidic ethanol-containing beverages, such as wine. The effect of ethanol on the OTA removal ability of *O. oeni* is described for the first time.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used for the production of fermented foods and beverages where they occur naturally or are added as pure cultures (Carr, Chill, & Maida, 2002; Hammes & Hertel, 2006). LAB have traditionally been used as natural biopreservatives of food and feed (Schnürer & Magnusson, 2005) and have beneficial health effects in humans (Ouweland, Salminen, & Isolauri, 2002). They are responsible for the malolactic fermentation (MLF), which implies conversion of L-malate into L-lactate and carbon dioxide. As a consequence of MLF, wine quality improves due to acidity decrease, gaining flavours, microbiological stability and organoleptic characteristics (Davis, Wibowo, Eschenbruch, Lee, & Fleet, 1985; Lafon-Lafourcade, Carre, & Ribéreau-Gayon, 1983). *Oenococcus oeni* (formerly *Leuconostoc oenos*) (Kunkee, 1967; Wibowo, Eschenbruch, Davis, & Lee, 1985) is a lactic acid bacterium recognised as the main organism driving MLF. This is the most tolerant species to unfavourable wine conditions (nutrient starvation, low pH, ethanol, fatty acids from yeasts, SO<sub>2</sub>) (Wibowo et al., 1985).

Ochratoxin A (OTA) is a naturally occurring mycotoxin produced by several species of *Aspergillus* and *Penicillium*. This toxin can induce intestinal fragility, nephrotoxicity, immunosuppression, teratogenicity, carcinogenicity (Abid et al., 2003; Creppy, 2002; Wangikar, Dwivedi, Sinha, Sharma, & Telang, 2005; Álvarez, Gil, Ezpeleta, García-Jalón, & López de Cerain, 2004), cytotoxicity in hepatic cell lines (Bondy & Armstrong, 1998) and induces iron

deficiency anemia (Huff, Chang, Warren, & Hamilton, 1979). The International Agency for Research on Cancer classified OTA in group 2B (possibly carcinogenic to humans) (IARC, 1993).

This mycotoxin affects many agricultural commodities and by-products all over the world (Medina, Mateo, López-Ocaña, Valle-Algarra, & Jiménez, 2005a; Medina et al., 2006; Trucksess, Giler, Young, White, & Page, 1999) and its occurrence in food and beverages of common consumption is considered a serious health hazard. Contamination of wines and grape juices with OTA was reported for the first time by Zimmerli and Dick (1995) and has been further confirmed in different countries (Mateo, Medina, Mateo, Mateo, & Jiménez, 2007). The mycobiota of ripe grape is very critical in assessing the risk of OTA presence in wine (Battilani et al., 2003; Pietri, Bertuzzi, Pallaroni, & Piva, 2001). *Aspergillus carbonarius* and *A. tubingensis* are the most important fungal species associated with wine contamination with OTA (Medina, Jiménez, Gimeno-Adelantado, Valle-Algarra, & Mateo, 2005b; Serra, Abrunhosa, Kozakiewicz, & Venâncio, 2003). OTA levels in grape products usually range from 0.01 to 3.5 µg/kg and a maximum limit of 2 µg/kg has been established in wine by the European Union (European Commission, 2006).

Physical, chemical and microbiological methods have been proposed to remove mycotoxins from foods and beverages, but few have practical applications. Selected strains of *O. oeni* from Spanish wines can remove up to 68% of OTA from synthetic media regardless of bacterial viability (Mateo et al., 2010). Reduction of OTA levels during alcoholic and malolactic fermentations by some yeasts and LAB has been reported (Bejaoui, Mathieu, Taillandier, & Lebrihi, 2004; Caridi, Galvano, Tafuri, & Riteni, 2006; Cecchini, Morassut, García-Moruno, & Di Stefano, 2006). The winemaking process is

\* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543144; fax: +34 96 3543202.  
E-mail address: [misericordia.jimenez@uv.es](mailto:misericordia.jimenez@uv.es) (M. Jiménez).

complex because many factors interact so that studies are needed to find out the way that OTA can affect the factors that are relevant to wine quality. It is unknown whether the ability of microorganisms to remove OTA is affected by conditions of the media. Changes of OTA level in controlled wine-like media or the possible interactions between this mycotoxin and others factors related to wine-making, such as the *O. oeni* population dynamics, MLF evolution or ethanol content have not been reported.

The aim of this work was to study the effect of the concentrations of ethanol and OTA in the medium on the capacity of *O. oeni* to remove OTA from the medium, the growth of the *O. oeni* population and MLF, as well as the possible interactions among these parameters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial origin and growth conditions

Five strains of *O. oeni* isolated from Spanish wine supplied by the ENOLAB research group (Department of Microbiology and Ecology, University of Valencia) were assayed to assess their ability to remove OTA in synthetic wine-like based medium as described in Section 2.3, and no significant differences among them were observed (results not shown). One of these strains (Ref. 6G) was chosen for further experiments. Before each experiment, strain 6G was cultured in Petri dishes containing medium for *Oenococcus oeni* (MLO) (Caspritz & Radler, 1983) at 28 °C for 7 d.

### 2.2. Standards

Standards of OTA, L-malic and L-lactic acids were purchased from Sigma (Sigma–Aldrich, Alcobendas, Spain). The OTA standard was solved and diluted in acetonitrile–water–acetic acid (49.5:49.5:1, v/v/v) under sterile conditions to prepare a stock solution containing 100 µg OTA/l. The appropriate amount of this solution was added to the culture media to reach the desired concentrations. L-malic and L-lactic acids were used to prepare standard solutions for determination of both acids.

### 2.3. Synthetic wine-like media, inoculation and cultures

The *O. oeni* strain was grown in liquid MLO at 28 °C without stirring until log phase. At this time, the number of colony forming units per millilitre of culture medium (cfu/ml) was  $1.22 \times 10^8$ . This culture was used for inoculation of *O. oeni*.

A medium reported by Liu, Davis, and Brooks (1995) with some modifications that imitates the composition of wine after alcoholic fermentation but contains no ethanol was used as a synthetic wine-like basal medium (SWBM). Its composition (g/l water) was: glucose, 1; fructose, 1; trehalose dihydrate, 1; glycerol (87%), 5.75; L-tartaric acid, 5; L-malic acid, 10; sodium acetate, 0.28; citric acid, 0.5; L-cysteine HCl, 0.5; yeast extract (Difco, Detroit, USA), 4; casaminoacids (Difco), 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.6; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.13; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.03; CaCl<sub>2</sub>, 0.13; KCl, 0.45. The pH value was adjusted to 4.0 with 1.0 mol/l NaOH (Liu et al., 1995) before sterilization (115 °C, 25 min). Another three sets of media containing 5%, 10% and 15% less water were prepared and, after sterilization, the amount of absolute ethanol (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) necessary to adjust ethanol concentration to 5% (w/w) (SWBM5%), 10% (w/w) (SWBM10%) and 15% (w/w) (SWBM15%), respectively, was added.

The four media were spiked with OTA solution to reach 2 or 5 µg/l. Controls having no OTA were also prepared. Fifty ml of each culture medium was poured in sterile 100-ml Erlenmeyer flasks. All experiments were performed in triplicate. All flasks were

inoculated with 410 µl of *O. oeni* culture in previously prepared MLO. The final concentration of *O. oeni* in the media was  $1 \times 10^6$  cfu/ml. Controls consisting of non-inoculated media spiked with OTA at the two levels were also run in parallel. Flasks were incubated at 25 °C and aliquots were removed under sterile conditions from day 1 up to day 30 after inoculation to quantify OTA, L-malic acid, and L-lactic acid by liquid chromatography (LC) and to assess cell concentration by spectrophotometry.

### 2.4. Absorbance measurements

Erlenmeyer flasks with bacterial cultures were shaken briefly. Aliquots of 1.5 ml were taken under sterile conditions and transferred into spectrophotometer cells whose absorbance was measured at 600 nm in a Beckman Coulter DU800 spectrophotometer to evaluate the concentration of *O. oeni* cells (both live and death) by means of a calibration curve using sterilized medium as control in all the experiments. After absorbance measurement, the samples were poured in Eppendorf centrifuge tubes and centrifuged at 4000 rpm for 6 min. One ml of supernatant was collected for OTA determination. The residue and the remaining supernatant were immediately frozen at –18 °C.

### 2.5. OTA determination

The appropriate amount of 0.1 mol/l H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution was added to the supernatant in tube to keep the pH between 2.5 and 3.0. Then, 2 ml of ethyl acetate was added. After shaking, the organic phase was loaded in an amber vial. This procedure was repeated once more time. The solvent was evaporated under N<sub>2</sub> stream at 50 °C, the residue was dissolved in 250 µl of LC mobile phase and 100 µl was injected into the LC system.

The LC system used consisted of a Waters 600E system controller, a Millipore Waters 717 Plus autosampler and a Waters 470 scanning fluorescence detector (Waters, Milford, Ma, USA). Excitation and emission wavelengths were 330 and 460 nm, respectively. The samples were separated using a C<sub>18</sub> Phenomenex Gemini<sup>®</sup> (150 mm × 4.6 mm, 5 µm particle size) (Phenomenex, Macclesfield, UK), provided with a guard column made of the same material. OTA retention time was about 12 min. The flow rate of the mobile phase (acetonitrile–water–acetic acid; 40:58:2, v/v/v) was 1 ml/min. Fluorescence measurements were processed by Millennium 32<sup>®</sup> version 4.0 software (Waters). OTA concentration was determined by means of a calibration line that was obtained using SWBM spiked with OTA standard in the range 0.2–6.0 µg/l. The average recovery ratio for OTA was 90% and the limit of detection (LOD) based on a signal-to-noise ratio = 3:1 was 0.01 µg OTA/l.

### 2.6. Determination of L-malic and L-lactic acids

To perform the determination of L-malic and L-lactic acids in the cultures, Eppendorf centrifuge tubes containing residual supernatant and bacterial pellet were thawed and centrifuged at 6000 rpm for 3 min. Twenty µl of supernatant was injected into the LC system (see Section 2.5). A Nucleogel<sup>®</sup> column (300 mm × 7.7 mm, 5 µm particle size) (Machery–Nagel GmbH, Düren, Germany) kept at 70 °C and provided with a guard column of the same material was used for separation. The flow rate of the mobile phase (8.5 × 10<sup>–3</sup> M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in water) was 0.35 ml/min. Detection was performed using both a Waters 2410 Refractive Index Detector (RID) and a Waters 996 Diode Array Detector (DAD) set at 210 nm. L-malic acid and L-lactic acid were detected at 18.3 and 24.3 min, respectively, using RID and at 17.8 and 23.8 min, respectively, using DAD. Calibration curves were prepared using SWBM added with standard solutions of L-malic and L-lactic acids covering the interval of concentrations from 0.01 to

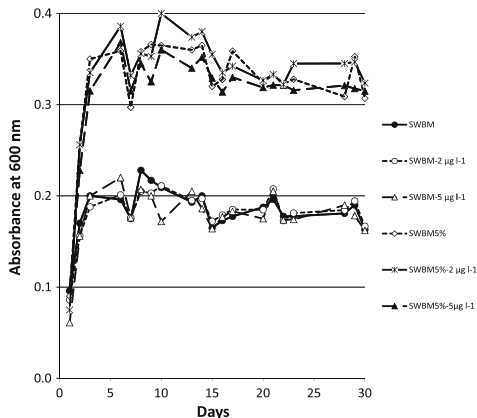
12 g/l. Concentrations were calculated with Millennium 32<sup>®</sup> version 4.0 software. The LOD of the method using DAD (210 nm) and a signal-to-noise ratio = 3:1 was 0.012 g/l for L-malic acid and 0.004 g/l for L-lactic acid.

### 2.7. Statistical analysis

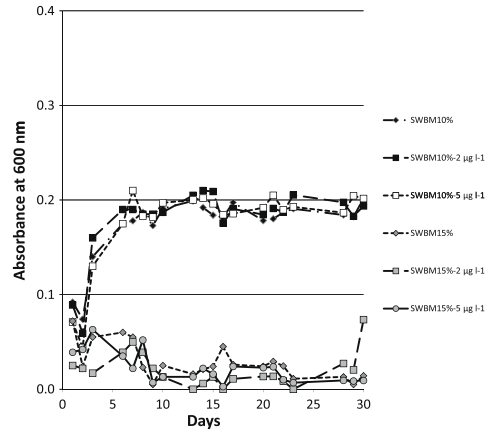
Statistical analysis of the data was performed using Statgraphics Centurion XV<sup>®</sup> version 15.1.02 (StatPoint, VA, USA). For analysis of variance (ANOVA) significant differences among mean values were reported at  $p$ -values  $\leq 0.01$ . Tukey's HSD (honestly significant difference) multiple range test at 99% confidence level was used to group the cases into homogeneous clusters with regard to the factors used.

### 3. Results

Figs. 1 and 2 show the results obtained in the study of growth of *O. oeni* in the media assayed. Statistical analysis (ANOVA and Tukey's HSD test) of the results reveals that three clusters are significant. ANOVA of the data permits to infer that ethanol concentration and incubation time significantly affect bacterial growth ( $p < 0.01$ ). However, no significant effect of OTA level ( $p = 0.418$ ) was revealed under the assayed conditions. According to Tukey's HSD test, the ethanol concentration provided three different groups. The population of *O. oeni* rapidly increased in SWBM5%, where the highest absorbance (about 0.34) was reached. At the third incubation day, the average level of bacteria, taking into account the three media containing 5% ethanol (SWBM5%, SWBM5% – 2  $\mu$ g/l, and SWBM5% – 5  $\mu$ g/l), was  $4.12 \times 10^8$  cells/ml and remained roughly constant up to day 30. The ethanol-free cultures (Fig. 1) and the cultures containing 10% ethanol (Fig. 2) showed the same pattern concerning absorbance measurement. Considering the six cultures, the average cell concentration was  $1.13 \times 10^8$  cells/ml at the third incubation day and  $1.34 \times 10^8$  cells/ml at the end of the incubation period. No significant change in bacterial population at the third incubation day



**Fig. 1.** Dynamics of *O. oeni* growth in cultures performed in synthetic wine-like basal media (SWBM) and incubated at 28 °C during 30 d. SWBM: culture without ethanol and OTA; SWBM – 2  $\mu$ g/l: culture containing 0% ethanol and 2  $\mu$ g OTA/l; SWBM – 5  $\mu$ g/l: culture containing 0% ethanol and 5  $\mu$ g OTA/l; SWBM5%: culture containing 5% ethanol but no OTA; SWBM5% – 2  $\mu$ g/l: culture containing 5% ethanol and 2  $\mu$ g OTA/l; SWBM5% – 5  $\mu$ g/l: culture containing 5% ethanol and 5  $\mu$ g OTA/l.



**Fig. 2.** Dynamics of *O. oeni* growth in cultures performed in SWBM10% and incubated at 28 °C during 30 days. SWBM10%: culture containing 10% ethanol but no OTA; SWBM10% – 2  $\mu$ g/l: culture containing 10% ethanol and 2  $\mu$ g OTA/l; SWBM10% – 5  $\mu$ g/l: culture containing 10% ethanol and 5  $\mu$ g OTA/l; SWBM15%: culture containing 15% ethanol but no OTA; SWBM15% – 2  $\mu$ g/l: culture containing 15% ethanol and 2  $\mu$ g OTA/l; SWBM15% – 5  $\mu$ g/l: culture containing 15% ethanol and 5  $\mu$ g OTA/l.

was observed in SWBM15% (Fig. 2) and the number of cells/ml was nearly constant up to day 30. No significant differences in cell concentration among the cultures with regard to the initial OTA level were observed and cases were clustered into a single group.

The MLF was monitored in the cultures to assess whether OTA and ethanol levels in the media influence the process. Thus, the factors considered in this assay were: incubation time, and the levels of OTA, L-malic acid, L-lactic acid and ethanol in the cultures.

The concentrations of L-malic acid and L-lactic acids over the incubation period appear in Tables 1 and 2, respectively. MLF was rapid and similar in both SWBM and SWBM5% cultures, so that the initial level of L-malic acid rapidly decreased. However, the decrease rate in SWBM10% was slower. After reaching less than 0.5 g/l, L-malic acid level stabilized with slight changes up to day 30. The decrease of L-malic acid levels (Table 1) closely matches the increase of L-lactic acid levels (Table 2) for the same cultures. No significant changes with regard to the starting acid concentration were observed in controls and SWBM15%.

From the ANOVA it may be inferred that both ethanol concentration and incubation time but not the initial OTA level have significant effects on MLF. The cases for both acids were grouped by the Tukey's HSD test into three homogeneous groups with regard to the ethanol concentration. However, no clustering was observed with regard to OTA initial level, in agreement with results from ANOVA.

No change over time was observed in the initial OTA levels of non-inoculated controls. Fig. 3 shows the results for the change of mycotoxin level with time in the cultures of *O. oeni*. Small shifts can be due to reproducibility of the analytical method. Very similar reduction patterns of the mycotoxin were observed in cultures with 0% and 5% ethanol (Fig. 3A). Nevertheless, although at the second incubation day the ratio of OTA reduction was about 15% in all these media, differences were noticeable from the fourth day: the % of toxin remaining in cultures was lower when the initial level was 2  $\mu$ g/l. The highest percentage of toxin reduction (about 29%) was recorded at incubation day 10 in SWBM5% – 2  $\mu$ g/l. Maximum reduction in SWBM – 2  $\mu$ g/l (26%) took place at day 6. The highest

**Table 1**Change of L-malic acid concentration (g/l) over time in cultures of *O. oeni* performed in SWBM containing different ethanol and OTA levels.

Days	Ethanol (% w/w)											
	0			5			10			15		
	0	2	5	0	2	5	0	2	5	0	2	5
0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
1	8.7	8.7	8.6	8.5	8.7	8.7	9.8	9.8	9.7	10.0	10.0	10.0
5	0.61	0.72	0.69	0.30	0.42	0.35	4.50	4.60	4.34	9.8	9.7	9.9
10	0.50	0.21	0.19	0.41	0.23	0.21	1.52	1.66	1.63	10.2	10.2	10.0
15	0.44	0.36	0.37	0.80	0.37	0.33	1.46	0.87	0.80	10.0	9.7	10.0
20	0.42	0.37	0.36	0.49	0.35	0.32	1.24	0.58	0.51	9.7	10.2	9.8
25	0.41	0.38	0.80	0.95	0.39	0.33	0.50	0.41	0.40	10.1	9.8	10.0
30	0.60	0.38	0.38	0.76	0.42	0.33	0.49	0.41	0.39	9.8	10.0	10.1

**Table 2**Change of L-lactic acid concentration (g/l) over time in cultures of *O. oeni* performed in SWBM containing different ethanol and OTA levels.

Days	Ethanol (% w/w)											
	0			5			10			15		
	0	2	5	0	2	5	0	2	5	0	2	5
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	1.06	1.08	1.18	1.23	1.13	1.12	0.43	0.42	0.42	ND	ND	ND
5	6.60	6.70	6.80	6.70	7.18	7.00	3.90	4.10	4.20	ND	ND	ND
10	6.96	7.12	7.16	7.18	7.35	7.23	6.28	6.07	6.22	ND	ND	ND
15	6.86	7.28	7.35	7.56	7.59	6.79	7.11	7.05	7.11	ND	ND	ND
20	7.43	7.48	7.35	8.18	8.23	7.85	7.42	7.73	7.85	ND	ND	ND
25	7.30	7.40	7.30	7.70	7.90	7.30	7.80	7.70	8.30	ND	ND	ND
30	7.81	7.97	8.13	8.34	8.77	8.22	8.41	8.56	8.80	ND	ND	ND

ND: not detected.

OTA reduction percentages in cultures containing 0% or 5% ethanol and spiked with 5 µg OTA/l ranged between 20% and 22% (Fig. 3A). OTA reduction ratios in cultures containing 10% ethanol were lower than in cultures containing 0% or 5% ethanol (Fig. 3B). The highest mycotoxin reduction ratio did not exceed 16.5% in SWBM10% – 2 µg/l, or 10% in SWBM10% – 5 µg/l. Maximum reduction ratios, once reached, were roughly constant up to the end of the incubation period. No changes in OTA levels were observed in non-inoculated media used as controls and *O. oeni* cultures supplemented with 15% ethanol.

ANOVA related to OTA removal by *O. oeni*, reveals that the three assayed factors had significant effects ( $p < 0.01$ ) on toxin elimination. In addition, a first order interaction (ethanol content × OTA starting concentration) was also found significant.

Using Tukey's HSD, ethanol concentration split the cases into three homogeneous non-overlapping clusters, concerning to cultures performed in SWBM/SWBM5%, SWBM10%, and SWBM15%. The cases were split into two homogeneous non-overlapping groups by the OTA concentration, which means that the initial OTA level in the medium significantly affects ( $p < 0.01$ ) toxin removal percentage, which was higher in the cultures spiked with 2 µg OTA/l.

#### 4. Discussion

In recent years, special attention has been paid to the frequent occurrence of OTA in grape, grape juice and wine. Previous studies carried out in our laboratory and another report (Del Prete et al., 2007) point out that *O. oeni* can remove OTA from synthetic media (MLO). However, no studies dealing with this species or other LAB in defined media simulating the conditions that bacteria find in

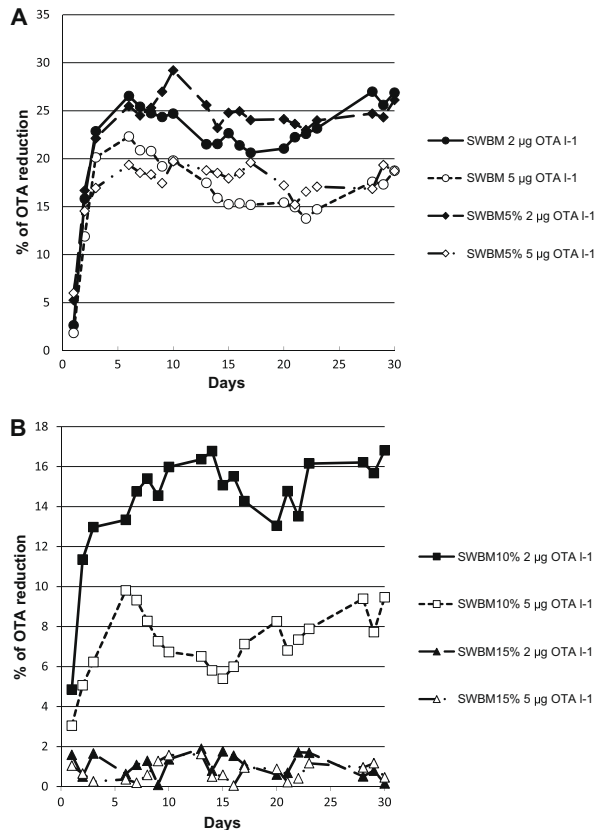
wine after alcohol fermentation have been reported to date. A decrease of initial OTA levels takes place during the vinification process (Abrunhosa, Fernandes, & Venâncio, 2005; García-Moruno, Sanlorenzo, Boccaccino, & Di Stefano, 2005; Savino, Limosani, & García-Moruno, 2007), but the characteristics of the process are not exactly known because wine is a complex medium and different factors occur in it. Thus, a synthetic wine-like basal medium (SWBM) (Liu et al., 1995; Reguant, Bordons, Arola, & Rozès, 2000), with some modifications was used. SWBM was supplemented with different levels of ethanol and OTA, so that toxin levels were similar to those that can be found in naturally contaminated wines (Battilani et al., 2003; JECFA, 2001; Mateo et al., 2007; Otteneder & Majerus, 2000).

Growth of *O. oeni* was mainly modulated by ethanol concentration. The largest growth rates and bacterial concentrations were observed in cultures containing 5% ethanol. Cavin, Divies, and Guzzo (1998) have reported that low levels of ethanol (3–5%) stimulate *O. oeni* growth, which agrees with the results in the present study. The strain used was isolated from wine and its growth is logically favored by presence of ethanol. Tolerance to ethanol varies from strain to strain but it is generally accepted that *O. oeni* strains can grow in media containing 10% ethanol (Britz & Tracey, 1990). The results of the present study show that the ethanol level in SWBM significantly affects population growth under the assay conditions.

The starting OTA levels were low because higher levels are rare in wine (Mateo et al., 2007). Piotrowska and Zakowska (2005) tested the tolerance of some *Lactobacillus* species to OTA and found that growth rate decreased when OTA levels added to the medium were higher than those used in the present study.

MLF proceeded similarly in SWBM and SWBM5%, even though cell concentration was higher in the experiments performed in





**Fig. 3.** Reduction percentage of OTA by *O. oeni* in cultures performed in SWBM incubated at 28 °C during 30 d and added with different levels of OTA (2–5 µg/l) and ethanol. (A) Ethanol concentration: 0 and 5%, w/w; (B) Ethanol concentration: 10% and 15%, w/w. For legend meaning, see Figs. 1 and 2.

SWBM5%. Transformation of L-malic was practically completed after 5 d in SWBM5% but more than 15 d were required in SWBM10%. Ethanol tolerance is crucial for the activity of *O. oeni* cells in wine (Da Silveira, Golovina, Hoekstra, Rombouts, & Abee, 2003; Vaillant, Formisyn, & Gerbaux, 1995). Capucho and San Romao (1994) report that 12% of ethanol inhibited cell growth, while malolactic activity was not affected. These differences can be due to the use of different culture media and to the fact that tolerance to ethanol changes from strain to strain (Britz & Tracey, 1990).

Yeasts and bacteria can remove OTA from the medium (Bejaoui et al., 2004; Del Prete et al., 2007; Fuchs et al., 2008; Piotrowska & Zakowska, 2005; Ringot et al., 2005). This phenomenon, called bio-sorption, is a metabolism independent adsorption of pollutants based on the partition process on microbial biomass (Ringot et al., 2005). Physical binding of OTA to the cell wall was suggested, but the binding mechanism has not yet been described.

In the present study, the ability of the *O. oeni* strain to remove OTA from the culture media depended on the assay conditions. Both OTA and ethanol levels in the medium significantly affected mycotoxin reduction. The percentage of OTA reduction when the initial level was 5 µg/l was lower than when it was 2 µg/l. These re-

sults are interesting because OTA levels exceeding 2 µg/l are rare in wine (JECFA, 2001; Mateo et al., 2007). It has been reported that binding of aflatoxin B1 to LAB depends on the initial level of the toxin (Haskard, El-Nezami, Peltonen, Salminen, & Ahokas, 1998).

OTA removal in MLO by binding of the toxin to *O. oeni* cell walls has been reported (Del Prete et al., 2007). Mateo et al. (2010) have shown that OTA removal is not caused by cell metabolism as there were no significant differences between living and heat-inactivated cells of *O. oeni* with regard to its ability to eliminate OTA.

LAB cell wall has a peptidoglycan matrix as the major structural constituent but there are also other components (teichoic and lipoteichoic acids, a proteinaceous S layer and neutral polysaccharides). Teichoic acids may contribute more than 50% to the cell wall weight and seems to be largely responsible for its hydrophobicity (Delcour, Ferain, Deghorain, Palumbo, & Hols, 1999). Thus, they might have a relevant role in the binding mechanism of OTA to LAB cell walls. The peptidoglycan or closely related structures might be the most likely carbohydrate involved in the binding process of aflatoxin B1 by *L. rhamnosus* (Lahtinen, Haskard, Ouwehand, Salminen, & Ahokas, 2004).

Fuchs et al. (2008) indicate that optimal OTA removal by some *Lactobacillus* species occurs at pH 5 and report a 50% reduction in OTA level by *L. acidophilus* at pH 7–8. Del Prete et al. (2007) recovered 57.4% of OTA by washing cell pellets of *O. oeni* growth in OTA-containing medium with phosphate buffer (pH 6.5). As small pH changes have such an effect on the amount of OTA bound to cells, the nature of this binding seems to be weak. Due to their acidic constants (Valenta, 1998) OTA is neutral at pH equal or slightly below five so that its solubility in common polar organic solvents is higher than in water, where its solubility is enhanced at pH  $\geq 7$ .

In previous studies performed in our laboratory, weak binding of OTA to bacteria was noticed in cultures of *O. oeni* (strain 6G) performed in MLO at pH 4.8 because small releases of OTA were detected in the medium over long incubation times in spite of having found OTA reduction ratios of up to 68% (data not shown). In those experiments, the medium had no ethanol and cell concentrations were higher than those shown in the present study. It was deduced that, in ethanol-free culture media, OTA reduction ratio depends on pH and bacterial concentration.

In the present study, cell concentration in SWBM was lower than in SWBM5% (Fig. 1) but OTA reduction ratios were similar in both media. Cell concentration was similar in SWBM and SWBM10%. However, OTA reduction ratios were higher in SWBM than in SWBM10%. No OTA reduction happened in cultures performed in SWBM15% where *O. oeni* hardly grew. If the hypothesis that *O. oeni* eliminates OTA by biosorption to the cell wall is accepted, our results point out that the ethanol percentage in the medium affects this mechanism. There are no previous studies dealing with the effect of ethanol concentration on the binding of mycotoxins to bacterial cell walls. The amount of OTA adsorbed to the cell walls and OTA concentration in the medium in equilibrium at a given temperature might likely be governed by the isotherm of Freundlich due to the lack of uniformity of the cell wall surface. The linearized form of this equation is:

$$\text{Log}S = \text{log}K + 1/n\text{log}C \quad (1)$$

where  $S$  is the amount of bound OTA/g of sorbent,  $K$  and  $1/n$  are constants and  $C$  is the equilibrium concentration of OTA in the solution, which depends on the composition of the medium. There are other biosorption models but the best one able to explain the binding of OTA to LAB is not known. Under acidic conditions, OTA has affinity towards hydrophobic environments, such as those provided by the teichoic acids in bacterial cell walls. However, at pH around four OTA solubility increases with the ethanol percentage in the aqueous medium, because the alcohol reduces the polarity. The enhanced solubility of OTA in ethanol-containing medium would decrease the amount of toxin adsorbed to cell walls because the total OTA amount is roughly constant. This can explain the same toxin reduction ratio found in SWBM and SWBM5%, regardless of the higher cell concentration in the latter. This would also explain that in SWBM and SWBM10% cultures, which show similar cell populations, the toxin reduction ratio is higher in the former, where OTA solubility would be lower.

The presence of ethanol in acidic wine-like medium negatively affects detoxification of OTA by *O. oeni*, probably because ethanol enhances the solubility of OTA at the acidic pH of the medium. Hence, wine does not seem to be a suitable medium to keep a strong binding of OTA to *O. oeni* cell walls, especially if wine features a high alcohol degree.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from FEDER, from Spanish Ministry of Science and Innovation (Projects AGL-2004-07549-C05-02/ALI, AGL2007-66416-C05-01/ALI and for two research grants) and from Valencian Government "Conselleria

d'Empresa, Universitat i Ciència" (Project ACOMP/2007/155). The authors wish to thank Dr. I. Pardo and Dr. S. Ferrer (ENOLAB Research group, University of Valencia) for supplying the bacterial strains.

#### References

- Abid, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maaroufi, K., Ellouz, F., et al. (2003). Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: Is the situation endemic? *Human and Experimental Toxicology*, 22, 77–84.
- Abrunhosa, L., Fernandes, A., & Venâncio, A. (2005). Ochratoxin A removal during the main steps of Wine Making. 7 Encontro de Química dos Alimentos, 13–16 Abril 2005, ESAV-IPV/SPQ, Viseu, Portugal.
- Álvarez, L., Gil, A. G., Ezepeleta, O., García-Jalón, J. A., & López de Cerain, A. (2004). Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 825–834.
- Battilani, P., Pietro, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., & Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*, 66, 633–636.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrhi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic medium and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1038–1044.
- Bondy, G. S., & Armstrong, C. K. L. (1998). Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-P1K and OK cell lines. *Cell Biology and Toxicology*, 14, 323–332.
- Britz, T. J., & Tracey, R. P. (1990). The combination effect of pH, SO<sub>2</sub>, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Microbiology*, 68, 23–31.
- Capucho, I., & San Romao, M. V. (1994). Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 391–395.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafuri, A., & Ritieni, A. (2006). Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 122–126.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281–370.
- Caspritz, G., & Radler, F. (1983). Malolactic enzyme of *Lactobacillus plantarum*. Purification, properties and distribution among bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 4907–4910.
- Cavin, J. F., Divies, C., & Guzzo, J. (1998). La fermentation malolactique. In C. Flanzy (Ed.), *Coordinateur, Oenologie. Fondements scientifiques et technologiques, Technique et documentation* (pp. 503–511). Paris: Lavoisier.
- Cecchini, F., Morassut, M., Garcia-Moruno, R., & Di Stefano, E. (2006). Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology*, 23, 411–417.
- Creppy, E. E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19–28.
- Da Silveira, M. G., Golovina, E. A., Hoekstra, F. A., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5826–5832.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290–301.
- Del Prete, V., Rodríguez, H., Carrascosa, A. V., De Las Rivas, A., García-Moruno, E., & Muñoz, R. (2007). In vitro removal of ochratoxin A by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 9, 2155–2160.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 159–184.
- European Commission (2006). Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364, 5–24.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundli, M., & Knasmüller, S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1398–1407.
- García-Moruno, E., Sanlorenzo, C., Boccacino, B., & Di Stefano, R. (2005). Treatment with yeast to reduce the concentration of ochratoxin A in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 73–76.
- Hammes, W. P., & Hertel, C. (2006). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The prokaryotes* (3rd ed., Vol. 4, pp. 319–402). New York: Springer Science and Business Media.
- Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Peltonen, K. D., Salminen, S., & Ahokas, J. T. (1998). Sequestration of aflatoxin B1 by probiotic strains: Binding capacity and localisation. *Revue de Médecine et Vétérinaire*, 149, 571.
- Huff, W. E., Chang, C. F., Warren, M. F., & Hamilton, P. B. (1979). Ochratoxin A-induced iron deficiency anemia. *Applied Microbiology*, 37, 601–604.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* (vol. 56, pp. 489–521). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- JECFA (Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives series 47. FAO food and

- nutrition paper 74. <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>>.
- Kunkee, R. E. (1967). Malo-lactic fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 9, 235–279.
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E., & Ribéreau-Gayon, P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during different stages of vinification and conservation of wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 46, 874–880.
- Lahtinen, S. J., Haskard, C. A., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., & Ahokas, J. T. (2004). Binding of aflatoxin B1 to cell wall components of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Food Additives and Contaminants*, 21, 158–164.
- Liu, S. Q., Davis, C. R., & Brooks, J. D. (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 166–174.
- Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E. M., Mateo, F., & Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 79–83.
- Mateo, E. M., Medina, A., Mateo, F., Valle-Algarra, F. M., Pardo, I., & Jiménez, M. (2010). Ochatoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control*, 21, 23–28.
- Medina, A., Jiménez, M., Gimeno-Adelantado, J. V., Valle-Algarra, F. M., & Mateo, R. (2005b). Determination of ochratoxin A in beer marketed in Spain by liquid chromatography with fluorescence detection using lead hydroxyacetate as a clean-up agent. *Journal of Chromatography A*, 1083, 7–13.
- Medina, A., Mateo, R., López-Ocaña, L., Valle-Algarra, F. M., & Jiménez, M. (2005a). Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* Section *Nigri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4696–4702.
- Medina, A., Valle-Algarra, F. M., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., Mateo, F., & Jiménez, M. (2006). New method for determination of ochratoxin A in beer using zinc acetate and solid-phase extraction silica cartridges. *Journal of Chromatography A*, 1121, 178–183.
- Ottener, H., & Majerus, P. (2000). Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants*, 17, 793–798.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: An overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 279–289.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L., & Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*, 18, 647–654.
- Piotrowska, M., & Zakowska, Z. (2005). The elimination of ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish Journal of Microbiology*, 4, 279–286.
- Reguant, C., Bordonas, A., Arola, L., & Rozès, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 1065–1071.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J. P., Auclair, E., Oriol, E., & Larondelle, Y. (2005). Effect of temperature on in vitro ochratoxin A biosorption onto yeast cell derivatives. *Process Biochemistry*, 40, 3008–3016.
- Savino, M., Limosani, P., & García-Moruno, E. (2007). Reduction of ochratoxin A contamination in red wines by oak wood fragments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 97–101.
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 70–78.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., & Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 63–68.
- Trucksess, M. W., Giler, J., Young, K., White, K. D., & Page, S. W. (1999). Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee-1997. *Journal of the AOAC International*, 82, 85–89.
- Vaillant, H., Formisyn, P., & Gerbaux, V. (1995). Malolactic fermentation of wine: Study of the influence of some physico-chemical factors by experimental design assays. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 640–650.
- Valenta, H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A. *Journal of Chromatography A*, 815, 75–92.
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A. K., & Telang, A. G. (2005). Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effects. *Toxicology*, 215, 37–47.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 302–313.
- Zimmerli, B., & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. *Journal of Chromatography B*, 666, 85–99.