

(043) "2002" Vel

1600227467X



UNIVERSITAT DE LLEIDA
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària



Universitat de Lleida
Registre General

28 OCT. 2002

4470

3:

**Ecofisiología de especies de *Fusarium*
productoras de fumonisinas,
zearalenona y deoxinivalenol en maíz:
aceites esenciales como inhibidores
fúngicos**



Tesis doctoral
Andrea Velluti Perrou
Lleida, 2002

2339-59260

0195-53960

RESUM

Es fumonisines, produïdes principalment per *Fusarium verticillioides* i *F. proliferatum*, i la zearalenona (ZEA) i el deoxinivalenol (DON), produïdes per *F. graminearum* entre altres espècies de *Fusarium*, són micotoxines que es troben freqüentment al panís. Donat que la producció de micotoxines es veu influenciada per diferents factors biòtics i abiòtics, el grau de contaminació amb aquestes toxines varia any rera any, depenent tant de las condicions climàtiques com de les pràctiques agràries. Les espècies del gènere *Fusarium* es consideren com a fongs de camp, ja que colonitzen els conreus abans de la collita; la prevenció mitjançant el control precollita és el primer pas per a minimitzar la contaminació amb les micotoxines produïdes per aquestes espècies. L'ús de fungicides sintètics s'està controlant cada cop més i la pressió per a trobar alternatives més segures augmenta. Diversos estudis s'han centrat en trobar fungicides que siguin segurs tant per a la salut com per al medi ambient. Els extractes naturals de plantes poden proveir una alternativa als fungicides sintètics. Diferents investigadors han realitzat estudis observant l'efecte dels olis essencials en el creixement fúngic i han constatat que alguns d'ells podrien servir com fungicides naturals.

Els objectius d'aquesta tesi han estat a) avaluar la contaminació per fumonisines B₁ (FB₁) en panís i productes derivats del panís destinats al consum humà i animal a Espanya. En segon lloc, b) s'ha determinat l'efecte de les interaccions fúngiques, entre soques de *F. verticillioides* i *F. proliferatum* productores de fumonisines, amb soques de *F. graminearum*, productores de zearalenona i deoxinivalenol, en el creixement i la producció de micotoxines y la relació amb els factors abiòtics. Posteriorment, c) s'ha realitzat una avaluació *in vitro* d'una sèrie d'olis essencials per a determinar el seu efecte inhibitori del creixement de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. graminearum*. Finalment, d) s'han seleccionat cinc olis essencials amb els quals s'han continuat els estudis, a fi d'avaluar el seu efecte com inhibidors del creixement de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* i *F. graminearum* i de la producció de fumonisines, zearalenona i deoxinivalenol en funció dels factors abiòtics (a_w i temperatura) en grans de panís irradiats.

Es va veure que el 86 % de les mostres recollides durant els anys 1998-2000, destinades al consum animal contenien FB₁ en un interval de 89-8760 ng g⁻¹. Quatre d'aquestes mostres presentaren nivells de FB₁ superiors a 5000 ng g⁻¹, que és el límit recomanat pel Comité de Micotoxines de l'

Associació Americana de Veterinaris de Laboratoris de Diagnosi per cavalls i altres equins. El 23 % de las mostres destinades al consum humà estaven contaminades amb FB₁, tot i que els valors trobats van ser generalment baixos. Es va veure que els productes de panís que han estat processats industrialment, principalment per via tèrmica, presenten concentracions menors de FB₁.

En general, la producció de les micotoxines estudiades no sembla tenir un paper lligat a l'obtenció d'un avantatge competitiu davant d'altres espècies. Tampoc s'observà una inhibició de la producció de micotoxines deguda a la presència d'altres espècies competidores. La producció va estar més condicionada pels factors abiòtics, com la temperatura i la a_w , que per la possible interacció entre diferents espècies de floridures.

Els olis essencials que mostraren major activitat antifúngica foren els de canyella, clau, lemongrass, orenga i palmarosa. L'acció antimicòtica i antimicotoxigènica d'aquests cinc olis essencials fou més accentuada quan el gra tenia la màxima a_w estudiada (0,995). Els olis essencials de orenga, clau i lemongrass inhibiren significativament el creixement de totes les soques de les tres espècies de *Fusarium* estudiades quan el gra de panís tenia una a_w inicial de 0,995 i s'incubava a 20 o a 30 °C. La producció de FB₁ per *F. verticillioides* i *F. proliferatum*, i la producció de DON per *F. graminearum* foren significativament inhibides pels cinc olis essencials estudiats quan els grans de panís tenien una a_w inicial de 0,995 y s'incubaven a 30 °C. No obstant, al realitzar la incubació a 20 °C, la producció de FB₁ per *F. verticillioides* fou estimulada pels olis essencials de clau i orenga. D'altra banda, la producció de ZEA fou inhibida només per l'oli essencial de palmarosa, a les dues temperatures quan la a_w inicial del panís era de 0,995 a_w .

Realitzar un seguiment de la temperatura, la precipitació y la humitat relativa durant el desenvolupament del gra de panís al camp permetria efectuar una sèrie de recomanacions sobre els tractaments a seguir. El tractament amb olis essencials com a fungicides podria ser una alternativa, encara que prèviament s'haurien de fer més estudis per a determinar la viabilitat. La implementació d'un sistema integrat, que consistiria bàsicament en un programa de control basat en l'Anàlisi de Perills y Punts Crítics de Control (APPCC), seria necessari per a assegurar una baixa contaminació en els aliments.

SUMMARY

Fumonisin, which are mostly produced by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*, and zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON), which are produced by *F. graminearum* among other *Fusarium* species, are common contaminants in maize. These mycotoxins production is influenced by some biotic and abiotic factors, therefore contamination level varies every year, and depends on environmental conditions and agricultural practices. *Fusarium* spp. is usually described as a field fungi, because it colonises the crop before harvest; the preharvest control is the first step to prevent from the invasion of these *Fusarium* species and mycotoxins production under field conditions. The use of synthetic fungicides is becoming more controlled, and there is an increasing pressure to find safer alternatives. Several researchers have focused in the search for fungicides that are safe to humans and for the environment. Natural extracts from plants may provide an alternative to synthetic fungicides. Researchers have examined the effect of some essential oils on growth rates of some fungi and have shown that some of them could be used as natural fungicides.

The objectives of the present thesis were to investigate a) the fumonisin B₁ (FB₁) contamination on corn and corn-based food products from Spain, intended for animal and human consumption; b) the effect of fungal interactions between producing fumonisin isolates, and isolates of *F. graminearum* producing zearalenone and deoxynivalenol, on growth rate and mycotoxins production and the relationship with abiotic factors; c) an *in vitro* screening of some essential oils on inhibition of mycelial growth of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*; and d) the study was continued with five selected essential oils from the screening assess their efficacy on growth rate of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and inhibition of FB₁, zearalenone and deoxynivalenol production at different a_w and temperature conditions in maize grain.

FB₁ superiores a 5000 ng g⁻¹, que es el límite recomendado por el comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Veterinarios de Laboratorio de Diagnósis para caballos u otros equinos. El 23 % de las muestras destinadas al consumo humano estuvieron contaminadas con FB₁, aunque los valores encontrados generalmente fueron bajos. Se vio que los productos de maíz que han sido sometidos a algún tipo de proceso, principalmente térmico, presentan valores menores de FB₁.

En general, la producción de las micotoxinas estudiadas no parece estar relacionada a una ventaja competitiva frente a otras especies. Tampoco se observó una inhibición de la producción de micotoxinas debida a la presencia de otras especies competidoras. La producción de micotoxinas parece estar más condicionada por los factores abióticos, como la temperatura y la a_w , que por la posible interacción entre diferentes especies de mohos.

Los aceites esenciales que mostraron mayor actividad antifúngica fueron los de canela, clavo, lemongrass, orégano y palmarosa. La acción antimicótica y antimicotoxigénica de estos cinco aceites esenciales fue mayor cuando el grano presentaba la máxima a_w estudiada (0,995). Los aceites esenciales de orégano, clavo y lemongrass inhibieron significativamente el crecimiento de todas las cepas de las tres especies de *Fusarium* estudiadas cuando el grano de maíz tenía una a_w inicial de 0,995 y se incubaba tanto a 20 como a 30 °C. La producción de FB₁ por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, y la producción de DON por *F. graminearum* fueron significativamente inhibidas por los cinco aceites esenciales estudiados cuando los granos de maíz presentaban una a_w inicial de 0,995 y se incubaban a 30 °C. No obstante, al realizar la incubación a 20 °C, la producción de FB₁ por *F. verticillioides* fue estimulada por los aceites esenciales de clavo y orégano. Por otra parte, la producción de ZEA fue solamente inhibida por el aceite esencial de palmarosa, a las dos temperaturas cuando la a_w inicial del maíz era de 0,995 a_w .

Realizar un seguimiento de la temperatura, las precipitaciones y la humedad relativa durante el crecimiento del grano de maíz, nos permitiría efectuar una serie de recomendaciones sobre los tratamientos a seguir. El tratamiento con aceites esenciales como fungicidas podrían ser una alternativa, aunque se necesitarían más estudios para comprobar su viabilidad. La implementación de un sistema integrado, lo que consistiría básicamente en un programa de control basado en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), sería necesario para asegurar una baja contaminación en los alimentos.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS COMO PRODUCTORES DE MICOTOXINAS	3
2. EL GÉNERO <i>FUSARIUM</i>	5
2.1. Ubicación taxonómica y morfológica de <i>Fusarium</i> spp	5
2.2. <i>Fusarium</i> Sección Liseola.....	6
2.3. <i>Fusarium graminearum</i> (Sección Discolor)	7
2.4. Ecología de <i>Fusarium</i>	7
3. MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR <i>FUSARIUM</i> SECCIÓN LISEOLA.....	7
3.1. Fumonisinias	8
3.1.1. Toxicidad de las fumonisinias	9
<i>Leucoencefalomalacia en equinos (ELEM)</i>	9
<i>Edema Pulmonar en porcinos (PPE)</i>	9
<i>Toxicosis en aves de corral</i>	10
<i>Toxicosis humana</i>	10
4. MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR <i>FUSARIUM</i> <i>GRAMINEARUM</i>	11
4.1. Deoxinivalenol (DON)	11
4.1.1. Toxicidad del DON.....	12
4.2. Zearalenona (ZEA)	13
4.2.1. Toxicidad la ZEA	13
5. FACTORES QUE AFECTAN A LA COLONIZACIÓN FÚNGICA DE LOS CEREALES	15
5.1. Actividad de agua.....	15
5.2. Temperatura	17

5.3. Relación entre la actividad de agua, temperatura y producción de micotoxinas	18
5.4. Interacciones microbianas.....	20
6. EL MAÍZ. IMPORTANCIA Y PROBLEMÁTICA MICROBIOLÓGICA.....	22
6.1. Generalidades	22
6.2. Contaminación fúngica	24
6.3. Contaminación de maíz por <i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i>	26
6.4. Contaminación de maíz por <i>F. graminearum</i>	29
6.5. Niveles de contaminación natural de granos de maíz con fumonisinas.....	30
6.6. Niveles de contaminación natural con fumonisinas de productos derivados de maíz.....	32
6.7. Incidencia natural de deoxinivalenol y zearalenona en maíz y en productos derivados de maíz.....	34
6.8. Prevención del crecimiento fúngico y de la contaminación por micotoxinas	37
<i>Control precosecha</i>	38
<i>Control en la cosecha</i>	39
<i>Control postcosecha</i>	40
7. ACEITES ESENCIALES. PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS.....	41
7.1. Composición química	42
7.2. Propiedades físicas	43
7.3. Usos	43
7.4. Métodos de obtención.....	43
7.5. Legislación y normativa aplicable en aceites esenciales.....	44
7.6. Actividad antimicrobiana.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA	47

II. OBJETIVOS	57
III. PLAN DE TRABAJO	58
IV. Occurrence of fumonisin B ₁ in spanish corn-based foods for animal and human consumption (<i>inglés</i>)	59
V. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> and <i>F. graminearum</i> and on fumonisin B ₁ and zearalenone formation (<i>inglés</i>).....	70
VI. Fumonisin B ₁ , zearalenone and deoxynivalenol production by <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> and <i>F. graminearum</i> in mixed cultures on irradiated maize kernels (<i>inglés</i>)	86
VII. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> and <i>F. graminearum</i> on maize-based agar media (<i>inglés</i>)	105
VIII. Control of <i>Fusarium verticillioides</i> growth and fumonisin B ₁ production in maize grain by the addition of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils (<i>inglés</i>)	123
IX. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B ₁ production by <i>Fusarium proliferatum</i> in maize grain (<i>inglés</i>).....	140
X. Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by <i>Fusarium graminearum</i> under different temperature and water activity conditions in maize grain (<i>inglés</i>).....	157
XI. DISCUSIÓN GENERAL	177
Generalidades	177

Evaluación de la presencia de FB ₁ en productos destinados a la alimentación humana y animal en España.....	179
Efecto de las interacciones fúngicas en la colonización y producción de micotoxinas en granos de maíz por <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> y <i>F. graminearum</i> . Influencia de la a_w y de la temperatura.....	181
<i>Generalidades</i>	181
<i>Efecto de la interacción fúngica en la colonización por F. verticillioides, F. proliferatum y F. graminearum</i>	182
<i>Efecto de la competencia fúngica en la producción de micotoxinas</i>	184
Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento fúngico.....	186
Aceites esenciales como inhibidores de la producción de micotoxinas.....	188
Bibliografía.....	191
XII. CONCLUSIONES	198
XIII. FUTURAS INVESTIGACIONES	199

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fuente más importante de alimentación de la población mundial son los cereales; habiéndose calculado que la cosecha excede los 1500 millones de toneladas. Los expertos estiman que del 10 al 30 % de los granos cosechados, dependiendo de la tecnología de almacenamiento y del clima, se pierde debido al deterioro producido por los hongos (Chelkowski, 1991).

La FAO estima que anualmente al menos el 25 % de las cosechas del mundo son afectadas por micotoxinas con sustancial impacto de las especies de *Fusarium* (Charmley *et al.*, 1994). La contaminación con especies de *Fusarium* afecta principalmente a la producción de maíz y de sorgo (Rice y Ross, 1994). La mayor parte de las especies del género *Fusarium* pueden producir un gran número de metabolitos secundarios. Al menos 24 especies de *Fusarium* han sido relacionadas con problemas de salud humana y animal, por producir micotoxinas (Torres *et al.*, 1998; Castellá *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). Las especies de *Fusarium* que se aíslan con más frecuencia del maíz (*Zea mays* L.) en climas templados son *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* seguidas por *F. subglutinans*, *F. culmorum* y *F. equiseti* (Sanchis *et al.*, 1994; Sohn *et al.*, 1999).

F. verticillioides es un fitopatógeno cosmopolita que se encuentra en la mayoría de los suelos donde ha crecido maíz. Es capaz de infectar sus plantas sin provocar síntomas evidentes, e infectar también el grano (Marasas *et al.*, 1984). *F. proliferatum* es casi tan común como *F. verticillioides* en maíz cultivado en zonas templadas, y también puede ser aislado de tejidos tanto sintomáticos como asintomáticos, incluyendo las semillas (Munkvold *et al.*, 1997). Estas dos especies de *Fusarium* son las principales productoras de fumonisinas.

Las fumonisinas han sido relacionadas con la leucoencefalomalacia en equinos (ELEM) (Bezuidenhout *et al.*, 1988), el edema pulmonar en cerdos (PPE) (Gelderblom *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 2000), y la hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y hepatocarcinogénesis en roedores (Gelderblom *et al.*, 1991; Norred *et al.*, 2001; Theumer *et al.*, 2002). Aunque sus efectos en humanos son difíciles de determinar, las fumonisinas han sido estadísticamente asociadas con la incidencia de cáncer de esófago en ciertas áreas de Sudáfrica (Rheeder *et al.*, 1992) y con cáncer de hígado en China (Ueno *et al.*, 1997). Investigaciones más recientes han propuesto los potenciales mecanismos carcinogénicos de las fumonisinas (Howard *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2001; Galvano *et al.*, 2002).

F. graminearum es principalmente patógeno de gramíneas. En maíz causa podredumbre en espigas y tallos, así como en mazorcas (Pitt y Hocking, 1997). Aunque estas enfermedades ocurren esporádicamente, este patógeno puede representar serios problemas a causa de las micotoxinas producidas, entre las cuales la zearalenona (ZEA) y el deoxinivalenol (DON) son muy comunes. La ZEA es un metabolito estrogénico, que tiende a acumularse en el maíz durante el almacenamiento más que en el campo. Esta micotoxina causa síndrome estrogénico en porcinos, así como infertilidad en las hembras, reducción del tamaño de la camada, rechazo del alimento y hemorragias (Reid *et al.*, 1996). Aunque no es genotóxica es carcinogénica en algunos animales (Gaumy *et al.*, 2001). El DON, un tricoteceno citotóxico, se produce principalmente en el campo y ha sido asociado con enfermedades del hígado, desordenes estrogénicos, cáncer esofágico y efectos inmunodepresores con lo que predispone a los animales a padecer otras enfermedades (Marasas *et al.*, 1984; Lou *et al.*, 1990).

Mediante la comprensión del efecto que los factores ambientales ejercen sobre las especies fúngicas responsables del deterioro del grano, puede ser posible la manipulación del entorno con el fin de conseguir un grano de calidad, prevenir la contaminación por micotoxinas y conseguir períodos de almacenamiento más largos (Magan y Lacey, 1989).

De todas formas, los cultivos intensivos, como el de cereales, a menudo requieren el uso de biocidas, incluyendo herbicidas, insecticidas y fungicidas, para proteger los cultivos durante el crecimiento y la maduración de los granos. Después de la cosecha, si el almacenamiento es prolongado, se puede requerir aun más biocidas, aunque es preferible lograr la estabilidad en el almacenamiento mediante el control de factores físicos tales como la temperatura y la actividad de agua. En 1986, la Academia Nacional de Ciencias (NAS) de los Estados Unidos publicó en el apartado de residuos de pesticidas en alimentos, que los fungicidas presentan mayor riesgo carcinogénico que los herbicidas e insecticidas juntos (Research Council, 1987). Por lo tanto, los fungicidas sintéticos están muy controlados y la presión para encontrar alternativas más seguras aumenta. En la actualidad las investigaciones en este campo se están centrando en encontrar fungicidas que sean seguros tanto para la salud como para el medio ambiente (Wilson *et al.*, 1997). Los extractos de plantas y aceites esenciales han mostrado actividad antifúngica contra un amplio rango de mohos y pueden proveer una alternativa a los conservantes sintéticos (Wilson *et al.*, 1997). Varios estudios han examinado el efecto de los aceites esenciales en el crecimiento fúngico y en la producción de micotoxinas (principalmente aflatoxinas) y han constatado que algunos de ellos podrían servir como fungicidas naturales (Chao y Young, 2000).

La mayoría de los aceites esenciales están considerados GRAS (generalmente reconocidos como seguros) por la Food and Drug Administration (FDA). Están definidos como productos derivados de materiales de plantas y extraídos por algún método físico sin provocar cambios químicos en su estructura (Sankarikutty y Narayanan, 1993).

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS COMO PRODUCTORES DE MICOTOXINAS

Los hongos filamentosos, en general, son capaces de producir un gran número de metabolitos secundarios diferentes, entre los que destacamos las micotoxinas. Estas toxinas fúngicas o micotoxinas son aquellos metabolitos secundarios que, incluso consumidos en pequeñas concentraciones, son tóxicos para vertebrados y otras especies (Frisvad y Thrane, 1995). La producción de las micotoxinas está muy relacionada con el crecimiento del hongo que las produce y, en general, se producen en el último tramo de la fase exponencial o en el primer tramo de la fase estacionaria de crecimiento (Bullerman y Draughon, 1994).

Existen varios factores que determinan la producción de micotoxinas, tales como el potencial genético del moho, actividad de agua (a_w), temperatura, y nutrientes. Sin embargo, la presencia de una especie fúngica micotoxigénica no indica necesariamente la presencia de micotoxinas, ya que no todas las cepas de estas especies son toxicogénicas; aún en condiciones óptimas, la producción de toxinas puede ser nula. A su vez, las micotoxinas pueden persistir por un largo tiempo después de que el crecimiento vegetativo del hongo haya cesado e incluso si el hongo ha muerto.

Las especies fúngicas contaminantes de cereales forman parte, en su mayoría, de la comunidad de microorganismos descomponedores oportunistas del suelo, y pueden producir metabolitos secundarios, como las micotoxinas (Wicklow *et al.*, 1988).

La mayoría de las micotoxinas conocidas son producidas por especies de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Éstas colonizan un amplio rango de hábitats ya sea en forma exclusiva o bien con otras especies con las que coexisten.

Las especies del género *Fusarium* se caracterizan por ser patógenas que atacan activamente a las plantas en los cultivos, aunque también pueden tener desarrollo saprofítico (saprófitos facultativos). Las especies de *Penicillium* son habitualmente saprófitas pero pueden ser patógenas activas sobre unos pocos tipos de frutos, especialmente en climas frescos (parásitos facultativos). Por último, las especies de *Aspergillus* son patógenas ocasionales de tejidos de plantas o animales pero son dominantes como saprófitas en climas cálidos y en condiciones de bajo contenido de humedad.

Las especies micotoxigénicas poseen amplia distribución mundial. En cereales, por ejemplo, la colonización y producción de toxinas puede producirse en el campo, en el momento de la cosecha y en el almacenamiento, siempre que se den las condiciones ambientales adecuadas. Sin embargo, la probabilidad de que la contaminación ocurra en cada una de las etapas mencionadas es distinta en los tres géneros fúngicos.

La susceptibilidad de los alimentos a la infección por mohos está directamente relacionada con las características de cada sustrato. Las semillas y granos son una parte susceptible de la planta por su riqueza en carbohidratos. Algunas especies, sin embargo, utilizan preferentemente celulosa y, por lo tanto, colonizan partes de las plantas con mayor contenido de fibras (Wicklow *et al.*, 1988).

Como ya hemos visto, *Fusarium* es uno de los tres principales géneros fúngicos productores de micotoxinas. Las micotoxinas de *Fusarium* más ampliamente distribuidas son los tricotecenos que están subdivididos en

dos tipos básicos: A y B. Los tricotecenos tipo A incluyen toxina la T-2, toxina HT-2, neosolaniol y diacetoxipenol (DAS), mientras que los tricotecenos tipo B incluyen DON o vomitoxina, los 3-acetil y 15-acetil derivados (3-ADON y 15-ADON, respectivamente), el nivalenol (NIV) y la fusarenona-X. La síntesis de los dos tipos de tricotecenos es característica de cada especie particular de *Fusarium*. Por ejemplo, los tricotecenos tipo A son predominantemente producidos por *F. sporotrichioides* y posiblemente también por *F. poae*, mientras que *F. culmorum* y *F. graminearum* son los principales productores de los tricotecenos tipo B (Placinta *et al.*, 1999). Muchas especies de *Fusarium* también son capaces de sintetizar ZEA, y esta toxina a menudo está presente junto con ciertos tricotecenos. Esto es importante en la etiología de las micotoxicosis debido al posible efecto aditivo o sinergista entre ellas. Además, la ZEA puede estar presente en forma de cuatro derivados hidroxilados (Placinta *et al.*, 1999). Las fumonisinas, son también importantes micotoxinas producidas por algunas especies de este género y se caracterizan por presentar estructuras análogas a las esfingosinas e interferir con las funciones de las membranas celulares tanto de hombres como de animales (Pitt y Hocking, 1997).

2. EL GÉNERO *FUSARIUM*

2.1. Ubicación taxonómica y morfológica de *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* es el estado anamorfo de varios géneros de Ascomycetes que pertenecen al orden Hypocreales y a la familia Nectriaceae. El estado sexual o teleomorfo pertenece a los géneros *Nectria*, *Gibberella* y *Calonectria* (Nelson *et al.*, 1983).

Este género se caracteriza por poseer macroconidios y microconidios como estructuras de propagación. Los macroconidios pueden producirse tanto en esporodoquios como en el micelio aéreo, mientras que los microconidios solo se producen en el micelio aéreo. Dependiendo de la especie, los macro y microconidios que crecen en el micelio aéreo pueden diferenciarse a partir de células conidiógenas monofialídicas o polifialídicas, mientras que los macroconidios que crecen en esporodoquios sólo se producen a partir de monofialídes.

Algunas especies forman clamidosporas como estructuras de resistencia y de propagación. Estas pueden presentarse solitarias, en cadenas, o en grupos y también formarse en los conidios. De todas las estructuras

mencionadas, la morfología de los conidios es la principal característica utilizada para la identificación de especies de *Fusarium*.

Muchas de las especies son cosmopolitas, de amplia distribución. Comúnmente colonizan tejidos aéreos y subterráneos de muchas plantas y pueden ser tanto invasores primarios como secundarios (Nelson *et al.*, 1983).

2.2. *Fusarium* Sección Liseola

Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg pertenecen a la sección Liseola (Nelson *et al.*, 1983) y se caracterizan por poseer conidióforos abundantes y microconidios fusiformes a ovoides, formando largas cadenas. Morfológicamente son similares, pero en *F. proliferatum* los microconidios se producen en monofiálides y en polifiálides, mientras que en *F. verticillioides* solo se producen en monofiálides. Los macroconidios son rectos a ligeramente curvados, de paredes delgadas y poseen la célula basal con forma de pie. Ninguna de estas dos especies producen clamidosporas. Liddell y Burgess (1985), observaron que los macroconidios pueden sobrevivir mas tiempo que los microconidios bajo condiciones adversas. De esta manera funcionarían como estructuras de propagación en aquellas condiciones ambientales donde los microconidios no pueden hacerlo. Dichos conidios funcionan como propágulos produciendo infecciones secundarias. Otras especies dentro de la sección Liseola son *Fusarium subglutinans* (Wollenweber y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas, *Fusarium anthophilum* (Braun, A) Wollenweber, *Fusarium nygamai* Burgess y Trimboli (Nelson, 1992), *Fusarium globosum* (Rheeder, Marasas y Nelson) (Rheeder *et al.*, 1996), *Fusarium thapsinum* Klittich, Leslie, Nelson y Marasas (Britz *et al.*, 1999). *F. verticillioides* es la especie más común dentro de esta sección (Nelson *et al.*, 1983).

El estado sexual o teleomorfo de varias de estas especies es *Gibberella fujikuroi* y es poco frecuente en la naturaleza. *Gibberella fujikuroi* es un complejo formado por al menos 8 especies con apareamientos diferentes ("mating population"). Si bien las características que se usan para delimitar las especies dentro de la sección Liseola son de carácter morfológico, también se utilizan criterios genéticos para distinguir especies biológicas pertenecientes a esta sección.

2.3. *Fusarium graminearum* (Sección Discolor)

F. graminearum (Schwae) pertenece a la sección Discolor y se caracteriza por presentar macroconidios distintivamente septados, de pared fina, pueden ser rectos o tener forma de hoz. La célula basal presenta forma de pie y la apical forma cónica. No tiene microconidios y las clamidosporas se forman tardíamente tanto en los macroconidios como en el micelio (Nelson *et al.*, 1993).

El estado teleomorfo de *F. graminearum* es *Gibberella zeae* (Scwabe) Petch. Francis y Burgess (1977) describieron dos poblaciones de *F. graminearum* en base a la formación o no de peritecios en cultivos con hojas de clavel, llamándolas grupo 2 y grupo 1, respectivamente.

2.4. Ecología de *Fusarium*

A pesar de haberse descrito como mohos de campo, *Fusarium* spp. pueden desarrollarse en almacén cuando la humedad es alta y la temperatura baja. Son importantes como patógenos de cereales, causando lesiones en tallo y raíces, así como infecciones en las espigas. Las diferentes especies son capaces de producir diversos tipos de tricotecenos, zearalenona, moniliformina y fumonisinas.

Las especies de *Fusarium* están ampliamente distribuidas en el suelo, particularmente en cultivos, y son activos en la descomposición de las partes celulósicas de las plantas. Son la principal causa del deterioro de frutas y vegetales y están comúnmente asociados a legumbres y cereales a los cuales invade generalmente antes de la cosecha (Pitt y Hocking, 1997). Tanto antes de la cosecha como en el almacén, el crecimiento fúngico viene determinado por el entorno, especialmente por la disponibilidad de agua, la temperatura y la composición gaseosa, por la interacción con otros microorganismos, y con artrópodos, y por las medidas adoptadas para su control (Lacey, 1989).

3. MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR *FUSARIUM* SECCIÓN LISEOLA

En 1988 un grupo de investigación de Sudáfrica (Bezuidenhout *et al.*, 1988) elucidó la estructura de las fumonisinas. Estas toxinas parecen estar relacionadas con la alta incidencia de cáncer de esófago en ese país. Son

estructuralmente semejantes a la toxina AAL producida por *Alternaria alternata* f.sp *lycopersici* (Nelson *et al.*, 1993).

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por diferentes especies del género *Fusarium*, y en menor cuantía, por el género *Alternaria*. Entre las especies de *Fusarium*, aquellas que pertenecen a la sección Liseola son las principales productoras de fumonisinas, a excepción de *F. subglutinans*. *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son los mayores productores de fumonisinas (Nelson *et al.*, 1992).

En lo que respecta con la coexistencia de micotoxinas de *Fusarium*, es de destacar que *F. verticillioides* es particularmente relevante debido a que se le ha asociado con las producción principalmente de tres micotoxinas, fumonisinas, moniliformina y fusarina C (Placinta *et al.*, 1999) y que algunos aislamientos de *F. proliferatum* han sido caracterizados como productores de moniliformina y ácido fusárico (Abbas *et al.*, 1989; Chelkowski *et al.*, 1990).

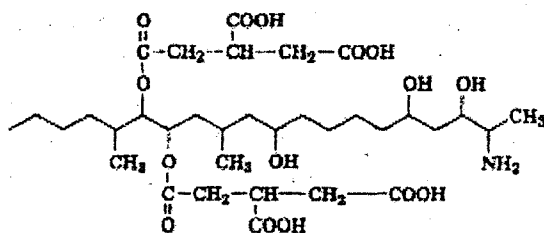
3.1. Fumonisin

La estructura química de las fumonisinas es la de un diéster del ácido tricarbánilico (ac. tricarbóxico) y del 2-amino-12,16-dimetilpolihidroieicosano (Fig. 1). Aunque se han identificado 7 análogos de fumonisinas estructuralmente relacionados, sólo 3 se han aislado de maíz y de sus productos derivados (Sydenham *et al.*, 1996).

El componente más activo aislado de cultivos de *F. verticillioides* fue designado fumonisina B₁ (FB₁) (Fig. 1). Las fumonisinas B₂ y B₃ (FB₂, FB₃) son homólogas de FB₁, pero carecen del grupo hidroxilo del carbono 10 y del carbono 5 respectivamente. Estas tres fumonisinas son las que se encuentran naturalmente contaminando maíz y sus derivados.

También se ha aislado la fumonisina B₄ (FB₄), que no posee los dos grupos hidroxilos, el del C-5 y el del C-10. La fumonisina C₁ es igual a FB₁ pero sin el grupo metilo en el C-1. Las otras dos fumonisinas aisladas son las fumonisina A₁ y fumonisina A₂, n-acetil derivados de FB₁ y FB₂ respectivamente.

Aunque se han identificado otros análogos de FB₁, FB₂ y FB₃, se piensa que sus modificaciones químicas pueden ser artefactos de las técnicas de purificación (Nelson *et al.*, 1993).

Fumonisin B₁**Figura 2.** Estructura de la fumonisina B₁

Fuente: Encyclopedia of Food Science and Technology

3.1.1. Toxicidad de las fumonisinas

La leucoencefalomalacia en equinos (ELEM), el edema pulmonar en porcinos (PPE) y el cáncer de hígado en ratas son las toxicosis causadas por las fumonisinas que se han comprobado hasta el momento. Sin embargo, la contaminación de los cereales con *F. verticillioides* se ha relacionado con muchas otras enfermedades en varias especies animales y en el hombre.

Leucoencefalomalacia en equinos (ELEM)

ELEM es una enfermedad que aparece esporádicamente como brote epidémico y se caracteriza por ocasionar un daño importante en los tejidos cerebrales. Los síntomas que se manifiestan inicialmente son apatía y disminución en el consumo de alimento, rápidamente siguen varios síntomas neurológicos como ataxia, parálisis facial, movimiento anormal de la cabeza y ceguera unilateral. A medida que la disfunción neurológica aumenta, puede llegar hasta la muerte (Prelusky *et al.*, 1994). El comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Diagnóstico de Laboratorio Veterinario recomienda no suministrar a caballos u otros equinos alimento contaminado con más de 5 µg de FB₁/g (Norred y Voss, 1994; Trucksess, 1996).

Edema Pulmonar en porcinos (PPE)

Existen evidencias que sugieren que las fumonisinas causan edema pulmonar (PPE) e hidrotórax en ganado porcino. Cuando se alimenta a cerdos con maíz con bajo contenido de fumonisinas los signos clínicos son sutiles y

no bien definidos, y en esos casos, el hígado parece ser el órgano blanco. Con niveles de fumonisinas mayores, los animales presentan edema pulmonar e hidrotórax que puede causar la muerte. (Prelusky *et al.*, 1994). Recientes estudios han indicado que la función cardiovascular de los cerdos es alterada por la FB₁ y que el PPE inducido por las fumonisinas causa un fallo en el lado izquierdo del corazón (Smith *et al.*, 2000). Aparentemente, la cantidad de FB₁ que induce PPE en porcinos es mayor que la requerida para inducir ELEM en equinos. Aunque aún no están claros los límites de tolerancia de FB₁ en porcino, el comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Diagnóstico de Laboratorio Veterinario recomienda no alimentar a estos animales con más de 10 µg de FB₁/g (Trucksess, 1996).

Toxicosis en aves de corral

El suministro de granos de maíz infectados con *F. verticillioides* también ha sido asociado con trastornos en aves de corral. En varios estudios donde se alimentó a pollos con maíz contaminado se observó disminución en el peso del animal, un incremento en la relación alimento/peso (Bacon y Nelson, 1994) e inmunosupresión en estos animales (Chu y Li, 1994). El comité de Micotoxinas de la Asociación Americana de Diagnóstico de Laboratorio Veterinario recomienda no alimentar a aves de corral con mas de 50 µg de FB₁/g (Trucksess, 1996).

Toxicosis humana

En los últimos años se ha producido una alta incidencia de cáncer de esófago en la población de Transkey, una región de Sudáfrica. Como el maíz es de consumo habitual y el análisis micológico ha revelado un alto grado de contaminación con *F. verticillioides*, se ha especulado que las fumonisinas podrían ser, al menos en parte, las responsables de la enfermedad. Sydenham *et al.* (1996) intentaron relacionar los niveles de contaminación de varias especies de *Fusarium* y de varias micotoxinas de zonas de Sudáfrica con la incidencia de cáncer de esófago. En las zonas con alta incidencia de la enfermedad *F. verticillioides* fue el hongo predominante y la contaminación con fumonisinas fue significativamente más alta que en las áreas con menor incidencia de cáncer. Por otra parte, en China, donde la incidencia de cáncer de esófago también es alta, se realizó un estudio comparativo de los niveles de fumonisinas presentes en muestras de maíz que pertenecían a zonas geográficas diferentes, una con alta incidencia de cáncer y la otra con baja

incidencia de la enfermedad. La contaminación con fumonisinas, en la zona con alta incidencia fue dos veces mayor (48 %) que el de la zona de baja incidencia (25 %). La contaminación simultánea con fumonisinas y tricotecenos (principalmente DON) fue significativamente mayor en la zona con alta incidencia de cáncer (Yoshizawa *et al.*, 1994). La Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) ha declarado a las fumonisinas como posibles carcinógenos en humanos (clase 2B) (Vainio *et al.*, 1993).

4. MICOTOXINAS PRODUCIDAS POR *FUSARIUM GRAMINEARUM*

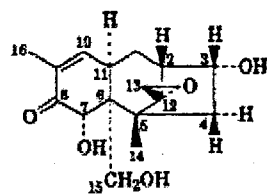
F. graminearum produce numerosas micotoxinas: cerca de 50 compuestos tóxicos han sido citados en la literatura reciente. Los más importantes desde el punto de vista económico son el DON y sus derivados acetilados (3-ADON y 15-ADON), el NIV y sus derivados y la zearalenona (Pitt y Hocking, 1997).

Basándose en la producción de diferentes tricotecenos, *F. graminearum* ha sido dividido en dos quimiotipos: los productores de DON pertenecen al quimiotipo I, mientras que los productores de NIV pertenecen al quimiotipo II. Las cepas productoras de 3-ADON se clasifican como quimiotipo IA y las productoras de 15-ADON como IB (Miller *et al.*, 1991).

Trigo, maíz y cebada son los cereales más afectados por las toxinas de *F. graminearum*, representando estos cereales las dos terceras partes de la producción de cereales del mundo (Miller, 1994).

4.1. Deoxinivalenol (DON)

Es una micotoxina producida por *Fusarium culmorum* y *F. graminearum*, los cuales son abundantes en varios cereales (trigo, maíz, cebada, avena y arroz) y en granos procesados (malta, cerveza y pan). Químicamente pertenece a la familia de los tricotecenos. El 3 y el 15-acetil DON pueden estar presentes (10-20 %) junto con el DON en cereales contaminados (Eriksen y Alexander, 1998). El DON es un 12,13-epoxy-3, 4,15-trihidroxytricotec-9-en-8-o. (Fig 2). Es un compuesto muy estable durante el almacenamiento, molienda y procesado de granos. Además, no se degrada con altas temperaturas (Rotter *et al.*, 1996; Ehling *et al.*, 1997; Eriksen y Alexander, 1998).



Deoxynivalenol

Figura 2. Estructura del deoxinivalenol (DON).

Fuente: Encyclopedia of Food Science and Technology

4.1.1. Toxicidad del DON

La toxicidad aguda y subaguda del DON en cerdos se caracteriza por la presencia de vómitos, rechazo del alimento, pérdida de peso y diarrea. Después de una intoxicación aguda se ha visto necrosis de varios tejidos tales como el tracto gastrointestinal, médula ósea y tejido linfático. La dosis mínima en cerdos es de 0,05-0,2 mg/kg de peso, cuando se administra por vía oral y los síntomas se han observado cuando se le suministra a cerdos alimento con más de 1-2 mg DON/kg de alimento (Eriksen y Alexander, 1998).

Después de una administración oral subcrónica en varias especies (ratas, ratones y cerdos) se han observado varios efectos: reducción en el consumo de alimentos, reducción en la ganancia de peso y cambios en los niveles de algunos parámetros en la sangre, incluidos algunas inmunoglobulinas del suero. Estudios con animales de experimentación han demostrado efectos en el sistema inmune, principalmente efectos en la IgA. En estudios experimentales en ratones, se ha observado una supresión de la inmunidad humoral y celular, lo que ocasiona un aumento en la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Eriksen y Alexander, 1998).

Estudios epidemiológicos realizados en seres humanos en India, donde 5000 personas se vieron afectadas al consumir trigo contaminado, estimaron un NOAEL de 0,44 µg/kg de peso seco, usando como promedio 67 g de trigo consumido y un peso medio de las personas de 52 kg. Los síntomas descritos fueron: dolores abdominales, mareos, dolor de cabeza, náuseas, vómitos y diarrea. Sin embargo, las muestras que causaron esta epidemia fueron recolectadas 4 meses después y no se puede asegurar que el DON haya sido la única toxina involucrada (Eriksen y Alexander, 1998).

La IARC clasificó al DON en 1993 en la categoría 3, esto quiere decir no reconocido como carcinogénico en humanos. La FDA permite 1 µg/g de DON en los productos finales que serán consumidos por humanos (McMuller *et al.*, 1997).

4.2. Zearalenona (ZEA)

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica no esteroidea producida por varias especies de *Fusarium*. Ha estado implicada en numerosas micotoxicosis en animales de granjas, especialmente cerdos. Se encuentra en varios cultivos de cereales, tales como maíz, cebada, avena, trigo, arroz y sorgo así como en pan (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; Aziz *et al.*, 1997).

La molécula de ZEA es: 3,4,5,6,9,10-hexaidro-14,16-dihidroxy-3-metil-1H-2-benzoxacicotetradecin-1,7(8H)-diona (Fig. 3).

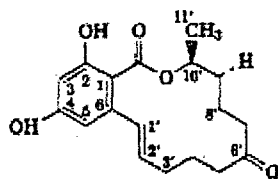


Figura 3. Estructura de la zearalenona (ZEA)

Fuente: Encyclopedia of Food Science and Technology

Es un compuesto estable y no se degrada ni durante el almacenamiento ni durante la molienda, tampoco durante el procesado del alimento y es estable frente a altas temperaturas (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; Gilbert, 1989; Lauren y Ringrose, 1997).

4.2.1. Toxicidad la ZEA

ZEA tiene toxicidad aguda después de una administración tanto oral como interperitoneal en ratas y ratones. La LD50 por vía oral presenta valores entre 4000 y 20000 mg/kg peso (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

Estudios de toxicidad oral después de 90 días indican que los efectos, tanto en animales domésticos como de laboratorio, son dependientes de la interacción de ZEA o sus metabolitos con los receptores estrogénicos. Basándose en los efectos estrogénicos, los cerdos y corderos son más

sensibles a ZEA que los roedores. El NOEL para cerdos es 40 µg/kg peso por día frente a 100 µg/kg peso por día para roedores.

ZEA causa alteraciones en el sistema reproductor de animales del laboratorio (ratas, ratones, hamsters, conejos) y en animales domésticos. Se han observado varios efectos estrogénicos, como disminución de la fertilidad, reducción del tamaño de la camada, cambios en el peso de las glándulas tiroidea y pituitaria, y cambios en los niveles de progesterona y estradiol en el suero (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987; JECFA, 2000). No se han observado cambios a nivel teratogénico.

La FAO ha estimado que el consumo de ZEA en Europa es de 1,5 a 3,5 µg/día. Asumiendo que un peso medio de 60 kg, esto correspondería a un consumo de 0,03 y 0,06µg/kg peso por día, respectivamente.

ZEA fue evaluada por la Agencia de Investigación sobre el Cáncer en 1993. Debido a que no hay evidencias en humanos y esta es limitada en animales, se la ha reconocido clasificada como perteneciente al Grupo 3 (no clasificable como carcinogénica en humanos).

5. FACTORES QUE AFECTAN A LA COLONIZACIÓN FÚNGICA DE LOS CEREALES

5.1. Actividad de agua

El agua es quizás el factor simple más importante que limita la colonización de granos de cereales. La disponibilidad de agua determina si una célula bacteriana o una espora fúngica puede germinar y con que rapidez, determina la velocidad metabólica, la actividad respiratoria y la velocidad de crecimiento, la cantidad de calor liberado por la respiración, y la modificación de la temperatura a través del calentamiento espontáneo. Por todo esto, este factor determina el tipo de microorganismos que pueden crecer en un determinado sustrato (Lacey y Magan, 1991).

De los microorganismos que colonizan los granos, los hongos son los más tolerantes a la baja disponibilidad de agua y en consecuencia son los principales causantes del deterioro (Lacey y Magan, 1991).

La colonización de los granos por microorganismos comienza justo antes de la emergencia de la espiga y continúa en el almacenamiento. Sin embargo, la cosecha marca cambios profundos en los factores ecológicos que afectan el crecimiento de microbio y por lo tanto, producen cambios en la microflora (Lacey y Magan, 1991).

La presencia de agua en el grano puede ser medida de diferentes formas pero no todos los métodos indican la disponibilidad de agua por los microorganismos. No toda el agua dentro del grano está igualmente disponible.

La disponibilidad de agua en materiales higroscópicos como los granos está mejor indicada por la humedad relativa en equilibrio (E.R.H), la actividad de agua (a_w) o el potencial hídrico (Ψ). E.R.H es la humedad relativa en la atmósfera intergranular en equilibrio con el agua en el sustrato; a_w es la relación entre la presión de vapor de agua sobre un sustrato y la presión del agua pura a la misma presión y temperatura; y Ψ es la suma de los potenciales osmótico, mátrico y de turgencia.

La E.R.H y la a_w tienen el mismo valor numérico, excepto que la E.R.H. está expresada como porcentaje y la a_w como una fracción decimal. La medida de la E.R.H. puede ser más apropiada en situaciones donde la humedad controla el crecimiento fúngico, como por ejemplo la esporulación de un moho en el grano antes de la cosecha, mientras la a_w y Ψ son mejores

indicadores cuando la disponibilidad de agua en un substrato controla el crecimiento, como en los granos almacenados.

La tabla 1 muestra valores comparativos de a_w y Ψ a 25 °C (Lacey y Magan, 1991).

Tabla 1. Relación entre actividad de agua (a_w) y el potencial hídrico (Ψ) a 25 °C.

a_w	Ψ (-Mpa)
0,999	0,14
0,995	0,69
0,99	1,38
0,98	2,78
0,95	7,06
0,90	14,5
0,85	22,4
0,80	30,7
0,75	38,6
0,70	49,1
0,65	59,2
0,60	70,3

Los requerimientos de a_w se han usado como método de diferenciación entre mohos. Así, Pelhate (1968) definió mohos xerofílicos, mesófilos e higrofilicos en base a su habilidad para crecer a menos de 0,95, 0,95-1,00 o solamente a 1,00 a_w , respectivamente. *Monascus bisporus* (*Xeromyces*) es de los hongos más xerofílicos que se conoce (0,6 de a_w mínima). A medida que sobrepasamos este valor, el número de hongos capaces de desarrollar su actividad metabólica va aumentando, provocando un calentamiento espontáneo del substrato. La mayor tolerancia a bajas disponibilidades de agua suele darse a temperaturas próximas a la óptima de crecimiento. La germinación de las esporas ocurre, generalmente, a menores valores de a_w que las requeridas para el crecimiento micelial, mientras que la esporulación suele ocurrir a valores superiores (Lacey, 1989). Marín (1998) determinó que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son capaces de germinar a 0,88 a_w a la temperatura óptima, mientras que el crecimiento se ve restringido a a_w iguales o mayores de 0,90, ambos sobre agar extracto de maíz.

El transporte de los granos suele realizarse a actividades de agua superiores a las limitantes del desarrollo fúngico, lo que puede ocasionar

importantes pérdidas. Por otra parte, el período de almacenamiento seguro puede verse reducido si el lote contiene granos verdes, rotos o mojados. El desplazamiento de la humedad debido al movimiento del vapor de agua desde zonas más calientes a zonas más frías, donde se condensa, es una importante causa de deterioro durante el almacenamiento y transporte de los granos. Este hecho puede darse en el silo debido al mayor calentamiento solar en una parte del silo que en otra, a la diferencia de temperatura entre la masa de grano y el aire ambiente, o a los focos de calor producidos por artrópodos o microorganismos (Lacey, 1989).

Los mohos de almacén son normalmente capaces de germinar y crecer a a_w más bajas que los mohos de campo. También es preciso constatar que la fase de latencia previa a la germinación aumenta conforme disminuye la a_w (Magan y Lacey, 1988).

A menudo las condiciones bajo las cuales los mohos se desarrollan en mayor medida son aquellas bajo las cuales sobreviven o compiten mejor, no aquellas a las que crecen mejor. Por ejemplo, *Eurotium* spp. predomina en el grano a 0,70 a_w , a pesar que su óptimo está alrededor de 0,90 a_w . Las especies que predominan son un buen indicador de las condiciones bajo las cuales se ha almacenado el grano (Lacey y Magan, 1991).

El conocimiento de la influencia de la interacción entre a_w y la temperatura en la germinación y crecimiento fúngico es de particular importancia para entender la ecología de cada especie individual y la interacción entre ellas (Lacey y Magan, 1991).

5.2. Temperatura

La mayoría de hongos que viven sobre las plantas antes de la cosecha, crecen bien entre 0 y 30 °C. Por lo que respecta a la etapa de almacén, los hongos difieren en las temperaturas que permiten su crecimiento, cuyo rango es entre 10-40 °C, y en las que éste es máximo, que se encuentra entre 25-35 °C. El descenso de la temperatura provoca una ralentización del metabolismo fúngico, y es una medida que se usa frecuentemente para frenar el deterioro de los alimentos. La actividad metabólica fúngica en productos húmedos almacenados libera calor que si no se evacúa mediante ventilación, puede dar lugar a un calentamiento espontáneo de los granos (Lacey, 1989).

Las temperaturas óptimas de crecimiento para las especies del género *Fusarium* oscilan dentro de un intervalo de 22-28 °C y, en lo que respecta a la disponibilidad de agua, se puede dar crecimiento si la a_w está

dentro del intervalo de 0,87-1,0 y la humedad en la superficie del grano persiste durante 48-60 horas, y en menor cantidad cuando las temperaturas son menores de 15 °C o la superficie del grano está húmeda durante menos de 24 horas. La tabla 2 muestra los intervalos de temperatura y de a_w orientativos para varias especies de *Fusarium*.

Tabla 2. Temperatura y a_w mínimas y óptimas para el crecimiento de algunas especies de *Fusarium*.

	Temperatura (°C)		a_w		Referencias
	Intervalo	óptimo	mínima	Óptimo	
<i>F. verticillioides</i>	4-37	30	0,90	0,98-0,994	Marín, 1998
<i>F. proliferatum</i>	4-37	30	0,90	0,994	Marín, 1998
<i>F. graminearum</i>	10	24-26	0,89	0,99-0,98	Lacey y Magan, 1991
<i>F. avenaeus</i>	-3-37	25	0,89	1,0	Lacey y Magan, 1991
<i>F. culmorum</i>	<0-37	25	0,89	0,99	Lacey y Magan, 1991
<i>F. sporotrichioides</i>	-2-35	22-28	0,88	Nd	Lacey y Magan, 1991
<i>F. subglutinans</i>	nd	25	nd	Nd	Lacey y Magan, 1991
<i>F. tricinctum</i>	<0-35	25	0,89	1,0	Lacey y Magan, 1991
<i>F. poae</i>	2-39	22-28	0,89	1,0	Lacey y Magan, 1991

nd. no determinado

5.3. Relación entre la actividad de agua, temperatura y producción de micotoxinas

La producción de micotoxinas ha sido estudiada principalmente a valores de temperaturas y a_w óptimas, y en medios ricos de laboratorio o en maíz, trigo, cebada o arroz estéril. Pocos estudios se han realizado para determinar la producción de micotoxinas bajo condiciones de estrés (Lacey y Magan, 1991). En un estudio en trigo inoculado con *F. graminearum* se detectó la mayor producción de DON a 0,98 a_w (la mayor a_w estudiada) y el rango de a_w en que se produjo DON fue entre 0,92-0,98 a_w , no encontrándose DON en a_w iguales o inferiores a 0,90 (Comerio *et al.*, 1999).

La biosíntesis de fumonisinas por *F. verticillioides* en maíz depende fundamentalmente de la a_w . Para un mismo grado de crecimiento medido en términos de concentración de ergosterol, la biosíntesis de fumonisinas decreció 3 veces cuando la a_w se redujo de 1 a 0,95 a_w (Cañagnier *et al.*, 1995). Marín (1998) determinó que la producción de FB₁ por *F. verticillioides* o *F. proliferatum* aumentaba con al a_w hasta el máximo de los valores ensayados (0,97 a_w). Por debajo de 0,93 a_w no se detectó producción de FB₁ por *F. verticillioides* ni por *F. proliferatum*. La producción de

fumonisina B₁ en maíz previamente esterilizado por irradiación se daba básicamente en el intervalo de 10-30 °C. La producción óptima para *F. proliferatum* fue alrededor de 15 °C y para *F. verticillioides* entre 20-30 °C (Marín, 1998).

Habitualmente, la a_w mínima que permite el crecimiento es más baja, así como más amplio el rango de temperaturas, que aquellas condiciones que permiten la producción de aflatoxina, patulina, ácido penicílico u ocratoxina A (Fig 4) (Lacey y Magan, 1991).

La tabla 3 muestra los valores mínimos de a_w para el crecimiento y producción de toxina para una serie de especies fúngicas. Los efectos de la a_w y de la temperatura sobre la producción de micotoxinas a menudo difieren de los efectos sobre el crecimiento y germinación y también pueden diferir para una toxina producida por dos especies diferentes o diferentes micotoxinas producidas por la misma especie. Por ejemplo, la producción de ocratoxina A por *A. ochraceus* en alimento para pollos fue mayor a 30 °C y 0,95 a_w mientras que la producción de ácido penicílico por esta misma

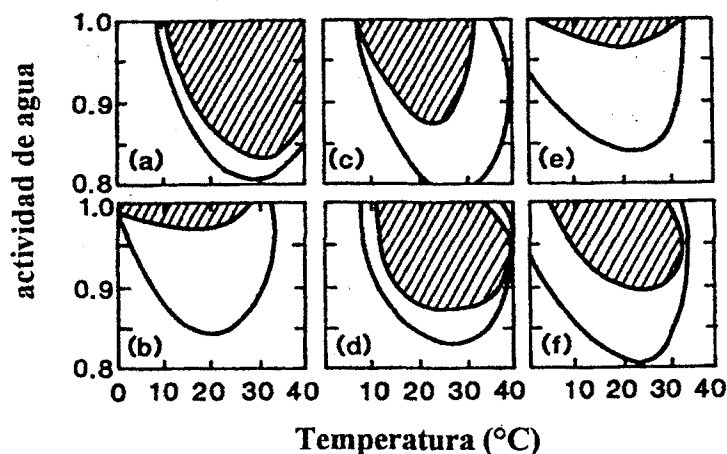


Figura 4. Condiciones de a_w /temperatura límites que permiten el crecimiento y la producción de micotoxinas por parte de (a) *Aspergillus flavus* y aflatoxina, (b) *A. ochraceus* y ácido penicílico, (c) *Penicillium aurantiogriseum* y ácido penicílico, (d) *P. aurantiogriseum* y ocratoxina A, (e) *P. aurantiogriseum* y ocratoxina A (adaptado de Northolt, 1979; Lacey y Magan, 1991).

especie fue favorecida a 22 °C y 0,90 a_w (Lacey y Magan, 1991).

Tabla 3. Valores mínimos de a_w para el crecimiento y la producción de micotoxinas por algunos mohos de cereales

Especies fúngicas	Micotoxina	a_w mínima para		Referencia
		Crecimiento	Producción toxina	
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina	<0,80	0,82	Multon, 1988
<i>A. flavus</i>		0,78-0,84	0,84	Diener y Davis, 1970
<i>A. parasiticus</i>		0,84	0,87	Northolt, 1979
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina	0,77	0,85	Bacon <i>et al.</i> , 1973
<i>P. aurantiogriseum</i>		0,82-0,85	0,87-0,90	Northolt, 1979
<i>P. viridicatum</i>		-	0,80	Patterson, 1986
<i>P. viridicatum</i>		0,80-0,81	0,83-0,86	Northolt, 1979
<i>A. ochraceus</i>	Ácido penicílico	0,77	0,88	Northolt, 1979
<i>P. aurantiogriseum</i>		0,82-0,85	0,97	Northolt, 1979
<i>P. patulum</i>	Patulina	0,81	0,95	Northolt, 1979
<i>P. expansum</i>		0,82-0,84	0,99	Northolt, 1979
<i>A. clavatus</i>		-	0,99	Northolt, 1979
<i>A. viridicatum</i>	Citrinina	-	0,85	Patterson, 1986
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina	-	0,85	Patterson, 1986
<i>P. commune</i>	Acido ciclopiazónico	-	0,85	Gqaleni <i>et al.</i> , 1997
<i>F. verticillioides</i>	Fumonisina B ₁	0,90	0,93	Marin, 1998
<i>F. proliferatum</i>				Marin, 1998

5.4. Interacciones microbianas

Los granos recién cosechados a menudo están contaminados con los llamados mohos de campo y de almacenamiento (Flanningan, 1978). El contenido de humedad del grano, la temperatura y la composición gaseosa, determinarán cuales de estos hongos se desarrollarán en el almacenamiento y dominarán el ecosistema de los granos almacenados (Magan y Lacey, 1984).

Se han descrito toda una serie de posibles reacciones entre las especies fúngicas involucradas: neutralismo (ninguno de los dos se beneficia), comensalismo y mutualismo (respectivamente, uno o ambos microorganismos se benefician), amensalismo (uno se ve perjudicado, mientras que el otro no se beneficia) y competición (ambos compiten por el mismo sustrato) (Magan y Lacey, 1984).

En la competición entre especies que ocupan el mismo nicho se pueden diferenciar dos formas de competir: explotación competitiva e interferencia competitiva. La explotación competitiva se refiere a la habilidad del hongo en consumir los nutrientes antes que la otra especie pueda hacerlo mientras que en la interferencia competitiva, se producen compuestos químicos que limitan el acceso del otro hongo al recurso. En especies que son patógenos de plantas, la agresividad es otra variable importante a la hora de competir (Reid *et al.*, 1999).

La interacción entre hifas se da inevitablemente y puede originar interacciones intra e interespecíficas. Las interacciones entre mohos y otra micoflora del grano puede también tener un profundo efecto en la habilidad de las cepas fúngicas para producir micotoxinas (Cuero *et al.*, 1987).

Las características del sustrato determinan no solo qué tipo de mohos van a crecer en un caso determinado, sino también la duración de la vida de los mismos en dicho sustrato. Todavía más, el éxito de la captura y asimilación de las fuentes de energía está fuertemente influido por el impacto adicional de la competencia, estrés y perturbaciones (Cooke y Whipps, 1993).

Marín *et al.* (1998) determinaron que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son capaces de dominar a otros mohos que comúnmente se encuentran contaminando el maíz bajo un amplio rango de temperatura y disponibilidad de agua. En ese estudio también se sugirió que *F. graminearum* podría tener ventajas competitivas frente a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* a 15 °C, pero a 15-30 °C estas especies de *Fusarium* coexisten en el mismo nicho. En otro estudio en maíz, inoculado antes de la cosecha con *F. graminearum* y *F. verticillioides* se observó que la infección por *F. graminearum* declina mientras que la de *F. verticillioides* aumenta conforme el grano madura (Miller *et al.*, 1983). Por otro lado, Cuero *et al.* (1988) sugirieron que la producción de ZEA por *F. graminearum* en maíz, cuando está coexistiendo con *A. flavus*, es muy dependiente de la temperatura, mientras que los niveles de ZEA no se modificaron en presencia de *A. parasiticus* (Etcheverry *et al.*, 1998).

La colonización y la producción de ocratoxina A en el caso de *Penicillium verrucosum*, y de toxina T-2 en el caso de *Fusarium sporotrichioides*, en cebada irradiada, se ve afectada de diferentes maneras por la presencia de flora acompañante y en función de la a_w y la temperatura; mientras que la colonización se ve disminuida en diferentes grados, la producción de micotoxinas puede verse inhibida o favorecida (Ramakrishna *et al.*, 1996). La tabla 4 muestra como la a_w y la temperatura son factores importantes que determinan que la producción de una micotoxina pueda ser estimulada o inhibida en presencia de otras especies contaminantes.

Tabla 4. Producción de aflatoxina y zearalenona (ng g^{-1}) por *Aspergillus flavus* y *Fusarium graminearum*, respectivamente, en cultivos puros y en presencia de otros microorganismos competidores (Adaptado de Cuero *et al.*, 1987; 1988).

Substrato	Arroz		Maíz					
	16	25	16			25		
Temperatura (°C)	16	25	16	16	16	25	25	25
a_w	0,98	0,98	0,98	0,95	0,90	0,98	0,95	0,90
Aflatoxina								
<i>A. flavus</i> (cultivo puro)	0	0	56	74	0	1020	989	100
+ levadura	1377	0	659	369	0	1322	2009	1185
+ <i>Bacillus</i>	243	0	446	64	0	2132	921	1303
+ <i>A. oryzae</i>	0	0	107	66	0	291	896	219
+ <i>A. niger</i>	0	0	213	203	0	533	936	534
+ <i>P. viridicatum</i>	0	0	0	47	17	231	738	1443
+ <i>F. graminearum</i>	0	0	0	0	0	578	879	1095
Zearalenona								
<i>F. graminearum</i> (cultivo puro)	0	0	289	453	0	404	310	138
+ <i>A. flavus</i>	0	0	32	7	6	428	233	33

6. EL MAÍZ. IMPORTANCIA Y PROBLEMÁTICA MICROBIOLÓGICA

6.1. Generalidades

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los principales cereales cultivados actualmente en el mundo ya que presenta una elevada capacidad de adaptación a los diferentes medios. Es una planta originaria, posiblemente, de América Central (Galinat, 1977, 1979), que fue traída a Europa y de aquí extendida al resto del mundo.

El grano de maíz es una cariósida relativamente grande y seca (Wolf *et al.*, 1952). Las dos principales partes que se pueden distinguir en la cariósida son la semilla, formada por el germen o embrión, por el endospermo y por la testa, que es la cubierta de la semilla, y el pericarpio que es la cubierta del fruto.

La textura del endospermo del maíz varía con el tipo de maíz y con la región del grano que se considera. Así, en las variedades de *Z. mays indentada* (denominado también dentado) predomina la parte del endospermo correspondiente al casquete (extremo opuesto al germen) que es de color claro y que contiene granos de almidón sueltos con poca proteína. Por el contrario, en las variedades de *Z. mays indurata* (llamado maíz duro) predomina la región del germen que es más coloreada y con granos de almidón pequeños embebidos en material proteico (Kent, 1987).

La distribución de los constituyentes del maíz es heterogénea. El 98 % del almidón y el 73 % de las proteínas del grano se localizan en el endospermo, y el 83 % del aceite, el 70 % de los azúcares y el 78 % de los minerales, en el germen.

El maíz es usado principalmente en la alimentación animal. Se incorpora siempre en piensos compuestos para aves, cerdos y corderos (Guerrero, 1977). El contenido en pigmentos carotenoides de las variedades del maíz condiciona el destino del pienso. Así, en Reino Unido las variedades con menor contenido en pigmentos se prefieren para el cebo del ganado vacuno, mientras que las de mayor contenido en carotenoides se destinan a piensos para gallinas ponedoras, ya que estos pigmentos intervienen en la producción del color amarillo de la yema de huevo, piel y patas del animal (McDonald *et al.*, 1999).

Es de destacar, que a partir de 1994, el consumo de maíz en la alimentación humana en España a tenido un importante aumento. El año 1996 conllevó un crecimiento espectacular de las ventas de maíz que ascendieron un 37.2 % respecto al año anterior (Previsiones de ventas del mercado de Alimentación. Instituto L.R. Klein/A.C. Nielsen julio 1999).

A partir del maíz y, tras la realización de su molienda, se producen diversos productos alimenticios para el consumo humano, como almidones, aceites de germen, gluten, sémolas y harinas de maíz, utilizadas en cervecería y preparación de alimentos extrusionados-expandidos. También se emplea para la producción de alcohol y bebidas alcohólicas. La molienda puede efectuarse en seco o en húmedo. En ambos casos el objetivo principal es conseguir la separación del germen, muy voluminoso (11-15 % en peso) y

rico en aceite, puesto que el rápido enranciamiento de la grasa puede transmitir malos sabores a los productos de la molienda (Cerveró, 2001).

El almacenamiento de los granos previo a la molienda es mejor realizarlo a una humedad del 10-15 %. No obstante, en almacenamientos prolongados, a temperaturas superiores a 20 °C puede ser necesario una humedad inferior (9 %). El conseguir un contenido tan bajo en agua exige el secado de los granos a una temperatura suave para no modificar las proteínas del gluten y evitar destruir las enzimas para la panificación. Una vez secos, los granos se deben almacenar en silos aislados térmicamente. También pueden usarse agentes químicos.

Las diferentes fracciones obtenidas de la molienda seca del maíz tienen diversos usos (Cerveró, 2001):

- Las sémolas laminables se utilizan para la obtención de cereales para el desayuno, copos de maíz. Son preferidas las procedentes de maíz amarillo.
- Las sémolas gruesas y medianas son de utilidad en la obtención de productos de cereales y de alimentos rápidos.
- Las sémolas finas se utilizan como aditivos de fermentación, suministrando hasta el 40 % de la malta.
- La harina gruesa granulada se utiliza en tortillas, preparaciones rápidas de maíz, productos de cereales, y otros usos de panadería.
- La harina mediana o conos de maíz, se utiliza para obtener pan de maíz, masas de panadería, alimentos infantiles y cereales para desayuno.
- La harina de maíz se utiliza en las masas de pan de tortillas, alimentos infantiles, galletas, obleas y en cereales de desayuno.

La molienda húmeda del maíz está dirigida, fundamentalmente, a la obtención del almidón que se emplea en la fabricación de aperitivos extruidos-expandidos (Ben-Gera *et al.*, 1984; Benavet, 1996).

6.2. Contaminación fúngica

Las semillas de los cereales contienen una gran variedad de microflora que va cambiando a lo largo del desarrollo de la semilla. Las condiciones ecofisiológicas de los cultivos agronómicos son sustancialmente diferentes durante los estadios pre y post cosecha. La invasión fúngica, infección y

elaboración de micotoxinas depende en gran medida de las condiciones ambientales. El período precosecha comienza con la emergencia de la plántula y continúa hasta la madurez, finalizando en la cosecha del grano. Un gran número de especies fúngicas producen micotoxinas durante su crecimiento en la planta que se acumulan en diferentes concentraciones en las distintas partes de la planta huésped (Bilgrami y Choudhary, 1998). Algunas condiciones son esenciales para la producción de micotoxinas en la pre-cosecha. Es primordial la presencia de cepas de especies micotoxigénicas, un huésped susceptible y un nicho agroclimático favorable. En el cultivo en crecimiento, la interacción huésped-especie fúngica-condiciones ambientales es crítica en la predisposición de la contaminación con micotoxinas. El estrés hídrico o de temperatura en el período crítico del ciclo de vida del cultivo son los factores determinantes para la contaminación. Las prácticas agronómicas y los insectos también juegan un papel importante en la contaminación. Una vez que el cultivo ha sido infectado bajo condiciones de campo, el crecimiento puede continuar en post-cosecha y aún en el almacenamiento (Bilgrami y Choudhary, 1998).

La colonización de los granos maduros empieza justo después de la formación de las espigas. Las bacterias son los primeros colonizadores, pero pronto son seguidas por las levaduras y los hongos filamentosos. El número de hongos crece durante la maduración, pero el mayor crecimiento se produce al final de este proceso. Las levaduras, al igual que las bacterias, alcanzan generalmente sus máximas poblaciones antes de la recolección, mientras que los hongos aumentan una vez realizada la recolección (Lacey y Magan, 1991).

Los mohos pueden actuar como fitopatógenos en el campo, causando lesiones en tallos, hojas, inflorescencias y granos inmaduros, con las pérdidas económicas que ello comporta. Los hongos presentes en las plantas antes de la cosecha se han denominado hongos de campo, e incluyen especies de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Verticillium*, *Fusarium* y otros mohos fitopatógenos (Lacey, 1989).

El momento de la cosecha marca unos cambios profundos en los factores ecológicos que afectan el crecimiento microbiológico, lo que produce cambios en la microflora del grano (Lacey y Magan, 1991). El crecimiento fúngico y el deterioro del grano almacenado vienen determinados principalmente por la humedad, el tipo de especies contaminantes, y de cómo éstas interaccionan con la temperatura y la composición gaseosa. En cereales almacenados, los mohos de campo persisten si el grano está lo suficientemente seco como para impedir el desarrollo de los hongos típicos de almacén. Estos últimos, están presentes en pequeñas cantidades antes de la cosecha y son

principalmente especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Lacey, 1989). Un gran número de los llamados hongos de almacenamiento (los responsables de la producción de micotoxinas durante el almacenamiento) están asociados al grano desde el campo, en los estadios pre-cosecha, sin embargo, éstos hongos pueden no ser capaces de crecer y desarrollarse en el campo, debido a que las condiciones requeridas para su crecimiento son menos favorables que en el almacenamiento (Bilgrami y Choudhary, 1998).

La distinción entre mohos de campo y de almacén no es clara, ya que se ha visto que especies de campo pueden crecer en algunos casos en almacén y viceversa. Así pues, los microorganismos deberían clasificarse en función de sus requerimientos ecológicos, mas que en función de su procedencia (Lacey, 1989).

6.3. Contaminación de maíz por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*

Una de las enfermedades causada por *Fusarium* spp. es la llamada podredumbre de la mazorca por *Fusarium*, y es causada principalmente por *F. verticillioides* y especies relacionadas, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*. Estos mohos pueden causar además, contaminación con micotoxinas al ser productores de fumonisinas y moniliformina (Thiel *et al.*, 1991). Esta enfermedad predomina en climas secos y el daño causado por insectos ayuda a su propagación. Estudios recientes han determinado que la producción de fumonisinas (FB₁ o FB₂ o FB₃) no es necesaria para que las cepas de *F. verticillioides* puedan infectar las mazorcas de maíz y causar la enfermedad (Desjardins y Plattner, 2000).

La incidencia de dicha enfermedad causada por *F. verticillioides* depende de la humedad durante la emergencia y desarrollo del estigma, y aumenta considerablemente si ésta persiste. La infección con *F. verticillioides* puede ser tanto sintomática como asintomática, las causas que producen estas diferencias aún no están bien conocidas. La podredumbre de las semillas causadas por *Fusarium*, generalmente se relaciona con la presencia de lluvias moderadas durante la emergencia del estigma seguidos por períodos alternantes de sequía-humedad (Bilgrami y Choudhary, 1998).

En un estudio de infección artificial en plántulas de maíz con *F. verticillioides*, se determinó que el hongo entra a la plántula a través de la ruptura del pericarpo producida durante la emergencia de la raíz en el proceso de germinación (Bacon *et al.*, 1994). Como *F. verticillioides* puede permanecer en estado de dormancia en los granos de maíz durante todo el invierno, estos granos infectados también podrían ser una fuente de infección de las plántulas y ocasionar la podredumbre del tallo (Thomas y Buddenhagen, 1980).

F. verticillioides es considerado un endófito en las plantas de maíz. En los primeros estadios de la planta puede protegerla de la infección de *F. graminearum*, pero en plantas maduras puede causar podredumbre del tallo en condiciones de sequía (Bacon *et al.*, 1994). Por lo tanto, en el grano de maíz en particular, la infección puede ser tanto sistémica como externa. La infección sistémica no necesariamente afecta el porcentaje de germinación, pero puede disminuir el vigor inicial de germinación y la velocidad de crecimiento.

Dentro de la semilla de maíz el hongo esta asociado con la porción próxima a la unión con la mazorca, justo por debajo del tejido vascular de cada grano, encontrándose muy poca cantidad de hifas en la parte mas profunda de la semilla. Sin embargo, las semillas que se encuentran asociadas a la toxicidad animal presentan grandes cantidades de hifas colonizando la mayor parte de la superficie interna incluso el embrión. Esto podría deberse principalmente a malas condiciones en el almacenamiento (Bacon y Nelson, 1994).

Las características fenológicas de la planta (posición de la espiga, color del estigma) pueden afectar la magnitud de la infección. Así, espigas inclinadas y que perdieron las brácteas, son menos susceptibles que las plantas con espigas erectas y con sus brácteas estrechamente unidas (Snijders, 1994).

La resistencia de plantas de maíz a insectos, permite indirectamente la expresión de un fenotipo resistente. Por ejemplo, la reducción de poblaciones de *Frankliniella occidentalis* (insecto vector) produce la disminución del porcentaje de infección con *F. verticillioides* y la aplicación de insecticidas que reduce esta población de insectos también reduce la incidencia de la enfermedad. Por lo tanto, la exclusión física de estos insectos, así como la exclusión de las brácteas estrechamente cerradas, son factores fundamentales para reducir los niveles de enfermedad. Además, las variedades de maíz con mayor susceptibilidad a daños en los granos (debido a insectos o aves) presentan mayores valores de infección (Snijders, 1994; Miller, 1994).

Scott y King (1984) realizaron un estudio para determinar si los factores de resistencia a la infección por *F. verticillioides* se encuentran en el pericarpo, endospermo o embrión. Mediante cruzamientos entre plantas susceptibles y resistentes a la infección, concluyeron que los genes de resistencia a *F. verticillioides* se manifiestan en la estructura del pericarpo. Los granos de maíz con pericarpo más fino son más susceptibles a la infección, permitiendo que el hongo entre al grano, principalmente a través de heridas causadas por insectos (Hoenisch y Davis, 1994).

Los factores fisiológicos también son importantes en la determinación de la resistencia a *F. verticillioides*, ya que las semillas que tienen un período de maduración más corto también tienen un período de susceptibilidad menor.

Otro factor que incide en la infección es el polen, ya que potencialmente sería capaz de establecer por si mismo al hongo en el estigma. También es importante el estado fisiológico del estigma ya que la colonización fúngica disminuye antes del comienzo de su senescencia. La infección de semillas con *F. verticillioides* en híbridos de maíz en crecimiento activo y con el estigma aún verde, es menor que en plantas senescentes y con estigmas marrones (Snijders, 1994). También se ha sugerido que variedades de maíz dulce donde los estigmas de la línea maternal crecen activamente y permanecen verdes después de la polinización, son resistentes a la infección con *F. verticillioides*. Esto implicaría que la viabilidad del estigma podría ser utilizada como criterio de selección de variedades de maíz resistentes a la infección por *F. verticillioides* (Snijders, 1994).

Por otra parte, se ha sugerido que la adaptación de algunos hongos fitopatógenos a huéspedes específicos radica en la habilidad de alterar, degradar o detoxificar las estrategias de defensa naturales del huésped. Se ha demostrado que cepas de *F. verticillioides*, aisladas de maíz, tienen la capacidad de degradar *in vitro* la 6-metil-benzoxazolinona (MBOA) y la 2-benzoxazolinona (BOA), compuestos naturales de las plantas de maíz asociados con la resistencia a hongos y a insectos. Ambos compuestos tienen actividad fungistática sobre *F. verticillioides*. Por lo tanto, la capacidad de *F. verticillioides* de detoxificar parte del sistema de defensa química natural de las plántulas de maíz, sugiere que dicha capacidad podría ser un prerrequisito para la infección (Richardson y Bacon, 1995). Recientemente, Glenn *et al.* (2001) observaron que 11 de 29 especies de *Fusarium* estudiadas presentaron algún nivel de tolerancia al MBOA y BOA, aunque el grado de susceptibilidad varía mucho de una especie a otra. *F. verticillioides*, *F. cerealis* (= *F. crookwellense*) y *F. graminearum* fueron las especies más tolerantes a dichos productos.

6.4. Contaminación de maíz por *F. graminearum*

Gibberella zeae (*F. graminearum*) y *F. culmorum* causan podredumbre de la mazorca por *Gibberella*, también llamada podredumbre rosa de la mazorca. Estos hongos también contaminan el maíz con DON, ZEA y toxina T-2. Esta enfermedad generalmente se extiende desde la punta de la mazorca y desciende por canales y túneles hechos por insectos. Los granos presentan luego un color rosado rojizo debido al crecimiento del moho. Esta enfermedad prevalece en climas templados, especialmente en años húmedos. Estudios recientes han determinado una relación positiva entre la severidad de la enfermedad, la concentración de DON y el número de días desde julio a setiembre con humedad relativa igual o mayor al 80 % (Vigier *et al.*, 2001). *F. graminearum* es el moho responsable de esta enfermedad en Canadá y en el norte de Europa mientras que *F. culmorum*, tiende a ser la especie predominante en Europa del este y centro-norte (Bilgrami y Choudhary, 1998).

La monitorización del crecimiento de *F. graminearum* en mazoras de maíz artificialmente infectadas muestra que la velocidad de crecimiento de esta especie es muy dependiente de la temperatura. Para que la infección tenga lugar deben coincidir factores climáticos que favorezcan la producción y dispersión de esporas en la superficie del huésped, justo en el momento en el que el maíz es más receptivo a *F. graminearum*. Las temperaturas óptimas se encuentran entre los 25 y 32 °C. La infección es favorecida por el calor y por períodos prolongados de humedad, mientras que el viento ayuda a la dispersión de esporas, y la persistencia de la humedad (de 28 a 60 horas) en la mazorca del maíz favorece la infección por el hongo (Sutton, 1982). Lluvias cortas después de la emergencia del estigma promueven el desarrollo epidémico de *F. graminearum* y subsecuentemente la acumulación de micotoxinas. En el desarrollo del grano y al empezar la etapa de madurez del cultivo, la humedad declina desde un 80 % hasta un 15 % ó 30 % en el momento de la cosecha. El crecimiento de *F. graminearum* es vigoroso por encima del 35 % de humedad, aunque puede ocurrir, con mucha menor frecuencia, con humedad tan baja como el 20 % (Bilgrami y Choudhary, 1998).

La susceptibilidad del maíz a la infección por *F. graminearum*, debido a esporas propagadas por el viento, es de 7 a 10 días después de que haya comenzado el desarrollo del estigma. La fuente de inóculo son conidios, ascosporas, clamidosporas, y fragmentos de hifas, los cuales sobreviven en restos de huésped tales como tallos viejos de maíz, granos o

mazorca. La susceptibilidad del maíz a la infección por *Fusarium* varía con los diferentes híbridos, su estrategia de desarrollo y las condiciones ambientales durante el cultivo. Así, cultivares de maduración tardía, en los cuales, el contenido de humedad del grano decrece lentamente por debajo del 30 % son más susceptibles a la infección por *Fusarium* (Bilgrami y Choudhary, 1998).

Los daños físicos causados por pájaros o insectos en la mazorca también aumentan la susceptibilidad a la infección. Los fungicidas ensayados, tanto en tratamiento en la semilla como en las hojas, no han sido efectivos en el control de la podredumbre de la mazorca (Bilgrami y Choudhary, 1998).

Por otra parte, estudios con cepas mutantes de *F. graminearum*, que tienen bloqueada la capacidad de producir tricotecenos, sugieren que la producción de estas micotoxinas puede ser un factor importante en la virulencia para infectar las mazorcas de maíz. Aunque estas cepas no productoras de tricotecenos fueron capaces de infectar las mazorcas de maíz, su virulencia fue mucho menor que la de las cepas micotoxigénicas (Desjardins y Hohn, 1997; Harris *et al.*, 1999).

6.5. Niveles de contaminación natural de granos de maíz con fumonisinas

En la tabla 5 se expone el nivel de contaminación con fumonisinas en muestras de maíz de diferentes países. El grado de contaminación con estas toxinas en las muestras pertenecientes a países de Europa central es inferior al grado de contaminación de los otros países expuestos en la tabla. Las variedades de maíz de Europa central no pueden considerarse como un genotipo resistente ya que estas variedades en otras condiciones climáticas y/o malas prácticas de almacenamiento podrían sufrir deterioro por hongos y contaminación con fumonisinas. En un estudio realizado en Brasil se detectó mayor promedio de FB₁ y de FB₂ en muestras pertenecientes al estado de Mato Grosso (tropical), con respecto al promedio registrado en el estado de Paraná (subtropical). A su vez, en la región norte de este estado es donde se registró mayor nivel de toxina (tabla 5). Estos datos podrían indicar que el nivel de fumonisinas se incrementa con la temperatura (Hirooka *et al.*, 1996).

Doko *et al.* (1995) observaron que la relación FB₂/FB₁ de muestras de maíz del oeste de Europa y de África variaba desde 0,21 a 0,33. Estos resultados coinciden con resultados anteriores que revelan que la concentración de FB₂ en granos de maíz y en productos derivados, es un 20-35 % de la concentración de FB₁ (Murphy *et al.*, 1993; Carmelli *et al.*, 1993; Doko y Visconti, 1994; Doko *et al.*, 1995).

Tabla 5. Incidencia de FB₁ y FB₂ en muestras de maíz de diferentes países.

País	FB ₁ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₁ /Mt ¹	FB ₁ /Mt ²	Referencia
Italia	0,10-5,31	0,01-2,33	62/62	36/62	Doko y Visconti, 1994
Italia	0,01-2,33	0,01-0,52	26/26	13/26	Doko <i>et al.</i> , 1995
España	0,20-19,20	0,20-5,90	48/55	22/55	Castellá <i>et al.</i> , 1999
España	nd-2,20	nd-0,70	12/17	5/17	Sanchis <i>et al.</i> , 1995
Portugal	0,09-2,30	0,25-4,45	9/9	8/9	Doko <i>et al.</i> , 1995
Croacia	0,01-0,06	0,01	11/19	4/19	Doko <i>et al.</i> , 1995
Polonia	0,01-0,02	0,01	2/7	1/7	Doko <i>et al.</i> , 1995
Rumania	0,01-0,02	0,01	3/6	1/6	Doko <i>et al.</i> , 1995
Benin	0,02-2,63	0,02-0,68	9/11	7/11	Doko <i>et al.</i> , 1995
Irán	1,27-3,98	0,19-1,18	11/11	11/11	Shephard <i>et al.</i> , 2000
Tailandia	0,06-18,80	0,05-1,40	16/ 18	12/ 18	Yoshizawa <i>et al.</i> , 1996
Corea	0,05-1,33	0,07-0,68	5/12	4/12	Ung-Soo <i>et al.</i> , 1994
China	0,06-0,20	nd	3/ 4	0/4	Ueno <i>et al.</i> , 1993
Mozambique	0,24-0,95	0,08-0,11	&	&	Doko <i>et al.</i> , 1995
Sudáfrica	0,40-3,50	&	&	&	Nelson <i>et al.</i> , 1992
Sudáfrica	0,20-0,50	&	3/49	&	Chelule <i>et al.</i> , 2001
(urbana)					
Sudáfrica	0,10-22,20	&	16/50	&	Chelule <i>et al.</i> , 2001
(rural)					
Sudáfrica	0,60	0,30	1/1	1/1	Ueno <i>et al.</i> , 1993
Zambia	0,05-4,60	0,10-5,50	12/24	7/24	Ueno <i>et al.</i> , 1993
Ghana	0,07-4,22*	&	14/14	&	Kpodo <i>et al.</i> , 2000
Nepal	0,02-1,42	0,01-0,29	20/20	15/20	Doko <i>et al.</i> , 1995
Uruguay	nd-3,69	&	&	&	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Argentina	0,09-8,79	nd-11,30	&	&	Chulze <i>et al.</i> , 1996
Argentina	0,05-3,35	0,02-0,29	30/52	17/52	Pacin <i>et al.</i> , 2001
Argentina	0,90	0,80	1/1	1/1	Ueno <i>et al.</i> , 1993
Brasil(Mato-Grosso)	4,90-18,00	3,62-19,00	8/8	8/8	Hirooka <i>et al.</i> , 1996
Brasil (Paraná)	0,06-2,50	1,20-10,20	39/39	39/39	Hirooka <i>et al.</i> , 1996
México	0,01-5,50	0,13-3,99	35/36	34/36	Desjardins <i>et al.</i> , 1994
USA	1,10-4,10	0,30-10,00	6/7	6/7	Ueno <i>et al.</i> , 1993
USA	0-19,10	0-12,30	&	&	Bullerman y Tsai, 1994

¹ muestras positivas FB₁/ muestras totales; ² muestras positivas FB₂/ muestras totales; nd Valores no detectados, < 0,01

$\mu\text{g/g}$; & No hay datos, * Fumonisinas totales

6.6. Niveles de contaminación natural con fumonisinas de productos derivados de maíz

Los mayores niveles de contaminación con fumonisinas en productos derivados de maíz han sido encontrados en muestras de harina de maíz o de sémola de maíz. Aunque la contaminación con FB₁ siempre es mayor que con FB₂, la mayoría de las muestras también poseen cantidades apreciables de FB₂ (Tablas 6 y 7).

Las muestras pertenecientes a países con climas fríos, como por ejemplo Suiza y Canadá, son las que presentan menores valores de contaminación. Hopmans y Murphy (1993) analizaron el contenido de fumonisinas en harina de maíz blanca y en harina de maíz amarilla, determinando que la concentración de FB₁ en harina de maíz blanca es significativamente menor que la concentración en harina de maíz amarilla (0,29 µg g⁻¹ vs 0,72 µg g⁻¹ de FB₁, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron con FB₂ (0,05 µg g⁻¹ vs 0,24 µg g⁻¹ de FB₂, respectivamente). También se ha analizado el contenido de fumonisinas en productos procesados derivados del maíz. Los mayores valores de contaminación con FB₁ corresponden al maíz inflado seguidos por el maíz dulce en lata. Ninguna muestra de maíz dulce enlatado presentó valores apreciables de FB₂ (Tabla 8). La particularidad del maíz dulce de no contener FB₂ ya había sido observada por otros investigadores (Sydenham *et al.* 1991; Pittet *et al.* 1992; Stack y Eppley 1992). Los valores de contaminación observados en las muestras de palomitas de maíz y en copos de maíz fueron muy bajos o nulos y la mayoría de las muestras no presentaron valores apreciables de FB₂.

De los datos expuestos en las tablas 5, 6, 7 y 8 se puede concluir que los niveles más altos de contaminación con fumonisinas se encuentran en el grano de maíz y en aquellos productos derivados del maíz que sufren procesamiento suave, por ejemplo harina de maíz y sémola de maíz, donde sólo se practica una molienda física. En copos de maíz, palomitas de maíz, maíz dulce en lata y otros derivados, el nivel de contaminación por estas toxinas es generalmente bajo. Esto podría deberse tanto a una descomposición química de las toxinas por el calor del procesamiento o a un fallo en la detección de las toxinas por los métodos de análisis usuales (Bullerman y Tsai, 1994).

Suiza es de los pocos países que ha establecido un límite máximo de aceptación de fumonisinas en alimentos, y éste es de 1000 ng g⁻¹ (1 µg g⁻¹) de FB₁ + FB₂ (FAO, 1997).

Tabla 6. Incidencia de FB₁ y FB₂ en harina de maíz de diferentes países.

País	FB ₁ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₁ /Mt ¹	FB ₂ /Mt ²	Referencia
Italia	0,42-3,73	0,08-0,84	6/6	6/6	Doko y Visconti, 1994
USA (Iowa)	0,21-0,84	0,03-0,27	6/6	6/6	Hopmans y Murphy 1993
USA (Washington)	0,28-2,05	0,05-0,53	2/2	2/2	Bullerman y Tsai, 1994
USA	1,05	0,29	15/16	15/16	Sydenham <i>et al.</i> , 1991
USA (Washington)	0,91	0,23	10/10	10/10	Stack y Eppley, 1992
USA	nd-2,50	nd-0,90	-	-	Bullerman y Tsai, 1994
Canadá	nd-0,05	nd	1/2	-	Bullerman y Tsai, 1994
México	0,59-1,8		2/2		Dombrink-Kurtzman y Dvorak, 1999
Perú	nd-0,70	nd-0,10	-	-	Bullerman y Tsai, 1994
Egipto	1,80-3,00	0,50-0,80	2/2	2/2	Bullerman y Tsai, 1994
Sudáfrica	nd-0,50	nd-0,10	-	-	Bullerman y Tsai, 1994
Suiza	nd-0,10	&	2/7	&	Bullerman y Tsai, 1994
España	nd-0,70	nd	1/3	0/3	Sanchis <i>et al.</i> , 1994
China	0,06-0,20	nd	3/4	0/4	Ueno <i>et al.</i> , 1993

¹ muestras positivas FB₁/ muestras totales; ² muestras positivas FB₂/ muestras totales; nd Valores no detectados, < 0,01

$\mu\text{g/g}$; & No hay datos.

Tabla 7. Incidencia de FB₁ y FB₂ en sémola de maíz.

País	FB ₁ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	FB ₁ /Mt ¹	FB ₂ /Mt ²	Referencia
Italia	3,76	0,91	1/1	1/1	Doko y Visconti, 1994
Japón	0,20-2,60	0,30-2,80	14/17	5/17	Ueno <i>et al.</i> , 1993
España	nd-0,90	nd	3/15	0/15	Sanchis <i>et al.</i> , 1994
USA (Washington)	0,140-2,70	nd-0,06	2/2	1/2	Bullerman y Tsai, 1994
Suiza	nd-0,80	&	34/53	&	Bullerman y Tsai, 1994

¹ muestras positivas FB₁/ muestras totales; ² muestras positivas FB₂/ muestras totales; nd. valores no detectados & No

hay datos.

Tabla 8. Incidencia de FB₁ y FB₂ en otros derivados del maíz

Producto	País	FB ₁ (µg g ⁻¹)	FB ₂ (µg g ⁻¹)	FB ₁ /Mt ¹	FB ₂ /Mt ²	Referencia
Maíz-dulce (en lata)	Italia	0,06-0,79	nd	4/4	0/4	DokoyVisconti, 1994
Maíz-dulce (en lata)	Suiza	nd-0,07	nd	1/7	0/7	Bullerman y Tsai, 1994
Maíz-dulce (en lata)	Italia	0,06-0,20	nd	&	&	Bullerman y Tsai, 1994
Maíz inflado	Italia	0,79-6,10	0,11-0,74	6/6	6/6	DokoyVisconti, 1994
Copos-de maíz	España	nd-0,10	nd	2/12	0/12	Sanchis <i>et al.</i> , 1994
Copos-de maíz	Suiza	nd-0,06	nd	1/12	nd	Bullerman y Tsai, 1994
Copos-de maíz	Italia	nd-0,01	nd	1/2	0/2	DokoyVisconti, 1994
Polenta	Italia	0,42-3,73	0,08-0,84	6/6	6/6	DokoyVisconti, 1994
Tortillas-de maíz	México	0,21-1,07		6/7		Dombrink-Kurtzman y Dvorak, 1999
Polenta	Uruguay	nd-0,43	nd	3/8	&	Piñeiro <i>et al.</i> , 1997
Palomitas-de maíz	USA	0,01-0,06 *	&	&	&	Bullerman y Tsai, 1994
Palomitas-de maíz	Italia	0,01-0,06	nd-0,02	4/6	1/6	DokoyVisconti, 1994

¹ muestras positivas FB₁/ muestras totales; ² muestras positivas FB₂/ muestras totales; nd Valores no detectados; & No hay datos; * Fumonisinas totales

6.7. Incidencia natural de deoxinivalenol y zearalenona en maíz y en productos derivados de maíz.

En el año 1994 se detectó una infección importante de *F. graminearum* en mazorcas de maíz dulce en Estados Unidos, con un porcentaje de enmohecimiento visible del 5-25 %. Al analizar la concentración de DON presente se detectaron niveles promedios de DON de 446000 µg/g en granos visiblemente infectados con *F. graminearum* y 10000 µg/g en granos con infección no visible (Wetter *et al.*, 1999).

Las tablas 9 y 10 resumen la contaminación con DON y ZEA en muestras pertenecientes a diferentes países. La contaminación en alimentos procesados a base de maíz refleja la incidencia de la infección fúngica en la materia prima, en este caso el maíz, la cual se ve a su vez afectada por varios factores tales como origen de las muestras, condiciones ambientales y daño causado por insectos. En general la incidencia de DON en los estudios que muestra la tabla 10 fue alta, variando entre un 13 y 100 % de las muestras

analizadas. En todas las muestras de productos derivados del maíz recolectadas en España se detectó DON, pero el valor medio de contaminación fue bajo. Es de destacar que ninguna de estas muestras de productos procesados superó la cantidad máxima permitida en diversos países (500 µg/kg para trigo y arroz en Austria es el menor de los niveles máximos establecidos) (Boutrif y Canet, 1998).

Los datos de las tablas 9 y 10 sugieren que la incidencia de ZEA y de DON es similar; al ser micotoxinas producidas por las mismas especies de *Fusarium* es probable que una misma muestra presente contaminación con ambas toxinas.

En general, los productos derivados de maíz contienen menor cantidad de toxinas que la materia prima y dentro de los diferentes productos el maíz congelado y el maíz dulce en lata son los que están menos contaminados con ZEA y DON. Estos productos se presentan como granos enteros, por lo que en la preselección de los mismos se podría haber eliminado aquellos granos que presentaran signos de ennegrecimiento (enmohecimiento) y/o daño por insectos, reduciéndose el riesgo de presencia por micotoxinas (Wong *et al.*, 1995; Lauren y Di Menna, 1999). Por el contrario, en el resto de los derivados, al elaborarse con productos de la molienda del maíz, la contaminación fúngica es menos aparente y mayor el riesgo de presencia de micotoxinas, aunque debe tomarse en cuenta que los tratamientos a que están sometidos estos productos también pueden reducir la contaminación.

Tabla 9. Incidencia de deoxinivalenol en maíz y en productos derivados de maíz.

País	Sustrato	Incidencia (%)	DON ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		Referencia
			media	máximo	
Austria (1984)	maíz	99	790	6200	Scott, 1990
Austria (1996)	maíz	95	728	-	Ellend <i>et al.</i> , 1997
Canadá	maíz	-	610	1200	Scott, 1990
Canadá	maíz	-	-	4090	Scott y Trucksess, 1997
China (1985)	maíz	100	4540	9600	Scott, 1990
Corea (1990-91)	maíz	65	310	2752	Kim <i>et al.</i> , 1993
Corea	maíz	-	145	-	Ryu <i>et al.</i> , 1996
USA (1984-84)	maíz	72	400	2470	Scott, 1990
USA (1992-93)	maíz	-	79-500	-	Park y Chu., 1996
Hungría (1993-94)	maíz	-	20	50	Fazekas <i>et al.</i> , 1996
Indonesia (1995)	maíz	13	27	32	Ali <i>et al.</i> , 1998
Nueva Zelanda (1984)	maíz	55	100	300	Scott, 1990
Nueva Zelanda (1986-89)	maíz	80	452	3500	Lauren <i>et al.</i> , 1991
Sudáfrica (1989)	maíz	44	200	925	Rheeder <i>et al.</i> , 1995
Sudáfrica (1990)	maíz	73	400	1830	Rheeder <i>et al.</i> , 1995
España (1999-2000)	cereales desayuno	100	90,9	173,2	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz congelado	100	38,3	68,6	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz dulce lata	100	25,7	54,4	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz inflado	100	73,9	159,3	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz frito	100	46,0	105,5	Cerveró, 2001

Tabla 10. Incidencia de zearalenona en maíz y en productos derivados de maíz.

País	Sustrato	Zearalenona ($\mu\text{g kg}^{-1}$)			Referencia
		Incidencia (%)	media	máximo	
Austria (1996)	maíz	71	126	-	Ellend <i>et al.</i> , 1997
Botswana (1996-97)	maíz	-	40	-	Siame <i>et al.</i> , 1998
Corea (1990-91)	maíz	17	151	388	Kim <i>et al.</i> , 1993
Este y Sur de Africa (1994)	maíz	13	140	400	Doko <i>et al.</i> , 1996
USA (1992)	maíz	-	242	-	Park <i>et al.</i> , 1996
USA (1993)	maíz	0,9	500	-	Park y Chu., 1996
Hungría (1993-94)	maíz	13	220	292	Fazekas <i>et al.</i> , 1996
Indonesia (1995)	maíz	17	12	12	Ali <i>et al.</i> , 1998
Nueva Zelanda (1986-89)	maíz	76	253	500	Leuren <i>et al.</i> , 1991
España (1999-2000)	cereales desayuno	60	114	125	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz congelado	25	32,6	54,9	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz dulce lata	25	10,5	16,2	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz inflado	100	34,6	79,8	Cerveró, 2001
España (1999-2000)	maíz frito	100	89,6	132,0	Cerveró, 2001

6.8. Prevención del crecimiento fúngico y de la contaminación por micotoxinas

La contaminación de los alimentos puede comenzar en el campo, mediante la contaminación de las cosechas por los mohos productores de micotoxinas.

Las prácticas agrícolas pueden afectar a la incidencia de las enfermedades y a la presencia de *Fusarium* en cultivos de cereales a través de los años (De Nijs *et al.*, 1996). Algunos de los factores que influyen en la infección y en la diversidad de especies de *Fusarium* son la temperatura, la rotación de cultivo, las plagas de insectos, la calidad de las semillas, los fungicidas aplicados, la susceptibilidad del cultivo usado y la región geográfica (De Nijs *et al.*, 1996). El almacenamiento de los granos secos después de la cosecha limita el crecimiento del micelio de *Fusarium*, pero las micotoxinas pueden haber sido producidas por el micelio presente en el grano antes o en el momento de la cosecha. La mayoría de las micotoxinas que contaminan los cereales son estables bajo las condiciones de

almacenamiento y de procesado de los granos y pueden así entrar en la cadena alimenticia (De Nijs *et al.*, 1996).

Para asegurar la inocuidad de alimentos y piensos, y evitar así el peligro asociado con las toxinas, deberían aplicarse una serie de medidas o procedimientos tanto en el campo como después de la cosecha. Un modo para afrontar los riesgos asociados con la contaminación con micotoxinas consistiría en utilizar un sistema integrado. La propuesta de un programa de control para piensos y alimentos procesados debería estar basado en el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). El programa deberá contener estrategias para la prevención, control, buenas prácticas de manufacturación y control de calidad en todas las fases de producción, desde el campo hasta el producto final. La prevención a través de un control pre-cosecha es el mejor método para controlar la contaminación con micotoxinas pero, cuando la contaminación ya ha ocurrido, los riesgos asociados a la contaminación con micotoxinas deben ser controlados a través de procedimientos post-cosecha. Los riesgos asociados con la contaminación por micotoxinas deben ser minimizados en cada fase de la producción (Lopez-Garcia *et al.*, 2000).

Control precosecha: Dado que las especies del género *Fusarium* son consideradas como hongos de campo, debido a que colonizan las plantas antes de la cosecha, la prevención a través del control precosecha es el primer paso para minimizar la contaminación con las micotoxinas producidas por estas especies. La implementación de medidas pre-cosecha debe estar centrada en controlar los factores críticos que potencian la producción de micotoxinas. Algunos de los factores más importantes a tener en cuenta son:

a) *Control de insectos.* Aunque se ha documentado que el daño de los granos no es un pre-requisito para la formación de micotoxinas, la infección fúngica y la contaminación por micotoxinas es mayor generalmente en granos dañados.

b) *Control de residuos de cultivo.* El inóculo potencial es un pre-requisito para la infección fúngica y la subsiguiente producción de micotoxinas. El tipo de suelo y las características del cultivo, así como la disponibilidad de esporas viables se consideran factores importantes en la reducción de estas toxinas. Cuando el cultivo se cosecha, algunos residuos permanecen en el campo en condiciones que permiten la supervivencia de esporas fúngicas y la subsiguiente infección del próximo cultivo. Un control

apropiado de los residuos de cultivo podrían ayudar a minimizar este problema.

c) *Rotación de cultivos.* Una rotación adecuada de cultivos podría ayudar a la prevención de la contaminación con micotoxinas. Por ejemplo, se ha publicado que la infección con *Fusarium* en una rotación maíz-soja es menor que con una rotación maíz-maíz (Lopez-Garcia *et al.*, 2000).

d) *Irrigación y condiciones del suelo.* La fertilidad del suelo y condiciones de estrés hídrico son factores que contribuyen a la contaminación con aflatoxinas en maíz antes de la cosecha. La humedad y la temperatura tienen los roles más importantes en la planificación de cualquier estrategia de control de desarrollo fúngico. Algunos estudios demuestran que el estrés hídrico seguido por condiciones de mucha humedad son condiciones ideales para la proliferación y producción de toxinas por *F. verticillioides*. Por lo tanto, es muy importante realizar esfuerzos para evitar condiciones extremas tanto de sequía como de humedad (Lopez-Garcia *et al.*, 2000).

Control en la cosecha: En la cosecha son importantes algunos factores como el tiempo adecuado de cosecha, la limpieza y el secado de los productos agrícolas. Este control es importante para prevenir la formación de micotoxinas durante el almacenamiento. La cosecha debe realizarse tan pronto como el grano haya completado su crecimiento y su ciclo. Existen estudios que demuestran que los cultivos que se han cosechado de forma tardía presentan mayor nivel de contaminación por micotoxinas.

El secado adecuado de los granos también es esencial para prevenir la proliferación fúngica durante el almacenamiento (Lopez-Garcia *et al.*, 2000).

El grano de maíz una vez cosechado tiene un contenido de humedad del 23 al 25 % y el grano en la mazorca del 25 al 30 % humedad. Una vez cosechado es importante bajar, lo más rápido, el contenido de humedad a valores menores o iguales a un 15 %. Este proceso no debe exceder las 24-48 horas después de la cosecha. El secado puede ser lento y producido por aire tanto natural o a baja temperatura, siempre que el grano no contenga más de 20-21 % de humedad. Otra posibilidad es utilizar temperatura alta de secado hasta que el grano llegue al 20-21 % de humedad y seguir con aire a baja temperatura hasta el 15-13 % de humedad.

También es importante limpiar los granos y los silos antes del almacenamiento.

Control postcosecha: En el almacenamiento es importante controlar los siguientes factores:

a) *Ventilación.* La ventilación remueve el calor, la humedad y el CO₂, por lo que aumenta el período de almacenamiento seguro.

b) *Humedad.* Es necesario asegurar que la humedad del grano no aumentará una vez dentro del silo por lo que el sitio de almacenamiento debe ser seco.

c) *Control de insectos.* Los insectos interactúan con los hongos contaminantes de diferentes formas; pueden crear condiciones en las cuales el hongo puede crecer al causar un calentamiento espontáneo del grano seco, y liberar agua por la respiración y así causar migración de la humedad. También pueden promover la infección fúngica causada por el daño en el grano, además de que pueden ser vehículos de contaminaciones al transportar las esporas fúngicas (Lacey y Magan, 1991).

d) *Temperatura.* Los granos deben estar almacenados en un sitio fresco.

El cultivo intensivo de cereales a menudo requiere un incremento en el uso de biocidas, tales como herbicidas, insecticidas y fungicidas, para la protección del cultivo durante su crecimiento. Después de la cosecha, el almacenamiento de los cereales puede requerir aún mas biocidas, aunque es preferible el control mediante la manipulación de factores físicos como temperatura y a_w .

La infección del grano durante el almacenamiento puede prevenirse o reducirse mediante el uso de fungicidas pre-cosecha, y mediante el uso de ácidos débiles como el benzoico, sórbico, propiónico, acético, nítrico y sulfuroso y sus sales. En almacén, sin embargo, las pequeñas concentraciones permitidas en alimentos pueden ser efectivas hasta un pH una unidad por encima de su pK_a ; a pH altos, existe poco ácido no disociado como para afectar significativamente el crecimiento fúngico (Lacey, 1989).

Resultados interesantes, y a la vez desafortunados, se obtuvieron con la aplicación de conservantes a base de propionatos en maíz en laboratorio. Si bien la combinación de dosis de 0,07 % de propionato en maíz a 0,93 a_w consiguió reducir por completo el crecimiento de *Fusarium* inoculado en forma de micelio, cuando se realizó la inoculación en las mismas condiciones en forma de esporas (es conocido que las condiciones requeridas para germinar son menos restrictivas que para crecer), no solo las cepas fueron capaces de germinar sino incluso produjeron fumonisinas, en cantidades importantes en el caso de *F. proliferatum* (Marín, 1998).

Se ha intentado el control de la producción de aflatoxina mediante conservantes, tipo sorbatos, en maíz almacenado en silos cerrados y con contenido de humedad relativamente altos. La eficiencia depende de la humedad, y de los microorganismos presentes, de forma que la dosis necesaria para inhibir la mayoría de los microorganismos e inhibir la producción de aflatoxina, el 1 %, fue demasiado alta para considerarse económica (Lee *et al.*, 1986).

En 1986 la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU. (NAS) publicó que los fungicidas poseen mas riesgos carcinogénicos que los insecticidas y herbicidas juntos (Research Council, Board of Agriculture, 1987). Por lo tanto, los fungicidas sintéticos están muy controlados y la presión para encontrar alternativas más seguras aumenta. Los estudios se han centrado en encontrar fungicidas que sean seguros tanto para la salud como para el medio ambiente (Wilson *et al.*, 1997). Los extractos de plantas y aceites esenciales han mostrado actividad antifúngica contra un amplio rango de mohos (Wilson *et al.*, 1997).

Extractos naturales de plantas pueden proveer una alternativa a estos conservantes. Varios estudios han examinado el efecto de los aceites esenciales en el crecimiento fúngico y han constatado que algunos de ellos podrían servir como fungicidas naturales (Chao y Young, 2000).

7. ACEITES ESENCIALES. PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS

Los aceites esenciales representan la principal fuente de olor de muchas especies biológicas y generalmente son extraídos por procesos físicos. Principalmente son compuestos volátiles y están formados por una amplia variedad de compuestos orgánicos con diferentes grupos funcionales y estructura molecular (Sankarikutty y Narayanan, 1993). Es frecuente que un aceite esencial contenga más de doscientos componentes, y a menudo en pequeñas cantidades, pero todos son muy importantes para determinar el olor y el sabor del aceite, por lo que la falta de un elemento puede cambiar el aroma (Rogers, 1998). Por otra parte, la composición de los aceites esenciales y de los extractos obtenidos de las plantas está determinada en primera instancia por la especie y la variedad, pero también por las condiciones agronómicas, el tiempo de cosecha y el tipo de procesamiento. Las condiciones ambientales y ecológicas de una región particular también son factores importantes que determinan el porcentaje de los diferentes constituyentes en un aceite en particular (Guillén *et al.*, 1996).

Su función en las plantas no está totalmente establecida. Sus olores atraen insectos que ayudan a la polinización y por lo tanto los aceites pueden ayudar a la polinización y a la selección natural. Los bálsamos y resinas que contienen aceites esenciales actúan como sellos protectores contra enfermedades o parásitos y previenen la pérdida de savia cuando los troncos están dañados (Sankarikutty y Narayanan, 1993).

7.1. Composición química

Los constituyentes orgánicos de los aceites esenciales incluyen terpenos, sus derivados oxigenados, compuestos aromáticos con una estructura bencenoide, hidrocarburos alifáticos y sus derivados oxigenados y compuestos conteniendo sulfuros y nitrógeno (Sankarikutty y Narayanan, 1993). Los terpenos pueden ser alifáticos, acíclicos o bi- y tri- cíclicos con varios grados de insaturación con dobles o triples enlaces. Aunque los terpenos hidrocarbonados son el principal componente de muchos aceites esenciales, su contribución al olor es pequeña comparada con sus derivados oxigenados. Los derivados oxigenados incluyen, alcoholes, aldehídos, cetonas, lactonas y ésteres. Son los que principalmente contribuyen al olor y sabor de los aceites.

Los compuestos benzoides son constituyentes aromáticos de los aceites esenciales cuya base es el anillo de benceno. Las reacciones bioquímicas asociadas al metabolismo de las plantas producen estos compuestos que incluyen todo el rango de grupos funcionales. El *n*-propilbenzeno se considera el precursor enzimáticamente activo. Los productos con varios grupos funcionales unidos al grupo benceno se forman en varios estados de oxidación.

Los compuestos que contienen nitrógeno o sulfuros generalmente no están originariamente presentes en los aceites. De todas formas, algunos de los más importantes compuestos nitrogenados se encuentran en el aceite de jazmín y en muchos aceites de cítricos. Los sulfuros se encuentran frecuentemente en las plantas, probablemente debido a la degradación de glucósidos que contienen azufre. Los aceites de ajo, cebolla y mostaza presentan sulfuros que han sido formados como productos de la acción enzimática (Sankarikutty y Narayanan, 1993).

7.2. Propiedades físicas

Generalmente los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente; sin embargo algunos son semisólidos y varios son sólidos (Rogers, 1998). La mayoría de sus componentes son sensibles a la luz, el calor, el aire y el agua, por lo que necesitan ser almacenados bajo condiciones cuidadosamente controladas (Sankarikutty y Narayanan, 1993; Wright, 1999).

7.3. Usos

Los aceites esenciales son compuestos extensamente empleados como saborizantes y agentes aromatizantes, especialmente en la industria de bebidas sin alcohol y en pastelería (Wright, 1999). Además, sus derivados son ampliamente utilizados en muchas aplicaciones específicas como por ejemplo en medicamentos, desinfectantes e insecticidas. La "aromaterapia", es el uso terapéutico de la fragancia para curar, disminuir o prevenir enfermedades o infecciones solamente al inhalar el aceite. Las propiedades fungitóxicas o bactericidas de los aceites así como su mínima concentración inhibitoria (MIC) están siendo estudiadas en detalle para su aplicación práctica (Sankarikutty y Narayanan, 1993).

Las especias han adquirido en los últimos años un importante papel en los hábitos alimentarios. Las nuevas tendencias en el consumo de alimentos con sabor intenso pero libres de sal y aditivos han vuelto a dar a las especias una importancia tal vez similar a la que tuvieron en siglos pasados. Se ha considerado que las especias, a los niveles generalmente utilizados en los alimentos, tienen una limitada acción inhibitoria del crecimiento de mohos; para lograr la inhibición es necesario utilizar grandes cantidades de especias. El contenido de aceites esenciales en las diferentes especias es variado, por ejemplo la canela, dependiendo de la variedad puede contener entre 0,9 y 2.3 % de aceite esencial y el clavo un 17 % (Salmeron y Pozo, 1991).

7.4. Métodos de obtención

Los aceites esenciales se localizan en pequeñas bolsas o sacos, aislándose de varias partes de la planta: las hojas, los frutos, la corteza, la raíz, la madera, el duramen, la goma, el bálsamo, las bayas, las semillas, las flores, los vástagos y los capullos. Estas porciones de la planta se procesan

con el fin de obtener los aceites esenciales, libres en su mayor parte de celulosa, glicéridos, almidones, azúcares, taninos, sales y minerales que pueda haber en las partes vegetales (Rogers, 1998).

Hay tres métodos básicos para aislar los aceites esenciales de las plantas (Sankarikutty y Narayanan, 1993):

- El método físico más común para extraer los aceites es la destilación. Normalmente, previo a la destilación, los materiales vegetales son secados y aplastados para que así se rompan los sacos de aceite y quede liberada el mayor número posible de estos. Hay varias técnicas adoptadas para aislar los aceites esenciales: la hidrodestilación, la destilación con vapor, la hidrodifusión y la destilación mediante vacío.

- Los aceites esenciales sensibles al calor pueden ser aislados por extracción usando un disolvente orgánico.

- El prensado es un método generalmente empleado en frutos con pieles ricas en aceites. El fruto entero es lavado y estrujado entre rodillos, separándose el aceite mediante centrifugación.

Podemos mejorar los aceites esenciales obtenidos mediante las técnicas anteriores, a partir de procesos de modificación como la concentración, la rectificación, la extracción y el tratamiento químico gracias a los cuales se consigue un mayor grado de separación, pureza y enriquecimiento en las fracciones deseables del aceite (Sankarikutty y Narayanan, 1993).

7.5. Legislación y normativa aplicable en aceites esenciales

La legislación española y de la Unión Europea específica de aceites esenciales es escasa o está por desarrollar, por lo que para su regulación es necesario referirse al uso final al que se van a destinar. De esta forma nos encontramos con 4 sectores en que se comercializan los aceites: alimentación, herboristería, farmacia, y cosmética y perfumería (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

En el sector alimentación se incluyen aquellos aceites que por sus propiedades tienen como misión principal servir como aditivos en la industria alimentaria, transmitiendo a las bebidas y alimentos sabores y olores deseables, o bien aprovechando sus propiedades antioxidantes, conservantes y germicidas.

A continuación se relaciona la normativa que controla la utilización de estos productos en el campo agroalimentario, habiéndose clasificado en la

categoría de aditivos como productos aromáticos naturales: Código Alimentario Español. Capítulo XXXI, XXXII y XXXIII y Real decreto 1477/1990, del 2 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los aromas que se utilizan en productos alimenticios y de los materiales de base para su producción (B.O.E. 22-11-90).

La normalización y certificación de los aceites esenciales en España está reflejada en las normas UNE, publicadas por la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Existen 34 normas UNE (27 de carácter general sobre: envases, toma de muestras, nomenclatura y métodos de análisis y 7 normas generales específicas sobre aceites esenciales de eucalipto, espliego, tomillo rojo, orégano español y romero) (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

La mayoría de los aceites esenciales son considerados GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguro) por la FDA. Están definidos como productos derivados de materiales de plantas, extraídos por algún método físico sin provocar cambios químicos en su estructura (Sankarikutty y Narayanan, 1993).

7.6. Actividad antimicrobiana

Muchos aceites esenciales presentan propiedades antimicrobianas. Estos aceites contienen componentes específicos que pueden inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos.

Maruzzella y Balter (1959) encontraron que 100 aceites esenciales, de las 119 especies estudiadas, presentaban efecto antagonista contra al menos 1 de los 12 hongos fitopatógenos estudiados y que 50 de estos compuestos mostraban un amplio espectro de actividad contra todos los mohos ensayados. Mas de 280 plantas han sido estudiadas por su efecto contra *Aspergillus* spp. y cerca de un centenar de ellas tuvieron algún efecto contra el crecimiento o la producción de micotoxinas. Entre ellas, las especias han sido el grupo con mejores resultados, pero en pocos casos se han estudiado sus aceites esenciales (Montes-Belmont y Carvajal, 1998).

También se ha observado que la actividad de los aceites esenciales no solo depende de sus componentes sino también de la estructura química de los mismos (Farag *et al.*, 1989). Mahmoud (1994) estudió el efecto de 20 constituyentes de aceites esenciales en el crecimiento y producción de aflatoxina por *A. flavus*. Cinco de estos constituyentes, geraniol, nerol, citronelol (alcoholes alifáticos), cinamaldehído (aldehído alifático) y timol

(cetona fenólica) inhibieron completamente el crecimiento de *A. flavus* y consecuentemente la producción de aflatoxina.

Los aceites de canela y de clavo así como sus componentes principales, aldehído cinámico y eugenol, respectivamente, inhibieron el crecimiento y la producción de aflatoxina por *A. parasiticus* (Bullerman *et al.*, 1977). También se ha observado, que el timol (extraído del tomillo) inhibe la producción de toxina por *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus* y *A. parasiticus* (Hitoko *et al.*, 1980; Buchanan y Shepherd, 1981). Montes-Belmont y Carvajal (1998) estudiaron el efecto de 11 aceites esenciales (clavo, canela, tomillo, albahaca, orégano, eucalipto, ajo, cebolla, pimienta negra, menta y hierba *epazote*) en la protección de semillas de maíz contra *A. flavus*, observando una total inhibición del crecimiento del hongo al utilizar clavo, canela, orégano, tomillo, albahaca, hierba *epazote* y menta. Por otra parte, también observaron que ninguno de los aceites esenciales estudiados disminuiría significativamente la germinación de los granos de maíz. Al estudiar el efecto de alguno de los principales constituyentes de los aceites esenciales observaron que solamente el timol y el o-metoxicinamaldehído (principal componente de la canela) mostraban algún grado de inhibición de la contaminación por *A. flavus* (Montes-Belmont y Carvajal, 1998).

También se ha observado que el aceite esencial de eucalipto presenta propiedades inhibitorias del crecimiento *in vitro* de *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*, *F. acuminatum* y *F. chlamidosporium* (Rai *et al.*, 1996). El aceite esencial del árbol de té exhibió un gran efecto inhibitorio sobre algunas bacterias, levaduras, mohos y bacteriófagos, mientras que el aceite de pino inhibió el crecimiento de ciertas bacterias, pero no tuvo efecto alguno sobre los hongos ensayados (Chao y Young, 2000).

Todos estos estudios abren la posibilidad de la utilización de estos productos en el control fúngico de los alimentos durante el almacenamiento, ya que siendo compuestos naturales de origen vegetal, se evitan los problemas de toxicidad residual que aportan las sustancias químicas sintéticas. Además, la composición predominantemente volátil de los aceites, permite una fácil aplicación sobre alimentos almacenados en forma de fumigación (Mishra y Dubey, 1994), siendo de gran interés seguir investigando el potencial antifúngico de los mismos en diferentes géneros.

8. BIBLIOGRAFÍA

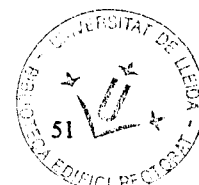
- Abbas, H.K.; Mirocha, C.J.; Kommedahl, T.; Vesonder, R.F. y Golinski, P. 1989. Production of trichothecene and non trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species isolated from maize from Minnesota. *Micopathologia*. vol. 108 pp:55-58.
- Ali, N.; Sardjono, A.; Yamashita, A. y Yoshizawa, T. 1998. Natural co-occurrence of aflatoxins and Fusarium mycotoxins (fumonisins, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone) in corn Indonesian. *Food Additives and Contaminants*. vol. 15 pp: 337-384.
- Bacon, C.W. y Nelson, P.E. 1994. Fumonisin Production in Corn by Toxicogenic Strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Journal of Food Protection*. vol. 57 pp: 514-521
- Bacon, C.W.; Hinton, D.M. y Richardson, M.D. 1994. A corn seedling assay for resistance to *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease*. vol. 78 pp: 302-305.
- Benavent, J.L.A. 1996. Procesos de elaboración de alimentos. Serie de publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
- Ben-Gera, I.; Rokey, G.J. y Smith, O.B. 1984. Extrusion cooking of grain for ethanol production. En: Extrusion cooking technology. Jowitt, R. (Ed.). Elsevier, New York, pp: 95-105.
- Bezuidenhout, S.C.; Gelderblom, W.C.A.; Gorst-Altam, C.P.; Horak, R.M. y Marasas, W.F.O. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications*. pp: 743-745.
- Bilgrami, K.S. y Choudhary, A.K. 1998. Mycotoxins in Preharvest Contamination of Agricultural Crops. En: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety. Sinha, K. and Deepak Bhatnagar (Eds.) pp: 1-43.
- Boutrif, E. y Canet, C. 1998. Mycotoxin prevention and control: FAO programs. *Revue de Médecine Veterinaire*. vol. 149 pp: 681-694.
- Buchanan, R.L. y Shephard, A.J. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by thymol. *Journal of Food Science*. vol. 46 pp: 976-977.
- Bullerman, L.B. y Draughon, F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. Introduction. *Journal of Food Protection*. vol. 57 pp: 547-553.
- Bullerman, L.B. y Tsai, W.J. 1994. Incidence and level of *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y Fumonisin in Corn-Based Food and Feeds. *Journal of Food Protection*. vol. 57 pp:541-546.
- Bullerman, L.B.; Lieu, F. y Seire, A.S. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science*. vol. 42 pp: 1107-1116.
- Burgess, L.W. y Liddell, C.M. 1983. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Sydney, N.S.W.; University of Sydney.
- Cahagnier, B.; Melcion, D. y Richard-Molard, D. 1995. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 20 pp: 247-251.
- Carmelli, M.; Dondo, A.; Cantini Cortellezzi, G.; Visconti, A.; Minervini, F.; Doko, M.B. y Guarda, F. 1993. Leukoencephalomalacia in equine caused by fumonisins: First report in Italy. *Ippologia*. vol. 4 pp: 49-56.

- Castellá, G.; Bragulat, M.R.; Cabafies, J.C. 1999. Surveillance in fumonisins in maize-based feed and cereals from Spain. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. vol. 47 pp: 4707-4710.
- Cerveró, M.C. 2001. Nuevo método de análisis de deoxinivalenol, toxina T-2, zearalenona, α - y β -zearalenol en maíz y derivados. Tesis doctoral. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia.
- Chao, S.C. y Young, D.G. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essential Oil Research*. vol. 12 pp: 630-649.
- Chamley, L.L.; Rosenber, A. y Trenholm, H.L. 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and foodstuffs. En: *Mycotoxins in Grain Compounds other than Aflatoxin*. Miller, J.D.; Trenholm, H.L. (eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 471-486.
- Chelkowski, J. 1991. Preface. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. J. Chelkowski (Ed.). Amsterdam:Elsevier. pp: 77-118.
- Chelkowski, J.; Zaguadziki, M.; Zajkowski, P.; Logrieco, A. y Botalico, A. 1990. Moniliformin production by *Fusarium* species. *Mycotoxin Research*. vol. 6 pp: 41-45.
- Chelule, P.K.; Gqaleni, N.; Dutton, M.F. y Chuturgoon, A.A. 2001. Exposure of rural and urban populations in KwaZulu Natal, South Africa, to fumonisin B₁ in maize. *Environmental Health Perspectives*. vol. 109 pp: 253-256.
- Chatterjee, D. y Mukherjee, S.K. 1994. Contamination of Indian Maize with fumonisin B₁ and its effects on chicken macrophage. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 18 pp: 251-253.
- Chu, F.S. y Li, G.Y. 1994. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B₁ and Other Mycotoxins in Mouldy Corn Collected from the People's Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 60 pp: 847-852.
- Chulze, S.N.; Ramirez, M.L.; Faronchhi, M.C.; Visconti, A. y March, G. 1996. *Fusarium* and fumonisin B₁ occurrence in Argentina corn at ear mature stage. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. vol. 44 pp: 2797-2801.
- Código Alimentario Español y disposiciones complementarias (Ed. P. Deleuze Isasi). 1997. 3ª edición. Capítulos XXXI, XXXII, XXXIII. Ed. Tecnos, S.A. Madrid.
- Comerio, R.M.; Pinto, V.E.F. y Vaamonde, G. 1999. Influence of water activity on deoxynivalenol accumulation in wheat. *Mycotoxin Research*. vol. 15 pp: 24-32.
- Cooke, R.C. y Whipps, J.M. 1993. Interactions with other Heterotrophs. En: *Ecophysiology of fungi*. Blackwell Scientific Publication, University Press Cambridge, UK. pp: 219-231.
- Cuero, R.G.; Smith, J.E. y Lacey, I. 1988. Mycotoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* in irradiated maize grains in the presence of other fungi. *Journal of Food Protection*. vol. 51 pp: 452-456.
- Cuero, R.G.; Smith, J.E. y Lacey, J. 1987. Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 52 pp: 1142-1146.
- De Nijs, M.; Soentro, P.; Delfgou-Van Asch, E.; Kamphuis, H.; Rombots, F.M. y Notermans, S.H.W. 1996. Fungal infection and presence of deoxynivalenol and zearalenone in cereal grown in Netherlands. *Journal of Food Protection*. vol. 59 pp: 772-777.
- Desjardins, A.E. y Hohn, T.M. 1997. Mycotoxin in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. vol. 10 pp: 147-152.

- Desjardins, A.E. y Plattner, R.D. 2000. Fumonisin B₁-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. vol. 48 pp: 5773-5780.
- Desjardins, A.E.; Plattner, R.D. y Nelson, P.E. 1994. Fumonisin Production and Other Traits of *Fusarium moniliforme* Strains from Maize in Northeast Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 60 pp: 1695-1697.
- Diener, U.L. y Davis, N.D. 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *A. flavus* in stored peanuts. *Journal American Oil Chemistry Society*. vol. 47 pp: 347-351.
- Doko, M.B. y Visconti, A. 1994. Occurrence of Fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn bases human foodstuffs in Italy. *Food Additives and Contaminants*. vol. 11 pp: 433-439.
- Doko, M.B.; Canet, C.; Brown, N.; Sydenham, E. W.; Mpuchane, S. y Siame, B.A. 1996. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based food eastern and southern Africa. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. vol. 44 pp: 3240-3243.
- Doko, M.B.; Rapior, S.; Visconti, A. y Schloth, J.E. 1995. Incidence and Levels of Fumonisin Contamination in Maize Genotypes Grown in Europe and Africa. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. vol. 43: 429-434.
- Dombrink-Kurtzman, M:A. y Dvorak, T.J. 1999. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. vol. 47. pp: 622-627.
- Ehling, G.; Cockburn, A.; Snowdon, P. y Buchhaus, H. 1997. The significance of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) for human and animal health. *Cereal Research Communication*. vol. 25 pp: 433-447.
- Ellend, N.; Binder, J.; Krska, R. y Horvath, E.M. 1997. Contamination of Austrian corn with *Fusarium* toxins in autumn 1996. *Cereals Research Communicatoins*. vol. 25 pp: 359-360.
- Eriksen, G.S. y Alexander, J. (eds), 1998. *Fusarium* toxins in cereals-a risk assessment. Nordic Council of Ministers; TemaNord 1998. vol. 502 pp: 7- 27 y 45-58; Copenhagen.
- Etcheverry, M.; Magnoli, C.; Dalcero, A.; Chulze, S. y Lecumberry, S. 1998. Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol production by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* in interactive cultures on irradiated corn kernels. *Mycopathologia*. vol. 142 pp: 37-42.
- FAO. (1997). World-wide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO. *Food and Nutrition Paper*. vol. 64. Rome, Italy.
- Fazekas, B.; Kis, M. y Hajdu, E.T. 1996. Data on the contamination of maize with fumonisin B₁ and other fusariotoxins in Hungary. *Acts Veterinary Hungary*. vol. 44 pp: 25-37.
- Flannigan, B. 1978. Primary contamination of barley and wheat grain by storage fungi. *Transactions of British Mycological Society*. vol. 71 pp: 37-42.
- Francis, R.G. y Burgess, L.W. 1977. Characteristics of two populations of *Fusarium roseum* 'Graminearum' in Eastern Australia. *Transactions of British Mycological Society*. vol. 58 pp: 421-427.
- Frisvad, J.C. y Thrane, U. 1995. Mycotoxin Production by Food-Borne Fungi. En: Introduction to Food-Borne Fungi. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. and Filtenborg, O (Eds.). CBS pp: 251-260.

- Fundación Alfonso Martín Escudero. 1999. Diagnóstico del sector. Legislación y normativa aplicable. En: Las Plantas de Extractos; Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. pp: 91-102. Ed. Grupo Mundi-Prensa. Madrid.
- Galinat, W.C. 1977. The origin of corn. Corn and corn improvement. Sprague, G.F. (Ed.). Agronomy. vol. 18 pp: 1-48.
- Galinat, W.C. 1979. Botany and origin of maize: CIBA-GEIGY Agrochemicals Technical Monograph. CIBA-GEIGY, Basle, Switzerland. pp: 6-12.
- Galvano, F.; Russo, A.; Cardile, V.; Galvano, G.; Vanella, A. y Renis, M. 2002. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B₁. *Food and Chemical Toxicology*. vol. 40 pp: 25-38.
- Gaumy, J.L.; Bailly, J.D.; Burgat, V. y Guerre, P. 2001. Zearalenone: properties and experimental toxicity. *Revue de Médecine Veterinaire*. vol. 152 pp: 291-234.
- Gelderblom, W.C.A.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Hora, R.M.; Vleggar, R. y Kriek, N.P.J. 1988 Fumonisins-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 54 pp: 1806-1811.
- Gelderblom, W.C.A.; Kriek, N.P.J.; Marasas, W.F.O. y Thiel, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *F. moniliforme* metabolite, Fumonisin B₁, in rats. *Carcinogenesis*. vol. 12 pp: 1247-1251.
- Gilbert, J. 1989. Current views on the occurrence and significance of *Fusarium* toxins. *Society Applied Bacteriology Symposium Series*. vol. 18: 89-98.
- Glenn, A.E.; Hinton, D.M.; Yates, I.E. y Bacon, C.W. 2001. Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 67 pp: 2973-2981.
- Gqaleni, N.; Smith, J.E.; Lacey, J. y Gettinby, G. 1997. Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 63 pp: 1048-1053.
- Guerrero, A. 1977. Cultivos herbáceos extensivos. pp: 95-99. Mundi-Prensa, Madrid.
- Guillén, M.D.; Cabo, N. y Burillo, J. 1996. Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal Science of Food Agriculture*. vol. 70 pp: 359-363.
- Harris, L.J.; Desjardins, A.E.; Plattner, R.D.; Nicholson, P.; Butler, G.; Young, J.C.; Weston, G.; Proctor, R.H. y Hohn, T.M. 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease*. vol. 83 pp: 954-960.
- Hirooka, E.Y.; Yamaguchi, M.M.; Aoyama, S., Sugirua, Y. y Ueno, Y. 1996. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Additives and Contaminants*. vol. 12 pp: 173-183.
- Hitoku, H.; Morozumi, T.; Wauke, S.; Sakai, S. y Kurata, H. 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxicogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 39. pp: 818-822.
- Hoenisch, R.W. y Davis, R.M. 1994. Relationship between kernel pericarp thickness and susceptibility to *Fusarium* ear rot in field corn. *Plant Disease*. vol. 78 pp: 517-519.

- Hopmans, E.C. y Murphy, P.A. 1993. Detection of Fumonisin B₁, B₂, B₃ and HB₁ in Corn-Containing Food. *Journal Agriculture Food Chemistry*. vol. 41 pp: 1655-1658.
- Howard, P.C.; Warbritton, A.; Voss, K.A.; Lorentzen, R.J.; Thurman, J.D.; Kovach, R.M. and Bucci, T.J. 2001. Compensatory regeneration as a mechanism for renal tube carcinogenesis of fumonisin B₁ in the F344/N/Nctr BR rat. *Environmental Health Perspectives*. vol. 109 pp: 309-314.
- JECFA 2000. Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives, 53rd Report. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series 44.
- Kent, N.L. 1987. Tecnología de los cereales. Acribia, Zaragoza.
- Kim, J.C.; Kang, H.J.; Lee, D.H.; Lee, W. y Yoshizawa, T. 1993. Natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecens and zearalenone) in barley and corn in Korea. *Applied Environmental Microbiology*. vol. 59 pp: 3798-3802.
- Kpodo, K.; Thrane, U. y Hald, B. 2000. Fusaria and fumonisins in maize from Ghana and their co-occurrence with aflatoxins. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 61 pp: 2-3.
- Kuiper-Goodman, T.; Scott, P.M. y Watanabe, H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory toxicology and Pharmacology*. vol. 7 pp: 253-306.
- Lacey, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of food and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*. Symposium Supplement, 11S-25S.
- Lacey, J. y Magan, N. 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Chelkowski, J. (Ed). Amsterdam: Elsevier. pp: 77-118
- Lauren, D.R. y Di Menna, M.E. 1999. Fusaria and *Fusarium* mycotoxins en leaves and ears of maize plants. 2. A time course study made in the waikato region, New Zealand, in 1997. *New Zealand Journal Crop Horticulture Science*. vol. 27 pp: 215-223.
- Lauren, D.R. y Ringrose, K. 1997. Determination of the fate of three *Fusarium* mycotoxins though wet-milling of maize using an improved HPLC analytical technique. *Food Additives and Contaminants*. vol 14 pp: 435-443.
- Lauren, D.R.; Agnew, M.P.; Smith, W.A. y Sayer, S.T. 1991. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in cereals grown in New Zealand in 1986-1989. *Food Additives and Contaminants*. vol. 8 pp: 59-605.
- Li, S.; Marquardt, R.R. y Abramson, D. 2000. Immunochemical detection of moulds: a review. *Journal of Food Protection*. vol. 63 pp:281-291.
- Liddell, C.M. y Burgess, L.W. 1985. Survival of *Fusarium moniliforme* at Controlled Temperature and Relative Humidity. *Transactions of British Mycological Society*. vol. 84 pp:121-130.
- Lopez-Garcia, R.; Park, D.L. y Phillips, T.D. 2000. Integrated mycotoxin management systems. <http://www.fao.org/docrep/X2100T/X2100T07.htm>. (revisado, agosto 2002).
- Lou, Y.; Yoshizawa, T. y Katayama, T. 1990. Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 56 pp: 3723-3726.



- Magan, N. y Lacey, J. 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transactions of British Mycological Society*. vol. 82 pp: 83-93.
- Magan, N. y Lacey, J. 1988. Ecological determinants of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 7 pp: 245-256.
- Magan, N. y Lacey, J. 1989. Water and the ecology of grain fungi. En: *Frontiers in Applied Microbiology*. Vol. III Mukerji, K.G.; Singh, V.P. y Garg, K.L. (Eds.), Rastogi & Co., India. pp: 231-261.
- Mahmound, A.-L.E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 19 pp: 110-113.
- Marasas, W.F.O.; Nelson, P.E. y Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology, Pennsylvania State University Press, University Park, pp: 216-246.
- Marín, S. 1998. Ecofisiología de cepas de *Fusarium* productoras de fumonisinas. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida, España.
- Maruzzella, J.C. y Balter, J. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*. vol. 43 pp: 1143-1147.
- McDonald, P.; Edwards, R.A.; Grenhalgh, J.F.D. y Morgan, C.A. 1999. Nutrición animal. 5ª Ed. Editorial Acribia, Zaragoza.
- McMuller, M.; Jones, R. y Gallenebreg, D. 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease*. vol. 81 pp: 1340-1348.
- Miller, J.D. 1994. Epidemiology of *Fusarium* Ear Diseases of Cereals. En: *Mycotoxin in Grain. Compounds Other Than Aflatoxin*. Miller, J.D. y Trenholm, H.L. (eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 19-36.
- Miller, J.D.; Greenhalgh, R.; Wang, Y.-Z. y Lu, M. 1991. Tricothecene chemotypes of three *Fusarium* species. *Mycologia*. vol. 83 pp: 21-130.
- Miller, J.D.; Young, J.C. y Trenholm, H.L. 1983. *Fusarium* toxins in field corn. I. Time of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botanical*. vol. 61 pp: 3080-3087.
- Montes-Belmont, R. y Carvajal, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection*. vol. 61 pp: 616-619.
- Multon, J.L. 1988. Interactions between water and the constituents of grains, seeds and by-products. En: *Preservation and storage of grains, seeds and their by-products*. Multon, J.L. (Ed.), Lavoisier, New York.
- Munkvold, G.P.; McGee, D.C. y Carlton, W.M. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. vol. 87 pp: 209-217.
- Murphy, P. A.; Rice, L. G. y Ross, P. F. 1993. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *Journal Agriculture of Food Chemistry*. vol. 41 pp: 263-266.
- Nelson, P.E. 1992. Fumonisin, Mycotoxins Produced by *Fusarium* species: Biology, Chemistry, and Significance. *Annual Review of Phytopathology*. vol. 31 pp: 233-252.
- Nelson, P.E.; Plattner, R.D.; Shackelford, D.D. y Desjardins, A.E. 1993. Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 58 pp: 984-989.

- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. (eds.) 1983. *Fusarium* species. The Pennsylvania State University Press, University Park and London.
- Norred, W.P. y Voss, K.A. 1994. Toxicity and Role of Fumonisin in Animal Diseases and Human Esophageal Cancer. *Journal of Food Protection*. vol. 57 pp: 522-527.
- Norred, W.P.; Riley, R.T.; Meredith, F.L.; Poling, S.M. y Plattner, R.D. 2001. Instability of N-acetylated fumonisin B₁ (FA₁) and the impact on inhibition of ceramide synthase in rat liver slices. *Food and Chemical Toxicology*. vol. 39 pp: 1071-1078.
- Northolt, M.D. 1979. The effect of water activity and temperature on the production of some mycotoxins. Ph.D. Dissertation, Bilthoven, Holland.
- Pacin, A.M.; Broggi, L.E.; Resnik, S.L. y Gonzalez, H.H.L. 2001. Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Entre Rios province, Argentina. *Mycotoxin Research*. vol. 17 pp: 31-38.
- Park, J.J. y Chu, F.S. 1996. Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in natural occurring moldy corn. *Journal of Association Official Analytical Chemistry International*. vol. 79 pp: 465-471.
- Patterson, M. y Damoglou, A.P. 1986. The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on bread analogue. *Letter Applied of Microbiology*. vol. 3 pp: 117-128.
- Pelhate, J. 1968. Mycopathology. *Mycological Applied*. vol. 36 pp: 117-128.
- Phinney, B.O. y West, C.A. 1960. Gibberellins as native plant grow regulators. *Annual Review of Plant Physiology*. vol. 11 pp: 411-436.
- Piñeiro, M.S.; Silva, G.E.; Scott, P.M.; Lawrence, G.A. y Stack, M.E. 1997. Fumonisin levels in Uruguayan corn Products. *Food Chemical Contaminants Journal of AOAC International*. vol 80 pp: 825-828.
- Pitt, J.L. y Hocking, A.D. 1997. Primary keys and miscellaneous fungi En: Fungi and Food spoilage Ed: Blackie Academic & Professional, London
- Pittet, A.; Parisod, V.; Schellenberg, M. 1992. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based product from the Swiss market. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 40 pp:1352-1354.
- Placinta, C.M.; D'Mello, J.P.F. y Macdonald, A.M.C. 1999. A review of world-wide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*. vol. 78 pp: 21-37.
- Prelusky, D.B.; Rotter, B.A. y Rotter, R.G. 1994. Toxicology of Mycotoxins. En: Mycotoxin in Grain. Compounds Other Than Aflatoxin. Miller, J.D. y Trenholm, H.L. (eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 359-403.
- Rai, M.K.; Qureshi, S. y Pandey, A.K. 1996. In vitro susceptibility of opportunistic *Fusarium* spp. to essential oils. *Journal Ethnopharmacology*. vol. 53 pp: 143-147.
- Ramakrishna, N.; Lacey, J. y Smith, J.E. 1996. The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Additives and Contaminants*. vol. 13 pp: 939-948.
- Real Decreto 1477/1990, del 2 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los aromas que se utilizan en productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. B.O.E. 22/1990, de 22 de noviembre.

- Reid, L.M.; Mather, D.E. y Hamilton, R.I. 1996. Distribution of Deoxynivalenol in *Fusarium graminearum*-infected maize ears. *Phytopathology*. vol. 86 pp: 110-114.
- Reid, L.M.; Nicol, R.W.; Ouellet, T. Savard, M.; Miller, J.D.; Young, J.C.; Stewart, D.W. y Schaafsma, A.W. 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxins accumulation. *Phytopathology*. vol. 89 pp: 1028-1037.
- Research Council, Board of Agriculture. 1987. Regulating Pesticides in Food. The Delaney Paradox. National Academy Press, Washington, DC.
- Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Sydenham, E.W.; Shephard, G.S. y Van Schalkwyk, D.J. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*. vol. 82 pp: 353-357.
- Rheeder, J.P.; Sydenham, E.W.; Marasas, W.F.O.; Thiel, P.G.; Shephard, G.S.; Schlechter, M.; Tockenstrom, S.; Cronje, D.W. y Viljoe, J.H. 1995. Fungal infestation and mycotoxins contamination of South African commercial maize harvest in 1989 and 1990. *South African Journal Science*. vol. 91 pp: 127-131.
- Rice, L.G. y Ross, P.F. 1994. Methods for Detection and Quantification of Fumonisin in Corn, Cereal Products and Animal Excreta. *Journal of Food Protection*. vol. 57 pp: 536-540.
- Ridchardson, M.B. y Bacon, C.W. 1995. Catabolism of 6-methoxy-benzoxazalinone and 2-benzoxazolinone by *Fusarium moniliforme*. *Micologia*. vol.87 pp: 510-517.
- Riley, R.T.; Enongene, E.; Voss, K.A.; Norred, W.P.; Meredith, R.P.; Sharma, J. Spitsbergen, J.; Williams, E.D.; Carlson, D.B. y Merrill, A.H.Jr. 2001. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspective*. vol. 109 pp: 301-308.
- Rogers, Jr. J.A. 1998. Aceites Esenciales. En: Enciclopedia de Tecnología química (Ed. Kirk-Othmer) Ed. Limusa S.A. México. pp: 9.
- Ryu, J.C.; Yang, J.S.; Song, Y.S.; Kwon, O.S.; Park, J. y Chang, L.M. 1996. Survey of natural occurrence of trichothecene mycotoxins and zearalenone in Korean cereals harvest in 1992 using gas chromatography/mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*. vol. 13 pp: 331-341.
- Salmerón, J. y Pozo, R. 1991. Effect of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and clove (*Eugenia caryophyllus*) on growth and toxigenesis of *Aspergillus gr. flavus*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition*. vol. 9 pp: 83-87.
- Salmerón, J., Jordano, R. Pozo, R. 1990. Influencia del pimentón (*Capsicum annum*, L.) en el crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus flavus*. *Alimentaria*. pp:43-46.
- Sanchis, V.; Abadias, M.; Oncins, L.; Sala, N.; Viñas, I. y Canela, R. 1994. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 60 pp: 2147-2148.
- Sanchis, V.; Abadias, M.; Oncins, L.; Sala, N.; Viñas, I. y Canela, R. 1995. Fumonisin B₁ and B₂ and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. *International Journal of Food Microbiology*. vol. 27 pp: 37-44.
- Sankarikutty, B. y Narayanan, C.S. 1993. Essential oils. En: Encyclopaedia of Food Science Food Technology and Nutrition. Macrae, R.; Robinson, R. K. y Sadler, M.R. (Eds) Academic Press Limited, London. vol. 3 pp: 1655-1668.

- Scott, G.E. y King, S.B. 1984. Site of action of factors for resistance to *Fusarium moniliforme* in maize. *Plant Disease*. vol. 68 pp: 804-806.
- Scott, P.M. 1990. Trichothecens in grains. *Cereal Food World*. vol. 35 pp: 661-666.
- Scott, P.M. y Trucksess, M.W. 1997. Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of Association Official Analytical Chemistry International*. vol. 80 pp: 941-949.
- Shephard, G.S.; Marasas, W.F.O.; Leggott, N.L.; Yazdanpanah, H.; Rahimian, H. y Safavi, N. 2000. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. vol. 48 pp: 1860-1864.
- Siame, B.A.; Mpuchane, S.F.; Gashe, B.A.; Allotey, J. y Teffera, G. 1998. Occurrence of aflatoxins, fumonisin B₁ and zearalenone in food and feeds in Botswana. *Journal and Food Protection*. vol. 61 pp: 1670-1673.
- Smith, G.W.; Constable, P.D.; Eppley, R.M.; Tumbleson, M.E.; Gumprecht, L.A. y Haschek-Hock, W.M. 2000. Purified fumonisin B₁ decreases cardiovascular function but dose not alters pulmonary capillary permeability in swine. *Toxicological Science*. vol. 56 pp: 240-249.
- Snijders, C.H.A. 1994. Breeding for Resistance to *Fusarium* in Wheat and Maize. En: Mycotoxin in Grain. Compounds Other Than Aflatoxin. Miller, J.D. y Trenholm, H.L. (eds.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp: 37-58.
- Sohn, H.; Seo, J. y Lee, Y. 1999. Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Additives and Contaminants*. vol. 16 pp: 153-158.
- Stack, M.E.; Eppley, R.M. 1992. Liquid chromatographic determination of Fumonisin B₁ and B₂ in corn and corn product. *Journal of AOAC International*. vol. 75 pp: 834-836.
- Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. vol. 4 pp: 195.
- Sydenham, E.W.; Shephard, G.S.; Thiel, P.G.; Marasas, W.F.O. y Steckenstrom, S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn based human foodstuffs. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. vol. 25 pp: 767-771.
- Sydenham, E.W.; Shephard, G.S.; Thiel, P.G.; Stockenstrom, S. y Snijman, P.W. 1996. Liquid chromatographic determination of Fumonisin B₁, B₂, and B₃ in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *Journal of AOAC International*. vol. 79 pp: 688-696.
- Theumer, M.G.; Lopez, A.G.; Masih, D.T.; Chulze, S.N. y Rubinstein, H.R. 2002. Immunobiological effects of fumonisin B₁ in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. vol. 9 pp: 149-155.
- Thiel, P.G.; Marasas, W.F.O.; Sydenham, E.W.; Shephard, G.S.; Gelderblom, W.C.A. y Nieuwenhuis, J.J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 57 pp: 1089-1093.
- Thomas, M.D. y Buddenhagen, I.W. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Micologia*. vol. 72 pp: 883-887.
- Torres, M.R.; Sanchis, V. y Ramos, J.A. 1998. Occurrence of fumonisins in Spain beers analyzed by an enzyme-linked immunoabsorbent assay method. *International of Food Microbiology*. vol. 39 pp: 139-143.
- Trucksess, M.W. 1996. Committee on Natural Toxins. Mycotoxins. *Journal of AOAC International*. vol. 79 pp: 200-205.

- Ueno, Y.; Aoyama, S.; Sugiura, Y.; Wang, D-S.; Lee, U-S.; Hirooka, E.Y.; Hara, S.; Karki, T. ; Chen, G. y Yu, S-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research*. vol. 9 pp: 27-34.
- Ueno, Y.; Iijima, K.; Wang, S.-D.; Sugiua, Y.; Sekijima, M.; Tanaka, T.; Chen, C. y Yu, S.-Z. 1997. Fumonisin as possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3 year study of corn harvested in Haimem, China, by HPLC and ELISA. *Food Chemical Toxicology*. vol. 35 pp: 1143-1150.
- Vainio, H.; Heseltine, E.; Wilbourn, J. 1993. Report on an IARC working group meeting on some naturally occurring substances. *International Journal of Cancer*. vol. 53 pp: 535-537.
- Vigier, B.; Reid, L.M.; Dwyer, L.M.; Stewart, D.W.; Sinha, R.C.; Arnason, J.T. y Butler, G. 2001. Maize resistance to gibberella ear rot: symptoms, deoxynivalenol, and yield. *Canadian Journal Plant Pathology*. vol. 23 pp: 99-105.
- Wetter, M.T.; Trucksess, M.W.; Roach, J.A. y Bean, G.A. 1999. Occurrence and distribution of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol in sweet corn ears. *Food Additives and Contaminants*. vol. 16 pp: 119-124.
- Wicklow, D.T.; Dowd, P.F.; Tepaske, M.R. y Gloer, J.B. 1988. Sclerotial metabolites of *Aspergillus flavus* toxic to a detritivorous maize insect (*Carpophilus hemipterus*, Nitidulida). *Transactions of British Mycological Society*. vol. 91 pp: 433-438.
- Wilson, C.L.; Solar, M.J.; Ghaouth, A.El. y Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extract and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinera*. *Plant Disease*. vol. 81 pp: 204-210.
- Wolf, M.J.; Buzan, C.L.; MacMaster, M.M. y Rist, C.E. 1952. Structure of the mature corn kernel. II. Microscopic structure of the pericarp, seed coat and hilar layer of dent corn. *Cereal Chemistry*. vol. 29 pp: 334-340.
- Wong, E.W.P.; Norred, W.P.; Bancon, C.W.; Riley, R.T. y Merrill, A.H. 1991. Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin: implications for diseases associated with *F. moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 266 pp: 14486-14490.
- Wright, J. 1999. Essential oils. En: Food Flavorings (ed. P.R. Ashurst), 3ª edición. pp: 1-38. Ed. Aspen Publishers, Inc. Maryland.
- Yoshizawa, T.; Yamashita, A. y Luo, Y. 1994. Fumonisin Occurrence in Corn from High- and Low -Risk Areas for Human Esophageal Cancer in China. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 60 pp: 1626-1629.
- Yoshizawa, T.; Yamashita, A. y Chokethaworn, N. 1996. Occurrence of fumonisins and aflatoxin in corn from Thailand. *Food Additives Contaminants*. vol. 13 pp: 163-168.

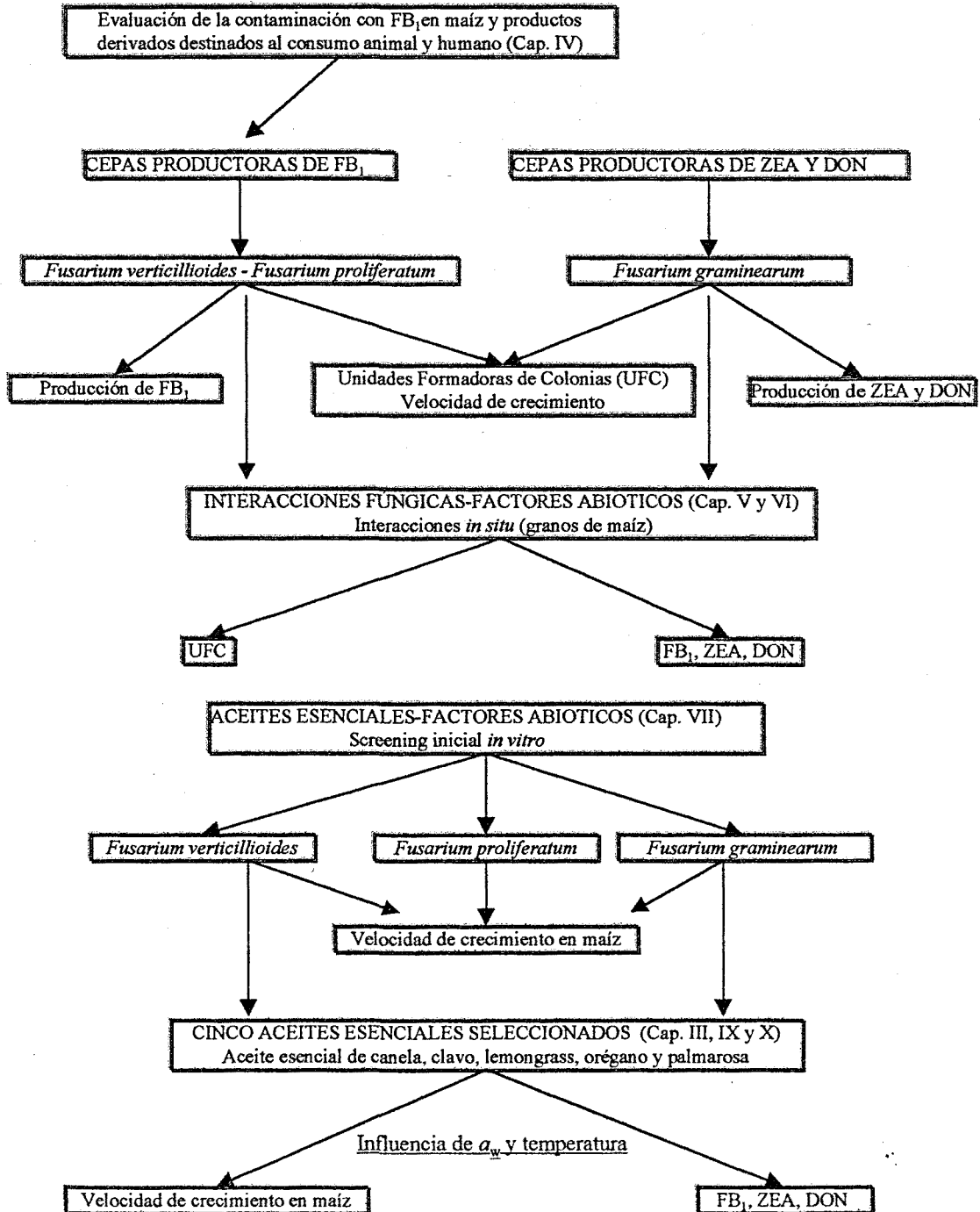
OBJETIVOS

El objetivo principal de la presente tesis es aportar más conocimientos de la ecofisiología de *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* así como de la producción de fumonisina B₁, zearalenona y deoxinivalenol en maíz, con el fin profundizar en las posibles medidas a adoptar para disminuir su incidencia natural en este cereal.

Para lograr este objetivo se llevaron a cabo los siguientes subobjetivos:

- Evaluar la contaminación con fumonisina B₁ en maíz y productos derivados del maíz destinados al consumo humano y animal en España.
- Analizar el impacto de la interacción entre cepas productoras de fumonisina B₁ y cepas productoras de zearalenona y deoxinivalenol, sobre el crecimiento y la acumulación de toxinas en granos de maíz a diferentes condiciones de a_w y temperatura.
- Realizar una evaluación *in vitro* de varios aceites esenciales con el fin de determinar su potencial como inhibidores del crecimiento de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* y la dependencia de su actividad con los factores abióticos (a_w y temperatura).
- Estudiar el efecto de cada aceite esencial seleccionado en el crecimiento y producción de toxinas por cepas de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*, bajo los factores abióticos (a_w y temperatura) en granos de maíz.

PLAN DE TRABAJO



Occurrence of fumonisin B₁ in Spanish corn-based foods for animal and human consumption.

Velluti Andrea, Marín Sonia, Sanchis Vicente y Ramos Antonio Javier
*Food Technology Department, Lleida University, CeRTA, Rovira Roure 191,
25198 Lleida, Spain*

Resumen

Este estudio describe la presencia de fumonisina B₁ (FB₁) en 228 muestras de alimentos a base de maíz destinados al consumo humano y en 58 muestras de productos destinados al consumo animal en España. La cuantificación de FB₁ se realizó por HPLC y con o-ftaldialdehido como reactivo de derivatización. Se detectó FB₁ en el 86% de las muestras destinadas al consumo animal, en un rango que va desde 89 a 8757 ng/g. Cuatro de estas muestras presentaron niveles de FB₁ superiores a 5000 ng/g, pero ninguna presentó niveles mayores de 10000 ng/g. Por otra parte, el 23 % de las muestras analizadas destinadas al consumo humano presentaron FB₁ en un rango de 16 a 938 ng/g. Las muestras de harina integral fueron las que presentaron mayores valores de FB₁, con concentraciones que variaron desde 299 a 938 ng/g.

Palabras claves: fumonisinas, maíz, alimentos a base de maíz, España

Summary

This survey describes the fumonisin B₁ (FB₁) occurrence in 228 and 58 corn-based foods samples from Spain for human and animal consumption respectively. High-performance liquid chromatography (HPLC) with o-phthaldialdehyde derivatization was used for the analysis of FB₁. We detected FB₁ in 86 % of the samples for animal consumption, ranging from 89 to 8757 ng/g. Four of these samples had levels of FB₁ > 5000 ng/g but none of them higher than 10000 ng/g. On the other hand, FB₁ was detected in 23% of the samples for human consumption. The lowest amount of FB₁ found in a positive sample was 16 ng/g and the highest was 938 ng/g. The most contaminated samples were the wholemeal corn flours, with a range of contamination that varied from 299 to 938 ng/g.

Keywords: fumonisins, corn, corn-based foods, Spain.

Introduction

Fumonisin are a group of naturally occurring metabolites produced by several *Fusarium* species (Nelson et al., 1992), isolated and characterised for the first time in 1988 (Bezuidenhout et al., 1988; Gelderblom et al., 1988). Of the currently identified fumonisins, fumonisin B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) and B₃ (FB₃), structurally similar mycotoxins, are the most abundant in naturally contaminated foods and feeds (Shephard et al., 1996). They have been found to be related to leukoencephalomalacia (ELEM) in horses (Bezuidenhout et al., 1988), porcine pulmonary edema (PPE) (Gelderblom et al., 1988), hepatotoxicity, nephrotoxicity, and hepatocarcinogenicity in rodents (Gelderblom et al., 1991). Although their effects on humans are difficult to determine, fumonisins have been statistically associated with high incidence of esophageal cancer (EC) in certain areas of the Transkei region of the Eastern Cape Province, South Africa (Rheeder et al., 1992). More recent work has shown an association with primary liver cancer in China (Ueno et al., 1997). On the basis of toxicological evidence, the International Agency for Research on Cancer (IARC) has declared the “toxins produced by *Fusarium moniliforme*” to be possibly carcinogenic to humans (class 2B carcinogens) (Vainio et al., 1993). *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (= *F. moniliforme* Sheldon) and *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg are probably the most important producers of FB₁ as they are common contaminants of corn in many areas of the world (Shephard et al., 2000). These strains have been frequently isolated from corn and corn-based food and feedstuffs (Nelson et al., 1992; Rheeder et al., 1992; Castellá et al., 1999), as well as from other grains like barley and wheat (Chelkowski et al., 1995; Castellá et al., 1999). Natural occurrence of fumonisins in corn or corn-based foods and feeds has been studied in detail (Sydenham et al., 1991; Pestka et al., 1994; Schneider et al., 1995; Shephard et al., 1996; Piñeiro y Silva, 1997; Castelo et al., 1998; Castellá et al., 1999; Shephard et al., 2000), and the presence of these toxins in other human foods like milk (Maragos y Richard, 1994) and beer (Scott y Lawrence, 1995; Torres et al., 1998) has been described. In Spain, several studies have assessed the fumonisin-producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals, and the fumonisin content of foods and feeds from the Spanish market (Sala et al., 1994; Sanchis et al., 1994, 1995; Castellá et al., 1999). These studies have shown that most of the *Fusarium* strains isolated are able to produce fumonisins (Sanchis et al., 1995) and that the fumonisin content ranged from an average of 400 ng/g in 50 corn-based feedstuffs samples (Sanchis et al.,

1995) to one of 80 ng/g in 50 corn-based foods for human consumption (Sanchis et al., 1994).

The objective of this study was to determine the occurrence and concentrations of FB₁ in corn and corn-based food products from Spain, destined to animal and human consumption in the last three years,

Material and Methods

Samples

All samples were collected during the years 1998, 1999 and 2000.

Samples for animal consumption

Samples were obtained from some agricultural co-operatives and some factories in Spain, mainly in Catalonia, Valencia and Aragon Communities.

A total of 58 samples were collected: corn (25), corn screenings (12), corn meal (8), and feed (13). Representative samples (approximately 1 kg) were taken, subsampled and stored at -20°C prior to fumonisin analysis.

Samples for human consumption

Two hundred twenty eight (228) corn-based human foods were purchased from different retail markets in Spain, mainly in Catalonia and Valencian Community. Samples belonged to 6 categories: corn snacks (39), corn flakes (39), corn flour (24), toasted corn (36), sweet corn (39) and corn grain for popcorn (51). With regard to corn flour category, both corn meal and corn flour were analysed. In the toasted corn category, samples of popcorn are included. Each category included different commercial brands, and 3 different batches of each brand were analysed. None of the samples had surpassed their expiry date.

Fumonisin standard

FB₁ was obtained from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. A stock solution of the pure crystalline FB₁ at 100 µg/ml methanol was prepared. Standard solutions of the toxin at diverse concentrations (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 10 µg/ml) were prepared by diluting the stock solution in

methanol. Fumonisin are suspected carcinogens and should be handled with care.

Fumonisin analysis

The samples were analysed by a modification of the Shephard method (Shephard *et al.*, 1990). In brief, 25 g of sample were blended with 50 ml methanol-water (3+1) and filtered. A 10-ml aliquot was applied to a Bond-Elut Sax cartridge (Varian, Harbor City, CA., USA) which had been previously conditioned with 5 ml of methanol followed by 5 ml of methanol-water (3+1). Subsequently, the cartridge was washed successively with 8 ml of methanol-water (3+1) and 3 ml of methanol, and the toxin was eluted with 14 ml of 0.5% acetic acid in methanol. The eluate was evaporated to dryness in a rotavapour, redissolved in methanol, and finally evaporated under a gentle stream of nitrogen and dissolved in methanol for HPLC. Four hundred microliters of *o*-phthaldialdehyde reagent prepared according to the method of Shephard *et al.* (1990) were added to a 100- μ l sample solution, of which 50 μ l was injected into a high-performance liquid chromatography system within 1 min after derivatization. The mobile phase was methanol-0.1M sodium phosphate (3+1) adjusted to pH 3.35 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was 0.7 ml \cdot min⁻¹. The limit of quantification of the method was 15 ng/g.

Statistical analysis

Analysis of variance was carried out in order to find significant differences between the FB₁ concentration found in the different kind of samples. Analyses were made by using SAS (Statistical Analysis System) version 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

Results and Discussion

Corn is one of the natural substrates that can easily be colonised by *Fusarium* species, including fumonisin-producer strains, and therefore fumonisin contamination in corn can reach significant levels (Murphy *et al.*, 1993). Many studies support this, not only in Spain (Sala *et al.*, 1994; Sanchis *et al.*, 1994, 1995; Castellá *et al.*, 1999) but also world-wide (Nelson *et al.*, 1991; Shephard *et al.*, 1996). As observed in most naturally contaminated corn in the world, FB₁ was the most abundant analogue and accounted on average for 74% of the total fumonisins in each sample (Shephard *et al.*, 1996). Our research group found that 34% of 119 strains of *F. verticillioides* isolated from Spanish corn were able to *in vitro* produce FB₁ on sterilised corn (Sala *et al.*, 1994). Contamination of food and feeds reflects the incidence of fungal infection of the original crops during a particular agricultural season, which is influenced by various factors such as origin, weather, and insect damage (Shephard *et al.*, 1996).

In our survey we detected FB₁ in 86 % of the samples for animal consumption, ranging from 89.1 to 8757 ng/g. The range and means of FB₁ concentration together with the number of samples found to be positives are given in Table 1. Statistical analyses of results showed that FB₁ contamination was not significantly different for corn, corn screenings and corn meal samples, but that feed samples were significantly less contaminated. The lower concentrations of FB₁ in feeds are probably due to their composition as they contain products other than corn. All corn meal and all corn screenings samples analysed except one had levels of FB₁ >1000 ng/g, the mean FB₁ levels were 2900 and 2153 ng/g, respectively. Two samples of corn, one of corn screenings and one of corn meal had levels of FB₁ > 5000 ng/g but no higher than 10000 ng/g.

TABLE 1

Occurrence of FB₁ in Spanish corn-based foods for animal consumption.

Presencia de FB₁ en alimentos a base de maíz destinados al consumo animal en España.

Product category	Incidence (Nº. positive samples/total)	Range of toxin amount (ng/g) ^a	Mean toxin amount of positive samples (ng/g)
Corn	19/25	136.4-8757	1709.7
Corn meal	8/8	1723-5964	2899.5
Feed	11/13	89.1-2105	585
Corn screening	12/12	772.4-5462	2152.7

a: FB₁ occurrence in other samples of the same category were negative or below limit of quantification (15 ng/g).

a: La presencia de FB₁ en otras muestras de la misma categoría fue negativa o por debajo del límite de cuantificación de método (15 ng/g).

Comparison of our results with other data of FB₁ contamination in corn and feed samples from Spain, shows that levels of FB₁ reported by Castilla *et al.*, (1999) were higher, with the mean of 55 samples of corn collected during 1994-1996 reaching 4800 ng/g, while the levels of FB₁ reported by Sanchis *et al.* (1995) were lower, with a mean approximately of 500 ng/g in corn samples collected during 1993. Toxicological studies show that exposure level resulting in mycotoxicoses and the natures of the disease syndrome induced are species dependent. About of fumonisins effects on animal, horses are the most sensitive species, and it has been recommended that a maximum fumonisin level of 5000 ng/g should be allowed in horse feed to avoid the danger of inducing ELEM. Similarly, for swine a maximum level of 10000 ng/g has been recommended to avoid PPE (Harrison *et al.*, 1990). Given these recommendations and the potential for high fumonisin levels in animal feeds, the need to monitor feed supplies is obvious. Similar importance has methods to reduce infection of corn crops with fumonisin-producing fungi and procedures for treating heavily contaminated batches (Shephard *et al.*, 1996).

Results for the positive samples for human consumption (23 % of total samples) are summarised in Table 2. The lowest amount of FB₁ found in a positive sample was 16.4 ng/g and the highest was 937.5 ng/g. At present, there is no worldwide regulation to limit the occurrence of fumonisins in foods and feeds, except that of Switzerland that established the maximum tolerated level of fumonisin B₁+B₂ in corn products at 1000 ng/g (FAO, 1997); none of our positive samples have surpassed this limit.

In a previous study developed by our group (samples collected in 1993), only 16% of 50 samples of Spanish market corn-based products for human consumption showed FB₁ contamination, in concentrations ranging from 50 to 200 ng/g, with a mean of 80 ng/g (Sanchis *et al.*, 1994). In the present study the percentage of positive samples was higher as well as the FB₁ contamination range, as 42.3% of the positive samples were below 25 ng/g versus 90% in the previous study.

Statistical analyses of results have shown that FB₁ contamination was significantly higher for corn flour category. In this case, six samples from two different commercial brands showed levels of FB₁ higher than 200 ng/g, one of them being wholemeal corn flour. This sample was the one that showed the highest FB₁ contamination, with a mean of 685 ng/g. This higher contamination of the wholemeal corn flour sample could be due to the presence of the outward layer of the grain that could contain a higher fungal contamination and, therefore, a higher FB₁ concentration. Surveys of milled corn products show that, during milling, significant amounts of fumonisins are removed with the screenings and bran, and it has been suggested that fumonisin levels decreases the level of refinement of corn meal increases (Shephard *et al.*, 1996). In general, the processed corn products show lower levels than those unprocessed. Although fumonisins are heat-stable compounds, heating fumonisin-spiked corn meal to 220 °C for 25 min results in complete loss of fumonisins, however, other studies show reduced fumonisin recoveries on heating of corn and feed at 110 °C, but this reduction may be due partly to binding of fumonisins to the matrix rather than to thermal degradation (Shephard *et al.*, 1996). In our samples, although there are no differences between categories, except for corn flour, the remaining categories tend to have decreasing concentrations from sweet corn, corn grain for popcorn, corn snacks, toasted corn to corn flakes. Our results are consistent with those obtained in other countries, in general corn flour shows significant fumonisin contamination, while samples of pop corn, sweet corn, corn flakes, corn snacks and toasted corn from various countries show little fumonisins

contamination (Shephard *et al.*, 1996). In Italy, Doko y Visconti (1994) found that 100% of sweet corn samples were positive for FB₁, at levels varying from 60 to 790 ng/g, whereas popcorn and corn flakes showed lower contamination (up to 60 and 10 ng/g, respectively). Castelo *et al.* (1998) found that 44 to 83% of 55 corn-based human foods analysed by HPLC, selected at three different states of the USA, contained FB₁, with levels that varied from <75 to 5916 ng/g. The highest fumonisin contamination were found in corn meal and the lowest in corn flakes. Machinski y Valente-Soares (2000) found that 49% of 81 samples of corn products from Brazilian market were contaminated with FB₁ at levels ranging from 60 to 4930 ng/g. The contamination of the samples tended to decrease along the sequence: corn meal, corn flour, pop corn and relatively lower incidence and levels of contamination were found in corn flakes.

TABLE 2

Occurrence of FB₁ in Spanish corn-based food destined for human consumption.

Presencia de FB₁ en alimentos en base a maíz destinados al consumo humano en España.

Product category	Incidence (Nº. positive samples/total)	Range of toxin amount (ng/g) ^a	Mean toxin amount of positive samples (ng/g)
<i>corn flour</i>	8/24	38.71-937.5	362.68
<i>sweet corn</i>	11/39	22.4-119.4	55.96
<i>corn snacks</i>	14/39	16.4-135.6	46.27
<i>corn flakes</i>	3/39	16.07-18.5	17.03
<i>corn grain for popcorn</i>	12/51	16.49-211.3	48.38
<i>toasted corn</i>	4/36	18.56-88.45	38.33

a: FB₁ occurrence in other samples of the same category were negative or below limit of quantification (15 ng/g).

a: La presencia de FB₁ en otras muestras de la misma categoría fue negativa o por debajo del límite de cuantificación de método (15 ng/g).

Results obtained have demonstrated that FB₁ contamination of Spanish corn-based foods destined for human consumption is of a certain concern, as more than 23% of samples were fumonisin-contaminated,

although, in general, they showed low levels of contamination. However, the adoption of a periodic analysis of the mycotoxin level in corn grain is recommended together with the implementation of a control system for the raw materials used, to avoid the introduction of contaminated materials into the food chain process. The results obtained in this study are only representative of the fumonisin contamination of Spanish corn-based food in 1998, 1999 and 2000 years, and contamination could be different in other years.

Acknowledgements

This work was supported by European Union (QLRT 1999_00996), Spanish Government (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, CICYT ALI98-0509-C04-01) and the Council of Lleida.

The authors are grateful to Delphine DuColombier and John P. O'Donoghue for their technical assistance

Bibliography

- Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R.M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G. y Vleggaar, R. (1988). Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 743-745.
- Castellá, G., Bragulat, M.R. y Cabañes, F.J. (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feed and cereals from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 707-710.
- Castelo, M.M., Summer, S.S. y Bullerman, L.B. (1998). Occurrence of fumonisins in corn-based food products. *Journal of Food Protection* 61: 704-707.
- Chelkowski, J., Visconti, A., Dokko, B. y Wisniewska, H. (1995). *Fusarium moniliforme* Sheldon - Pathogenicity to wheat seedlings and ability to produce fumonisins. *Journal of Phytopathology* 143: 491-493.
- Doko, M.B. y Visconti, A. (1994). Occurrence of fumonisins B1 and B2 in corn and corn-based human foodstuffs in Italy. *Food Additives and Contaminants* 11:433-439.
- FAO. (1997). Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO. *Food and Nutrition Paper* 64. Rome, Italy.
- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Hora, R.M., Vleggar, R. y Kriek, N.P.J. (1988) Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 1806-1811.
- Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. y Thiel, P.G. (1991). Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247-1251.

- Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E. y Cole, J.R. (1990). Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2: 217-221.
- Machinski, M. y Valente-Soares, L.M. (2000). Fumonisin B₁ and B₂ in Brazilian corn-based food products. *Food Additives and Contaminants* 17: 875-879.
- Maragos, C.M. y Richard, J.L. (1994). Quantitation and stability of fumonisins B₁ and B₂ in milk. *Journal of AOAC International* 77: 1162-1167.
- Murphy, P.A., Rice, L.G. y Ross, P.F. (1993). Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 41: 263-266.
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. y Desjardins, A.E. (1991). Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2410-2412
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. y Desjardins, A.E. (1992). Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 984-989.
- Pestka, J.J., Azcona-Olivera, J.I., Plattner, R.D., Minervini, F., Doko, M.B. y Visconti, A. (1994). Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *Journal of Food Protection* 57: 169-172.
- Piñeiro, M.S. y Silva, G.E. (1997). Fumonisin levels in Uruguayan corn Products. *Food Chemical Contaminants* 80: 825-828.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. y van Schalkwyk, D.J. (1992). *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 82: 353-357.
- Sala, N., Sanchis, V., Vilaro, P., Viladrich, R., Torres, M., Viñas, I. y Canela, R. (1994). Fumonisin producing capacity of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. *Journal of Food Protection* 57: 915-917.
- Sanchis, V., Abadías, M., Oncins, L., Sala, N., Viñas, I. y Canela, R. (1994). Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn-based products from the Spanish market. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2147-2148.
- Sanchis, V., Abadías, M., Oncins, L., Sala, N., Viñas, I. y Canela, R. (1995). Fumonisin B₁ and B₂ and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from the Spanish market. *International Journal of Food Microbiology* 27: 37-44.
- Schneider, E., Usleber, E. y Märtilbauer, E. (1995). Rapid detection of fumonisin B₁ in corn-based food by competitive direct dipstick enzyme immunoassay/enzyme-linked immunofiltration assay with integrated negative control reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2548-2552.
- Scott, P.M. y Lawrence, G.A. (1995). Analysis of beer for fumonisins. *Journal of Food Protection* 58: 1379-1382.
- Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Leggott, N.L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H. y Safavi, N. (2000). Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 48: 1860-1864.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G. y Gelderblom, W.C.A. (1990). Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13: 2077-2087.

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.

A. Velluti^a, S. Marín^b, L. Bettucci^a, A. J. Ramos^b, V. Sanchis^{b,*}

^a *Laboratory of Mycology. Faculty of Science, Faculty of Engineering, Universidad de la República. Julio Herrera y Reissig 565, 23859 Montevideo, Uruguay*

^b *Food Technology Department, Lleida University, CeRTA, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain*

Abstract

The effect of water activity (0.98, 0.95, 0.93) and temperature (15, 25°C) on fungal growth and toxin production from interactions between isolates of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* producing fumonisin, and an isolate of *F. graminearum* producing zearalenone, incubated at the same time on irradiated maize grains were determined *in vitro*. Populations (CFUs) of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* were reduced to a greater or lesser extent by the presence of *F. graminearum* under all conditions tested, while that the presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum* had a minor inhibitory effect on fungal populations of *F. graminearum*. Fumonisin B₁ production by *F. proliferatum* was inhibited at all conditions tested, while fumonisin B₁ production by *F. moniliforme* was inhibited at 15°C, and enhanced at 25°C in presence of *F. graminearum*. The level of zearalenone (ZEA) was not significantly modified in the presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* under the conditions tested.

1. Introduction

Cereals are among the most suitable substrates for mycotoxin production (Etcheverry et al., 1998). The most frequently isolated *Fusarium* species from maize in temperate climates have been *Fusarium graminearum* and *Fusarium moniliforme*, followed by *F. culmorum*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, and *F. equiseti* (Sohn et al., 1999).

Fusarium graminearum produces an estrogenic mycotoxin, zearalenone (ZEA), as well as trichothecenes. ZEA is usually considered a cereal storage contaminant, and although the toxin can be naturally produced in the field, the majority of toxin production often occurs during cold weather storage of high-moisture feeds carrying the mould. The contaminated grain may have a normal or mouldy appearance (Hollinger and Ekperigin, 1999). On the other hand, *F. moniliforme* and *F. proliferatum* are also economically important because they cause maize ear rot and produce fumonisins and other mycotoxins. Fumonisin have been shown to be involved in leukoencephalomalacia in equine species (Thiel et al., 1991; Thiel et al., 1992b), associated with pulmonary edema syndrome in swine (Wilson et al., 1990), and implicated in esophageal cancer in humans (Cahagnier et al., 1995; Thiel et al., 1992a).

Fungal growth and mycotoxin production result from the complex interaction of several factors, and therefore, an understanding of each factor involved is essential to understand the overall process and to predict and prevent mycotoxin development (Charmley et al., 1994). Environmental conditions have a major impact on the fungal growth and play a critical role in the mycotoxicosis epidemiology. In addition, mycotoxin production is genetically regulated in response to environmental conditions (Hollinger and Ekperigin, 1999). Temperature and water availability are the primary environmental factors that influence growth and interaction between *Fusarium* spp. and other fungal colonists (Marín et al., 1998a).

Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins has become a significant issue with complex and indeterminate implications for animal and human health. The scientific literature most often reports research on a single-component mycotoxicosis, but clinicians should be aware that the fungi producing these toxins might produce more than one toxin or that multiple toxins might be present in an animal feed. These conditions can result in multiple toxin mycotoxicosis (Hollinger and Ekperigin, 1999).

Marín et al. (1998a) reported that *F. moniliforme* and *F. proliferatum* are dominant over other species which commonly contaminate maize over a

wide range of temperature and water availability conditions. Studies on pre-harvest inoculated maize have shown that viable counts and infection of kernels by *F. graminearum* declined while those of *F. moniliforme* increased in mid-season (Miller et al., 1983). Blaney et al. (1986) and Rheeder et al. (1990a,b) also found a negative correlation between the isolation of *F. moniliforme* and *F. graminearum*.

On the other hand, Cuero et al. (1988), suggested that ZEA production by *F. graminearum* in maize, when it was paired in culture with *Aspergillus flavus*, is dependent on temperature, however the levels of ZEA were not modified in the presence of *A. parasiticus* (Etcheverry et al., 1998).

Little is known about the effects of interactions between *F. moniliforme* and *F. proliferatum* with *F. graminearum*, at different water activities (a_w) and temperature on fungal population changes and on fumonisin and ZEA production. The outcome of interactions between these fungi and toxins production under different environmental conditions may enable a more accurate prediction of which species may initiate spoilage in stored maize.

The aim of this work was to evaluate, under laboratory conditions, the effect of a_w and temperature on fungal growth and toxin production from interactions between isolates of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* producing fumonisin, and an isolate of *F. graminearum* producing zearalenone, incubated at the same time on irradiated grains.

2. Materials and methods

2.1. Fungal isolates

Single isolates of three species were used in this study: *Fusarium moniliforme* (25N) (= *F. verticilloides*), *F. proliferatum* (73N), and *F. graminearum* (CECT 2150, ATCC 26557). All the *Fusarium* species were isolated from maize and *F. moniliforme* and *F. proliferatum* have previously been shown to be high fumonisin producers in culture and maize grain (Marín et al., 1995). All the strains used in the study are maintained in the Food Technology Department fungus collection of the University of Lleida, Spain.

2.2. Grain preparation at different water activity (a_w)

Spanish dent maize grain was irradiated with 12 kGrays of gamma irradiation and stored aseptically at 4°C. The grain contained no fungal infection or contamination but had retained the ability to germinate. The initial water content of the grain was 13.9% (= 0.71 a_w).

For all experiments, irradiated maize was weighed into sterile flasks and rehydrated to the desired treatment a_w levels (0.93, 0.95 and 0.98) by addition of sterile distilled water. The amount of water added was calculated from a moisture adsorption curve for grain. The grain treatments were allowed to equilibrate at 4°C for 48 hours, with periodic shaking.

Finally, the a_w values were confirmed by using a water activity meter (AquaLab, Pullman, Washington, USA).

2.3. Inoculation, incubation and growth assessment

Rehydrated maize was placed in sterile Petri plates (20g per plate, approximately) forming a single layer of grains (Marin et al., 1995). A 5 mm diameter agar disk was taken from the margin of a 5 day old growing colony of each isolate on malt extract agar and transferred to the centre of each plate. Then, plates containing grain at the same a_w were placed in containers along with beakers containing glycerol water solutions (Dallyn, 1978) of the same a_w as the plates in order to create an atmosphere with a same equilibrium relative humidity. Containers were incubated at 15 and 25°C. All treatments were repeated three times.

Colonies were measured daily with the aid of a binocular magnifier. Two diameters were obtained from each colony and growth rates expressed as mm d^{-1} were calculated by linear regression of colony radius against time for each strain at each set of conditions tested.

2.4. Inoculation, incubation, and population changes during interaction under different $a_w \times$ temperature conditions

Rehydrated maize was placed in sterile Petri plates (25 g per plate, approximately). For pure culture studies, four agar discs (5 mm diameter) were used, while for mixed cultures, four similar discs were used for each species, distributed on the grain in a fixed pattern. Then, plates containing grain of the same a_w were placed in sealed containers and incubated, as described previously, during 4 weeks at 15 and 25°C. All treatments were repeated twice.

After incubation, plates were taken and analysed for fungal populations (CFU g⁻¹) by dilution plating using MEA (malt extract agar, per 1 l distilled water: 20 g malt extract, 20 g glucose, 1 g peptone, pH=5.5) as enumerating media. *Fusarium* were counted on plates bearing a total number of colonies between 5 and 150.

The remaining grains were frozen at -20°C for later fumonisin and ZEA analysis.

2.5. Mycotoxin quantification (*Fumonisin B₁* and ZEA).

A modification of the method of Shephard et al., 1990 was followed for Fumonisin B₁ (FB₁) quantification. Subsamples (10 g) were ground and extracted by blending in 20 mL methanol-water (3+1). Extracts were filtered. Filtrate (8 mL) was loaded on a preconditioned SAX (strong anion exchange) column and eluted with 0.5% acetic acid in methanol. The eluate was evaporated to dryness in a rotavapour, redissolved in methanol, and finally evaporated under a gentle stream of nitrogen and dissolved in methanol for HPLC. Sample was coupled to OPA (phthaldialdehyde) reagent and assayed by HPLC, by comparison with external standards, using methanol: 0.1 M dihydrogen sodium phosphate (3+1) (pH = 3.35) as mobile phase at a 0.7 mL min⁻¹ flow rate. The reference standard of FB₁ was purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

For ZEA quantification the AOAC method for α -zearalenol and zearalenone in maize was followed (AOAC, 1995).

2.6. Dry matter determination

The percentage of dry matter from each sample was determined by drying subsamples of approximately 10 g at 105°C for 17 h (ISTA, 1976). Thus, all results are presented on a dry weight basis.

2.7. Statistical analyses of the data

Analysis of variance were made for colony radii after 4 days, CFUs g⁻¹, zearalenone, and fumonisin concentrations by using SAS program version 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA). CFU data were transformed prior to analysis by $y = \log(\text{CFU g}^{-1})$. Finally, correlation analyses were carried out between CFU and mycotoxin production in pure cultures. For mixed cultures, analysis of correlation was carried out between

amount of mycotoxins presents and percentage of inhibition of fungal populations.

3. Results

3.1. Growth rates of *Fusarium* spp.

Generally, growth rates increased from 0.93 to 0.98 a_w at both temperatures on irradiated maize grain. Furthermore, the three *Fusarium* species examined grew faster at 25°C than at 15°C (Table 1). The highest growth rates obtained for *F. moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* were 4.1, 4.0, and 9.8 mm day⁻¹, respectively, at 0.98 a_w and 25°C. *F. graminearum* grew faster than *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolates under all conditions tested.

Table 1. Effect of water activity and temperature on growth rates of three *Fusarium* species (mm day⁻¹).

Temp. (°C)	a_w	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. graminearum</i>
15	0.93	0.15	0.27	0.70
	0.95	0.76	0.85	2.48
	0.98	2.22	2.27	5.49
25	0.93	0.67	0.85	1.50
	0.95	2.52	2.32	5.82
	0.98	4.12	4.03	9.79

3.2. Effect of the presence of *F. graminearum* on populations and FB_1 production by *F. moniliforme*

CFUs. All single factors (a_w , temperature and presence of *F. graminearum*) had a significant effect (Table 2) on fungal populations (CFU per gram of grain) of *F. moniliforme*. There were significantly more CFUs of *F. moniliforme* at 25°C than at 15°C ($P < 0.01$). At 15°C more CFUs of *F. moniliforme* were present at 0.98 than at 0.95 or 0.93 a_w whereas at 25°C populations at different a_w were not significantly different.

The presence of *F. graminearum* decreased the number of CFUs per gram of grain of *F. moniliforme* under all conditions tested (7 % mean

reduction) (Fig. 1), but no significant differences were found in the percentages of reduction at different temperatures or a_w .

FB₁. Only a_w and the presence of *F. graminearum* at different temperature levels (T x I) were significant (Table 2). FB₁ production increased at increasing a_w values.

At 15°C, FB₁ production by *F. moniliforme* decreased (72 % mean reduction), due to the presence of *F. graminearum*. However, at 25°C AFB₁ production was significantly enhanced (150 % mean increase), mainly at 0.95 and 0.98 a_w (Fig. 1).

Table 2. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), temperature (t), and presence of *Fusarium graminearum* (I) on population (CFUs) and fumonisin B₁ production by *F. moniliforme*.

Source of variation	df	CFUs		FB ₁ production	
		MS	F	MS	F
t	1	8.45	241.11**	21.71	0.92
a_w	2	1.35	38.38**	351.41	14.85**
$t \times a_w$	2	0.43	12.35**	94.01	3.97
I	1	1.77	50.41**	0.52	0.02
$t \times I$	1	0.004	0.13	667.82	28.21**
$a_w \times I$	2	0	0.01	74.8	3.16
$t \times a_w \times I$	2	0.27	7.67**	74.5	3.15

Note: MS, means square.

* Significant $P < 0.05$

** Significant $P < 0.01$

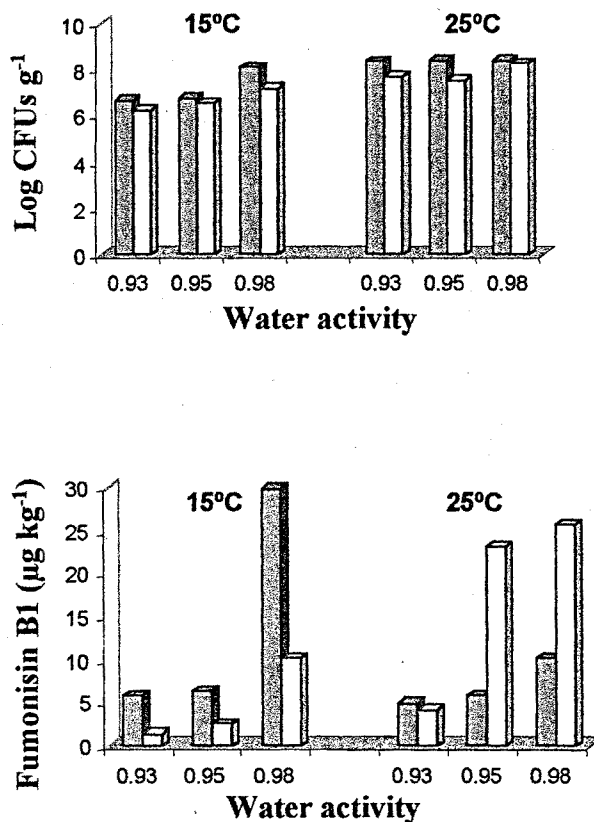


Figure 1. Effect of coinoculation of *F. graminearum*, a_w and temperature on growth and FB₁ production by *F. moniliforme* on irradiated maize grain and incubated for 28 days. Single inoculum (■); mixed inoculum (□).

3.3. Effect of the presence of *F. graminearum* on populations and FB₁ production by *F. proliferatum*

CFUs. All single factors (a_w , temperature and presence of *F. graminearum*), as well as two way interactions were significant (Table 3). More CFUs of *F. proliferatum* were present at 25°C than at 15°C and more at 0.98 than 0.95 or 0.93 a_w . In the presence of *F. graminearum*, the number of CFUs decreased almost under all conditions tested, but it was more evident at 15°C than at 25°C (11 % and 5 % log CFU reduction respectively) (Fig. 2).

FB₁. All single factors, as well as their two- and three- way interactions, had a significant effect on FB₁ production (Table 3). In general, more FB₁ was

produced at 15°C than at 25°C, and when a_w increased. In the presence of *F. graminearum*, FB₁ production decreased under almost all conditions, at 15°C the inhibition was higher than at 25°C (78 % and 65 % mean reduction respectively), and was more important at the highest a_w (Fig. 2).

Table 3. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), temperature (t), and presence of *Fusarium graminearum* (I) on population (CFUs) and fumonisin B₁ production by *F. proliferatum*.

Source of variation	df	CFUs		FB ₁ production	
		MS	F	MS	F
t	1	7.46	424.24**	4016.14	31.64**
a_w	2	5.74	327.12**	4842.08	38.15**
$t \times a_w$	2	0.24	13.62**	1735.16	13.67**
I	1	1.93	109.82**	4246.35	33.45**
$t \times I$	1	0.18	10.08**	1958.55	15.43**
$a_w \times I$	2	0.23	13.12**	21.72	17.11**
$t \times a_w \times I$	2	0.02	1.31	1120.22	8.83**

Note: MS, means square.

* Significant $P < 0.05$

** Significant $P < 0.01$

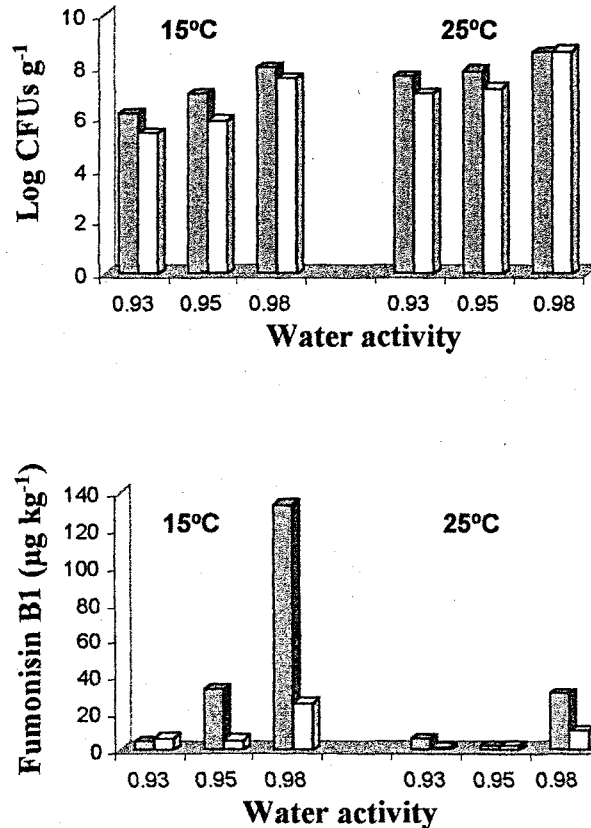


Figure 2. Effect of coinoculation of *F. graminearum*, a_w and temperature on growth and FB1 production by *F. proliferatum* on irradiated maize grain and incubated for 28 days. Single inoculum (■); mixed inoculum (□).

3.4. Effect of the presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum* on populations and ZEA production by *F. graminearum*

CFUs. All single factors (a_w , temperature and presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum*) as well as their two, and three way interactions were significant (Table 4), except for temperature \times a_w . In pure culture, more CFUs of *F. graminearum* were present on maize at 0.98 a_w rather than at 0.95 and 0.93 and at 25°C than at 15°C.

In the presence of *F. moniliforme*, CFUs of *F. graminearum* were reduced significantly at 15°C and 25°C, while the presence of *F. proliferatum* only had a significant inhibitory effect at 25°C.

ZEA. The effect of a_w , temperature, as well as their two way interaction were significant (Table 4), but in presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum*, ZEA production by *F. graminearum* was not significantly affected (Table 4). However, ZEA production, in the presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum* was under certain conditions higher than in pure culture. There was more ZEA production by *F. graminearum* at 15°C than at 25°C and more at 0.98 than at 0.95 and 0.93 a_w (Fig. 3).

3.5. Correlation analyses

In pure culture no correlation was seen between FB₁ production and fungal populations of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, nor between ZEA production and CFUs of *F. graminearum*. The percentage of reduction of CFUs of *F. moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures were not correlated significantly with ZEA or FB₁ concentration.

Table 4. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), temperature (t), and presence of *Fusarium moniliforme* or *F. proliferatum* (I) on population (CFUs) and zearalenone production by *F. graminearum*.

Source of variation	df	CFUs		FB ₁ production	
		MS	F	MS	F
t	1	4.61	443.03**	1626.26	5.5*
a_w	2	1.33	127.8**	15781.11	53.32**
$t \times a_w$	2	0.03	3.16	3809.01	12.87**
I	2	0.1	9.24**	468.23	1.58
$t \times I$	2	0.05	4.33*	333.67	1.13
$a_w \times I$	4	0.13	11.97**	336.55	1.14
$t \times a_w \times I$	4	0.1	9.1**	386.26	1.31

Note: MS, means square.

* Significant $P < 0.05$

** Significant $P < 0.01$

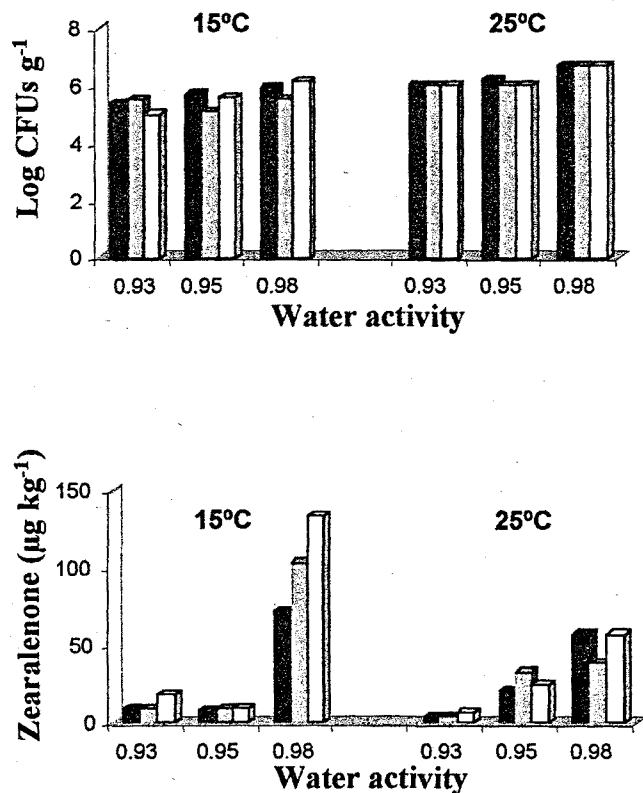


Figure 3. Effect of coinoculation of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* isolates, water activity and temperature on growth and ZEA production by *F. graminearum* on irradiated maize grain incubated for 28 days. Single inoculum (■); mixed inoculum with *F. moniliforme* (▨); mixed inoculum with *F. proliferatum* (□).

4. Discussion

Our data showed that *F. moniliforme* and *F. proliferatum* populations were reduced to a greater or lesser extent by the presence of *F. graminearum* under all conditions tested, while the presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum* had a limited inhibitory effect on fungal populations of *F. graminearum*.

It has been suggested that the significant correlation between the presence of different *Fusarium* species over locations may be due not to

interactions, but rather as the influence of environmental conditions (Rheeder et al., 1990a). Previous reports from South Africa (Marasas et al., 1979; Rheeder et al., 1990b) indicated that *F. moniliforme* was more adapted to a warm and dry climate than *F. graminearum*. Our data also reflected that development and toxin production by the different *Fusarium* species were differently affected by environmental conditions. However, besides abiotic factors, such as a_w and temperature, it was found that fungal interaction is a biotic factor that significantly affected fungal development in grain.

Although growth rate and populations are probably useful measure to assess fungal colonization by *Fusarium* spp. in maize grain, they do not correlate well with fungal colonization in mixed cultures. *F. graminearum* had a higher growth rate than *F. moniliforme* or *F. proliferatum* under all conditions tested, while *F. moniliforme* or *F. proliferatum* sporulated more than *F. graminearum*. The ability to grow fast and to sporulate abundantly are both important characteristics for occupation of an ecological niche (Magan and Lacey, 1984; Ramakrishna et al., 1993).

Marín et al. (1998a) suggested that *F. graminearum* at 15°C might have a competitive advantage over *F. moniliforme* and *F. proliferatum* probably due to the ability to utilise resources that these latter species cannot. By contrast, at 25-30°C, these *Fusarium* species appeared to coexist in the same niche. The outcome of pairings of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* with *F. graminearum* resulted in mutually antagonistic interactions upon contact (Marín et al., 1998a). It has been suggested that *F. moniliforme* protects maize seedlings against infection by *F. graminearum* (van Wyk et al., 1988).

Our data showed no good correlation between CFUs and mycotoxin production in pure culture at neither of species studied, meaning that in this case there is not correlation between sporulation and toxin formation.

On the other hand, the absence of correlation between the percentage of reduction of *F. moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* populations in mixed culture and ZEA and FB₁ concentration respectively, suggests that neither FB₁ nor ZEA might act as fungal inhibitors, although their production is affected by fungal interactions under certain environmental conditions. Similar results were obtained by Marín et al. (1998b) working with fumonisin-producers and a range of *Aspergillus* and *Penicillium* species.

There are many conflicting reports about the effects of fungal interactions on mycotoxin production. We have shown for first time the effect of coinoculation of different *Fusarium* species on FB₁ and ZEA

production. Our results revealed different behaviour in FB₁ production by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* in presence of *F. graminearum*. FB₁ production by *F. proliferatum* was inhibited at all conditions tested. On the other hand, *F. graminearum* was able to inhibit the FB₁ production by *F. moniliforme* at 15°C, while at 25°C, it was significantly increased. Marín et al. (1998b) also found a significant increase in fumonisin concentration when fungal interaction occurred, mainly with some *Aspergillus* species and at high water availability.

In our study, the level of ZEA was not significantly modified in the presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* at any of the conditions tested. Etcheverry et al. (1998) also found that ZEA production was not affected when *F. graminearum* was paired with *A. parasiticus* at 28°C and 0.97 *a_w*. Conversely, ZEA production by *F. graminearum* was markedly decreased in paired culture with *A. flavus* at 16°C but not at 25°C (Cuero et al., 1988). Our results suggest that when the environmental conditions, in maize grain are favourable and the potentially toxin producers strains *F. proliferatum* and *F. graminearum* are found together, a diminishing in the concentration of FB₁ may happen, but no change on level of ZEA will happen. Nevertheless, if *F. moniliforme* and *F. graminearum* are found together, the production of FB₁ under certain conditions might be enhanced, while the concentration of ZEA might remain unchanged.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Government (CICYT, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, grant ALI98-0509-C04-01), to the Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (A. E. C. I) and to the Lleida Council for their financial support.

References

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1997. *In Official Methods of Analysis of AOAC International*. Edited by Gunniff, P. Gaithersburg, Maryland, USA, chapter 49, pp. 45-46.
- Blaney, B.J., Ramsey, M.D., Tyler, A.L., 1986. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested during 1983 in Far North Queensland. *Aust. J. Agric. Res.* 37, 235-244.
- Cahagnier, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., 1995. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 247-251.
- Charmley, L.L., Rosenber, A., Trenholm, H.L., 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. In Miller, J.D.,

- Trenholm, H.L. (eds.). Mycotoxins in Grain Compounds other than Aflatoxin. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 471-486.
- Cuero, R.G., Smith, J.E. and Lacey, L., 1988. Mycotoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Fusarium graminearum* in irradiated maize grains in the presence of other fungi. J. Food Prot. 51, 452-456.
- Dallyn, H., 1978. Effect of substrate water activity on growth of certain xerophilic fungi. Ph.D. Thesis, South Bank University, London.
- Etcheverry, M., Magnoli, C., Dalcerro, A., Chulze, S., Lecumberry, S., 1998. Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol production by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* in interactive cultures on irradiated corn kernels. Mycopathologia 142, 37-42.
- Hollinger, K. and Ekperigin, H.E., 1999. Mycotoxicosis in food producing animals. Veterinary Clinics of North America 15, 133-165.
- ISTA (International Seed Testing Association), 1976. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 43, 3-77.
- Magan, N., and Lacey, J., 1984. Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 82, 83-93.
- Marasas, W.F.O., Kriek, N.P.J., Wiggins, V.M., Steyn, P.S., Towers, D.K., Hastie, T.J., 1979. Incidence, geographical distribution, and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. Phytopathology 69, 1181-1185.
- Marín, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R., Magan, N., 1995. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. Lett. Appl. Microbiol. 21, 289-301.
- Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N., 1998a. Environmental factors, *in vitro* interspecific interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from maize grain. Mycol. Res. 102, 831-837.
- Marín, S., Sanchis, V., Rull, F., Ramos, A. J., Magan, N., 1998b. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. J. Food Prot. 61, 1489-1496.
- Miller, J.D., Young, J.C., Trenholm, H.L., 1983. *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. Can. J. Bot. 61, 3080-3087.
- Ramakrishna, N., Lacey, J., Smith, E., 1993. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. Mycol. Res. 97, 1393-1402.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., van Wyk, P.S., 1990a. Fungal associations in corn kernels and effects on germination. Phytopathology 80, 131-134.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., van Wyk, P.S., van Schalkwyk, D.J., 1990b. Reactions of South African maize cultivars to ear inoculation with *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Diplodia maydis*. Phytophylactica 22, 213-218.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Liquid Chromatogr. 13, 2077-2087.

- Sohn, H., Seo, J., Lee, Y., 1999. Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Addit. Contam.* 16, 153-158.
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A., Nieuwenhuis, J.J., 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1089-1093.
- Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A., 1992a. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117, 3-9.
- Thiel, P.G., Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Wilson, T.M., 1992b. Levels of fumonisin B₁ and B₂ in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. *J. Agric. Food Chem.* 39, 109-111.
- Van Wyk, P.S., Scholtz, D.J., Marasas, W.F.O., 1988. Protection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* against infection by *Fusarium graminearum* in the soil. *Plant Soil* 107, 251-257.
- Wilson, T.M., Ross, P.F., Rice, L.G., Osweiler, G.D., Nelson, H.A., Owens, D.L., Plattner, R.D., Reggiardo, C., Noon, T.H., Pickrell, J.W., 1990. Fumonisin B₁ levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 213-216.

Fumonisin B₁, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in mixed cultures on irradiated maize kernels.

Andrea Velluti, Sonia Marín, Roger Gonzalez, Antonio J Ramos and Vicente Sanchis*

Abstract The impact of interactions between fumonisin-producing isolates of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, and a zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) producing isolate of *F. graminearum* inoculated together on irradiated maize, on their growth and mycotoxin formation at 15 and 25°C and at 0.98, 0.95 or 0.93 a_w were studied. The presence of *F. graminearum* decreased the number of fungal populations (CFUs) per gram grain of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* under almost all conditions tested. In presence of *F. moniliforme*, CFUs of *F. graminearum* raised significantly at 25°C mainly at 0.93 and 0.95 a_w , while the presence of *F. proliferatum* made them increase at 15°C. The presence of *F. graminearum* always inhibited the FB₁ production except at 25°C and 0.98 a_w where it was raised. However, the observed differences were not statistically significant. There was no effect of fungal interaction on ZEA production by *F. graminearum*, however, when paired with *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, DON production by *F. graminearum* was significantly stimulated mainly at 0.98 a_w .

Key words: *Fusarium*, *fumonisin*s, *zearalenone*, *deoxynivalenol*, *water activity*, *temperature*, *maize*.

INTRODUCTION

Fusarium species cause seedling blight and root, stalk, and ear rots in maize. The most frequently isolated species from maize in temperate climates are *F. graminearum* and *F. moniliforme* followed by *F. culmorum*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum* and *F. equiseti* (1). Various secondary metabolites generated by this fungi have been shown to have potent inhibitory effects on lower organisms (antibiotics) or repellent (e.g., peramine, an insect repellent) or toxin (mycotoxins) effects on higher organisms. Because of this and other reasons, it has been suggested that fungi produce mycotoxins to limit competition. Mycotoxicosis can occur whenever susceptible animals are exposed to ingest toxic amounts of mycotoxin. Significant proportions of the world's cereal grains are estimated to be contaminated with one or more mycotoxins (2).

F. graminearum produces mycotoxins such as zearalenone (ZEA) and trichothecenes. Among the trichothecenes, the most important economically are nivalenol (NIV), deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxinivalenol (3-ADON) and 15-acetyldeoxinivalenol (15-ADON). Among these, the mycotoxins frequently found in cereals are DON, NIV and ZEA (3).

DON, a cytotoxic trichothecene, has been associated with liver disease, oestrogenic disorders, oesophageal cancer, and immunotoxic effects (4, 5). ZEA occurs frequently in maize used as raw material in feedstuffs and produces a well-known hyperestrogenic syndrome (6).

On the other hand, *F. moniliforme* and *F. proliferatum* produce several mycotoxins such as fumonisins. These toxins have been shown to induce leukoencephalomalacia in horses, pulmonary edema in swine and to be hepatotoxic and carcinogenic to rats. Maize and fumonisins have also been associated with incidences and increased risk of human esophageal cancer in regions of South Africa and China (7-11).

Environmental factors have a major impact on the growth of fungi and play a critical role in the epidemiology of mycotoxicosis. In addition, secondary metabolism and the production of mycotoxins by fungi is genetically regulated in response to environmental conditions (2). There would be no mycotoxin production and no incidence of mycotoxicosis if environmental factors were such that they prevented the growth of fungi. Previous studies have detailed the important influence of abiotic factors as water activity (a_w) and temperature and fungal interactions on the ability of

these *Fusarium* species to germinate, grow and produce mycotoxins *in vitro* and on maize grain (12-14).

Many field studies (15-19) have demonstrated a negative correlation between the isolation frequencies of *F. graminearum* and *F. moniliforme*. Interactions between species have also been shown to influence the production of mycotoxins in cereals (20, 21).

Despite fumonisins, DON and ZEA are common mycotoxins found in maize, little is known about the interaction between *F. moniliforme* and *F. graminearum* and the pattern of toxin production at different temperatures and water activity in maize grain. Therefore our objectives in this study were to describe the impact of interactions between fumonisin-producing isolates of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, and a ZEA-and DON producing isolate of *F. graminearum* inoculated together on irradiated maize, on their growth and mycotoxin formation at different a_w and temperature levels.

EXPERIMENTAL

Fungal isolates

Single isolates of three species were used in this study: *Fusarium moniliforme* (25N) (= *F. verticillioides*), *F. proliferatum* (73N), and *F. graminearum* (ITEM 223). All the *Fusarium* species were isolated from maize and *F. moniliforme* and *F. proliferatum* have previously been shown to be high fumonisin producers in culture and maize grain (22). *F. graminearum* isolate was kindly provided by Dr. Chulze (Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina). All the strains used in the study are maintained in the Food Technology Department fungi collection of the University of Lleida, Spain.

Grain preparation at different water activity (a_w)

Spanish dent maize grain was irradiated with 12 kGreys of gamma irradiation and stored aseptically at 4°C. The grain contained no fungal infection or contamination but had retained the ability to germinate. The initial water content of the grain was 13.9% (= 0.71 a_w).

For all experiments, irradiated maize was weighed into sterile flasks and rehydrated to the desired treatment a_w levels (0.93, 0.95 and

0.98) by addition of sterile distilled water. The amount of water added was calculated from a moisture adsorption curve for grain. The grain treatments were allowed to equilibrate at 4°C for 48 hours, with periodic shaking.

Finally, the a_w values were confirmed by using a water activity meter (AquaLab, Pullman, Washington, USA).

Inoculation, incubation and growth assessment

Rehydrated maize was placed in sterile Petri plates (20 g per plate, approximately) forming a single layer of grains (22). A 5 mm diameter agar disk was taken from the margin of a 5 day old growing colony of each isolate on malt extract agar and transferred to the centre of each plate. Plates containing grain at the same a_w were placed in containers along with beakers containing glycerol water solutions (23) of the same a_w as the plates in order to create an atmosphere with a same equilibrium relative humidity. Containers were incubated at 15 and 25°C. All treatments were repeated three times.

Colonies were measured daily with the aid of a binocular magnifier. Two diameters were obtained from each colony and growth rates expressed as mm d^{-1} were calculated by linear regression of colony radius against time for each strain at each set of conditions tested.

Inoculation, incubation, and population changes during interaction under different $a_w \times$ temperature conditions

Rehydrated maize was placed in sterile Petri plates (25 g per plate, approximately). For pure culture studies, four agar discs (5 mm diameter) were used, while for mixed cultures, four similar discs were used for each species, distributed on the grain in a fixed pattern. Then, plates containing grain of the same a_w were placed in sealed containers and incubated, as described previously, during 4 weeks at 15 and 25°C. All treatments were repeated twice.

After incubation, plates were taken and analysed for fungal populations (CFU g^{-1}) by dilution plating using MEA (malt extract agar, per 1 l distilled water: 20 g malt extract, 20 g glucose, 1 g peptone, $\text{pH}=5.5$) as enumerating media. *Fusarium* were counted on plates bearing a total number of colonies between 5 and 150.

The remaining grains were frozen at -20°C for later fumonisin, DON and ZEA analysis.

Mycotoxin quantification (Fumonisin B₁, DON and ZEA).

A modification of the method of Shephard *et al* (24) was followed for fumonisin B₁ (FB₁) quantification. Subsamples (10 g) were ground and extracted by blending in 20 ml methanol-water (3+1). Extracts were filtered. Filtrate (8 ml) was loaded on a preconditioned SAX (strong anion exchange) column and eluted with 0.5% acetic acid in methanol. The eluate was evaporated to dryness in a rotavapour, redissolved in methanol, and finally evaporated under a gentle stream of nitrogen and dissolved in HPLC grade methanol. Sample was coupled to OPA (o-phthaldialdehyde) reagent and assayed by HPLC, by comparison with external standards, using methanol: 0.1 M dihydrogen sodium phosphate (3+1) (pH = 3.35) as mobile phase at a 0.7 ml min⁻¹ flow rate. The reference standard of FB₁ was purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

For ZEA quantification the AOAC method for α -zearelenol and zearelenone in maize was followed (25).

DON was extracted with 40 ml of acetonitrile/water (84+16) added to 10 g of ground sample, followed by shaking on a magnetic stirrer for 1 h. The extract was filtered through Whatman n° 1 filter paper. Purification of the crude extract was carried out by using a one-step cleanup column (Mycosep™ # 227, Romer Labs., Inc., Union, Mo.). 2 ml of purified extract was transferred to vial and evaporated to dryness in a 60 C waterbath under vacuum and dissolved in 1 ml of mobile phase, acetonitrile/methanol/water (4+4+92) for HPLC analysis. 125 μ l of that was injected into the HPLC system. The flow rate for mobile phase was 1.0 ml min⁻¹. The wavelength of the absorbance detector was set at 220 nm. The reference standard for DON was purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA.

Dry matter determination

The percentage of dry matter from each sample was determined by drying subsamples of approximately 10 g at 105°C for 17 h (26). Thus, all results are presented on a dry weight basis.

Statistical analyses of the data

Analysis of variance were made for colony radii after 4 days, CFUs g⁻¹, zearalenone, DON and fumonisin concentrations by using SAS program version 6.12 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA). CFU data were transformed prior to analysis by $y = \log(\text{CFU g}^{-1})$. Finally, correlation analyses were carried out between CFU and mycotoxin production in pure cultures. For mixed cultures, analysis of correlation was carried out between amount of mycotoxins presents and percentage of inhibition of fungal populations.

RESULTS

Growth rates of *Fusarium* spp.

Generally, growth rates increased from 0.93 to 0.98 a_w at both temperatures. Furthermore, on irradiated maize grain, all *Fusarium* isolates examined grew faster at 25°C than at 15°C (Table 1). The highest growth rates obtained for *F. moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* were about 5.23, 4.99, and 10.36 mm day⁻¹, respectively, at 0.98 a_w and 25°C. *F. graminearum* grew faster than *F. moniliforme* and *F. proliferatum* isolates under all conditions tested.

TABLE 1. Effect of water activity and temperature on growth rates (mm day⁻¹)

Temp. (°C)	a_w	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. graminearum</i>
15	0.93	0.48	0.61	1.02
	0.95	1.07	1.16	2.33
	0.98	2.43	2.33	4.71
25	0.93	1.61	1.57	2.11
	0.95	3.24	3.17	5.44
	0.98	5.23	4.99	10.36

Effect of the presence of *F. graminearum* on populations and FB₁ production by *F. moniliforme*. Influence of a_w and temperature

CFUs. All single factors (a_w , temperature and presence of *F. graminearum*) had a significant effect (Table 2) on fungal populations (CFU per gram grain) of *F. moniliforme*. The presence of *F. graminearum* decreased the number of CFUs per gram grain of *F. moniliforme* under almost all conditions tested (Fig 1). There were significantly more CFUs of *F. moniliforme* at 25°C than at 15°C ($P < 0.01$). At both temperatures more CFUs of *F. moniliforme* were present at 0.98 rather than at 0.95 or 0.93 a_w .

FB₁ The production of FB₁ by *F. moniliforme* was significantly affected by a_w , as well by its two and three way interactions (Table 2). The presence of *F. graminearum* had not any significant effect on FB₁ production. The presence of *F. graminearum* always inhibited the FB₁ production except at 25°C and 0.98 a_w where it was raised. However, the observed differences were not statistically significant (Fig 1). High differences between replicates could be the reason why none of the factors were statistically significant. There was more FB₁ production at 0.98 than at 0.95 or 0.93 a_w (Fig 1).

TABLE 2. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), temperature (t), and presence of *F. graminearum* (I) on population (CFUs) and fumonisin B₁ (FB₁) production by *F. moniliforme*.

Source of variation	df	CFUs		FB ₁ production	
		MS	F	MS	F
<i>T</i>	1	17.3	681.67**	362098.18	2.93
a_w	2	1.22	48.06**	1751392.63	4.17**
<i>t</i> x a_w	2	0.05	1.98	788823.68	6.38*
<i>I</i>	1	2.26	88.95**	6641.71	0.05
<i>t</i> x <i>I</i>	1	1.32	52.14**	1165069.79	9.42*
a_w x <i>I</i>	2	0.024	0.96	793010.17	6.41*
<i>t</i> x a_w x <i>I</i>	2	1.77	69.82**	720890.42	5.83*

Note: MS, means square
 Df, degrees of freedom
 * Significant $P < 0.05$
 ** Significant $P < 0.01$

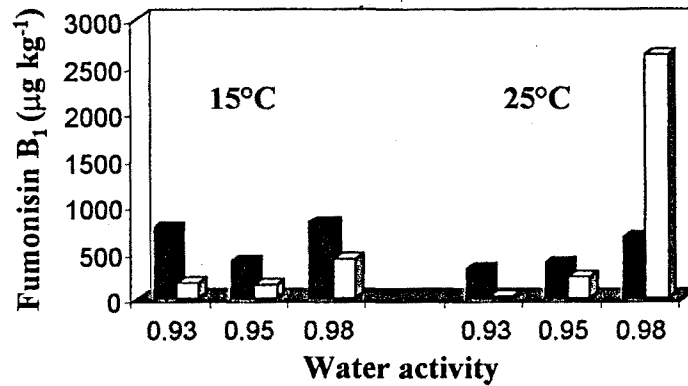
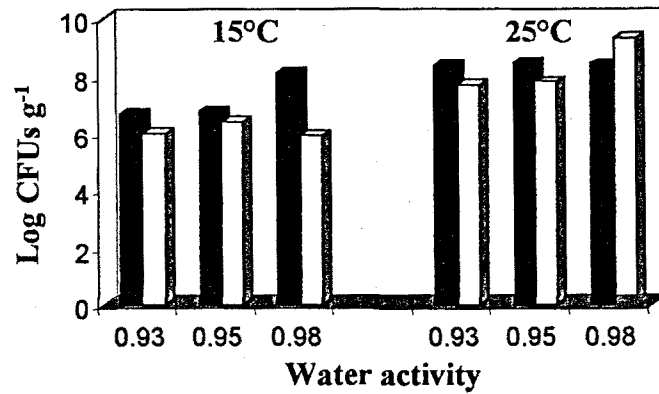


Fig 1. Effect of coinoculation of *Fusarium graminearum*, water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ production by *F. moniliforme* on irradiated maize grain incubated for 28 days. Single inoculum (■); mixed inoculum (□).

Effect of the presence of F. graminearum on populations and FB₁ production by F. proliferatum. Influence of a_w and temperature

CFUs. All single factors (a_w , temperature and presence of *F. graminearum*) were significant (Table 3). In presence of *F. graminearum*, the number of CFUs decreased almost under all conditions tested and in pure culture, more CFUs of *F. proliferatum* were present at 25°C than at 15°C and more at 0.98 than 0.95 and 0.93 a_w .

TABLE 3. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), temperature (t), and presence of *F. graminearum* (I) on population (CFUs) and fumonisin B₁ (FB₁) production by *F. proliferatum*.

Source of variation	df	CFUs		FB ₁ production	
		MS	F	MS	F
T	1	6.21	199.87**	5396914.33	1.27
a_w	2	5.95	191.53**	11378161.3	2.67
T x a_w	2	0.11	3.57	1688669.32	0.4
I	1	2.25	72.36**	9499139.93	2.23
T x I	1	0.06	2.01	3139907.63	0.74
a_w x I	2	0.3	9.63**	2798372.72	0.66
T x a_w x I	2	0.07	2.35	1284533.64	0.3

Note: MS, means square
Df, degrees of freedom
* Significant $P < 0.05$
** Significant $P < 0.01$

FB₁ None of the single factors or interactions had any significant effect. Anyway, the Fig 2 shows a slight trend of *F. graminearum* to inhibit *FB₁* production by *F. proliferatum*. As with *FB₁* production by *F. moniliforme*, high differences between replicates could be the reason why none of the factors were statistically significant.

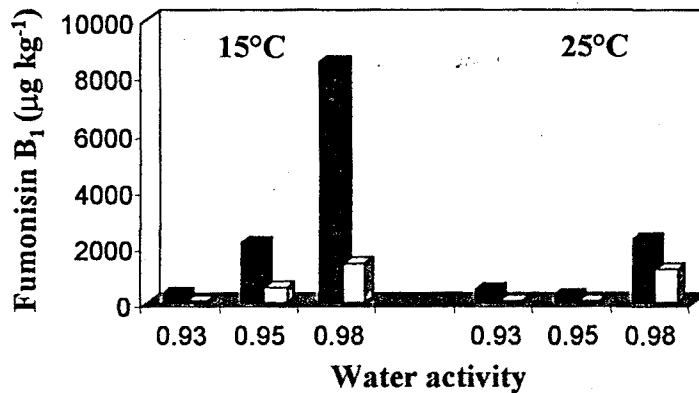
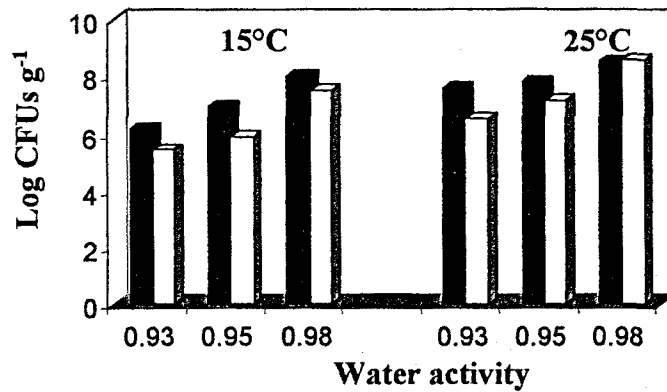


Fig 2. Effect of coinoculation of *Fusarium graminearum*, water activity and temperature on growth and FB₁ production by *F. proliferatum* on irradiated maize grain incubated for 28 days. Single inoculum (■); mixed inoculum (□).

Effect of the presence of F. moniliforme and F. proliferatum on populations and ZEA and DON production by F. graminearum. Influence of a_w and temperature

CFU The effect of a_w , temperature, as well as their two-way interaction was significant (Table 4). In presence of *F. moniliforme*, CFUs

of *F. graminearum* were raised significantly at 25°C mainly at 0.93 and 0.95 a_w , while the presence of *F. proliferatum* made them increase at 15°C at 0.93 and 0.98.

In pure culture, more CFUs of *F. graminearum* were present on maize at 0.98 a_w rather than at 0.95 and 0.93 a_w and at 25°C rather than at 15°C (Fig 3).

TABLE 4. Analysis of variance of effect of water activity (a_w), temperature (t), and presence of *F. moniliforme* or *F. proliferatum* (I) on population (CFUs) and zearalenone (ZEA) and deoxynivalenol (DON) production by *F. graminearum*.

Source of variation	df	CFUs		ZEA production		DON production	
		MS	F	MS	F	MS	F
t	1	1.24	27.29**	5.29	0.03	1486.19	8.4**
a_w	2	4.44	97.56**	2084.51	13.6**	40435.99	228.41**
t x a_w	2	0.98	21.49**	1056.85	6.9**	9464.38	53.6**
I	1	0.11	2.33	29.49	0.19	2947.76	16.65**
t x I	1	0.35	7.6**	138.74	0.91	136.184	0.77
a_w x I	2	0.26	5.7**	23.87	0.16	3172.76	17.92**
t x a_w x I	2	0.36	7.96**	101.19	0.66	144.91	0.82

Note: MS, means square
 Df, degrees of freedom
 * Significant $P < 0.05$
 ** Significant $P < 0.01$

ZEA. There was not any effect of fungal interaction on ZEA production. The effect of a_w , and the interaction with temperature were significant (Table 4), there was more ZEA production by *F. graminearum* at 0.98 than at 0.95 or 0.93 a_w (Fig 3).

DON. All single factors (a_w , temperature and presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*) had a significant effect (Table 4) on DON production by *F. graminearum*. In presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, production of DON was significantly stimulated mainly at 0.98 a_w (Fig 3). There was more DON production at 25°C than at 15°C ($P < 0.01$). In both temperatures more toxin was produced at 0.98 rather than at 0.95 or 0.93 a_w .

Correlation analyses

In pure culture there was not correlation between FB₁ production and fungal populations of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, neither between ZEA and DON production and CFUs of *F. graminearum*.

On the other hand, there was positive correlation between CFUs of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* and DON production and CFUs of *F. graminearum* and FB₁ production in mixed culture. Moreover, correlation between DON and ZEA production and DON and FB₁ production was found.

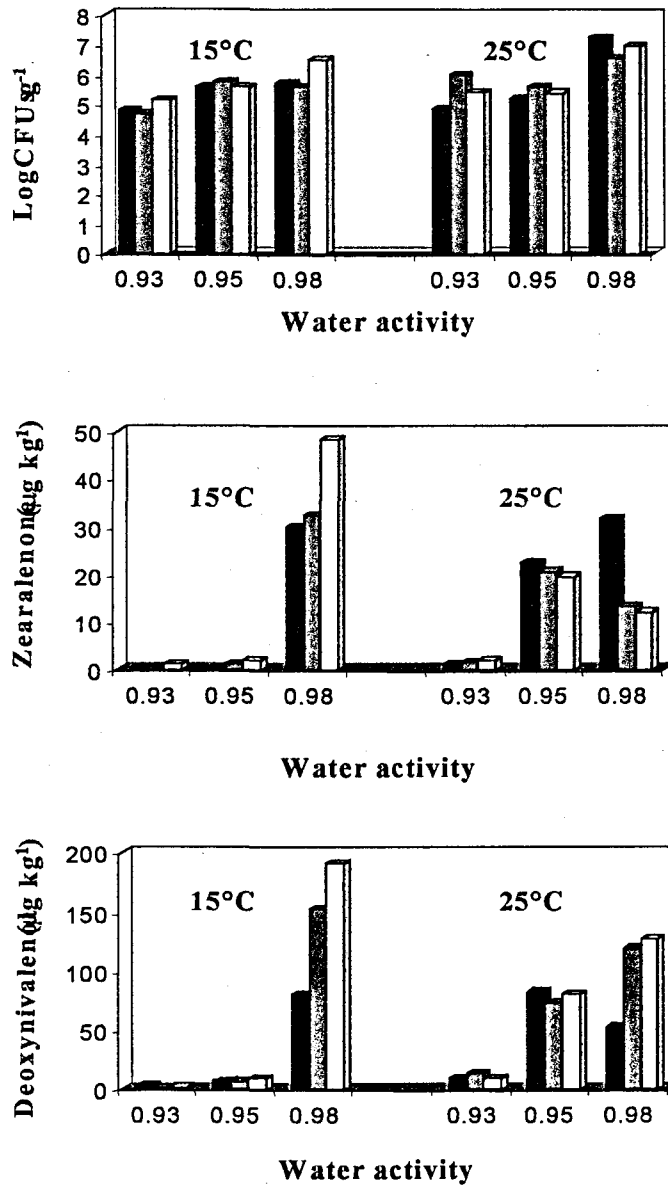


Fig 3. Effect of coinoculation of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* isolates, water activity and temperature on growth and ZEA and DON production by *F. graminearum* on irradiated maize grain incubated for 28 days. Single inoculum (■); mixed inoculum with *F. moniliforme* (▨); mixed inoculum with *F. proliferatum* (□).

DISCUSSION

Our data reflected that development and toxin production by the different *Fusarium* species were differently affected by environmental conditions. However, besides abiotic factor, such as a_w and temperature, it was found that fungal interaction is a biotic factor that significantly affected fungal development in grain.

These studies have shown that *F. moniliforme* and *F. proliferatum* populations were reduced by the presence of *F. graminearum* under almost all condition tested. However, in presence of *F. moniliforme*, CFUs of *F. graminearum* were enhanced significantly at 25°C mainly at 0.93 and 0.95 a_w and at 15°C in presence of *F. proliferatum*. Cooke and Whipps (27) suggested that when mycelia of two species meet or intermingle, a frequent result is stimulation of sporulation in one or both fungi. Accelerated or enhanced reproduction can be viewed as being beneficial, but is obviously achieved at the expense of curtailed vegetative development.

On the other hand, recently, Velluti *et al* (14) in a similar experiment also reported that *F. moniliforme* and *F. proliferatum* populations were reduced by the presence of *F. graminearum*, while the presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* had a limited inhibitory effect on fungal populations of *F. graminearum*. They have not observed an increased of it as our results. It could be due to intraspecific difference between *F. graminearum* strain.

It have been suggested that, *F. moniliforme* protected maize seedlings against infection by *F. graminearum*. Blaney *et al* (18) and Van Wyk *et al* (28) and reported a negative correlation between the isolation frequencies of *F. graminearum* and *F. moniliforme*. These studies were based on naturally contaminated samples and, thus, it is difficult to compare with our *in vitro* assessment. For most natural habitats it is difficult to express, except in relatively crude term, the complex qualitative and quantitative effects of interactions amongst fungi, and between them and other microorganisms (27).

On the other hand, Marín *et al* (12) and Velluti *et al* (14) suggested that, although growth rates and populations are probably useful measures to assess fungal colonisation by *Fusarium* spp. in inoculated maize grain, they do not correlate properly with the fungal colonisation in mixed cultures. *F. graminearum* had a higher growth rate than *F. moniliforme* or *F. proliferatum* under all conditions tested, while *F.*

moniliforme or *F. proliferatum* sporulated more than *F. graminearum*. The ability to grow fast and to sporulate abundantly are both important characteristics for occupation of an ecological niche (29, 30).

Our data showed no good correlation between CFUs and mycotoxin production in pure culture for any of species studied, meaning that in this case there is not correlation between sporulation and toxin formation. Ramakrishna *et al* (31, 32) also showed that, with *P. verrucosum*, seed infection or fungal population gave little indication of ochratoxin A production in barley grain in paired cultures.

Interesting studies by Yoshizawa *et al* (33) on Thai maize showed that fumonisins were present in visually healthy maize as well as in moldy maize. Surprisingly, there was no significant difference in levels of these toxins between the two sample groups.

There are many conflicting reports about the effects of fungal interactions on mycotoxin production. In our study, FB₁ production by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* in the presence of *F. graminearum* had different patterns. FB₁ production by *F. moniliforme* was inhibited and enhanced depending on temperature, however, FB₁ production by *F. proliferatum* shown a slight trend to be inhibited by *F. graminearum* under almost all conditions tested. Velluti *et al* (14), indicated the same different behavior in FB₁ production by *F. moniliforme* and *F. proliferatum* in presence of different isolate of *F. graminearum*.

In the presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* ZEA production by *F. graminearum* was not significantly modified at any of the conditions tested. Other studies by Velluti *et al* (14) also showed that ZEA was not modified for those interactions. Etcheverry *et al* (33) also found that ZEA production was not affected when *F. graminearum* was paired with *A. parasiticus* at 28°C and 0.97 *a_w*. Conversely, ZEA production by *F. graminearum* was markedly decreased in paired culture with *A. flavus* at 16°C but not at 25°C (21). The present study revealed that the level of ZEA produced was not significantly modified under different temperature levels. It contrasts with Velluti *et al* (14) whose indicated that more ZEA was produced by *F. graminearum* at 15 than at 25°C. It has been suggested that low temperature stress stimulate ZEA production in some strains of *F. graminearum* (34).

Patterns of DON toxin production changed with environmental conditions as well as with the species paired. The optimum conditions for DON production by *F. graminearum* were 25°C and 0.98 *a_w*. These data agree with Comerio *et al*. (3) who investigate the influence of *a_w* on DON

accumulation by *F. graminearum* in wheat at 25°C, the maximum accumulation that they reported was at 0.98 a_w after 75 days.

In presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum*, DON production was significantly enhanced. Ramakrishna *et al* (31) shown that under some conditions, T-2 toxin production by *F. sporotrichioides* in barley in the presence of *A. flavus* and *P. verrucosum* was higher than that in pure culture.

Even though there was not a good correlation between CFUs and mycotoxin production in pure culture, in mixed culture there was a good correlation between DON and CFUs of species of the *Fusarium* Liseola. This finding, together with the fact that DON production was significantly enhanced by the presence of *F. moniliforme* and *F. proliferatum* could imply that DON production is a defense strategy held by *F. graminearum* against other competing fungi. Further studies on this topic should be performed to fully understand the overall processes.

CONCLUSIONS

The mycotoxin concentration in a sample of grain is determined by the combination of effects, whether that fungi are alone or in presence of other species and the different environmental conditions that the fungi grown. The environmental conditions exert different pressure for different species of *Fusarium* but in this case, 0.98 a_w and 25° C was the best condition for grow and toxin production. Our studies of mixed fungal cultures indicate that the results may include stimulation, inhibition and not modification of toxin production. The final concentration of toxin is thus an integration of all these changes and further studies should be done to predict it.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Spanish Government (CICYT, Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, grant ALI98-0509-C04-01), to the Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (A. E. C. I) and to the Lleida Council for their financial support.

REFERENCES

- 1 Sohn H, Seo J, Lee Y, Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Addit Contam* 16: 153-158 (1999).
- 2 Hollinger K, Ekperigin HE, Mycotoxicosis in food producing animals. *Vet Clin North Am* 15: 133-165 (1999).
- 3 Comerio RM, Fernandez Pinto VE, Vaamonde G, Influence of water activity on deoxynivalenol accumulation in wheat. *Mycotax Res* 15: 24-32 (1999).
- 4 Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA, Toxigenic *Fusarium* species, in *Identity and Mycotoxicology*, Ed by Pennsylvania State University Press, University Park, pp 328 (1984).
- 5 Lou Y, Yoshizawa T, Katayama T, Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl Environ Microbiol* 56: 3723-3726 (1990).
- 6 Scott PM, The natural occurrence of trichothecenes, in *Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiological effects*, Ed by Beasley VR. Boca Raton, Florida, pp 1-26 (1990).
- 7 Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole JR, Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest* 2: 217-221 (1990).
- 8 Kellerman TS, Marasas WFO, Thiel PG, Gelderblom WCA, Cawood ME, Coetzer JAW, Leukoencephalomalacia in two horses by oral dosing of fumonisin B₁. *J Vet Res* 57: 269-275 (1990).
- 9 Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WFO, Shephard GS, van Schalkwyk DJ, Koch KR, Natural occurrence of same *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J Agric Food Chem* 38: 1900-1903 (1990).
- 10 Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG, Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247-1251 (1991).
- 11 Gao HP, Yoshizawa T, Further study on *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat from high-risk area for human esophageal cancer in China. *Mycotax* 45: 51-55 (1997).
- 12 Marín S, Sanchis V, Rull F, Ramos A J, Magan N, Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *J Food Prot* 61: 1489-1496 (1998).
- 13 Marín S, Sanchis V, Ramos A J, Vinas I, Magan N, Environmental factors, *in vitro* interspecific interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from maize grain. *Mycol Res* 102: 831-837 (1998).
- 14 Velluti A, Marín S, Bettucci L, Ramos AJ, Sanchis V, 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 (2000, in press)

- 15 Singh DV, Mathur SB, Neegaard P, Seed health testing of maize. Evaluation of testing techniques, with special reference to *Drechslera maydis*. *Seed Sci Technol* 2: 349-365 (1974).
- 16 Marasas WFO, Kriek NPJ, Wiggins VM, Steyn PS, Towers DK, Hastie TJ, Incidence, geographical distribution, and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. *Phytopathology* 69: 1181-1185 (1979).
- 17 Miller JD, Young JC, Trenholm HL, *Fusarium* toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Can J Bot* 61: 3080-3087 (1983).
- 18 Blaney BJ, Ramsey MD, Tyler AL, Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested during 1983 in Far North Queensland. *Aust J Agric Res* 37: 235-244 (1986).
- 19 Rheeder JP, Marasas WFO, van Wyk PS, van Schalkwyk DJ, Reactions of South African maize cultivars to ear inoculation with *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Diplodia maydis*. *Phytophylactica* 22: 213-218 (1990).
- 20 Wicklow DT, Hesseltine CW, Shotwell OL, Adams GL, Interference competition and aflatoxin levels in corn. *Phytopathology* 70: 761-764 (1996).
- 21 Cuero RG, Smith JE, Lacey I, Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains. *Appl Environ Microbiol* 53: 1142-1146 (1988).
- 22 Marín S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N, Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Lett Appl Microbiol* 21: 289-301 (1995).
- 23 Dallyn H, Effect of substrate water activity on growth of certain xerophilic fungi. Ph.D. Thesis, South Bank University, London (1978).
- 24 Shephard GS, Sydenham EW, Thiel PG, Gelderblom WCA, Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liquid Chromatogr* 13: 2077-2087 (1990).
- 25 AOAC (Association of Official Analytical Chemists) Natural Toxins in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Ed by Gunniff, P, Publ, AOAC International chapter 49, pp. 45-46 (1997).
- 26 ISTA (International Seed Testing Association) International rules for seed testing. *Seed Sci Technol* 43: 3-77 (1976).
- 27 Cooke RC, Whipps JM, Interactions with other Heterotrophs, in *Ecophysiology of fungi*, Ed by Blackwell Scientific Publ, University Press Cambridge, UK, pp 219-231 (1993).
- 28 Van Wyk PS, Scholtz DJ, Marasas WFO, Protection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* against infection by *Fusarium graminearum* in the soil. *Plant Soil* 107: 251-257 (1988).
- 29 Magan N, Lacey J, Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Trans Br Mycol Soc* 82: 83-93 (1984).
- 30 Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE, Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. *Mycol Res* 97: 1393-1402 (1993).
- 31 Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE, The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Addit Contam* 13: 939-948 (1996).

- 32 Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE, Colonization of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. *J Food Prot* 59: 1311-1317 (1996).
- 33 Yoshizawa T, Yamashita A, Chokethaworn N, Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit Contam* 13: 163-168 (1996)
- 34 Etcheverry M, Magnoli C, Dalcero A, Chulze S, Lecumberry S, Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol production by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* in interactive cultures on irradiated maize kernels. *Mycopathologia* 142: 37-42 (1998).
- 35 Ryu D, Bullerman LB, Effect of cycling temperatures on the production of deoxynivalenol and zearalenone by *Fusarium graminearum* NRL 5883. *J Food Prot* 62: 1451-1455 (1999).

Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media.

Andrea Velluti, Sonia Marín, Pilar Gonzalez, Antonio J. Ramos and Vicente Sanchis

Food Technology Department, Lleida University, CeRTA, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.

ABSTRACT

An *in vitro* initial screening of a range of 37 essential oils on inhibition of mycelial growth of *Fusarium verticilloides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* under different temperature (20- 30°C) and water activity (a_w) (0.95-0.995) conditions was made. The basic medium was a 3% maize meal extract agar. Maize meal agar was modified with glycerol to a range of water activity conditions and the essential oils were incorporated at different concentrations (0; 500; 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarosa oils were the products tested for their use as novel preservatives in the control of the three *Fusarium* species studied. Although water activity was determinant for the growth of the isolates, in general, the preservative effect of the oil was quite independent of a_w . However, a trend to a higher inhibition by the oils when a_w was low was observed. Temperature had a minor importance in the inhibitory effect of the preservatives. *In vivo* studies may be required to confirm the usefulness of the results obtained.

INTRODUCTION

Many species of fungi are capable of producing mycotoxins. *Fusarium* species cause seedling blight and root, stalk, and ear rots in corn. The most frequently isolated species from corn in temperate climates are *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* followed by *F. subglutinans*, *F. culmorum* and *F. equiseti* (Sanchis *et al.* 1994, Sohn *et al.* 1999).

Fungi-inhibiting chemicals (mainly low-molecular-weight organic acids) have been used for the preservation of stored grain. However, many disadvantages are associated with the use of acids (Christensen, C. M. & Sauer, D.B. 1982) and there is a world trend towards reducing their use in grain and foodstuffs. Natural plant extracts may provide an alternative to these preservatives. Several other studies have examined the effect of compounds isolated from oils on fungi to search for natural fungicides and a number of these oil constituents have shown to be inhibitory (Chao & Young 2000). Maruzzella & Balter (1959) found that 100 essential oils out of 119 spices tested possessed an antagonistic effect against at least one out of 12 phytopathogenic fungi and 50 of these compounds showed a wide spectrum activity against all fungi tested. Mishra & Dubey (1994) screened 14 oils for their antifungal activities against *Aspergillus flavus* and found that only the oil from lemongrass possessed fungitoxicity against *A. flavus*.

In general, the response to the different oils is dependent on the species of fungi tested, it can range from a lack of inhibition (resistance) to various degrees of susceptibility (Pattnaik, Subramanyam & Kole 1996). Little is known about the effect of essential oils on phytopathogen *Fusarium* species from corn and the impact on environmental conditions on this effect.

The aim of this work was to make an *in vitro* initial screening of a range of 37 essential oils on inhibition of mycelial growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* at different water activity (a_w) and temperature conditions.

MATERIALS and METHODS

Fungal isolates

The fungal species used in this study were *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*. For each species 3 different strains from different procedence were used (Table 1).

Table 1. Identification and procedence of the strains of *Fusarium* used

Strains	<i>F. verticillioides</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. graminearum</i>
a	25N*	73N*	CECT2150@
b	123N*	37N*	ITEM 223#
c	1111&	1097&	G2 SG1&

*Food Technology Department fungi collection of the University of Lleida, Spain.

Provided by Dr. Chulze (Universidad Nacional de Rio Cuarto, Argentina).

& Provided by Dr. Fannelli (Department of Biology, University of Roma "La Sapienza", Rome, Italy).

@ Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain)

Experimental design test

An in vitro initial screening of a range of 37 essential oils on inhibition of mycelial growth of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* under different temperature (20-30°C) and a_w (0.95-0.995) conditions was made.

For the first 20 essential oils studied, the experiment was designed as screening using a statistical program (MODDE version 5.0, UMETRI AB, Umea, Sweden). The factors and levels were a_w (0.95-0.995); temperature (20-30°C); doses of oils (0-1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and three different strains of each species. Two different sets of experiments with 48 runs each, were required, as the program did not allow more than 10 levels of a qualitative factor at a time.

For the remaining essential oils, the experiments were designed as a response surface model (RSM) using the same statistical program. This design resulted in 126 runs for each set of essential oils. Their factors and levels were the same as described above. Table 2 shows the essential oils studied in each design and their commercial marks.

Table 2. Experimental design for the essential oils
Designed as screening model

1 st set of essential oils	2 th set of essential oil.
aniseed	basil
cinnamon leaf	bay
eucalyptus	clove
grapefruit	ginger
lemon	peppermint
lemongrass	pine silvestris
lime	rosemary
mandarin	sage
orange	sweet fennel
spearmint	thyme

Designed as Response Surface Model (RSM)	
1 st set of essential oils	2 nd set of essential oils
bay leaf ^a	cedar ^a
birch ^a	citronella ^a
cinnamon leaf	lavender a ^{&}
clove	lavender b ^a
cypress ^a	mint ^a
incense ^a	nutmeg ^a
lemongrass	oregano ^a
marjoram ^a	palmarosa ^a
moss ^a	tea tree ^{&}
petitgrain ^a	ylang-ylang ^{&}

All essential oils are from F. D. Copelans & Songs, Ltd. London, except those from Raveillat Aromatics, S.L. Barcelona (^a) and Laboratorios Dicana S.L. Barcelona ([&]).

Inoculation, incubation and growth assessment

The basic agar medium was a 3% maize meal. Maize meal agar was modified with glycerol to a range of a_w conditions. Essential oils were incorporated into the agar after autoclaving to give final concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ medium. Tween-80 (0.005 % v/v) was used as an emulsifying agent. Tween-80 (0.005 % v/v) but no oil was used as a positive growth control, too. Media were poured in 9-cm Petri plates.

A 5 mm diameter agar disk was taken from the margin of a 5-days old growing colony of each isolate on maize meal agar and transferred to the centre of each plate. Plates enclosed in sealed plastic bags were incubated for 28 days, and diameters of growing colonies were measured every two days.

Data analysis

The data were analysed by using MODDE 5.0. program. Partial Least Square Projections to Latent Structures (PLS) was applied.

RESULTS

For the first 20 essential oils, two different sets of 10 essential oils designed as screening were analysed separately by PLS. All three species and days of measurement were included in the same analyses as different responses.

For the first 10 essential oils assayed, all responses were correlated to some extent. A model of 9 components was produced with a $R^2=0.90$ and $Q^2=0.72$. The first component explained 50% of the data variability, while the second component explained 27%. For each term of the model, coefficients of importance related to the responses were calculated, and their significance was given. Firstly, PLS was applied separately for each species, and as there was no significant intraspecific differences, all three isolates and days of measurement were included in the same analyses as different responses. PLS coefficients are of interest because they make the model interpretation less laborious and time-consuming when there are several components (>4-5) in a PLS model. Their big advantage, on the one hand, is that the analyst obtains only one vector of concise model information per response, not several vectors of weights (Eriksson et al. 1999). On the other hand, the disadvantage is that a list of coefficients is given for each response

(different days and species in our case). It is important to note, that the single essential oil factor represent the mean global effect of this essential oil at all doses levels (0, 500 and 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$), while the cross term essential oil*doses, show the effect of different doses for each separated essential oil; the program then evaluates the differences between the effect of the positive control (0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and 500 and 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ doses.

a_w had a positive effect on growth rates of species studied; temperature also had a positive effect on growth except for *F. graminearum* where no significant effect was found. None of the 10 essential oils studied had a significant effect on growth rates, only a slight inhibition trend was observed for lemongrass and cinnamon oil.

For the second set of essential oils, all responses were correlated to some extent, too. A model of 9 components was produced with a $R^2=0.89$ and $Q^2=0.64$. The first component explained 42% of the data variability, while the second component explained a 33%. For each term of the model, coefficients of importance related to the responses were calculated, and their significance was given. a_w was the only factor which had a significant positive effect on the responses, as far as coefficients are concerned. None of the 10 essential oils studied had significant effect on growth rates, only a slight inhibition trend was observed for clove oil.

For the other 20 essential oils, two different sets of 10 essential oils designed by RSM were analysed separately by PLS. The essential oils that had been observed to slightly inhibit in the previous screening design (clove, cinnamon, and lemongrass) were included in this design.

For the first 10 essential oils, a model of 9 components was produced with a $R^2= 0.83$ and $Q^2= 0.67$. The first component explained 42% of the data variability, the second component explained 19% and the third explained an 8%. The first component was mainly dominated by a_w and doses, showing that increasing a_w , growth rates increased. Since the other factors had a minor importance in this component, a loadings plot for components 2 and 3 was better to explain their importance (Fig 1). The second component was dominated in the negative axes by cinnamon and lemongrass effects and to a lesser extent clove and birch oils. The third component was dominated for doses and bay leaf, marjoram and incense oils. An increase of doses of the oils reduces the growth rates. However, only the coefficients for cinnamon, clove and lemongrass were always significant and negative for almost all days and species studied.

Figure 2 shows the effect of cinnamon oil doses on growth rates after 12 incubation days. Cinnamon oil was useful at controlling growth of

Fusarium spp. under all a_w levels. In general, the preservative effect of the oil was quite independent of a_w . However, a trend to inhibit more at low a_w was observed. Colony diameters were in general reduced by more than 80% when cinnamon oil dose was increased from 0 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for all the species.

Figure 3 shows the effect of different doses of lemongrass oil on growth rates after 12 incubation days. There was an inhibitory effect in growth rates of three species due to lemongrass oil presence. In this case, percentage of reduction of colony diameters was about 45-60 % at 0.995 a_w and 75-95 % at 0.95 a_w when lemongrass oil dose was increased from 0 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for all the species studied.

Figure 4 shows that there was a negative correlation between the concentration of clove oil after 12 incubation days. In this case colony diameters were reduced more than 65 % at 0.995 a_w and more than 92 % at 0.95 a_w when clove oil dose was increased from 0 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for all the species tested.

For all three oils, similar results were showed at the different temperature levels and incubation times.

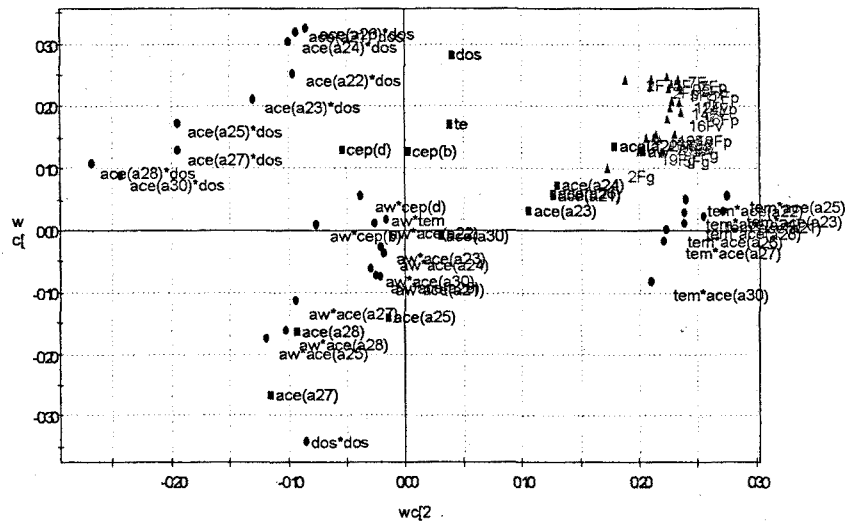
For the second set of 10 oils, a model of 11 components was produced. We found a quite high percentage of variation of the response explained by the model ($R^2 = 0.80$). On the other hand, the predictive power of the model (Q^2) is 0.48. The loadings plot of growth data for components 1 and 2 is shown in Fig 5. The plot shows that a_w , oregano oil, doses (concentration of oil), citronella and palmarosa oils were the most important factors describing growth variables. The first component, which explains 29% of the total variation in the growth rate, was dominated by a_w , oregano oil, concentration of oil, citronella and palmarosa oils. The increase of a_w made growth rates increase, while an increase of oil doses and presence of oregano, citronella and palmarosa oils, reduced growth rates. The second component ($R^2 = 0.27$) was mainly dominated by a_w . It is important to point out that the coefficients for citronella oil were never significant for almost all days and species, while the coefficients for oregano and palmarosa oils were always significant for almost all days and species.

Figure 6 shows the effect of palmarosa oil on growth rates after 12 incubation days. There was a negative correlation between doses of palmarosa oil and growth rates for all a_w studied. For *F. verticillioides* and *F. proliferatum*, it was observed a high effect of this oil at low a_w . The percentages of reduction of colony diameter were more than 35 % at 0.995 a_w and more than 62 % at 0.95 a_w when palmarosa oil dose was increased

from 0 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for all the species. This trend was not observed for *F. graminearum*, which the percentage of reduction was about 67% at all a_w .

Figure 7 shows the effect of oregano oil on growth rates after 12 incubation days. There was a negative correlation between doses of oregano oil and growth rates for all a_w studied. At 0.995 a_w the percentage of reduction of growth was more that 33% and at 0.95 a_w was more than 68% when oregano oil dose was increased from 0 to 1000 ppm for all the species.

For the two oils, similar results were shown on different temperature levels and incubation times.



ace(a21) marjoram, ace(a22) petitgrain, ace(a23) moss,
 ace(a24) incense, ace(a25) birch, ace(a26) bay leaf,
 ace(a27) clove, ace(a28) cinnamon leaf, ace(a29) cypress,
 ace(a30) lemongrass

Figure 1. Loadings plot of components 2 and 3 from partial least square (PLS) regression showing the relationship of a_w , temperature (temp), doses (dos), essential oils [ace(a21)...ace(a30)] and cross-terms on colony diameters (mm) of three isolates of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*.

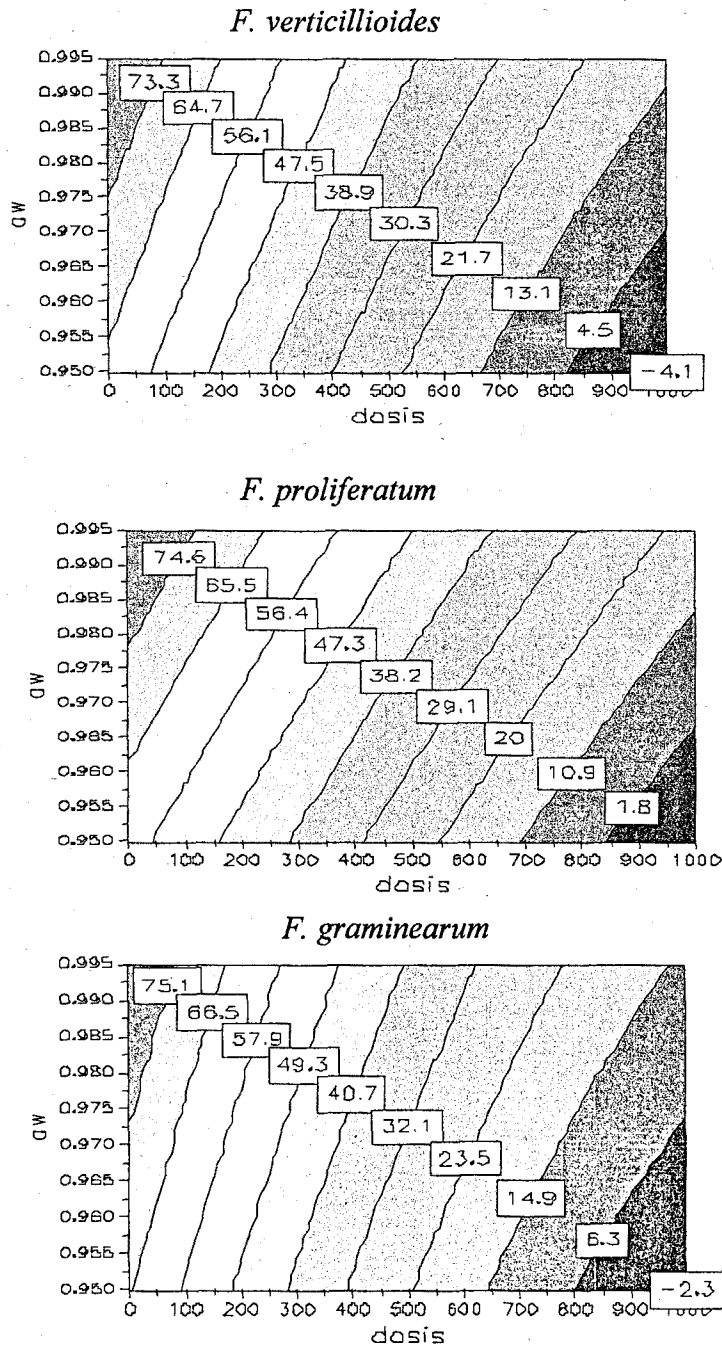


Figure 2. Contour plots based on models from PLS regression showing colony diameters (mm) of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* growth after 12 incubation days at 25°C as affected by a_w and doses of cinnamon oil ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

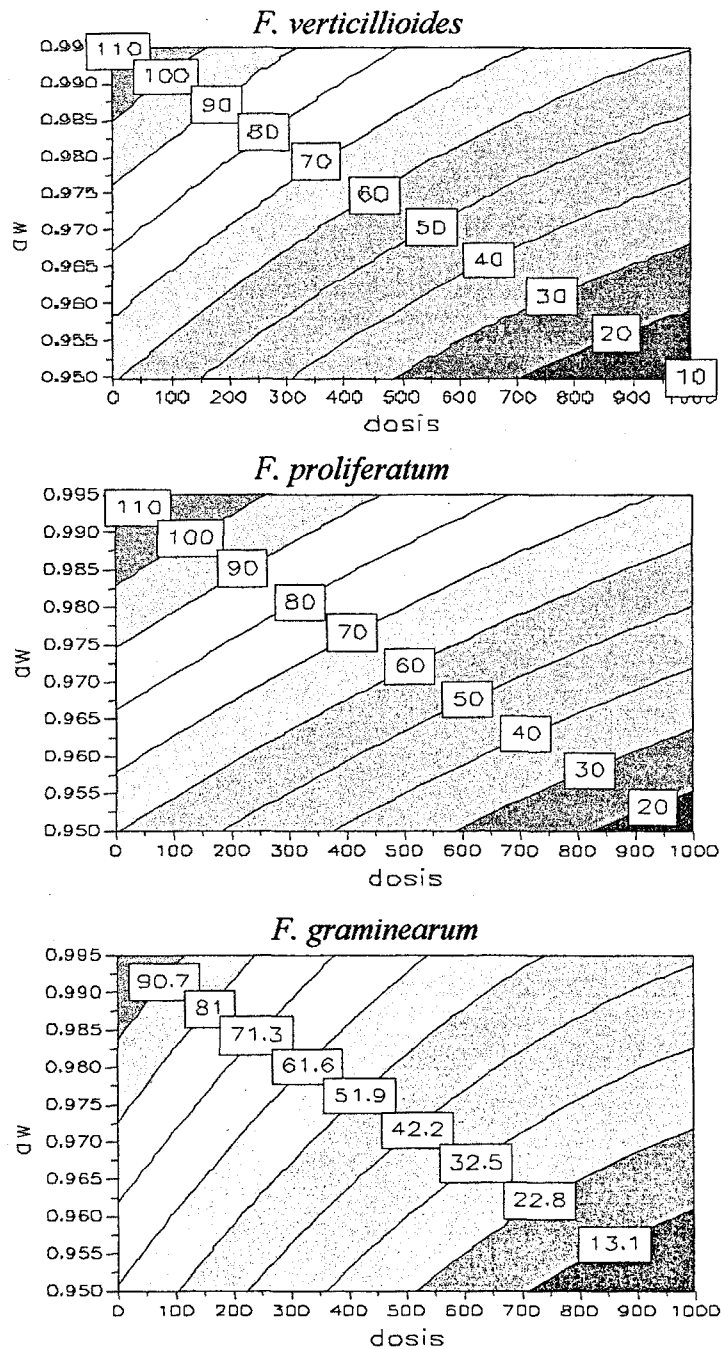


Figure 3. Contour plots based on models from PLS regression showing colony diameters (mm) of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* growth after 12 incubation days at 25°C as affected by a_w and doses of lemongrass oil ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

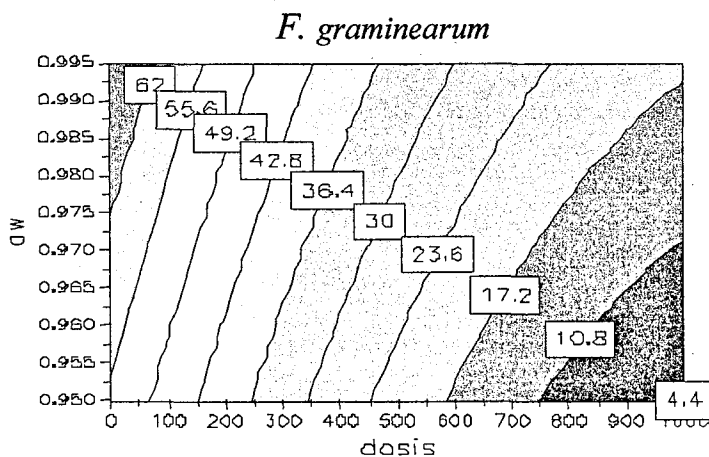
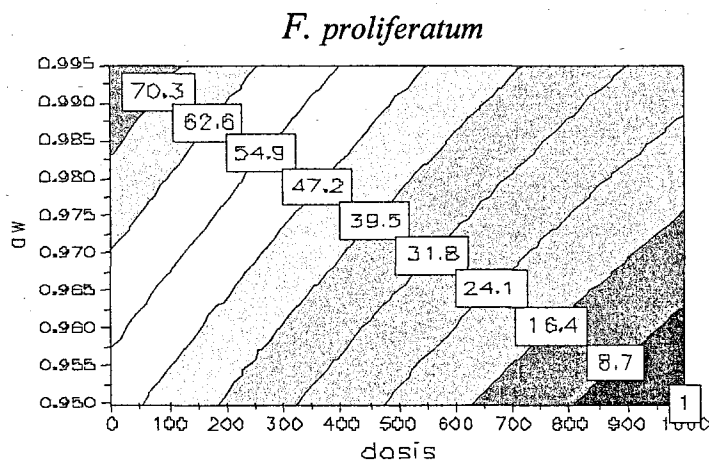
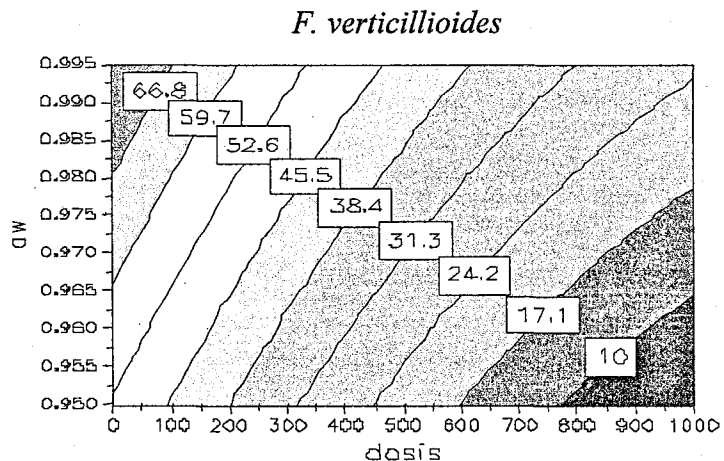
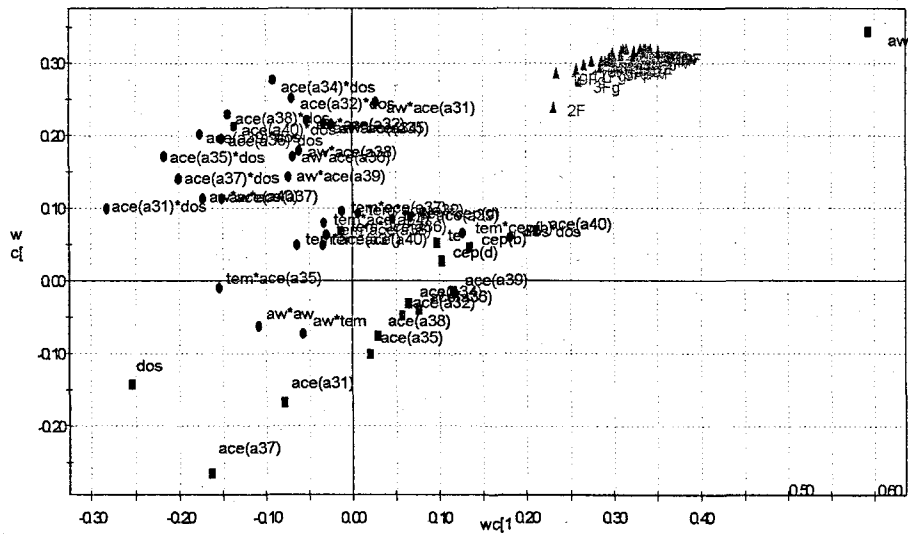


Figure 4. Contour plots based on models from PLS regression showing colony diameters (mm) of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* growth after 12 incubation days at 25°C as affected by a_w and doses of clove oil ($\mu\text{g ml}^{-1}$).



ace(a31) oregano, ace(a32) cedar, ace(a33) mint, ace(a34) lavender
a, ace(a35) citronella, ace(a36) ylang-ylang, ace(a37) palmarosa,
ace(a38) nutmeg, ace(a39) tea tree, ace(a40) lavender b

Figure 5. Loadings plot of components 1 and 2 from partial least square (PLS) regression showing the relationship of a_w , temperature (temp), doses (dos), essential oils [ace(a31)...ace(a40)] and cross-terms on colony diameters (mm) of each three isolates of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*.

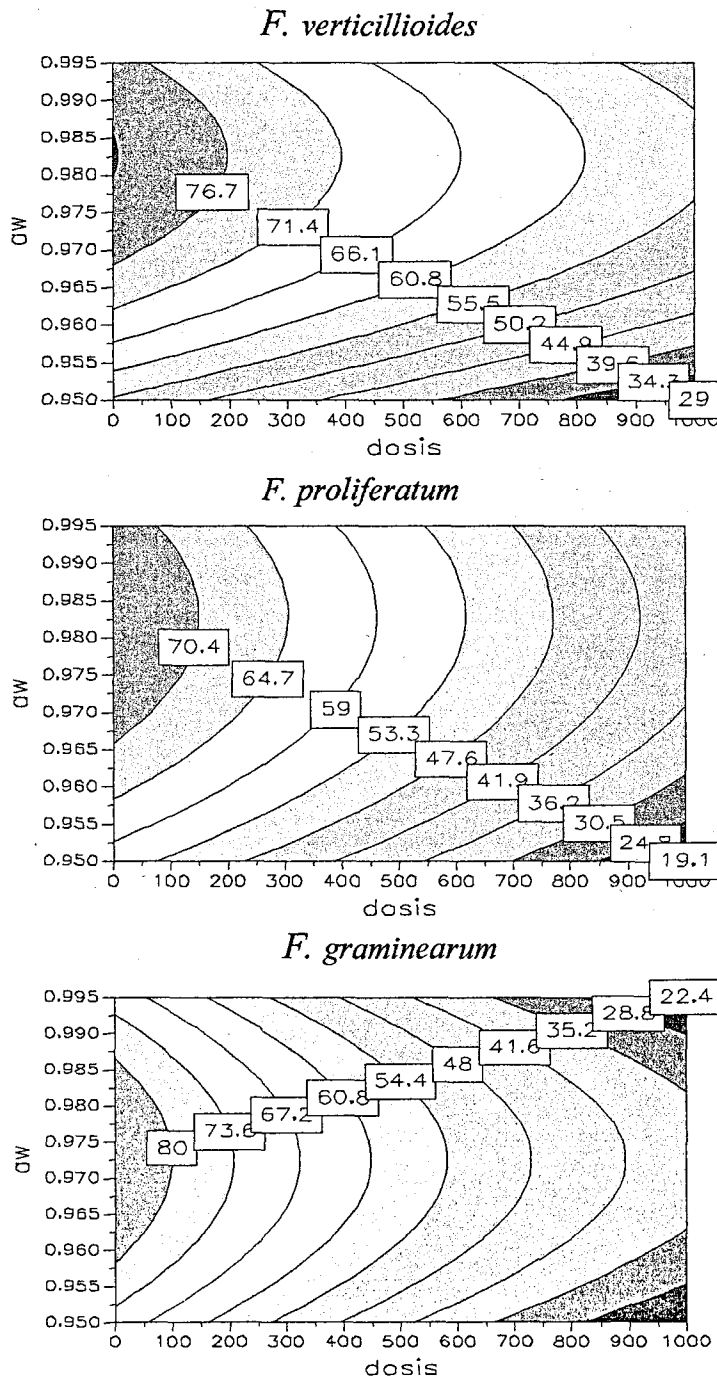


Figure 6. Contour plots based on models from PLS regression showing colony diameters (mm) of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* growth after 12 incubation days at 25°C as affected by a_w and doses of palmarosa oil ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

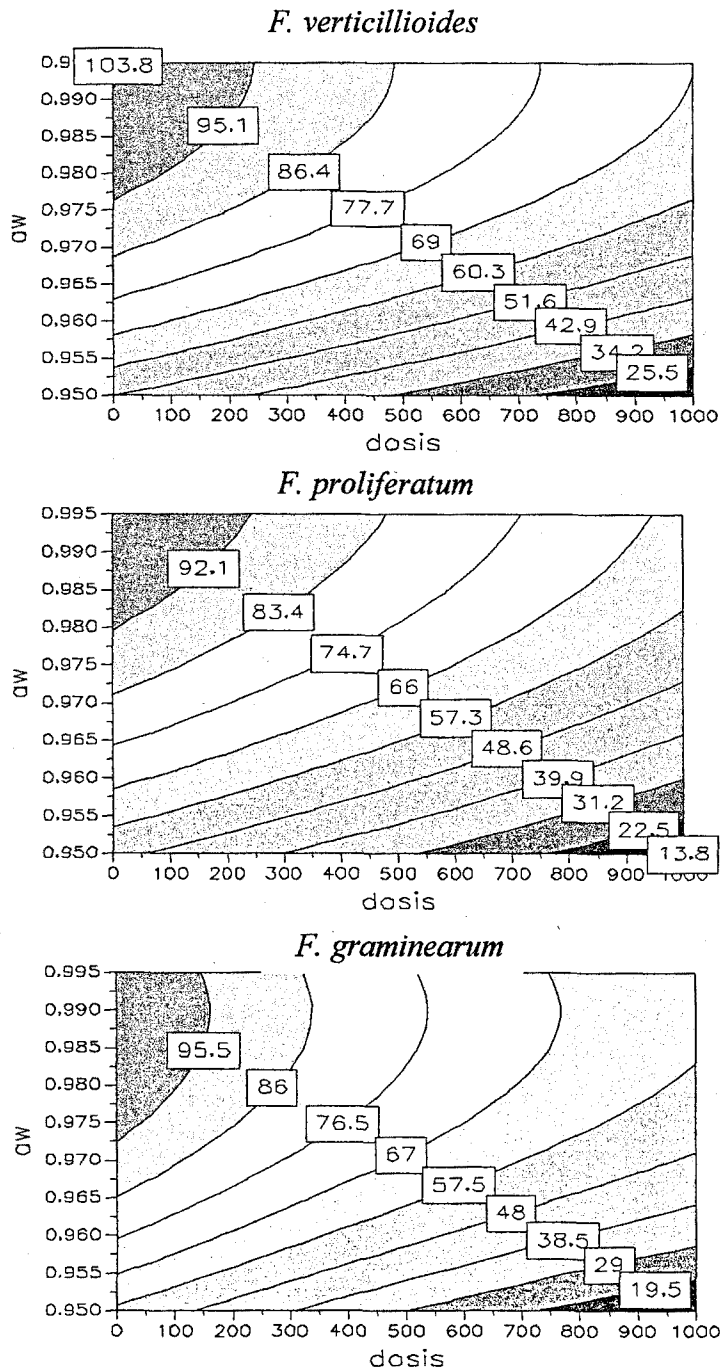


Figure 7. Contour plots based on models from PLS regression showing colony diameters (mm) of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* growth after 12 incubation days at 25°C as affected by a_w and doses of oregano oil ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

DISCUSSION

The resurgence of interest in natural therapies and increasing consumer demand for effective, safe, natural products means that quantitative data on plant oils and extracts are required (Hammer, Carson & Riley 1999). It is important to investigate scientifically those plants, which have been used in traditional medicines as potential sources of novel antimicrobial compounds (Mitscher et al. 1987).

In this study the ability of 37 essential oils to inhibit some of the most frequently *Fusarium* species from corn in temperate climates under different laboratory conditions was evaluated. Five oils (lemongrass, cinnamon, clove, palmarosa and oregano) of these 37 evaluated oils showed antifungal activity.

Various publications have documented the antimicrobial activity of essential oils including lemongrass, cinnamon, clove, palmarosa and oregano oils (Chao & Young 2000, Farag, Daw & Abo-Raya 1989, Hammer et al. 1999, Inouye et al. 1998, Mishra & Dubey 1994, Paster et al. 1995, Patkar et al. 1993, Pattnaik et al. 1996, Salmeron & Pozo 1991, Sinha, Sinha & Prasad 1993) against different microbial species.

Our results indicate that lemongrass oil could be an effective inhibitor of the three *Fusarium* species studied in corn. In vivo studies should be performed to fully understand the overall processes when lemongrass oil is added to corn. Many researches have documented the antifungal activity of lemongrass oil against different fungi (Chao & Young 2000, Hammer et al. 1999, Inouye et al. 1998, Pattnaik et al. 1996). Our results agree with Mishra & Dubey (1994), who reported that this oil showed 90% and 100% *F. verticillioides* inhibition at 500 and 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. They also reported that lemongrass oil is an effective postharvest fungitoxicant of higher-order plant origin potentially suitable for protection of foodstuffs from storage fungi. They found, under laboratory conditions, that lemongrass oil exhibited a broad spectrum of fungitoxicity by inhibiting growth completely of 35, 45, and 47 fungal species at 500, 1000, and 1500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively, and its potency remained unaltered for 210 days of storage, after which it started to decline.

We found that cinnamon and clove oils under all conditions tested reduced *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* colony growth; 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of clove and cinnamon oils reduced colony growth about 62 and 80 % respectively. Several other groups have reported the effect of clove and cinnamon oils on inhibiting growth and aflatoxin

production by *Aspergillus flavus* (Bullerman, Lieu & Seire 1977, Montes-Belmont & Carvajal 1998, Sinha et al. 1993). Mahmoud (1994) observed that 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of cinnamaldehyde completely suppressed growth of *A. flavus* and consequently prevented formation of aflatoxin [65 to 75 % of cinnamon essential oil are compound form cinnamaldehyde (Salmeron & Pozo 1991)]. The minimum inhibitory concentration (MIC) revealed that cinnamaldehyde was highly effective at 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Mahmoud, 1994).

Even though oregano and palmarosa oils were less effective in controlling *Fusarium* species growth than lemongrass, clove and cinnamon oils, they significantly inhibited growth under the different conditions tested. These results suggest that it could be interesting to study the answer of these oils in maize grain, too. The ability of oregano oil to inhibit *A. flavus*, *A. ochraceus* and *A. niger* has been evaluated previously (Paster et al. 1990, Paster et al. 1995). The results of the in vitro experiments showed clearly that 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of oregano oil had fungicidal activity in controlling mycelia of *A. flavus*, *A. ochraceus* and *A. niger* (Paster et al. 1995). In vivo studies by the same authors showed that oregano oil was highly effective in controlling the internal wheat fungi (Paster et al. 1995). On the other hand, Pattnaik et al. (1996) reported that palmarosa oil had the same inhibitory activity against twelve fungi tested; the response ranged from various degrees of susceptibility to total inhibition. This work showed that the response to this oil is dependent on the species of fungi tested.

The temperature showed very little effect on the activity of lemongrass, cinnamon, clove, palmarosa and oregano oils. a_w did not show a clear effect in the activity of these oils, but a trend that the effect of these oils were better at the lower a_w tested was observed. In general, when the grain are stored the a_w is low, this could suggest that the antifungal activity of these oils in stored grain could be good.

It is important to note that there were not significant interspecific differences in the responses to the essential oils. This would suggest that the behaviour of any *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* strain could be similar.

Fusarium spp. chiefly colonise cereal grains before harvest but they may occur in stored grain when a_w is high (Ramakrishna et al 1996). In both outdoor and storage environments they occur together with and compete with other species of fungi (Magan & Lacey 1984). It is important to find essential oils that have antimycotic effect against the most common species of fungi isolated from maize grain. Our data confirms that lemongrass,

clove, cinnamon, oregano and palmarosa oils possess in vitro antifungal activity against the species of *Fusarium* studied.

Acknowledgements

This work was supported by European Union (QLRT 1999-00996) and Spanish Government (Comisión Interministerial de Ciencia and Tecnología, CICIYT ALI98-0509-C04-01).

REFERENCES

- Bullerman, L. B. Lieu, F. Y. & Seire, A. S. (1977) Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science* 42: 1107-1116.
- Chao, S.C. & Young, D.G. (2000) Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essential Oil Research* 12: 630-649.
- Christensen, C. M. & Sauer, D.B. (1982) Microflora. In *Storage of cereal grains and their products* (C.M. Christensen, eds): 210-241. American Association of Cereal Chemists, INC., St. Paul, MN.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N. & Wold, S. (1999). *Introduction to Multi-and Megavariate Data Analysis using Projection Methods (PCA & PLS)*. Eds Umetrics AB. Sweden.
- Farag, R. S., Daw, Z. Y. & Abo-Raya, S. H. (1989) Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science* 54: 74-76.
- Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T.V. (1999) Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86: 985-990.
- Inouye, S., Watabable, M., Nishiyama, Y., Takeo, K., Akao, M. & Yamaguchi, H. (1998) Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses* 41: 403-410.
- Magan, N & Lacey, J. (1984). Effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. *Transaction of the British Mycological Society* 82: 83-93.
- Mahmound, A.-L. E. (1994) Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology* 19: 110-113.
- Maruzzella, J.C. & Balter, J. (1959) The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Disease* 43: 1143-1147.
- Mishra, A. K. & Dubey, N.K. (1994) Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1101-1105.
- Mitscher, L. A., Drake, S., Gollapudi, S.R. & Okwute, S. K. (1987) A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products* 50: 1025-1040.

- Montes-Belmont, R. & Carvajal, M. (1998) Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection* 61: 616-619.
- Paster, N., Juven, B. J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H. & Ravid, U. (1990) Inhibition effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11: 33-37.
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U. & Juven, B. (1995) Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection* 58: 81-85.
- Patkar, K. L., Usha, C. M., Shetty, H. S., Paster, N. & Lacey, J. (1993) Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology* 17: 4-51.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R. & Kole, C. (1996) Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro. *Microbios* 86: 237-246.
- Ramakrishna, N., Lacey, J. & Smith, J. E. (1996) The effects of fungal competition on colonization of barley grain by *Fusarium sporotrichioides* on T-2 toxin formation. *Food Additives and Contaminants* 13: 939-948.
- Salmeron, J. & Pozo, R. (1991) Effect of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and clove (*Eugenia caryophyllus*) on growth and toxigenesis of *Aspergillus gr. flavus*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 9: 83-87 [In Spanish].
- Sanchis, V., Abadias, M., Oncins, L., Nuria, S., Viñas, I. & Canela, R. (1995). Fumonisin B₁ and B₂ and toxigenic *Fusarium* strains in feeds from Spanish market. *International Journal of Food Microbiology* 27: 37-44
- Sinha, K. K., Sinha, A. K. & Prasad, G. (1993) The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology* 16: 114-117.
- Sohn, H., Seo, J. & Lee, Y. (1999) Co-occurrence of *Fusarium* mycotoxins in mouldy and healthy corn from Korea. *Food Additives and Contaminants* 16: 153-158.

Control of *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production in maize grain by the addition of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils

A. Velluti, V. Sanchis*, A.J. Ramos, S. Marín

Food Technology Department, Lleida University, CeRTA, Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain. Tel. 34 973-702535; Fax. 34 973-702596; E-mail: vsanchis@tecal.udl.es

Abstract

The effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils to prevent growth and fumonisin B₁ (FB₁) production by *F. verticillioides* at different a_w (0.95 and 0.995) and temperature levels (20 and 30°C) in irradiated maize grain was evaluated. All essential oils tested inhibited growth of *F. verticillioides* isolates under all conditions tested and FB₁ production was inhibited at 30°C and 0.995 a_w . There was no essential oil with a significant better ability to inhibit FB₁ production when compared to the others. The inhibitory effect on growth rate at 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ essential oil g^{-1} was higher than at 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, whereas no differences were observed between both levels tested on inhibitory effect on FB₁ production.

Keywords: *Fusarium*, fumonisins, water activity, temperature, maize, essential oil.

1. Introduction

Fusarium verticillioides is associated with disease at all stages of maize plant development, infecting the roots, stalk, and kernels (Munkvold and Desjardins, 1997). Moreover, *F. verticillioides* produces several mycotoxins such as fumonisins. These toxins have shown to induce leukoencephalomalacia in horses, pulmonary edema in swine and to be hepatotoxic and carcinogenic to rats. Maize and fumonisins have also been associated with incidence and increased risk of human esophageal cancer in regions of South Africa and China (Harrison et al., 1990; Gao and Yoshizawa, 1997).

Fungal growth and mycotoxin production result from the complex interaction of several factors, and therefore, an understanding of each factor involved is essential to understand the overall process and to predict and prevent mycotoxin development (Charmley et al., 1994). Temperature and water availability are the primary environmental factors that influence growth and interaction between *Fusarium* spp. and other fungal colonists (Marín et al., 1998).

Fungi-inhibiting chemicals (mainly low-molecular-weight organic acids) have been used for the preservation of stored grain. However, many disadvantages are associated with the use of organic acids (Christensen and Sauer, 1982) and there is a world trend towards reducing their use in grain and foodstuffs. Natural plant extracts may provide an alternative to these preservatives. Several other studies have examined the effect of compounds isolated from essential oils extracted from plants on fungi to search for natural fungicides and a number of these oil constituents have shown to be inhibitory (Chao and Young, 2000).

In general, the response to the different essential oils is dependent on the species of fungi tested, and it can range from a lack of inhibition (resistance) to various degrees of susceptibility (Pattnaik et al., 1996). Little is known about the effect of essential oils on growth and mycotoxin production by *Fusarium* species from corn and the impact on environmental conditions on this effect. Recently, Velluti et al. (2002) screened 37 essential oils, under *in vitro* conditions, for their inhibitory activity on growth of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum*. They found that cinnamon, clove, lemongrass, palmarose and oregano essential oils have the best antifungal activity against the three species of *Fusarium* tested.

In the present work, the aim was to study the antifungal potential of these five essential oils in maize grain, to prevent growth and fumonisin B₁ (FB₁) production by *F. verticillioides* at different a_w and temperature levels.

2. Materials and Methods

2.1. Culture material

The species tested in this study was *F. verticillioides*. Three different isolates of *F. verticillioides* were used: isolate 111 provided by Department of Biology, University of Roma "La Sapienza", Rome, Italy and isolates 25 N and 123 N, which belong to the Food Technology Department fungi collection of the University of Lleida, Spain.

2.2. Essential oils

The essential oils used were cinnamon, clove, lemongrass oregano and palmarose (Ravetllat Aromatics. S.L., Barcelona, Spain).

Stock solutions of each essential oil were prepared. Tween 80 (10%) was used as an emulsifying agent. Each essential oil was added to the irradiated maize to give final concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g/g}$ of maize.

2.3. Grain preparation at different water activities (a_w)

Spanish dent maize grain was irradiated with 12 k Grays of gamma irradiation and stored aseptically at 4°C. In this way, the grain contained no fungal infection or contamination but had retained the ability to germinate. The initial water content of the grain was 139 g kg⁻¹ (= 0.71 a_w). For all experiments, irradiated maize was weighed into sterile flasks and rehydrated to the desired treatment a_w levels (0.95 and 0.995) by addition of sterile distilled water and essential oils solutions. The amount of water added was calculated from the moisture adsorption curve of the grain. The grain treatments were allowed to equilibrate at 7°C for 48 hours, with periodic shaking. Finally, the a_w values were confirmed by using a water activity meter (AquaLab, Pullman, Washington, USA).

2.4. Inoculation, incubation and growth assessment

Rehydrated maize was placed in sterile Petri plates (20 g per plate, approximately) forming a single layer of grain. A 5 mm diameter agar disk was taken from the margin of a 5 day old growing colony on maize meal agar (MMEA) at 26°C of each isolate and transferred to the centre of each plate. Plates containing grain at the same a_w level and the same essential oil were placed in containers along with beakers containing glycerol water solutions of the same a_w as the plates in order to create an atmosphere with the same equilibrium relative humidity. Containers were incubated at 20 and 30°C. All treatments were repeated twice. Diameters of growing colonies were measured every day with the aid of a binocular magnifier. Two diameters were obtained from each colony and growth rates expressed as mm d^{-1} were calculated by linear regression of colony radius against time for each strain at each set of conditions tested. After 28 days, the grains were frozen at -20°C for later FB_1 analysis.

2.5. Fumonisin B_1 analyses

CEN (2000) method for determination of fumonisin B_1 was followed.

2.6. Dry matter determination

The dry matter content of each sample was determined by drying subsamples of approximately 10 g at 105°C for 17 h (ISTA, 1976). Thus, all results are presented on a dry weight basis.

2.7. Statistical analyses of the data

A full factorial design was used. The factors were a_w , temperature, isolates and concentration of essential oils and the responses were radii of growing colonies and FB_1 production. Analysis of variance was performed for colony radii and FB_1 concentrations using SAS version 8.02 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA). Statistical significance was judged at the level $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of the presence of the essential oils on growth rates of *F. verticillioides* spp.

All single factors (a_w , temperature, essential oils, concentrations, isolates) as well as some all two and three way interactions had a significant effect on growth of *F. verticillioides* (Table 1). The five essential oils analysed had an inhibitory effect on growth of *F. verticillioides*; their efficacy depended mainly on a_w and temperature levels. In general, the inhibitory effect at 1000 μg essential oil/g was higher than that at 500 $\mu\text{g/g}$. Growth was faster at 0.995 a_w (Figure 1) than at 0.95 a_w (Figure 2); and at both a_w , more at 30 than 20°C. The essential oils were more effective as preservatives under limiting conditions for growth: at the lower a_w level and lower temperature. Among the essential oils, oregano and sometimes lemongrass and clove oils were the most effective at 0.995 a_w , while at 0.95 a_w , oregano and clove oils were the more useful ones, being clove oil able to completely inhibit growth of all isolates at 20°C. The pattern of inhibition was quite similar for all three isolates.

Table 1. Analysis of variance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on growth of *F. verticillioides* isolates (i) at different a_w and temperature (t) levels.

	DF	Cinnamon oil		Clove oil		Lemongrass oil	
		MS	F	MS	F	MS	F
c	2	5326.1	126.6**	10447.1	167.0**	5245.1	155.9**
t	1	10885.0	256.7**	4016.5	64.2**	8686.6	258.2**
cxt	2	71.0	1.7	217.9	3.5*	327.9	9.8**
i	2	1934.6	45.6**	1328.2	21.2**	1914.1	56.9**
cx i	4	59.5	1.4	73.6	1.2	335.5	9.9**
tx i	2	232.6	5.5**	414.0	6.6**	529.8	15.8**
cxtxi	4	23.9	0.6	47.8	0.8	138.7	4.1**
a_w	1	72005.5	1698.3**	104846.6	1676.2**	56019.7	1665.1**
cx a_w	2	2089.0	49.3**	7272.8	116.3**	216.6	6.4**
tx a_w	1	861.3	20.3**	176.8	2.8	4130.8	122.8**
cxtx a_w	2	193.6	4.6*	541.6	8.7**	1053.2	31.3**
a_w xi	2	157.1	3.7*	2.9	0.1	180.3	5.4**
cx a_w xi	4	114.6	2.7*	248.3	4.0**	199.6	5.9**
tx a_w xi	2	60.6	1.4	8.5	0.1	155.9	4.6**
cxtx a_w xi	4	21.4	0.5	105.2	1.7	222.4	6.6**

	DF	Palmarose oil		Oregano oil	
		MS	F	MS	F
c	2	2749.9	78.7**	11586.0	196.2**
t	1	8433.5	241.5**	8560.7	145**
cxt	2	41.7	1.2	56.3	1.0
i	2	2410.4	69.0**	806.6	13.7**
cx i	4	378.9	10.9**	163.7	2.8*
tx i	2	271.0	7.8**	5.5	0.1
cxtxi	4	285.3	8.2**	112.9	1.9
a_w	1	53561.0	1533.6**	76859.3	1301.5**
cx a_w	2	1625.1	46.5**	1887.5	32.0**
tx a_w	1	2288.5	65.5**	637.5	10.8*
cxtx a_w	2	204.7	5.9**	11.3	0.2
a_w xi	2	559.7	16.0**	6.9	0.1
cx a_w xi	4	337.1	9.7**	149.0	2.5*
tx a_w xi	2	243.2	7.0**	97.7	1.7
cxtx a_w xi	4	548.6	15.7**	10.7	0.2

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

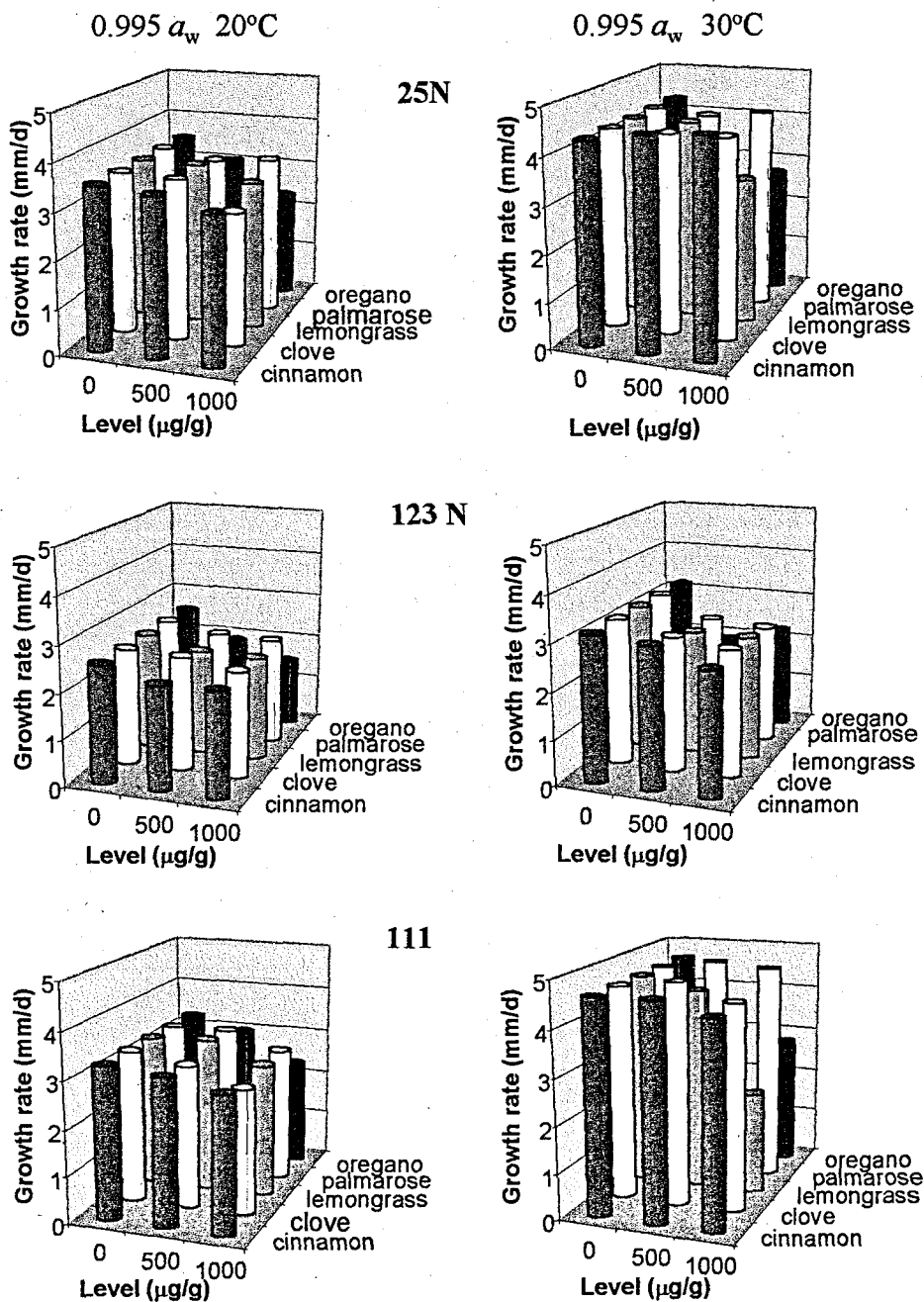


Figure 1. Effect of essential oils on growth rates of *F. verticillioides* spp. at 0.995 a_w .

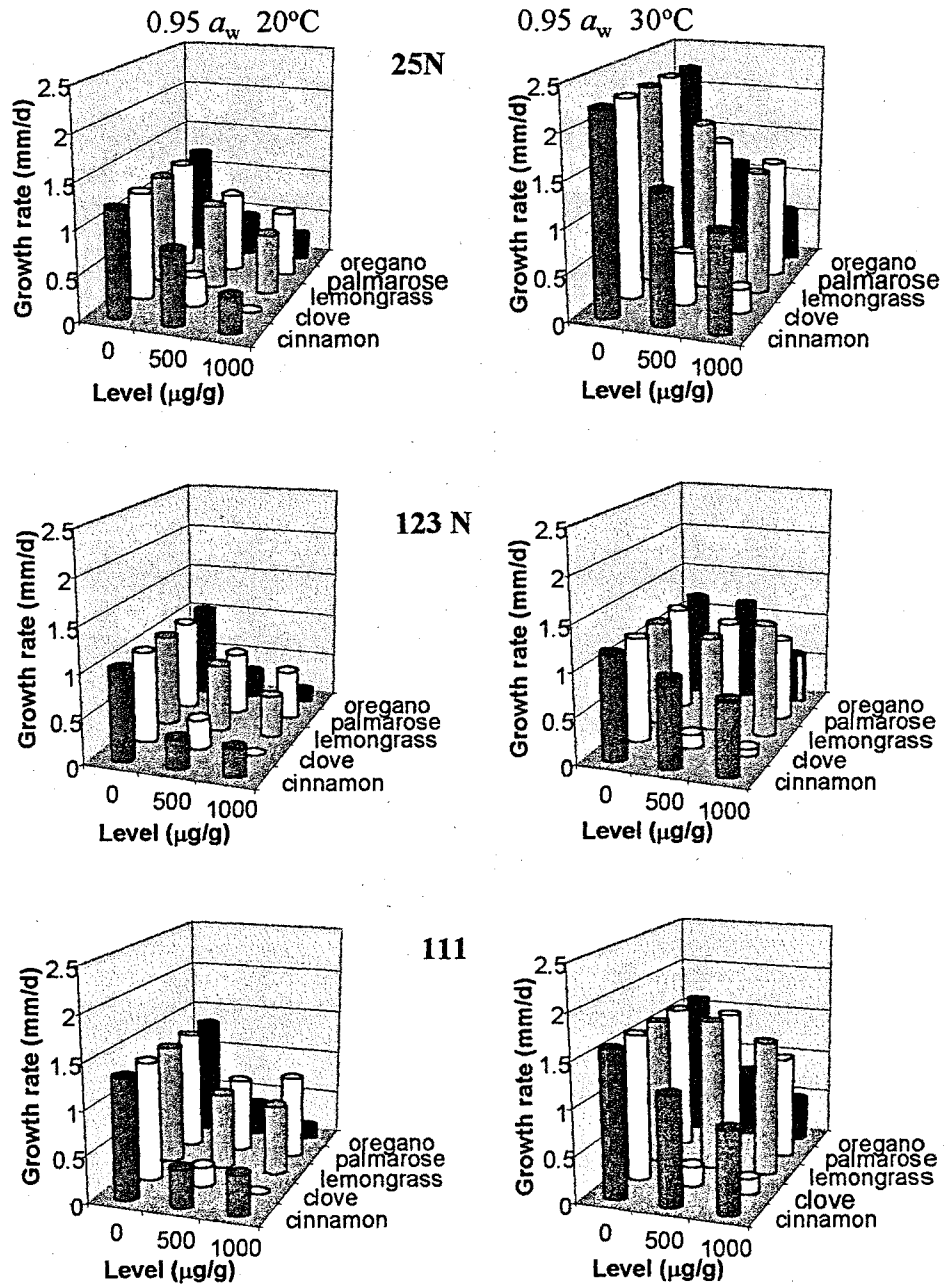


Figure 2. Effect of essential oils on growth rates of *F. verticillioides* spp. at $0.95 a_w$.

3.2. Effect of the presence of the essential oils on fumonisin B₁ production by *F. verticillioides* spp.

Almost all single factors a_w , temperature, essential oils, concentrations, and isolates as well as some of their interactions had a significant effect on FB₁ production by *F. verticillioides*.

When analyses were carried out separately for each essential oil, different significant factors were found in each case (Table 2). FB₁ production was very dependent on a_w levels assayed. In the absence of essential oils, higher levels of FB₁ were found at 0.995 a_w , sometimes at 20°C and sometimes at 30°C, depending on the isolates (Figure 3). At 0.95 a_w less FB₁ was produced (<100 µg g⁻¹), being the levels higher at 20 than at 30°C (Figure 4).

No consistent pattern could be found in terms of the efficacy of the essential oils except for that at 0.995 a_w and 30°C; under these conditions all essential oils tested seemed to be clearly inhibitory.

When statistical analysis was made for each essential oil tested separately, the following remarks could be made:

Cinnamon oil: No significant effect was found at 20°C regardless of a_w , while at 30°C, there was a significant enhancement of FB₁ production at 0.95 a_w and a significant inhibition at 0.995 a_w (both concentrations, 500 and 1000 µg g⁻¹ did not inhibit in a significant different way).

Clove oil: At 20°C no inhibitory effect was found, while at 30°C, only at 0.995 a_w all isolates were equally inhibited by both concentrations tested.

Lemongrass oil: No significant effect of lemongrass oil was found at 20°C neither at 30°C/0.95 a_w . Again, at 0.995 a_w /30°C all isolates were equally inhibited by both concentrations tested.

Palmarose oil: At 20°C the inhibition was significant only at 0.995 a_w , and for the 25N strain. At 30°C, FB₁ production was enhanced by palmarose oil concentrations at 0.95 a_w , and inhibited at 0.995 a_w .

Oregano oil: At 20°C no inhibitory effect was found, while at 30°C, only at 0.995 a_w all isolates were equally inhibited by both concentrations tested.

Table 2. Analysis of variance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on FB_1 production by *F. verticillioides* isolates (i) at different a_w and temperature (t) levels.

	Cinnamon oil			Clove oil		Lemongrass oil	
	DF	MS	F	MS	F	MS	F
C	2	746.7	1.3	42.8	0.3	153.5	2.4
I	2	664.5	1.1	1290.3	7.8*	602.6	24.6**
cxi	4	569.2	1.0	217.9	1.3	87.1	1.3
a_w	1	23226.9	39.9**	20887.2	126.7**	13937.7	213.8**
$c \times a_w$	2	945.1	1.6	43.5	0.3	111.8	1.7
$i \times a_w$	2	760.8	1.3	1406.7	8.5*	1581.5	24.3**
$c \times i \times a_w$	4	556.4	1.0	181.9	1.1	80.0	1.2
t	1	10970.1	18.9**	8295.2	50.3**	4774.6	73.2**
$c \times t$	2	2060.0	3.5*	1158.3	7.0*	539.7	8.3*
$i \times t$	2	261.0	0.5	952.5	5.8*	1362.2	20.9**
$c \times i \times t$	4	580.4	1.00	159.9	1.0	61.1	0.9
$a_w \times t$	1	9440.0	16.2**	7667.2	46.5**	4062.6	62.3**
$c \times a_w \times t$	2	2305.0	4.0*	1489.1	9.0*	734.6	11.3*
$i \times a_w \times t$	2	311.8	0.5	801.5	4.9*	1313.2	20.1**
$c \times i \times a_w \times t$	4	597.6	1.0	207.8	1.26	77.3	1.2

	Palmarose oil			Oregano oil	
	DF	MS	F	MS	F
c	2	843.9	12.0**	5652.6	24.5**
I	2	498.1	7.1*	10401.7	45.0**
cxi	4	201.7	2.9*	1075.3	4.7*
a_w	1	5686.6	81.0**	62553.0	270.8**
$c \times a_w$	2	815.0	11.6**	5880.4	25.5**
$i \times a_w$	2	449.7	6.4*	10809.8	46.8**
$c \times i \times a_w$	4	180.1	2.6	1191.6	5.2*
t	1	1220.4	17.4*	41567.8	180.0**
$c \times t$	2	48.4	0.7	10289.1	44.6**
$i \times t$	2	226.6	3.2	9056.3	39.2**
$c \times i \times t$	4	223.9	3.2*	1246.6	5.4*
$a_w \times t$	1	890.0	12.7*	38233.0	165.5**
$c \times a_w \times t$	2	128.4	1.8	10713.9	46.4**
$i \times a_w \times t$	2	183.1	2.6	9237.5	40.0**
$c \times i \times a_w \times t$	4	186.0	2.7*	1392.8	6.0**

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

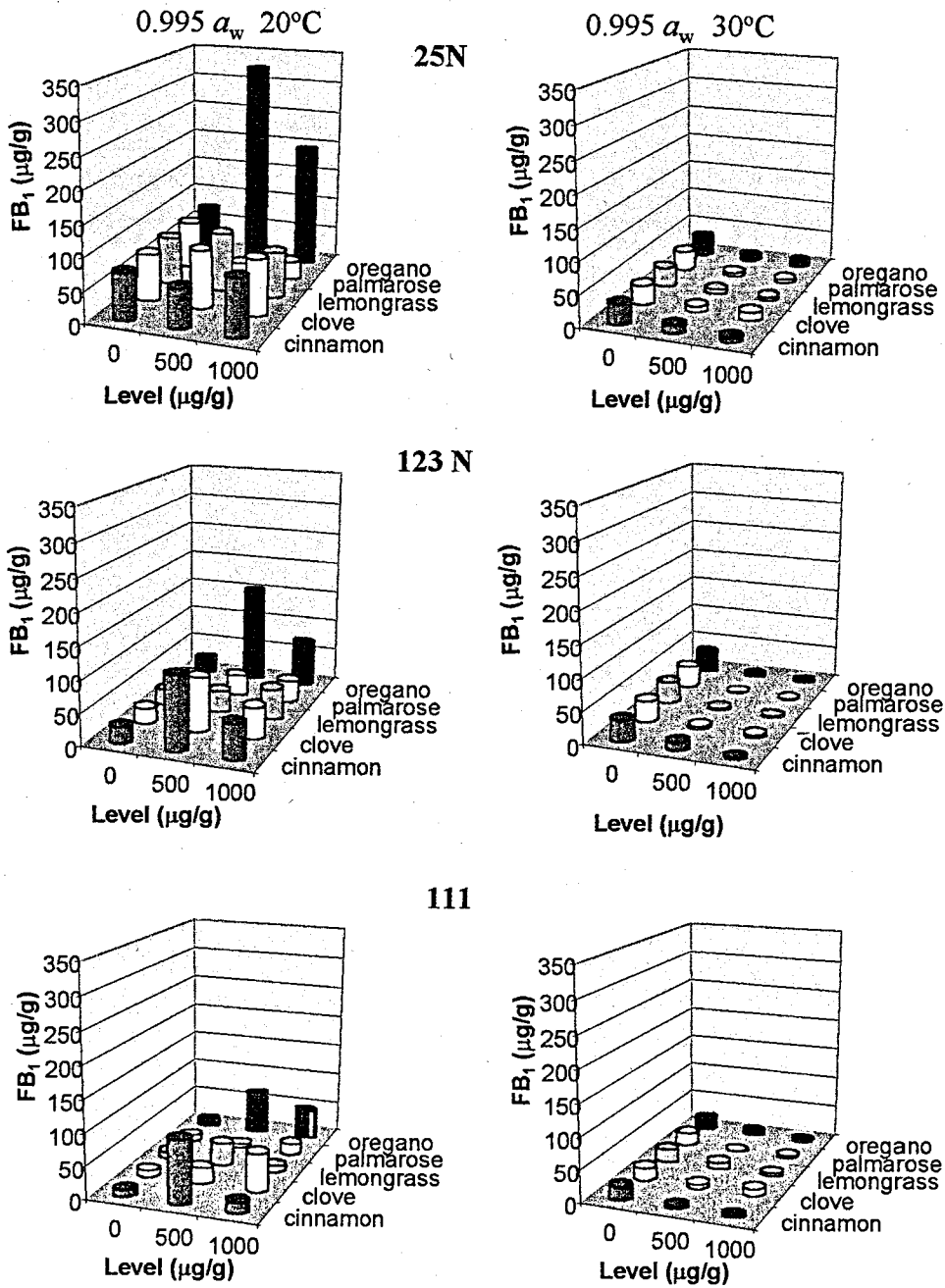


Figure 3. Effect of essential oils on fumonisin B₁ production at 0.995 a_w by *F. verticillioides* spp.

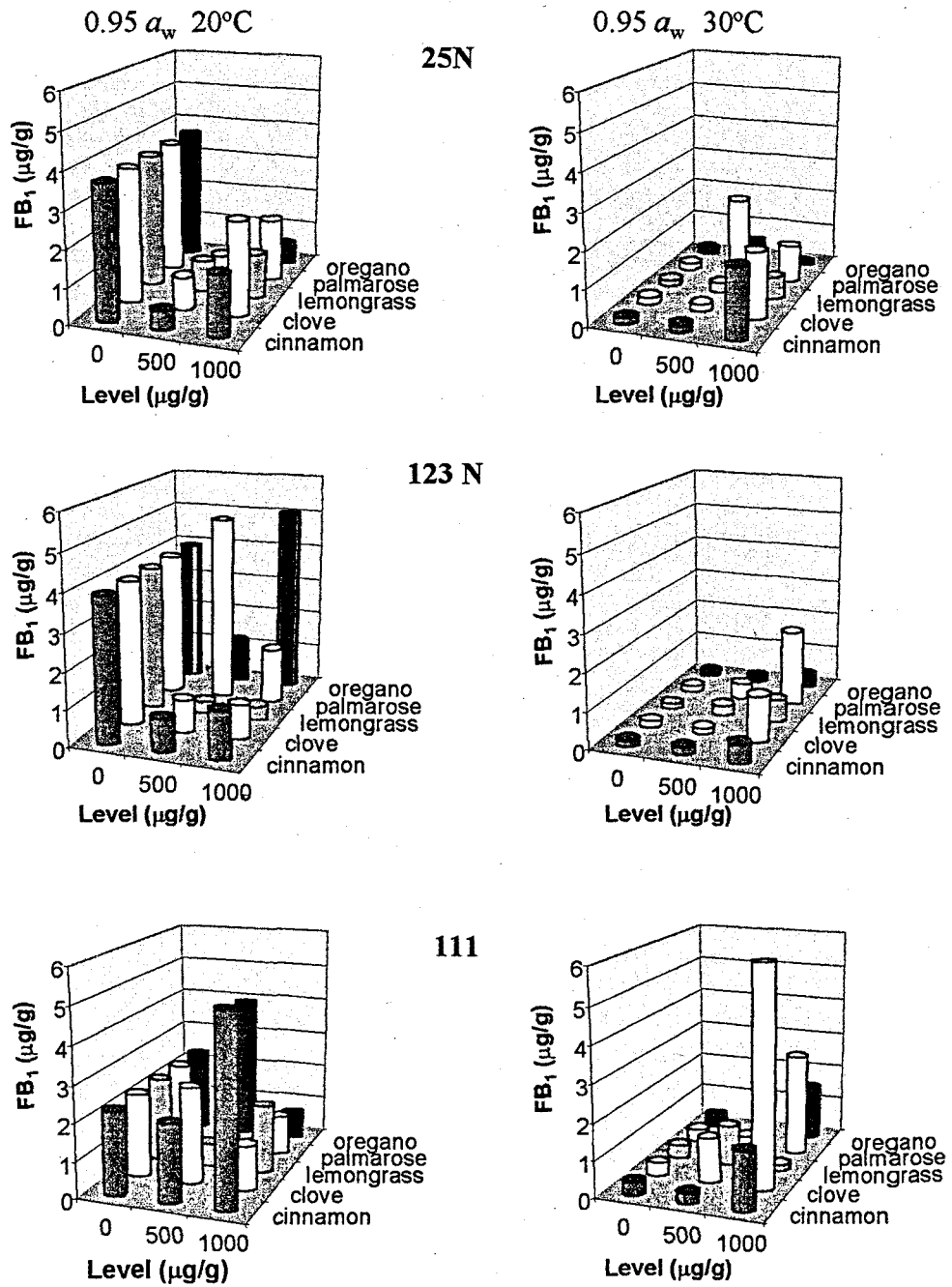


Figure 4. Effect of essential oils on fumonisin B₁ production at 0.95 a_w by *F. verticillioides* spp.

4. Discussion

FB₁ production was inhibited by all five essential oils tested at 30°C and 0.995 a_w . The results were consistent for all three isolates tested and there was no essential oil with a significant better ability to inhibit FB₁ production when compared to the others. Although all five essential oils tested also inhibited growth of *F. verticillioides* isolates under all conditions tested, the optimum conditions were completely different, being more effective at the lower temperature (20°C) and a_w (0.95). Similarly, Velluti et al. (2002) reported that, although a_w had not a clear effect in the inhibitory activity of lemongrass, cinnamon, clove, palmarose and oregano oils against *F. verticillioides* growth under *in vitro* conditions, a trend of these essential oils to better inhibit at the lower a_w tested was observed. However, Paster et al. (1995) found that oregano oil decreased the levels of infection in wheat grains with 20% moisture contents (m.c.) more than wheat with 15% m.c. They suggested that the penetration of the oils into the internal parts of the grain is improved in the presence of water, and therefore pathogens could be more easily controlled in the inner parts of the moist grains.

There was no correlation between growth inhibition and FB₁ inhibition. This means that the reduction of FB₁ was not due to the decreased presence of *F. verticillioides*. Other authors have reported that, sometimes, toxin production may be inhibited without fungal growth being affected (Bullerman, 1974). It has been reported that inhibitory effect of cinnamon and clove oils are higher on aflatoxin production than on growth of *Aspergillus flavus* (Salmeron and Pozo, 1991). The antimycotoxigenic activity of essential oils could be attributed to the presence of different chemical groups, which could react with active sites of target enzymes, affecting mycotoxin production without affecting the growth of fungi. Further studies with other mycotoxigenic *Fusarium* on this topic should be performed to fully understand the overall processes.

The inhibitory effect on growth rate at 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ essential oil was higher than at 500 $\mu\text{g g}^{-1}$, whereas no differences were observed between both levels tested on inhibitory effect on FB₁ production. It is difficult to compare with the levels used by other authors; several factors such as the methodology, the microorganisms and the essential oils used are known to influence the results of antimicrobial susceptibility tests (Pattnaik et al., 1996).

Our results revealed that oregano oil was the most effective among the five oils tested in inhibiting growth of *F. verticillioides*. FB₁ production,

however, was only decreased by oregano oil at 0.995 a_w and 30°C. The ability of oregano oil to inhibit growth of *A. flavus*, *A. ochraceus* and *A. niger* has been previously evaluated (Paster et al. 1990; Paster et al. 1995). *In vivo* studies made by the same authors showed that oregano oil was highly effective in controlling the internal wheat fungi (Paster et al. 1995).

Our results showed the inhibitory activity of clove and cinnamon oils on growth rate of *F. verticillioides* in irradiated maize grain. Similarly, Velluti et al. (2002) found that clove and cinnamon oils reduced *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* colony growth in synthetic medium; 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of clove and cinnamon oils reduced colony growth about 62 and 80 %, respectively. Despite of the promising results found in the literature on aflatoxin inhibition, FB_1 production reduction was only observed when using clove and cinnamon oils under limited abiotic conditions. Chao et al. (2000) reported that cinnamon oil was inhibitory for *A. niger* and *Rhizopus oligosporus* under *in vitro* conditions. Mahmoud (1994) observed that 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of cinnamaldehyde completely suppressed growth of *A. flavus* and consequently prevented formation of aflatoxin in culture medium [65 to 75 % of cinnamon essential oil are compound form cinnamaldehyde (Salmeron and Pozo, 1991)]. Several other groups have reported the effect of clove and cinnamon oils on inhibition of growth and aflatoxin production by *A. flavus* and *A. parasiticus* in synthetic medium (Farag et al. 1989; Salmeron and Pozo, 1991; Sinha et al. 1993; Patkar et al., 1993). In maize grain, Sinha et al., (1993) reported that cinnamon and clove oils were effective against aflatoxin formation by *A. flavus* under favourable conditions after 10 days.

Lemongrass oil was an effective inhibitor of *F. verticillioides* growth, but FB_1 production was only inhibited at 0.995 a_w and 30 °C. It has been reported that lemongrass oil decreases *F. verticillioides* growth rate in PDA to a 90% and 100% at 500 and 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively (Mishra and Dubey, 1994). Velluti et al. (2002) determined that the percentage of reduction in colony diameters was about 45-60% at 0.995 a_w and 75-95% at 0.95 a_w when lemongrass oil dose was increased from 0 to 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for all the *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* strains studied in synthetic media. However, it has been reported that *F. verticillioides* growth is not affected when lemongrass oil is added in culture medium, but samples of maize treated with lemongrass powder (0.5w/w) by the same authors, did not show signs of visual deterioration under ambient condition after 10 days (Adegoke and Odesola, 1996).

We observed that in irradiated maize grain, palmarose oil was effective in inhibiting growth of *F. verticillioides* but the effect on FB₁ production was very dependent of a_w ; at 30°C FB₁ production was enhanced at 0.95 a_w , and inhibited at 0.995 a_w . Pattnaik et al. (1996) reported that palmarose oil had inhibitory activity against the twelve tested fungi; the response ranged from various degrees of susceptibility to total inhibition.

In summary, this study shows the antifungal activity against *F. verticillioides* that oregano, clove, cinnamon, lemongrass and palmarose oils have when applied directly to maize grain. Moreover, their inhibitory activity on FB₁ production was shown for the first time, under limited abiotic conditions.

Further studies with other mycotoxigenic *Fusarium* species might be useful for better understanding the antimycotoxigenic properties of these essential oils. On the other hand, it would be important to test their efficacy when the natural mycoflora of grain is present.

Acknowledgements

This work was supported by European Union (QLRT 1999-00996) and Spanish Government (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, CICYT ALI98-0509-C04-01).

The authors are grateful to Montse Prim for her technical assistance

References

- Adegoke G.O., Odesola, B.A., 1996. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 81-84.
- Bullerman, L.B., 1974. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. *Journal of Food Science* 39, 1163-1164.
- CEN, 2000. European committee for standarization. Foostuffs-Determination of fumonisins.
- Chao, S.C., Young, D.G., 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essential Oil Research* 12, 630-649.
- Charmley, L.L., Rosenber, A., Trenholm, H.L., 1994. Factors responsible for economic losses due to *Fusarium* mycotoxin contamination of grains, foods and feedstuffs. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Ed), *Mycotoxins in Grain Compounds other than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA, pp. 471-486.
- Christensen, C.M., Sauer, D.B., 1982. Microflora. In: Christensen, C.M. (Ed), *Storage of cereal grains and their products*. American Association of Cereal Chemists, INC., St. Paul, MN, pp. 210-241.

Farag, R.S., Daw, Z.Y., Abo-Raya, S.H., 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *Journal of Food Science* 54, 74-76.

Gao, H.P., Yoshizawa, T., 1997. Further study on *Fusarium* mycotoxins in corn and wheat from high-risk area for human esophageal cancer in China. *Mycotox* 45, 51-55.

Harrison, L.R., Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E., Cole, J.R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2, 217-221.

ISTA (International Seed Testing Association), 1976. International rules for seed testing. *Seed Science Technology* 43: 3-77.

Mahmound, A.-L.E., 1994. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology* 19, 110-113.

Marín, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Vinas, I., Magan, N., 1998. Environmental factors, *in vitro* interspecific interactions, and niche overlap between *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. graminearum*, *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from maize grain. *Mycological Research* 102, 831-837.

Mishra, A.K., Dubey, N.K., 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1101-1105.

Munkvold, G.P. and Desjardins, A.E., 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence?. *Plant Disease* 81, 556-564.

Paster, N., Juven, B.J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H., Ravid, U., 1990. Inhibition effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 11, 33-37.

Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B.J., 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection* 58, 81-85.

Patkar, K.L., Usha, C.M., Shetty, H.S., Paster, N., Lacey, J., 1993. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology* 17, 4-51.

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Kole, C., 1996. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. *Microbios* 86, 237-246.

Salmeron, J., Pozo, R., 1991. Efecto de la canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y el clavo (*Eugenia caryophyllus*) sobre el crecimiento y toxigenesis de *Aspergillus* gr. *flavus*. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 9, 83-87.

Sinha, K.K., Sinha, A.K., Prasad, G., 1993. The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology* 16, 114-117.

Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2002. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F.*

proliferatum and *F. graminearum* on maize-based agar media. Food Microbiology (submitted).

