

(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

Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain

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

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

Keywords: Fusarium; fumonisins; essential oils; maize; water activity.

Abstract

The effect of cinnamon, clove, oregano, palmarose and lemongrass oils on growth and FB₁ production by three different isolates of *F. proliferatum* in irradiated maize grain at 0.995 and 0.95 a_w and at 20 and 30°C was evaluated. The five essential oils inhibited growth of *F. proliferatum* isolates at 0.995 a_w at both temperatures tested, while at 0.95 a_w only cinnamon, clove and oregano oils were effective in inhibiting growth of *F. proliferatum* at 20°C and none of them at 30°C. Cinnamon, oregano and palmarose oils had significant inhibitory effect on FB₁ production by the three strains of *F. proliferatum* tested at 0.995 a_w and both temperatures, while clove and lemongrass oils had only significant inhibitory effect at 30°C. No differences were found using 500 or 1000 μg essential oil g^{-1} . At 0.95 a_w none of the essential oils tested had any significant effect on FB₁ production. The results suggest that mainly cinnamon and oregano oils could be effective in control of growth and FB₁ production by *F. proliferatum* in maize under preharvest conditions.

1. Introduction

More than 1340 plants are known to be potential sources of antimicrobial compounds but few have been studied scientifically (Wilkins and Board, 1989). It appears that there is a relationship between the chemical structures of the most abundant compounds in the essential oils and their antifungal effect. Generally, the extent of the inhibition of the oils could be attributed to the presence of an aromatic nucleus containing a polar functional group (Farang et al., 1989). Over 30000 different components isolated from plant oils, compounds containing phenol groups are those most used in the food industry (Meeker and Linke, 1988).

On the other hand, some publications have documented the antimicrobial activity of lemongrass, cinnamon, clove, palmarose and oregano oils (Farang et al., 1989; Chao and Young 2000; Hammer et al., 1999; Inouye et al. 1998; Mishra and Dubey, 1994; Paster et al., 1995; Patkar et al., 1993; Pattnaik et al., 1996; Salmeron and Pozo, 1991; Sinha et al., 1993) against different microbial species. Lemongrass oil is an effective postharvest fungitoxicant of higher-order plant origin potentially suitable for protection of foodstuffs against storage fungi (Mishra and Dubey, 1994). The effect of clove and cinnamon oils on inhibiting growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* has been reported (Bullerman et al., 1977; Montes-Belmont and Carvajal, 1998; Sinha et al., 1993). In maize grain cinnamon and clove oils were effective against aflatoxin formation by *A. flavus* after 10 days under favourable conditions for mycotoxin production (Sinha et al., 1993). 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). *In vivo* studies 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 palmarose oil had some inhibitory activity against twelve fungi tested; the response ranged from various degrees of susceptibility to total inhibition. It was shown that the response to this oil is dependent on the species of fungi tested.

Fusarium verticillioides and *F. proliferatum* are probably the most important producers of fumonisin B₁ (FB₁) as they are common contaminants of corn in many areas of the world (Shephard et al., 2000). They are usually described as field fungi but they occasionally develop in storage when a_w is high and temperature low (Lacey and Magan, 1991). Thirty-seven essential oils have been screened as inhibitors of mycelial growth of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in maize

meal extract agar (Velluti et al., 2002a). It was found that cinnamon, clove, oregano, palmarose and lemongrass oils were the best oils tested. In irradiated maize grain, these five essential oils have shown to have inhibitory effect on growth of *F. verticillioides* under different temperature (20- 30°C) and water activity (a_w) (0.95-0.995) conditions and to inhibit FB_1 production at 30°C and 0.995 a_w (Velluti et al., 2002b). The objective of the present work was to study the effect of cinnamon, clove, oregano, palmarose and lemongrass oils on growth and FB_1 production by *F. proliferatum* in irradiated maize grain at different a_w and temperatures conditions.

2. Materials and Methods

2.1. Culture material

Three different isolates of *F. proliferatum* were used for this studies: isolate 1097 provided by Department of Biology, University of Roma "La Sapienza", Rome, Italy, and isolates 73 N and 37 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). The analyses of the main components of each essential oil (Table 1) were run on a Hewlett Packard GC-MS system (GC 6890; MSD 5973, Hewlett Packard, Vienna, Austria) by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Química Orgánica General, Madrid, 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).

Table 1. Essential oils tested: the main components and their relative contents (%).

Cinnamon oil		Clove oil		Lemongrass oil	
α -curbebene	<1.0	humulene	1.5	limonene	5.4
linalool	1.8	cariophyllene	8.2	methyl heptenone	1.4
cariophyllene	4.6	eugenol	88.2	neral	28
eugenol	82.3	cariophyllene oxide	<1.0	geranial	52
cinnamaldehyde	1.0			geraniol	2.0
2-propionyl	1.0			geranyl acetate	3.6
benzodioxol					
eugenil acetate	2.1				
cinnamil alcohol acetate	1.0				

Palmarose oil		Oregano oil	
linalool	3.8	γ -terpinene	1.8
cariophyllene	2.5	<i>p</i> -cimeme	16.7
geraniol	87.6	linalool	2.1
geranyl acetate	1.1	cariophyllene	2.1
3-carene	1.5	thymol	0.2
		cravacrol	70.0
		phenyl-methyl-benzoate	1.3

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 25°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 by HPLC 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 concentration. 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 5 % level.

3. Results

3.1. Effect of the addition of the essential oils on growth rates of *F. proliferatum* spp.

a_w , temperature and concentrations of essential oils as well as some all two and three way interactions had a significant effect on growth of *F. proliferatum* (Table 2). No significant differences between the three isolates tested were shown when cinnamon, oregano, palmarose and lemongrass oils were used. The different isolates, however, had different responses to a_w , temperature and essential oil concentration. The five essential oils analysed had an inhibitory effect on growth of *F. proliferatum* at $0.995 a_w$ at both temperatures (Figure 1). At $0.95 a_w$, the effect of essential oils on growth

rates was dependent on the temperature (Figure 2). At 20°C, cinnamon, clove and oregano oils (1000 µg essential oil/g) had inhibitory effect, while at 500 µg g⁻¹ only cinnamon and oregano were effective. Lemongrass and palmarose oils enhanced growth of the three strains tested. At 30°C none of the essential oils analysed had any inhibitory effect on growth rates of the three strains of *F. proliferatum*, moreover, the growth rate was enhanced when the essential oils were added.

3.2. Effect of the addition of the essential oils on fumonisin B₁ production by *F. proliferatum* spp.

Almost all single factors a_w , temperature, concentrations, and isolates as well as some of their interactions had a significant effect on FB₁ production by *F. proliferatum* (Table 3).

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 , more at 20°C than at 30°C (Figure 3). At 0.95 a_w less FB₁ was produced (< 4.5 µg g⁻¹), sometimes more at 20°C and sometimes more at 30°C, depending on the isolates (Figure 4).

When statistical analysis were made separately for a_w level, it showed that at 0.995 a_w and both temperatures, cinnamon, oregano and palmarose oils had significant inhibitory effect on FB₁ production by the three strains of *F. proliferatum* tested, while clove and lemongrass oils had only significant inhibitory effect at 30°C. No differences were found using 500 or 1000 µg oil/g. At 0.95 a_w none of the essential oils tested had any significant effect on FB₁ production.

Table 2. Analysis of variance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on growth of *F. proliferatum* 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	1093.3	19.7**	3539.3	68.8**	815.9	18.9**
t	1	12250.8	220.2**	8002.6	155.5**	3722.7	86.2**
c x t	2	1216.1	21.9**	663.1	12.9**	146.1	3.4*
i	2	153.1	2.8	331.9	6.5**	14.6	0.3
c x i	4	294.8	5.3**	50.7	1.0	217.6	5.0**
t x i	2	318.8	5.7**	140.7	2.7	486.0	11.3**
c x t x i	4	200.0	3.6**	104.8	2.0	11.8	0.3
a_w	1	75681.3	1360.2**	70368.8	1366.9**	68170.7	1578.8**
c x a_w	2	59.4	1.1	1399.9	27.2**	600.5	13.9**
t x a_w	1	4283.7	77.0**	2822.1	54.8**	1100.3	25.5**
c x t x a_w	2	653.6	11.8**	292.8	5.7**	84.2	2.0
a_w x i	2	301.5	5.4**	420.8	8.2**	148.9	3.5*
c x a_w x i	4	276.8	5.0**	101.5	2.0	178.6	4.1**
t x a_w x i	2	134.2	2.4	104.2	2.0	152.5	3.5*
c x t x a_w x i	4	54.9	1.0	38.7	0.8	37.1	0.9

	Palmarose oil			Oregano oil	
	DF	MS	F	MS	F
c	2	773.18	16.4**	3112.8	67.8**
t	1	5209.3	110.5**	6188.6	134.9**
c x t	2	353.9	7.5**	343.0	7.5**
i	2	26.9	0.6	135.3	3.0
c x i	4	166.6	3.5**	81.2	1.8**
t x i	2	149.6	3.2*	220.9	4.8
c x t x i	4	41.9	0.9	60.4	1.3
a_w	1	66807.6	1416.5**	85216.3	1856.8**
c x a_w	2	878.1	18.6**	102.0	2.2
t x a_w	1	810.2	17.2**	1571.5	34.2**
c x t x a_w	2	189.4	4.0*	83.5	1.8
a_w x i	2	114.8	2.4	343.2	7.5**
c x a_w x i	4	239.4	5.1**	147.5	3.2
t x a_w x i	2	5.9	0.1	33.0	0.7
c x t x a_w x i	4	50.7	1.1	47.9	1.0

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

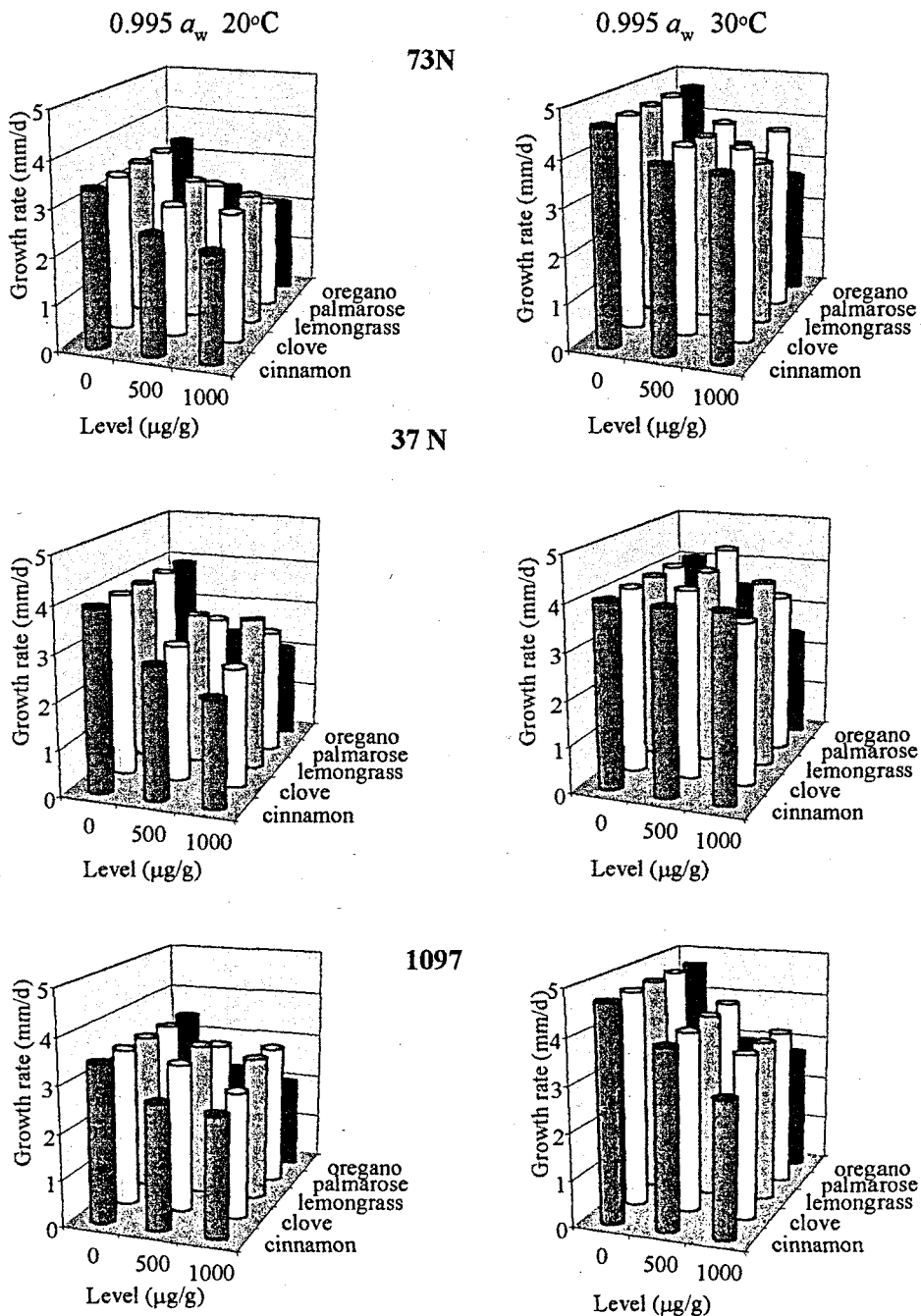


Figure 1. Effect of essential oils on growth rates of *F. proliferatum* spp. at 0.995 a_w .

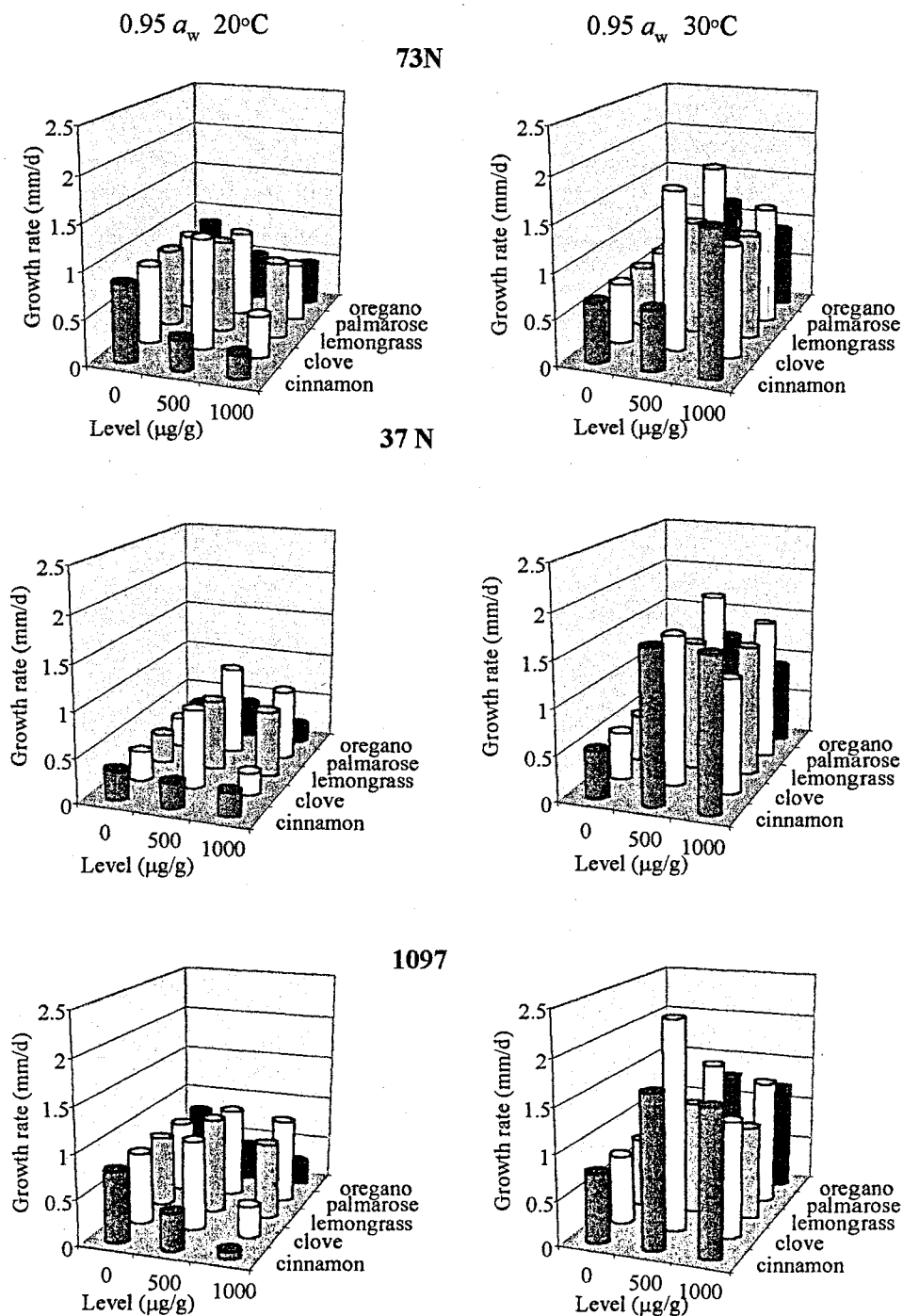


Figure 2. Effect of essential oils on growth rates of *F. proliferatum* spp. at 0.95 a_w .

Table 3. Analysis of variance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on FB_1 production by *F. proliferatum* 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	18532.1	11.9**	1758.8	0.3	8871.9	3.7*
i	2	5654.5	3.6*	35739.1	6.1**	18522.6	7.7**
cxi	4	5015.6	3.2*	1304.4	0.2	2282.4	1.0
a_w	1	133838.6	85.6**	368379.3	63.3**	212172.5	88.2**
$cx a_w$	2	17637.6	11.3**	1772.2	0.3	8415.0	3.5*
$ix a_w$	2	5744.1	3.7*	36306.2	6.2**	19087.3	7.9**
$cxix a_w$	4	5205.5	3.3*	1506.4	0.3	2384.4	1.0
t	1	70319.1	45.0**	263544.6	45.3**	113928.0	47.4**
cxt	2	4494.0	2.9	7781.4	1.3	1531.6	0.6
ixt	2	1634.2	1.0	26237.7	4.5*	6805.3	2.8
cxixt	4	2291.7	1.5	573.6	0.1	1333.2	0.6
a_wxt	1	69012.3	44.1**	260698.5	44.8**	113518.4	47.2**
$cx a_wxt$	2	4611.8	3.0	7464.5	1.3	1490.5	0.6
$ix a_wxt$	2	1653.5	1.1	26906.0	4.6*	7101.2	3.0
$cxix a_wxt$	4	2426..9	1.6	612.5	0.1	1322.8	0.6

	Palmarose oil			Oregano oil	
	DF	MS	F	MS	F
c	2	27510.5	18.4**	5652.6	24.5**
i	2	6871.9	4.6*	10401.7	45.0**
cxi	4	4977.7	3.3*	1075.3	4.7**
a_w	1	88947.5	59.4**	62553.0	270.8**
$cx a_w$	2	27505.4	18.4**	5880.4	25.5**
$ix a_w$	2	7154.2	4.8*	10809.9	46.8**
$cxix a_w$	4	5108.5	3.4*	1191.6	5.2**
t	1	39897.1	26.7**	41567.9	180.0**
cxt	2	7802.3	5.2*	10289.2	44.6**
ixt	2	2327.2	1.6	9056.3	39.2**
cxixt	4	2211.9	1.5	1246.6	5.4**
a_wxt	1	42754.1	28.6**	38233.0	165.5**
$cx a_wxt$	2	7258.7	4.9*	10713.9	46.4**
$ix a_wxt$	2	2373.7	1.6	9237.5	40.0**
$cxix a_wxt$	4	2373.8	1.6	1392.8	6.0**

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

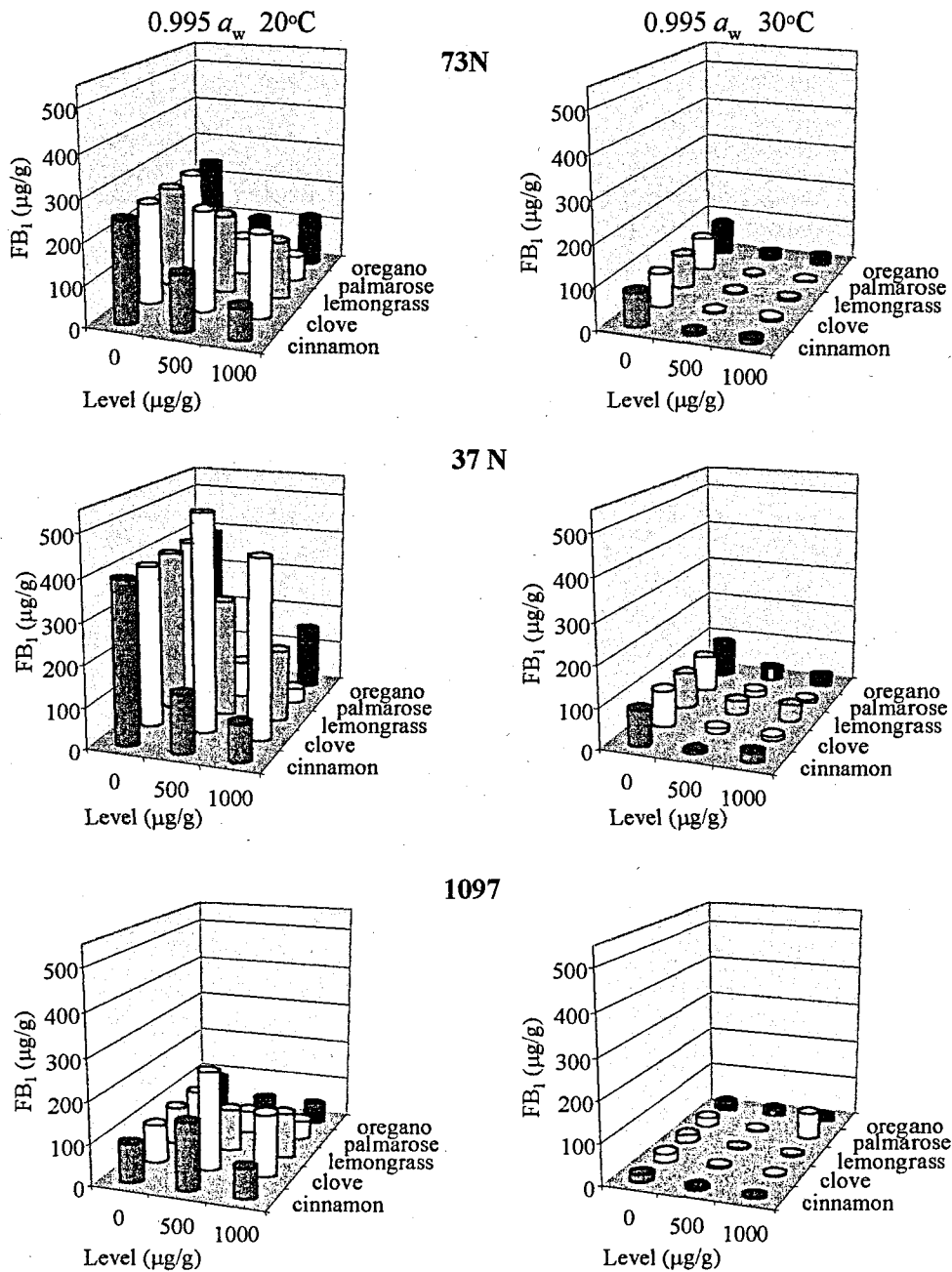


Figure 3. Effect of essential oils on fumonisin B₁ production at 0.995 a_w by *F. proliferatum* spp.

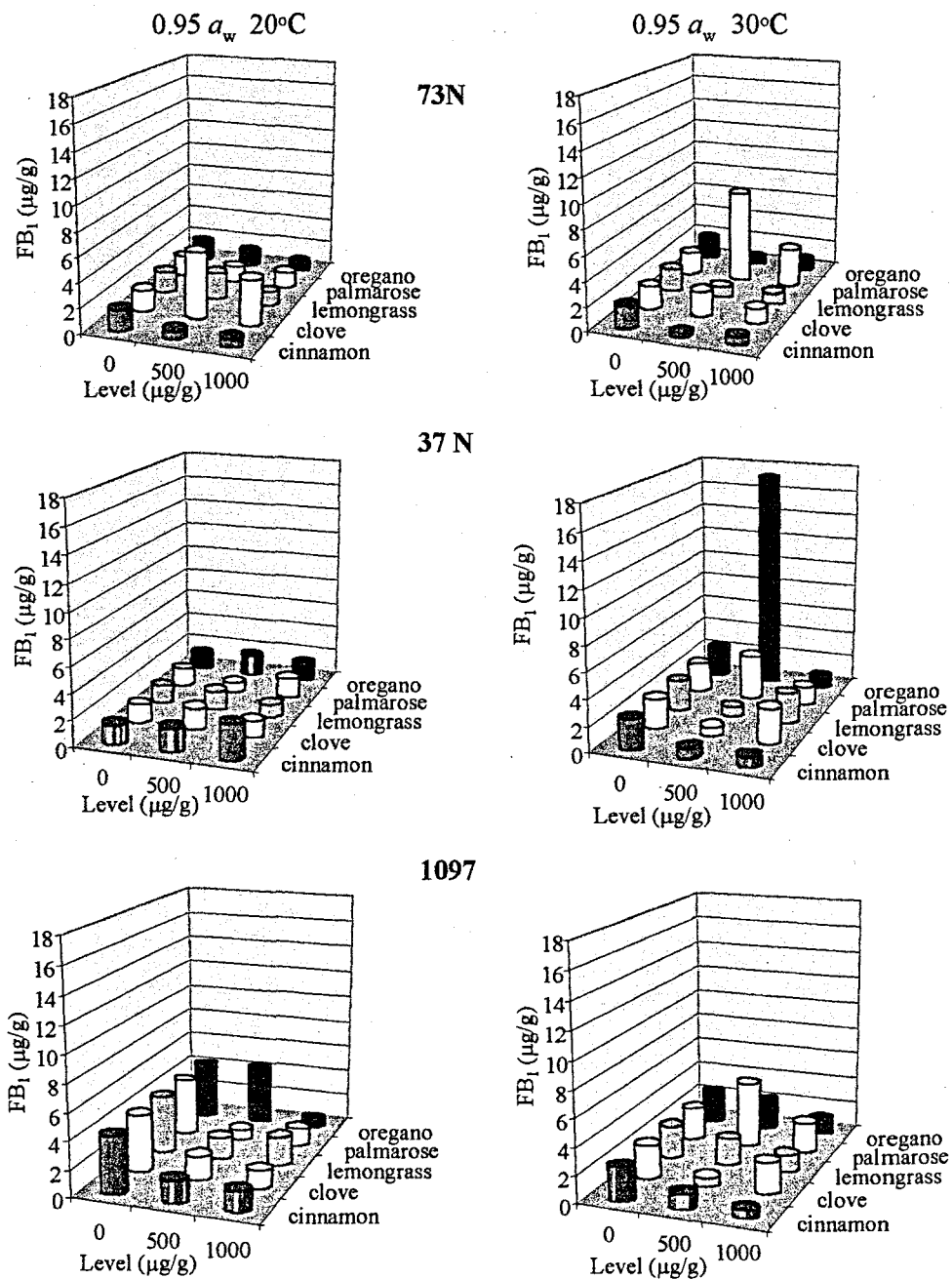


Figure 4. Effect of essential oils on fumonisin B₁ production at 0.95 a_w by *F. proliferatum*

4. Discussion

This study complements a previous work in which the inhibitory effect of cinnamon, clove, palmarose, lemongrass and oregano oils on growth of different isolates of *F. verticillioides* on irradiated maize was demonstrated at 0.995 and 0.95 a_w and at 20 and 30°C (Velluti et al., 2002b). However, although those conditions inhibited *F. verticillioides* growth, FB₁ production was only inhibited at 0.995 a_w and 30°C (Velluti et al., 2002b). The present study showed that although all five essential oils tested also inhibited growth of *F. proliferatum* isolates at 0.995 a_w , at 0.95 a_w only cinnamon, clove and oregano oils were effective in inhibiting growth of *F. proliferatum* at 20°C, and none of them at 30°C. Interestingly, they also inhibited FB₁ production by *F. proliferatum* at 0.995 a_w and 30°C. Moreover, cinnamon, oregano and palmarose oils had also inhibited effect at 0.995 a_w and 20°C. Despite these differences, the results indicated that the efficacy of essential oils is quite similar for the isolates of the two *Fusarium* species tested. The higher the a_w of the grain, the better the inhibitory effect of essential oils. *Fusarium* spp. maize infection is most likely just after silk emergence and its prevalence is considerably increased with wet weather later in the season; at this time moisture of the kernel is approximately 30% ($\cong 0.98-0.99 a_w$) (Bilgrami and Choudhary, 1998). The essential oils tested, mainly cinnamon and oregano oils, could be effective in controlling growth and FB₁ production by *F. proliferatum* and *F. verticillioides* in maize under preharvest conditions. It has been 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 (Paster et al., 1995).

There was no correlation between growth inhibition and FB₁ inhibition. This means that the reduction of FB₁ was not mainly due to the decreased presence of *F. proliferatum*. Similarly, no correlation has been found between inhibition of growth and FB₁ production by *F. verticillioides* (Velluti et al., 2002b). Other authors have reported that, sometimes, toxin production may be inhibited without fungal growth being affected (Bullerman, 1974).

It has been suggested that antimicrobial activity of essential oils depends not only on their components but also on the chemical structure of these components (Guenther, 1961). Three out of the five essential oils tested, oregano, clove and cinnamon oils, have aromatic compounds among their major components. Eugenol (the main component of clove and

cinnamon oils) and carvacrol (from oregano oil) are phenols. The antimicrobial activity of these oils can be attributed to the presence of an aromatic nucleus and a phenolic OH group that is known to be reactive and to form hydrogen bonds with active sites of target enzymes (Farang et al., 1989). It has been reported that the antioxidant effect of aromatic plants is due to the presence of hydroxyl groups in their phenolic compounds (Shahidi et al., 1992). Although clove and cinnamon oils have eugenol as major components, the abiotic conditions under which they had inhibitory effect on FB₁ production by *F. proliferatum* were not exactly the same. These results suggest that minor compounds may play an important role. A fraction of oregano essential oil containing only thymol and carvacrol exhibited significant antioxidant effect, but the antioxidant effectiveness of complete essential oil was higher than the activity of each separated compound (Milos et al., 2000).

The effect of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* was tested (Helander et al., 1998). It was noted that carvacrol and thymol decreased the intracellular ATP content of *E. coli* cell while simultaneously the extracellular ATP increased. This was taken to indicate a disruptive action of the compounds on the plasma membrane (Helander et al., 1998). Recently, it has been proposed that carvacrol acts as transmembrane carrier of monovalent cations by exchanging its hydroxyl proton for another ion such as a potassium ion causing destabilisation of the membrane (Ultee et al., 2002).

On the other hand, the main component of palmarose oil is geraniol, an aliphatic alcohol, and geranial and neral, aliphatic aldehydes, the main components of lemongrass oil. It has been reported that, geraniol, nerol and citronellol (aliphatic alcohol), completely suppressed growth of *A. flavus* and consequently prevented formation of aflatoxin (Mahmoud, 1994). Essential oils containing aliphatic alcohols and phenols, exhibited significant action against *A. aegyptiaceus*, *Penicillium cyclopium* and *Trichoderma viride* (Megalla et al., 1980). These results together with ours suggest that aliphatic alcohols could have antifungal action against a broad spectrum of fungi.

The link between macroscopic bioenergetic parameters (growth-rate, yield) and microscopic bioenergetic parameters (substrate utilisation, ATP levels, ATP/ADP ratios), intracellular redox balance, and the molecular reactions in stress response mechanisms is a field of research that is only just emerging (Brul and Coote, 1999).

Further studies with other mycotoxigenic *Fusarium* on this topic should be performed to compare the effectiveness of the essential oils and

therefore to optimise the abiotic parameters that encourage their antifungal power. Our data confirm that lemongrass, clove, cinnamon, oregano and palmarose oils possess antifungal and antimycotoxigenic activity against *F. proliferatum* isolates studied, mostly at high a_w . On the other hand, in both outdoor and storage environments the moulds occur together with and compete with other species (Magan and Lacey, 1984). It is important to find essential oils with antimycotic effect against a broad range of maize grain fungi.

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

5. References

- Bilgrami, K.S. and Choudhary, A.K., 1998. Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. 1-43. In: Sinha, K.K. (Ed.), Mycotoxins in agriculture and food safety. Deepak Bhatnagar, New Orleans, Louisiana.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1-17.
- 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. *J. Food Sci.* 42, 1107-1116.
- Bullerman, L.B., 1974. Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. *J. Food Sci.* 39, 1163-1164.
- CEN, 2000. European committee for standardisation. Foodstuffs-Determination of fumonisins, 1-11.
- Chao, S.C., Young, D.G., 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J. Essential Oil Res.* 12, 630-649.
- 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. *J. Food Sci.* 54, 74-76.
- Guenther, E., 1961. The essential oils, cited in Megalla, S.E., El-Keltawi, N.E.M., Ross, S.A., 1980. A study of antimicrobial action of some essential oil constituents. *Herba Polonica* 3, 181-186.

- 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.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., Wanasundara, P. D., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 32, 67-103.
- Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Leggott, N.L., Yazdanpanah, H., Rahimian, H., Safavi, N., 2000. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1860-1864.
- 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*. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 114-117.
- Ultee, A. Bennik, M.H.J., Moezelaar, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1561-1568.
- Velluti, A., Marin, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2002a. 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).
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marin, S., 2002b. Control of *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production in maize grain by the addition of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils. *J.Food Sci.* (submitted).
- Wilkins, K.M., Board, R.G., 1989. Natural antimicrobial systems, chapter 11. In: Gould, G.W. (Ed.), *Mechanisms of action of food preservation procedures*. Elsevier Applied Science, London.

Impact of essential oils on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* under different temperature and water activity conditions in maize grain.

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

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

Abstract

The effect of five essential oils (oregano, cinnamon, lemongrass, clove and palmarose) on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by three different strains of *F. graminearum* at different a_w (0.95 and 0.995) and temperature (20 and 30°C) conditions was studied in irradiated maize grain. At 0.995 a_w all essential oils tested had inhibitory effect on growth rate of *F. graminearum* at both temperatures studied. At this a_w level, DON production in general was inhibited by all essential oils at 30°C and, although palmarose oil was the only essential oil with statistically significant inhibitory effect on ZEA production, an inhibitory trend was observed when cinnamon, clove and oregano oils were added to maize grain. It is apparent that essential oils should be considered as alternative preharvest natural fungicides. Further investigation on natural maize grain might be useful to study the effectiveness of these essential oils in presence of natural mycoflora of maize grain.

Keywords: *Fusarium*; essential oils; zearalenone; deoxynivalenol; water activity; maize.

INTRODUCTION

Fungi are significant destroyers during storage, rendering them unfit for human consumption by retarding their nutritive value and sometimes by producing mycotoxins. *Fusarium* is a genus ubiquitous fungi, and several species are important pathogens of cereal crops (Booth 1977). One such fungus, *Fusarium graminearum* Schw. [*Gibberella zeae* (Schw.) Petch.] causes gibberella ear rot in corn which is also called pink ear rot and contaminates the kernels with mycotoxins (Miller *et al.* 1983; Bilgrami and Choudhary 1998) such as zearalenone (ZEA) and trichothecenes as deoxynivalenol (DON). ZEA occurs frequently in maize used as raw material in feedstuffs and produces a well-known hyperestrogenic syndrome (Scott 1990). DON, a cytotoxic trichothecene, has been associated with liver disease, oestrogenic disorders, oesophageal cancer, and immunotoxic effects (Marasas *et al.* 1984; Lou *et al.* 1990).

Storage fungi are commonly controlled by synthetic chemicals; however, most of the fungicides of this group create several side effects in the forms of carcinogenicity, teratogenicity, and residual toxicity (Mishra and Dubey 1994).

Many species and herbs and their extracts possess antimicrobial activity, which is almost invariably due to their essential oil fraction (Paster *et al.* 1990). Thus the antimicrobial effects of spice and herb essential oils are of interest regarding their possible use as alternatives to food preservatives currently in use. Several studies have examined the effect of compounds isolated from oils to search for natural fungicides and a number of these oil constituents have shown to be inhibitory (Chao and Young 2000). Essential oils containing aliphatic alcohol and phenols exhibit significant action against *Aspergillus aegyptiaceus*, *Penicillium cyclopium* and *Trichoderma viride* (Megalla *et al.* 1980). Bullerman *et al.* (1977), working with cinnamon and clove oils and their two major constituents, cinnamic aldehyde and eugenol, found these materials to be inhibitors of the mould growth. A later report evaluated the ability of oregano and thyme essential oils and of two of their major constituents (carvacrol and thymol) to inhibit internal wheat fungi. They showed that oregano oil was highly effective, while thyme oil and the constituents carvacrol and thymol were less effective (Paster *et al.* 1995). On the other hand, little is known about the effect of essential oils on growth and micotoxin production by phytopathogen *Fusarium* species from corn and the impact on environmental conditions on this effect. Velluti *et al.* (2002a) screened 37 essential oils for their

inhibitory activity on growth of *F. verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* in maize meal extract agar. They found that cinnamon, clove, lemongrass, palmarose and oregano oils were the best oils tested.

The objectives of the present investigation were to determine the efficacy of cinnamon, clove, lemongrass, palmarose and oregano oils on growth rate and ZEA and DON production by *F. graminearum* in irradiated maize grain at different a_w and temperature conditions.

MATERIALS AND METHODS

Culture material

Three different isolates of *F. graminearum* were used for these studies: isolate CECT 2150 provided by Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, Spain), isolate ITEM 223 provided by Dr. Chulze, National University of Río Cuarto, Argentina and isolate G2 SG1, provided by Dr. Fannelli, Department of Biology, University of Roma "La Sapienza", Rome, Italy.

Essential oils

The essential oils used were from cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose (Ravetllat Aromatics. S.L., Barcelona, Spain). The analyses of the main components of each essential oil (Table 1) were run on a Hewlett Packard GC-MS system (GC 6890; MSD 5973, Hewlett Packard, Vienna, Austria) by the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Química Orgánica General, Madrid, 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 μg essential oil g^{-1} of maize.

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).

Table 1. Essential oils tested: the main components and their relative contents (%).

Cinnamon oil		Clove oil		Lemongrass oil	
α -curbebene	<1.0	humulene	1.5	limonene	5.4
linalool	1.8	cariophyllene	8.2	methyl heptenone	1.4
cariophyllene	4.6	eugenol	88.2	neral	28
eugenol	82.3	cariophyllene	<1.0	geranial	52
		oxide			
cinnamaldehyde	1.0			geraniol	2.0
2-propionyl	1.0			geranil acetate	3.6
benzodioxol					
eugenil acetate	2.1				
cinnamil alcohol	1.0				
acetate					

Palmarose oil		Oregano oil	
linalool	3.8	γ -terpinene	1.8
cariophyllene	2.5	<i>p</i> -cimeme	16.7
geraniol	87.6	linalool	2.1
geranil acetate	1.1	cariophyllene	2.1
3-carenone	1.5	thymol	0.2
		cravacrol	70.0
		phenyl-methyl-benzoate	1.3

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 25°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 ZEA and DON analyses.

Zearalenone analyses

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

Deoxynivalenol analyses

DON was extracted with 20 ml of acetonitrile/water (84+16) added to 5 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 (MycoSepTM# 227, Romer Labs., Inc., Union, Mo.). 2 ml of purified extract was transferred to a vial and evaporated to dryness in a 60°C water bath under vacuum and dissolved in 1 ml of mobile phase, acetonitrile/methanol/water (4+4+92) for HPLC analysis. 125 μl aliquot of solution 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 was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

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.

Statistical analyses of the data

A full factorial design was used. The factors were a_w (0.95, 0.995), temperature (20, 30°C), isolates (CECT 2150, ITEM 223, G2 SG1) and concentrations of essential oils (500, $1000 \mu\text{g g}^{-1}$) and the responses were radii of growing colonies and DON and ZEA concentration. Analysis of variance was performed for colony radii and ZEA and DON concentrations

using SAS version 8.02 (SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA). Statistical significance was judged at the 5 % level.

RESULTS

Water activity was the major factor affecting results, being growth rate, ZEA and DON production were higher at 0.995 than at 0.95 a_w , regardless of temperature, in absence of essential oils.

Oregano oil

Growth rate

Water activity, concentration as well as their interaction had significant effect on growth of *F. graminearum* (Table 2). Oregano oil had inhibitory effect at both a_w . At 0.995 a_w the inhibitory effect of 1000 $\mu\text{g oil/g}$ was higher than that of 500 $\mu\text{g oil g}^{-1}$, while at 0.95 a_w no differences were found using either 500 or 1000 $\mu\text{g oregano oil g}^{-1}$ (Fig. 1a).

Zearalenone production

Most of the single factors (a_w , temperature, concentrations) as well as almost all two and three way interactions had a significant effect on ZEA production by *F. graminearum* (Table 3). The statistical results showed that the only condition where oregano oil had a significant inhibitory effect on ZEA production was for G2 SG1 strain and at 0.95 a_w /30°C (Fig. 1b).

Deoxynivalenol production

All single factors (a_w , temperature, concentrations, strains) as well as all two and three way interactions had a significant effect on DON production by *F. graminearum* (Table 4). At 0.995 a_w DON production by ITEM 223 and CECT 2150 strains was significantly inhibited at 30°C by 500 and 1000 $\mu\text{g oregano oil g}^{-1}$. At 20°C, oregano oil had inhibitory effect only for the ITEM 223 strain. At 0.95 a_w significant inhibitory effect only was found at 20°C for ITEM 223 strain (Fig. 1c).

Cinnamon oil

Growth rate

All single factors (a_w , temperature, concentrations, strains) as well as some two and three way interactions had a significant effect on growth of *F.*

graminearum (Table 2). At 0.995 a_w and with 1000 $\mu\text{g oil g}^{-1}$ an inhibitory effect on the three strains tested was observed; no differences were found between 20 and 30°C (Fig. 2a). At 0.95 a_w the cinnamon oil effect was dependent of temperature. At 20°C growth of the three strains studied were inhibited but at 30°C cinnamon oil led to an increase of their growth rates.

Zearalenone production

Water activity was the only factor that significantly affected ZEA production in presence of cinnamon oil (Table 3).

Deoxynivalenol production

All single factors (a_w , temperature, concentrations, strains) as well as all two and three way interactions had a significant effect on DON production by *F. graminearum* (Table 4). At 0.995 a_w /30°C DON production by G2 SG1 and CECT 2150 strains was inhibited by both concentrations used (Fig. 2c). No significant effect of cinnamon oil was found at 20°C neither at 30°C/0.95 a_w .

Lemongrass oil

Growth rate

All single factors (a_w , temperature, concentrations of lemongrass, strains) as well as almost all two way interactions had a significant effect on growth of *F. graminearum* (Table 2). At 0.995 a_w lemongrass oil had inhibitory effect for the three strain tested, it was higher at 1000 $\mu\text{g oil/g}$ than that at 500 $\mu\text{g g}^{-1}$. No differences were found between 20 and 30°C. At 0.95 a_w all strains tested were inhibited at 1000 $\mu\text{g lemongrass oil g}^{-1}$ of maize (Fig. 2b).

Zearalenone production

No inhibitory effect was found by lemongrass oil in ZEA production. Water activity was the only factor with significant effect in ZEA production (Table 3).

Deoxynivalenol production

All single factors (a_w , temperature, concentrations of lemongrass, strains) as well as all two and three way interactions had a significant effect on DON production by *F. graminearum* (Table 4). Significant inhibitory effect was found at 0.995 a_w and 30°C for G2 SG1 and CECT 2150 strains at both concentrations of lemongrass tested (Fig. 2c).

Clove oil

Growth rate

Most of the single factors (a_w , concentrations of clove, strains) as well as some two and three way interactions had a significant effect on growth of *F. graminearum* (Table 2). At 0.995 a_w both 500 and 1000 μg clove oil g^{-1} had inhibitory effect for CECT 2150 strain while only 1000 μg clove oil/g was effective for ITEM 223 and G2 SG1 strains; no differences were found between 20 and 30°C for any of the strains tested. At 0.95 a_w the clove oil effect depended on temperature. At 20°C clove oil inhibited the growth of the three strains studied but at 30°C the growth rate of the three strain was increased by the presence of clove oil (Fig 3a).

Zearalenone production

Water activity was the only factor with significant effect on ZEA production in presence of clove oil (Table 3). However, at 0.995 a_w and 30°C an inhibitory effect by clove oil in ZEA production was observed (Fig.3b).

Deoxynivalenol production

All single factors (a_w , temperature, concentrations, strains) as well as almost all two and three way interactions had a significant effect on DON production by *F. graminearum* (Table 4). At 0.995 a_w and for G2 SG1 and CECT 2150 strains a significant inhibitory effect by both concentrations of clove oil used was observed at 30°C (Fig 3b), while at 20°C the three strains studied also were inhibited. No significant effect of clove oil was found at 0.95 a_w .

Palmarose oil

Growth rate

All single factors (a_w , temperature, concentrations of palmarose, strains) as well as almost all two way interactions had a significant effect on growth of *F. graminearum* (Table 2). At 0.995 a_w , at both temperatures, all strains studied were inhibited at 1000 μg palmarose g^{-1} . At 0.95 a_w the inhibitory effect of palmarose oil also was more evident at 1000 μg oil g^{-1} of maize (Fig. 4a).

Zearalenone production

Water activity, concentration and their interaction had significant effect in ZEA production (Table 3). A significant inhibitory effect was observed at 0.995 a_w with 500 or 1000 μg palmarose g^{-1} for all strains and temperatures tested (Fig. 4b).

Deoxynivalenol production

All single factors (a_w , temperature, concentrations of palmarose, strains) as well as all two and three way interactions had a significant effect on DON production by *F. graminearum* (Table 4). No significant effect was found at 20°C regardless of a_w , while at 30°C there was a significant inhibitory effect for G2 SG1 and CECT 2150 strains at 0.995 a_w (Fig. 4b).

Table 2. Analysis of covariance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on growth rate of *F. graminearum* isolates (i) a different a_w and temperature (t) levels.

	Oregano oil			Cinnamon oil		Lemongrass oil	
	DF	MS	F	MS	F	MS	F
t	1	37.7	0.4	589.2	8.4*	2844.3	40.2**
a_w	1	45350.6	509.4**	58287.8	831.2**	59799.5	845.2**
i	2	122.4	1.4	1513.6	21.6**	1198.3	16.9**
c	2	15689.3	176.2**	668.7	9.5**	1905.5	26.9**
$ix a_w$	2	47.3	0.5	898.1	12.8**	393.6	5.6*
$cx a_w$	2	5854.7	65.8**	403.1	5.8*	263.3	3.7*
$tx a_w$	1	6.4	0.1	119.8	1.7	3873.9	54.8**
$cx i$	4	51.3	0.6	146.3	2.1	145.6	2.1
$tx i$	2	87.8	1.0	34.3	0.5	226.4	3.2*
$tx c$	2	13.4	0.2	1624.3	23.2**	18.6	0.3
$ix a_w x c$	4	47.5	0.5	220.5	3.1*	219.7	3.1*
$a_w x i x t$	2	53.2	0.6	5.2	0.1	222.1	3.1*
$cx a_w x t$	2	63.9	0.7	1512.3	21.6**	16.8	0.2
$ix c x t$	4	19.1	0.2	239.2	3.4*	100.1	1.4
$cx ix a_w x t$	4	8.3	1.0	316.9	4.5*	61.0	0.9

	Clove oil			Palmarose oil	
	DF	MS	F	MS	F
t	1	36.8	0.5	3534.5	50.6**
a_w	1	56354.4	778.3**	54720.2	783.2**
i	2	1505.6	20.9**	800.9	11.5**
c	2	3941.9	54.4**	2184.9	31.3**
$ix a_w$	2	718.0	9.9**	341.7	4.9*
$cx a_w$	2	1315.1	18.2**	365.4	5.2*
$tx a_w$	1	15.7	0.2	2431.1	34.8**
$cx i$	4	113.5	1.6	79.9	1.1
$tx i$	2	157.1	2.2	292.9	4.2*
$tx c$	2	982.2	13.6**	53.4	0.8
$ix a_w x c$	4	189.0	2.6*	191.1	2.7*
$a_w x i x t$	2	144.0	2.0	22.1	0.3
$cx a_w x t$	2	1062.4	14.7**	317.5	4.6*
$ix c x t$	4	182.8	2.5*	23.9	0.3
$cx ix a_w$	4	214.0	3.0*	135.2	2.0
$x t$					

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

Table 3. Analysis of variance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on zearalenone production by *F. graminearum* isolates (i) a different a_w and temperature (t) levels.

	Oregano oil			Cinnamon oil		Lemongrass oil	
	DF	MS	F	MS	F	MS	F
c	2	1348.0	3.7*	1644.7	2.7	145.2	0.1
i	2	588.0	1.6	731.4	1.2	6661.9	2.4
a_w	1	4542.9	12.4*	10271.5	16.7**	32806.2	12.0*
t	1	1635.7	4.5*	209.9	0.3	10509.9	3.8
$i \times a_w$	2	624.8	1.7	730.7	1.2	6477.0	2.4
$c \times a_w$	2	1285.7	3.5*	1612.4	2.6	118.2	0.0
$t \times a_w$	1	1754.2	4.8*	221.7	0.4	10908.1	4.0
$c \times i$	4	1015.3	2.8*	349.8	0.6	814.5	0.3
$t \times i$	2	1001.3	2.7	712.4	1.2	5972.3	2.2
$t \times c$	2	1755.4	4.8*	954.8	1.6	208.4	0.1
$i \times a_w \times c$	4	1034.2	2.8*	352.5	0.6	751.0	0.3
$a_w \times i \times t$	2	967.8	2.7	715.8	1.2	6145.6	2.2
$c \times a_w \times t$	2	1797.9	4.9*	981.5	1.6	232.4	0.1
$i \times c \times t$	4	991.0	2.7*	361.4	0.6	167.4	0.1
$c \times i \times a_w \times t$	4	986.6	2.7*	360.3	0.6	194.0	0.1

	Clove oil			Palmarose oil	
	DF	MS	F	MS	F
c	2	1364.3	2.2	2312.5	3.8*
i	2	31.1	0.1	72.4	0.1
a_w	1	10356.0	17.0**	6786.3	11.1 *
t	1	44.2	0.1	311.8	0.5
$i \times a_w$	2	35.7	0.1	71.2	0.1
$c \times a_w$	2	1499.1	2.5	2280.0	3.7*
$t \times a_w$	1	100.7	0.2	334.8	0.6
$c \times i$	4	680.4	1.1	549.8	0.9
$t \times i$	2	1161.9	1.9	784.6	1.3
$t \times c$	2	1732.7	2.9	859.2	1.4
$i \times a_w \times c$	4	663.2	1.1	549.2	0.9
$a_w \times i \times t$	2	1231.6	2.0	787.9	1.3
$c \times a_w \times t$	2	1920.2	3.2	876.8	1.4
$i \times c \times t$	4	281.3	0.5	368.9	0.6
$c \times i \times a_w \times t$	4	264.4	0.4	369.3	0.6

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

Table 4. Analysis of variance of the effect of different concentrations (c) of essential oils on deoxynivalenol production by *F. graminearum* isolates (i) a different a_w and temperature (t) levels.

	Oregano oil			Cinnamon oil		Lemongrass oil	
	DF	MS	F	MS	F	MS	F
c	2	1591.2	57.4**	21251.0	26.4**	16603.2	14.6**
i	2	379.1	13.7**	8879.8	11.0*	13072.6	11.5**
a_w	1	2621.8	94.6**	56401.5	70.1**	75946.8	66.6**
t	1	1331.9	48.1**	36936.1	45.9**	47612.6	41.8**
$i \times a_w$	2	473.1	17.1**	8951.8	11.1*	12691.6	11.1*
$c \times a_w$	2	1643.8	59.3**	21313.6	26.5**	16487.8	14.5**
$t \times a_w$	1	1159.9	41.9**	38946.7	48.4**	50058.5	43.9**
$c \times i$	4	465.2	16.8**	10046.1	12.5**	7980.9	7.0*
$t \times i$	2	292.4	10.6*	10791.0	13.4**	15220.1	13.4**
$t \times c$	2	615.926	22.2**	12924.0	16.1**	10074.0	8.8*
$i \times a_w \times c$	4	405.1	14.6**	9870.7	12.3**	8012.9	7.0*
$a_w \times i \times t$	2	348.7	12.6**	10473.0	13.0**	15705.0	13.8**
$c \times a_w \times t$	2	697.0	25.2**	13011.7	16.2**	10317.2	9.1*
			**				
$i \times c \times t$	4	319.3	11.5**	12379.2	15.4**	10039.3	8.8**
$c \times i \times a_w \times t$	4	327.8	11.8**	12609.9	15.7**	9810.2	8.6**

	Clove oil			Palmarose oil	
	DF	MS	F	MS	F
c	2	26728.9	33.8**	21033.2	14.6**
i	2	9978.7	12.6**	16352.2	11.4**
a_w	1	40538.7	51.2**	59479.3	41.3**
t	1	26934.5	34.0**	33458.4	23.2**
$i \times a_w$	2	10031.6	12.7**	16471.3	11.4**
$c \times a_w$	2	26774.0	33.8**	20298.9	14.1**
$t \times a_w$	1	26194.5	33.1**	36156.1	25.1**
$c \times i$	4	8553.1	10.8**	6775.8	4.7*
$t \times i$	2	12814.3	16.2**	21144.3	14.7**
$t \times c$	2	16187.8	20.5**	14060.4	9.8*
$i \times a_w \times c$	4	8488.7	10.7**	6653.1	4.6*
$a_w \times i \times t$	2	12256.6	15.5**	20839.0	14.5**
$c \times a_w \times t$	2	17322.0	21.9**	13977.4	9.7*
$i \times c \times t$	4	10583.0	13.4**	8033.5	5.6*
$c \times i \times a_w \times t$	4	10901.9	13.8	8125.7	5.7*

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$

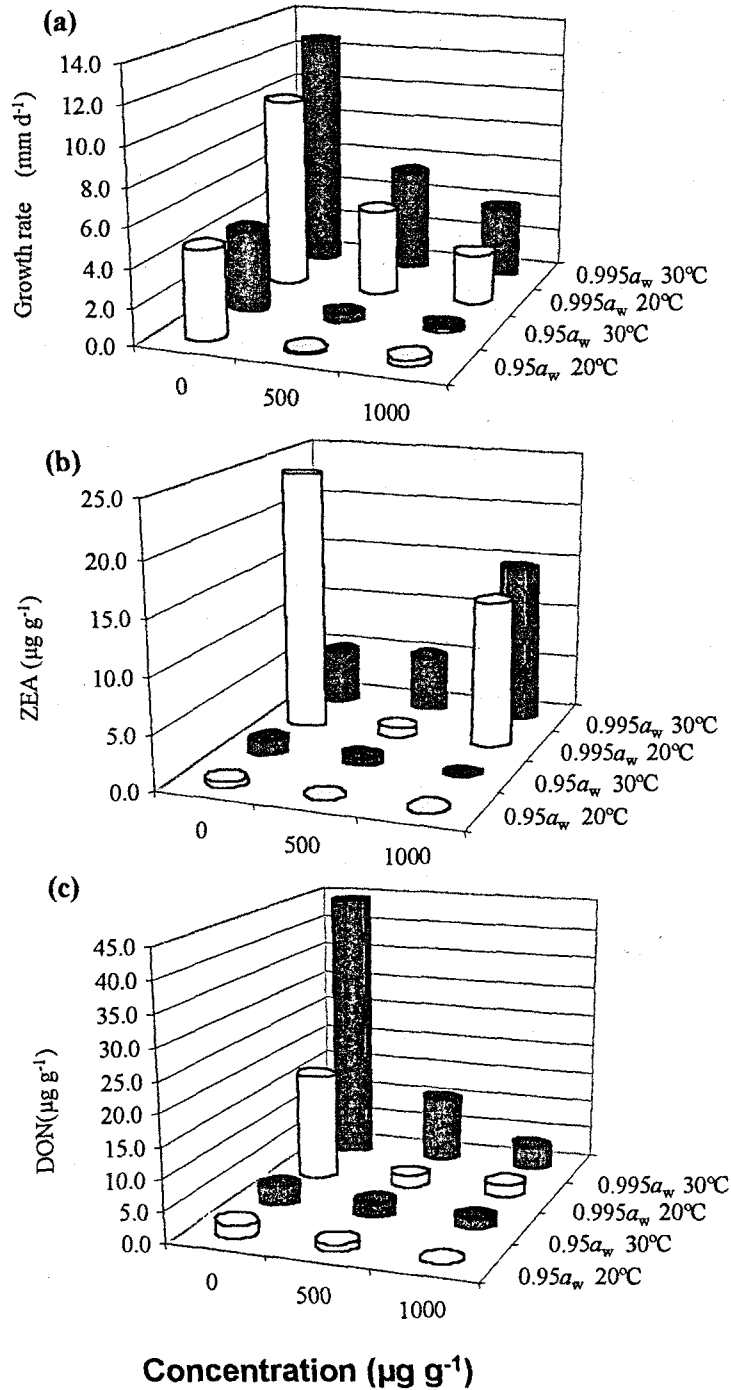


Figure 1. Effect of oregano oil on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by *F. graminearum* under different water activity and temperature conditions. (a) growth rate of ITEM 223 strain, (b) zearalenone production by G2 SG1 strain and (c) deoxynivalenol by ITEM 223 strain.

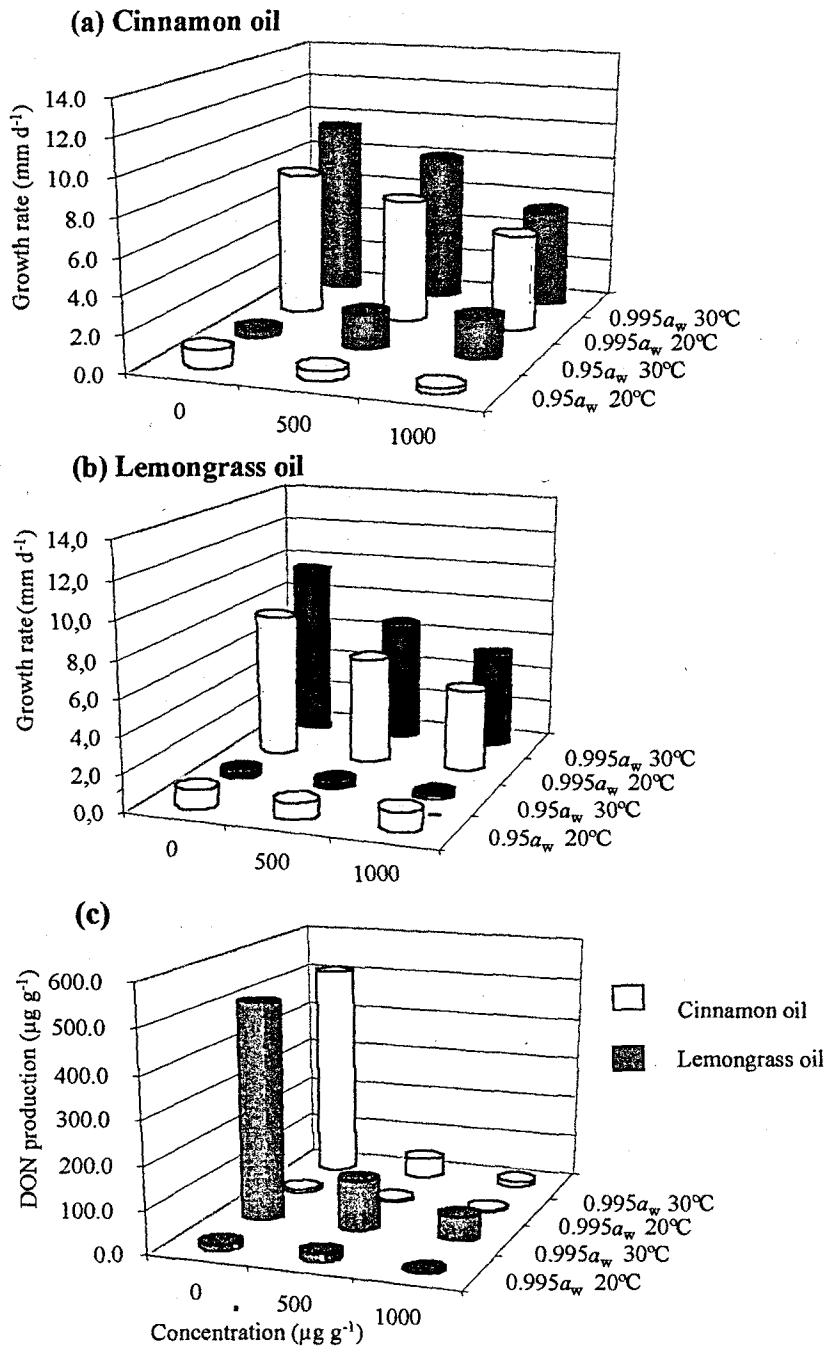


Figure 2. Effect of cinnamon and lemongrass oils on growth rate and deoxynivalenol production by CECT 2150 strain of *F. graminearum* under different water activity and temperature conditions. (a) Cinnamon oil effect on growth rate (b) Lemongrass oil effect on growth rate (c) Cinnamon oil and lemongrass oil effect on deoxynivalenol production.

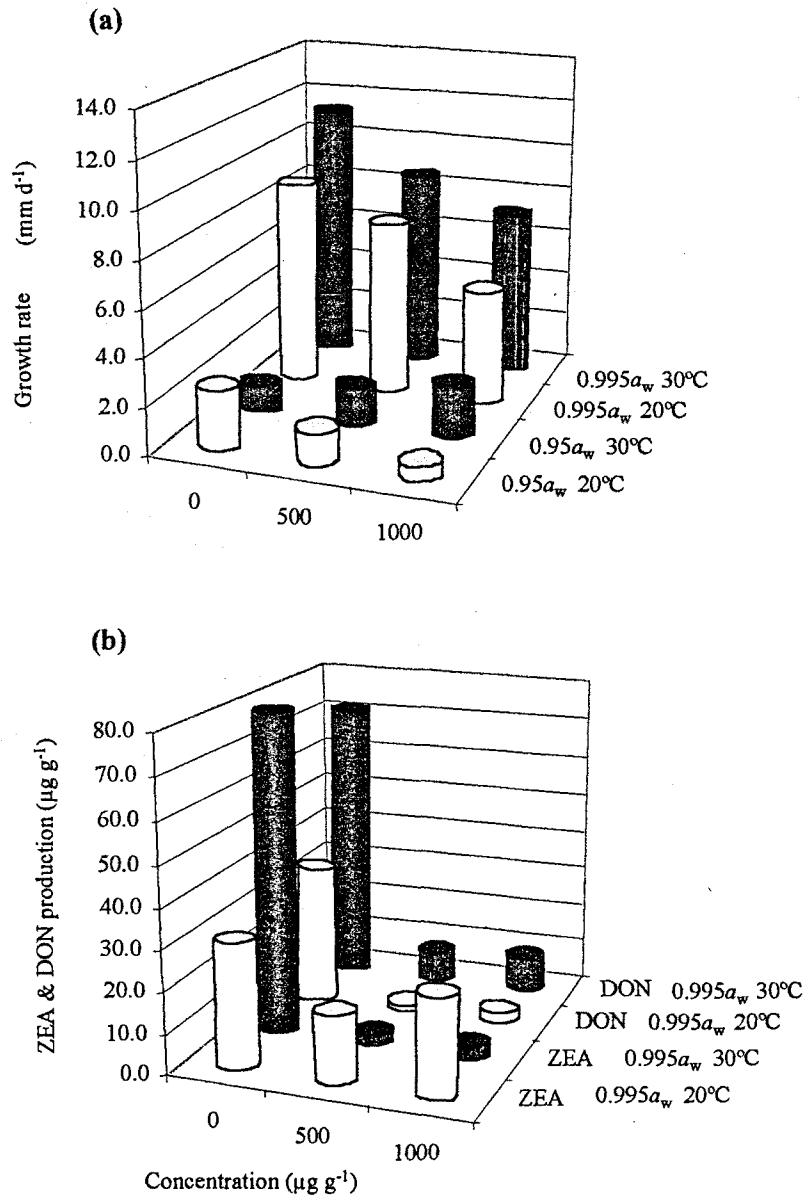


Figure 3. Effect of clove oil on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by G2 SG1 strain of *F. graminearum* under different water activity and temperature conditions. (a) growth rate and (b) zearalenone and deoxynivalenol production

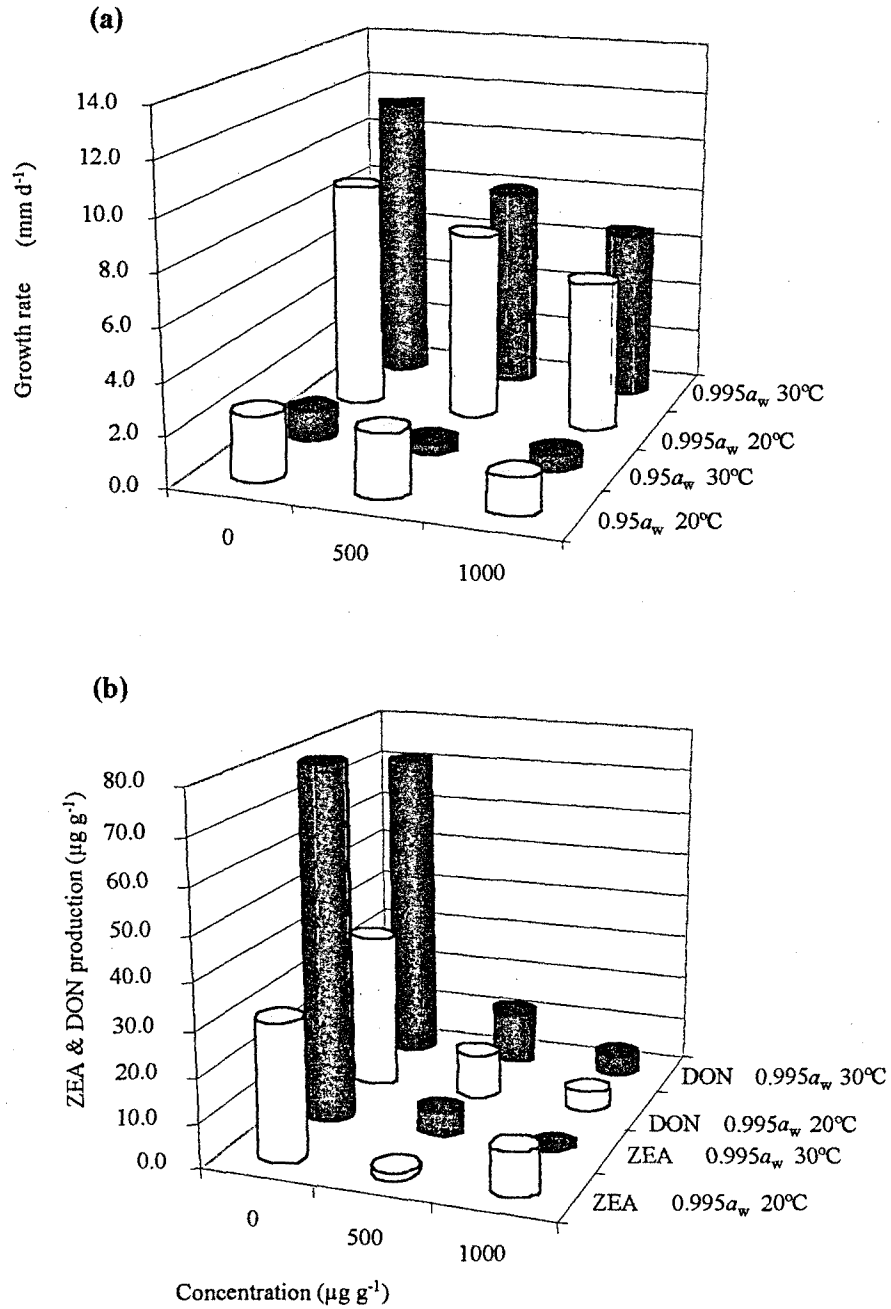


Figure 4. Effect of palmarose oil on growth rate, zearalenone and deoxynivalenol production by G2 SG1 strain of *F. graminearum* under different water activity and temperatures conditions. (a) growth rate and (b) zearalenone and deoxynivalenol production

DISCUSSION

This study has shown that potential exists for controlling mainly growth and deoxynivalenol production by *F. graminearum* using essential oils over a range of a_w and temperature conditions. Ours results indicated that the essential oils tested were more effective at high a_w . At 0.95 a_w the inhibitory effect was not so clear, the low ZEA and DON production and the high differences between replicates could be the reason why almost none of the essential oils had statistically significant effect on these mycotoxins production by *F. graminearum*.

At 0.995 a_w all essential oils tested had inhibitory effect on growth rate of *F. graminearum* and both temperatures studied. At this a_w level, DON production in general was inhibited by all essential oils at 30°C and, although palmarose oil was the only essential oil with statistically significant inhibitory effect on ZEA production, a inhibitory trend was observed when cinnamon, clove and oregano oils were added to maize grain. Recent studies have demonstrated that oregano, clove and lemongrass oils were effective in inhibiting growth of *F. verticillioides* and *F. proliferatum* at 0.995 a_w in irradiated maize. Moreover, oregano, cinnamon and palmarose oils significantly reduced fumonisin B₁ at 0.995 a_w and 30°C (Velluti *et al.* 2002b,c). These results together with the results of the present study indicate that the efficacy of the five essential oils studied is quite similar for the isolates of the three *Fusarium* species tested; the higher the a_w of the grain, the better the inhibitory effect of essential oils. It might be assumed 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 grain (Paster *et al.* 1995). Weather factors favourable for production and dispersal of spores on the host surface and infection must coincide with the time when the corn is very receptive to *F. graminearum*. Optimum temperatures are between 25 and 32°C (Bilgrami and Choudthary 1998). Gibberella ear rot epidemics are usually completed in one cycle because corn ears remain highly receptive for only 10 to 20 days following silking, at this time moisture content of the kernel is approximately 30% ($\cong 0.98-0.99 a_w$) (Sutton 1982). Therefore, the essential oils tested could be effective in controlling mainly growth and DON production by *F. graminearum* in maize under preharvest conditions.

At present, the information on the mechanism of action of the essential oils on *Fusarium* species is limited. It has been suggested that antimicrobial activity of essential oils depends not only on their components but also on the chemical structure of these components (Megalla *et al.* 1980).

It has been reported that the antioxidant effect of aromatic plants is due to the presence of hydroxyl groups in their phenolic compounds (Shahidi *et al.* 1992). Three out of the five essential oils tested, oregano, clove and cinnamon oils, have aromatic compounds among their major components. Eugenol (the main component of clove and cinnamon oils) and carvacrol (from oregano oil) are phenols. The antimicrobial activity of these oils can be attributed to the presence of an aromatic nucleus and a phenolic OH group that is known to be reactive and to form hydrogen bonds with active sites of target enzymes (Frag *et al.* 1989). It was described earlier that the hydroxyl group (bound to a benzene ring) is important for the activities of some antimicrobial compounds and that these activities are enhanced by the presence of α - β double bonds (Ultee *et al.* 2002). Several authors have pointed out the antimicrobial activity of carvacrol; it has been suggested that it interact with the cell membrane, disrupting it (Kim *et al.* 1995; Thomson 1996). On the other hand, the main component of palmarose oil is geraniol, an aliphatic alcohol, and geranial and neral, aliphatic aldehydes, the main components of lemongrass oil. It has been reported that, geraniol, nerol and citronellol (aliphatic alcohol) completely suppressed growth of *A. flavus* and consequently prevented formation of aflatoxin (Mahmoud 1994).

From the results obtained in this investigation, it is apparent that essential oils should be considered as alternative preharvest natural fungicides. Further investigation on natural maize grain might be useful to study the effectiveness of these essential oils in presence of natural mycoflora of maize grain.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by EC, Quality of Life Programme (QoL), Key Action 1 (KA1) on Food Nutrition and Health, (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

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995) Natural Toxins. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International* ed. Gunniñ, P. pp. 45-46. AOAC International
- Bilgrami, K.S. and Choudhary, A.K. (1998) Mycotoxins in preharvest contamination of agricultural crops. In *Mycotoxins in agriculture and food safety* ed. Shina, K.K. and Bhatnagar, D. pp. 1-43. New York: Marcel Dekker, Inc.

- Booth, C. (1977) The genus *Fusarium*. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute.
- Bullerman, L.B. Lieu, F.Y. and 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. and Young, D.G. (2000) Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essential Oil Research* **12**, 630-649.
- Farag, R.S., Daw, Z.Y. and 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.
- ISTA (International Seed Testing Association) (1976) International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* **43**, 3-77.
- Kim, J.M., Marshall, M.R., Cornell, A.J. Preston III, J.F. and Wei, C.I. (1995) Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science* **60**, 1364-1368.
- Lou, Y., Yoshizawa, T., 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* **56**, 3723-3726.
- Mahmound, A.-L.E. (1994) Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology* **19**, 110-113.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A. (1984) Toxigenic *Fusarium* species. In: *Identity and Mycotoxicology* ed. Pennsylvania State University Press, University Park, pp. 328.
- Megalla, S.E., El-Keltawi, N.E.M. and Ross, S.A. (1980) A study of antimicrobial action of some essential oil constituents. *Herba Polonica* **3**, 181-186.
- Miller, J.D., Young, J.C. and Trenholm, H.L. (1983) *Fusarium* toxins in field corn. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. *Canadian Journal of Botany* **61**, 3080-3087.
- Mishra, A.K. and 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.
- Paster, N., Juven, B.J., Shaaya, E., Menasherov, M., Nitzan, R., Weisslowicz, H. and 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. and 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.
- Scott, P.M. (1990) The natural occurrence of trichothecenes. In *Trichothecene mycotoxicosis: Pathophysiological effects* ed Beasley, V.R. pp 1-26. Florida: Boca Raton.
- Shahidi, F., Janitha, P. K. and Wanasundara, P. D. (1992) Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **32**, 67-103.
- Sutton, J.C. (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *F. graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **4**, 195-200.
- Thompson, D.P. (1996) Inhibition of growth of mycotoxin *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *Journal of Food Protection* **59**, 419-415.
- Ultee, A. Bennik, M.H.J. and Moezelaar, R. (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 1561-1568.
- Velluti, A., Marín, S., Gonzalez, P., Ramos, A.J. and Sanchis, V. (2002a) 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).

- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Marín. S. (2002b) Control of *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production in maize grain by the addition of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils. *Journal of Food Science* (submitted).
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egido, J. and Marín. S. (2002c) Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth rate and fumonisin B₁ production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* (submitted).

DISCUSIÓN GENERAL

Generalidades

La base de partida para el desarrollo del presente trabajo son, en primer lugar, los estudios previos realizados por Sala (1993) en los cuales se determinó la incidencia de *Fusarium* en muestras de cereales y piensos destinadas a la alimentación animal en Cataluña, así como la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas. Se aislaron un número importante de cepas de *Fusarium* a partir de las muestras analizadas, de las cuales, para el caso del trigo, maíz y piensos, porcentajes cercanos al 100 % pertenecieron a las especies *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. El 66 % de las cepas de *F. verticillioides* resultaron productoras de FB₁ y el 62 % de FB₂, mientras que para *F. proliferatum* los porcentajes fueron del 52 % y 47 %, respectivamente.

El maíz es la base de los productos en los que se han encontrado fumonisinas de forma natural con más frecuencia hasta la fecha. Resulta también destacable el hecho de que cepas altamente toxigénicas sobre maíz son incapaces de sintetizar fumonisinas sobre cebada y trigo (Marín *et al.*, 1999a).

El presente trabajo se centra en el estudio de cepas de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Estas especies se aíslan con más frecuencia del maíz en climas templados (Sanchis *et al.* 1995; Sohn, *et al.*, 1999), y causan la llamada podredumbre de la mazorca por *Fusarium* y podredumbre de la mazorca por *Gibberella*.

Dado que Marín (1998) estudió la ecofisiología de cepas de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* productoras de fumonisinas, el presente trabajo pretende, utilizando estos conocimientos, profundizar en el estudio del comportamiento de estas cepas cuando coexisten junto con *F. graminearum* en el grano de maíz, así como estudiar en esta última especie, el crecimiento y la producción de zearalenona y deoxinivalenol.

Teniendo en cuenta que la flora natural del maíz, está constituida por una mezcla de especies fúngicas, algunas de ellas micotoxigénicas, una aproximación a la problemática de varias micotoxinas sería el estudio en cultivo mixto de diferentes especies fúngicas y así determinar como la interrelación afecta a su crecimiento y a la producción de toxinas. Este estudio adquiere más relevancia si tenemos en cuenta que Marín (1998) ha sugerido que la propia competencia fúngica interespecífica podría servir como medida de control de algunas micotoxinas.

Desde la maduración del grano de maíz en el campo hasta su secado definitivo, se dan toda una serie de oportunidades para el crecimiento y la producción de micotoxinas por cualquiera de las tres especies de *Fusarium* estudiadas que estén colonizando este cereal. Además, disponemos de una serie de datos sobre la ecofisiología de estas especies como los realizados por Marín *et al.* (1995;1999a) que determinaron que el crecimiento óptimo para *F. verticillioides* y *F. proliferatum* se produce a 0,994 a_w y a 30 °C, seguido de 25, 15 y 10 °C. Otros estudios demuestran que las condiciones de crecimiento óptimo de *F. graminearum* son 0,98-0,99 de a_w y 24-26 °C (Cook *et al.*, 1976). Por todo lo anteriormente citado, la producción óptima de micotoxinas, tanto de fumonisinas como de ZEA y DON, se da a altos valores de a_w . Por lo tanto, la prevención a través de un control precosecha sería un buen método para controlar la contaminación con estas micotoxinas pero, cuando la contaminación ya ha ocurrido, los riesgos asociados a la contaminación con micotoxinas deben ser controlados a través de procedimientos postcosecha, como podría ser, entre otros, una selección de los granos por color, por tamaño, segregación por densidad o la utilización de compuestos adsorbentes.

Resultados obtenidos por Marín *et al.* (1999b) sobre la aplicación en maíz de conservantes a base de propionatos, revelaron que sólo la combinación de dosis del 0,07 % de propionato en maíz a 0,93 a_w conseguía inhibir por completo el crecimiento de *Fusarium* inoculado en forma de micelio. Sin embargo, cuando se inoculó en estas condiciones el moho en forma de esporas, las cepas fueron capaces de germinar e incluso producir fumonisinas.

Se ha visto que los extractos naturales de plantas poseen efecto antimicrobiano y ha sido documentado por varios investigadores el uso de aceites esenciales como fungicidas naturales (Maruzzella y Balter, 1959; Mishra y Dubey, 1994; Chao y Young, 2000) por lo que el objetivo final de este trabajo será estudiar aceites esenciales capaces de inhibir el crecimiento de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*, así como la producción de micotoxinas.

Evaluación de la presencia de FB₁ en productos destinados a la alimentación humana y animal en España

El maíz y sus derivados son los productos en los que con más frecuencia se han detectado fumonisinas de forma natural. La presencia de estas toxinas conlleva un riesgo para la salud humana y animal, y unas consiguientes pérdidas económicas asociadas. Estudios previos realizados en España han mostrado la alta incidencia de *Fusarium* y fumonisinas en productos destinados a la alimentación animal y humana (Sanchis *et al.*, 1994, 1995; Castellá *et al.*, 1999). Así, la incidencia de *Fusarium* en las muestras estudiadas de maíz y piensos que contienen este cereal oscila entre 88 y 100 % (Sala, 1993).

Nuestros resultados muestran que el 86 % de las muestras destinadas al consumo animal recolectadas en España durante los años 1998-2000 contienen FB₁ en un intervalo de 89-8760 ng g⁻¹ (cap. IV). Sanchis *et al.* (1995) encontraron un promedio de 400 ng g⁻¹ de FB₁ en muestras recolectadas durante el año 1993 y Castellá *et al.* (1999) encontraron un promedio de 4800 ng g⁻¹ de FB₁ en 48 de 55 muestras de maíz recolectadas durante los años 1994-1996. Estos datos ponen de manifiesto que la contaminación del maíz con FB₁ puede variar año tras año. Dado que son muchos los factores que influyen en la producción de FB₁ es difícil predecir la contaminación con dicha toxina en un año determinado; el factor climático principalmente, pero también las prácticas de almacenamiento del cereal son importantes factores a tener en cuenta. Aunque los valores de FB₁ detectados no fueron excesivamente altos, nuestros resultados revelan que la posibilidad de que los alimentos esten contaminados con altos valores de FB₁ existe. Es más, cuatro de las muestras analizadas presentaron niveles de FB₁ superiores a 5000 ng g⁻¹, que es el límite recomendado por el comité de micotoxinas de la Asociación Americana de Diagnóstico de Laboratorio Veterinario para piensos destinados a caballos u otros equinos (Norred y Voss 1994; Trucksess, 1996).

El análisis de muestras destinadas al consumo humano en España revela que, aunque más del 23 % de las muestras estuvieron contaminadas con FB₁, los valores encontrados generalmente fueron bajos (cap. IV). Si tenemos en cuenta que el límite establecido por Suiza de 1000 ng g⁻¹ de fumonisinas totales (FAO, 1997) contempla también la FB₂, toxina que no hemos analizado pero que se encuentra en menor cantidad que FB₁ (20-35 % de FB₁) (Murphy *et al.*, 1993; Carmelli *et al.*, 1993; Doko y Visconti, 1994; Doko *et al.*, 1995), también podríamos suponer, que el grado de contaminación por ambas toxinas en la mayoría de las muestras analizadas no superaría este límite.

En general, los productos de maíz que no han sido sometidos a ningún tipo de procesado presentan valores mayores de contaminación. Así, las muestras de harina de maíz analizadas fueron las que presentaron mayor nivel de contaminación; siendo el promedio de FB₁ de estas muestras de 363 ng g⁻¹ y estando una de las muestras contaminada con 938 ng g⁻¹ de FB₁ (cap. IV). Estos resultados concuerdan con las afirmaciones de Bullerman y Tsai (1994), que concluyeron 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 un procesado suave, por ejemplo harina y sémola de maíz, donde tan sólo se practica una molienda física. En las copos de maíz, palomitas de maíz, maíz dulce enlatado y otros derivados, el nivel de contaminación por estas toxinas es generalmente bajo. Esto podría deberse a una descomposición química de las toxinas por el calor del proceso. En nuestros resultados, la contaminación de las muestras tiende a decrecer desde harina de maíz, sémola de maíz, palomitas de maíz hasta copos de maíz donde la incidencia y valores de contaminación con FB₁ son muy bajos (cap. IV). Es importante tener en cuenta que el riesgo de que las muestras analizadas estén además, contaminadas con otras micotoxinas existe. Las consecuencias, desde el punto de vista de la salud de los consumidores tanto animales como humanos, de una coexistencia de varias micotoxinas es muy difícil de evaluar, siendo también difícil desde un punto de vista práctico y económico el análisis de todas las probables micotoxinas presentes en estas muestras.

Con el fin de asegurar una baja contaminación en los alimentos, sería muy útil implementar un sistema integrado, que consistiría en un programa de control 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. De esta manera se disminuiría la probabilidad de contaminación con altos valores tanto de *Fusarium* como de micotoxinas.

Efecto de las interacciones fúngicas en la colonización y producción de micotoxinas en granos de maíz por *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*. Influencia de la a_w y de la temperatura.

Generalidades

Las diferentes especies de *Fusarium* pueden estar presentes en un substrato durante largos períodos de tiempo, durante los cuales la a_w y la temperatura pueden cambiar. En el desarrollo del grano de maíz y al empezar la etapa de madurez del cultivo, la humedad declina desde un 80 % ($=1,0 a_w$) hasta un 15 % ó 30 % (aprox. 0,90 a_w) en el momento de la cosecha (Bilgrami y Choudhary, 1998). Es importante, por lo tanto, conocer las condiciones óptimas de a_w y de temperatura para la germinación y el crecimiento de las especies de *Fusarium*, así como el intervalo que les permite un crecimiento sub-óptimo (Magan y Lacey, 1984). Las temperaturas en el periodo previo a la recolección pueden ser cercanas al óptimo para el desarrollo de varias especies de *Fusarium*, 30 °C para *F. verticillioides* y *F. proliferatum* y 24-26 °C para *F. graminearum* (Cook y Christen, 1976; Marín *et al.*, 1995; 1999a). En condiciones de sequedad o de bajas temperaturas, las fases de latencia de dichas especies de *Fusarium* se alargan, siendo en las condiciones límites incapaces de germinar. Además de la influencia de los factores abióticos, como la a_w y la temperatura, en el crecimiento de las diferentes especies, las interacciones fúngicas son un factor biótico que afecta significativamente al desarrollo de los mohos en el grano.

La competencia se define como la demanda por parte de dos o más individuos de la misma o de diferentes especies del mismo recurso. La competencia adopta diversas formas, que comprenden diferentes mecanismos, pero se han de tener en cuenta dos aspectos principales: la captura primaria del recurso y el combate. El primero es el proceso que permite el acceso inicial, influir sobre un determinado recurso, y ocupar el territorio o nicho ecológico. El segundo comprende la defensa del territorio ocupado, y la captura secundaria de recursos de otro ocupante ya establecido (Cooke y Whipps, 1993). Las especies combativas son persistentes y de larga vida, capaces de defender los recursos capturados, con o sin crecimiento rápido y germinación de esporas, reproducción lenta o

intermitente y una buena competencia enzimática (Magan, 1997). *Fusarium* podría pertenecer a este tipo de microorganismos, pero sólo bajo condiciones no estresantes, de lo contrario los hongos resistentes al estrés predominarían (Marín, 1998). Por otra parte, en la competencia fúngica la producción de metabolitos secundarios, como las micotoxinas, también puede verse afectada y contribuir al éxito de una especie en particular por exclusión de otras del nicho ecológico (Magan y Lacey, 1984;1985).

A partir de estos datos, deducimos que son muchos los factores que influyen en el momento de predecir la especie fúngica que dominará en un determinado sustrato, su comportamiento frente a las especies competidoras y las estrategias de competición que utilizará.

Efecto de la interacción fúngica en la colonización por F. verticillioides, F. proliferatum y F. graminearum.

F. verticillioides y *F. proliferatum* poseen una gran habilidad no solo para crecer en un amplio intervalo de temperaturas y a_w sino también para germinar. Estas características le podrían conferir a estas dos especies de la sección Liseola ventajas competitivas frente a *F. graminearum*. Por ejemplo, las mínimas condiciones que necesitan *F. verticillioides* y *F. proliferatum* de a_w y temperatura para crecer en agar extracto de maíz son 0,90 a_w y 4 °C (Marín *et al.*, 1995), mientras que en las mismas condiciones, *F. graminearum* necesita 0,935 a_w y 10 °C (Cook y Christen, 1976). Estas diferencias se hacen aún más evidentes cuando analizamos las condiciones mínimas para la germinación; *F. graminearum* necesita entre 0,94-0,95 a_w a 25 °C para germinar (Sung y Cook, 1981), mientras que aproximadamente a la misma temperatura, Marín *et al.* (1996) han mostrado que *F. verticillioides* y *F. proliferatum* son capaces de germinar a 0,88 a_w .

En nuestros estudios, el intervalo de a_w (0,93, 0,95 y 0,98) y de temperatura (15 y 25 °C) elegido es superior a los requerimientos mínimos necesarios para crecer de las tres especies de *Fusarium* estudiadas, de manera que al estudiar su comportamiento frente a la otra especie competidora, los factores abióticos no deben ser limitantes para el crecimiento de ninguna éstas. En condiciones ambientales que permitan a las diferentes especies fúngicas germinar y crecer sin las condiciones estresantes provocadas por temperaturas y a_w límites, el combate predominará frente a la captura primaria de recursos. En estos casos los valores de temperatura y a_w continuarán teniendo importancia para determinar la predominancia de una determinada especie.

En un estudio donde se inoculó *F. verticillioides* y *F. graminearum* en los estigmas de plantas de maíz, se demostró que *F. verticillioides* tiene ventajas competitivas frente a *F. graminearum*; *F. verticillioides* presenta un intervalo más amplio de temperatura en el cual se desarrolla bien, lo que le confiere beneficios al competir. La temperatura es un factor muy importante en el momento de determinar qué especie de *Fusarium* predominará (Reid *et al.*, 1999). Estudios epidemiológicos y de campo asocian la presencia de *F. verticillioides* con condiciones climáticas más secas y calurosas que las que se asocian a *F. graminearum*, que son más húmedas y con temperaturas intermedias (Miller, 1994). Por otra parte, se ha sugerido que *F. verticillioides* protege a las plántulas de maíz de la infección por *F. graminearum* y también, curiosamente, que *F. graminearum* predispone a la mazorca de maíz a la infección por *F. verticillioides* (Miller, *et al.*, 1995); esto ha sido observado cuando el efecto de las condiciones ambientales promueve la infección por este último. Más aún, Blaney *et al.* (1986) y Van Wyk *et al.* (1988) encontraron una correlación negativa entre la frecuencia de aislamientos de *F. graminearum* y *F. verticillioides*. La existencia de una correlación entre estas especies podría ser debido principalmente a la influencia de las condiciones ambientales más que al efecto antagonista entre ellas (Rheeder *et al.*, 1990).

La velocidad máxima de crecimiento para las tres especies fúngicas estudiadas se determinó a la máxima a_w (0,98) y temperatura ensayada (25 °C) (cap. V y cap. VI). Los valores obtenidos de la velocidad de crecimiento de *F. graminearum* fueron superiores a los de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en todas las condiciones estudiadas. Por otra parte, los recuentos fúngicos de *F. verticillioides* y de *F. proliferatum* fueron menores en presencia de *F. graminearum* que en cultivo puro en todas las condiciones ensayadas (cap. V y cap. VI). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Marín *et al.* (1998c), donde las unidades formadoras de colonias (UFC) de *F. verticillioides* y de *F. proliferatum* fueron inhibidas por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Respecto al comportamiento de *F. graminearum* frente a *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, se observaron diferencias de comportamiento dependiendo de la cepa de *F. graminearum* estudiada; mientras que una cepa mostró una inhibición del número de UFC al estar frente a *F. verticillioides* o *F. proliferatum* (cap. V), los recuentos detectados de la otra cepa de *F. graminearum* fueron superiores al estar en presencia de *F. verticillioides* y de *F. proliferatum* (cap. VI) que al estar en cultivo puro, sugiriendo que las diferencias entre cepas son importantes, lo

que en este caso, nos impide generalizar acerca del comportamiento de *F. graminearum* al estar frente a estas especies de la sección Liseola.

Aunque la velocidad de crecimiento y las UFC son probablemente medidas útiles para determinar la colonización fúngica por *Fusarium* spp. en granos de maíz, ambos parámetros no se correlacionan exactamente en cultivos puros. *F. graminearum* tiene mayor velocidad de crecimiento que *F. verticillioides* y que *F. proliferatum* bajo todas las condiciones estudiadas, pero *F. verticillioides* y *F. proliferatum* esporulan más que *F. graminearum*. Ambas características son importantes para ocupar el nicho ecológico (Magan y Lacey, 1984; Ramakrishna *et al.*, 1993). Por otra parte, ninguna de estas medidas (velocidad de crecimiento o UFC) es mejor que otra para predecir la micoflora predominante bajo unas condiciones determinadas, simplemente dan información sobre diferentes aspectos. La determinación del número de unidades formadoras de colonias fúngicas en medios de cultivo es uno de los pocos métodos que permiten valorar el resultado de la competencia entre cepas en un substrato, pero tiene una serie de inconvenientes derivados de la imposibilidad de discernir si las UFC provienen de fragmentos de micelio, conidios individuales o grupos de conidios, u otras esporas (Jarvis *et al.*, 1983; Marín, 1998). Las especies con gran capacidad para esporular son sobrestimadas y las que esporulan poco, son subestimadas. En nuestro caso, *F. verticillioides* y *F. proliferatum* presentan mayor número de conidios (principalmente microconidios) que *F. graminearum*, que solo presenta macroconidios y éstos tardan más en formarse y el número es menor, por lo que es probable que las UFC de este último provengan en su mayoría de fragmentos de micelio. Para minimizar errores de este tipo, las UFC de cada cepa en los cultivos mixtos se compararon con su control en cultivo puro.

Dado que las UFC tanto de *F. verticillioides* como de *F. proliferatum* fueron inhibidas por la presencia de *F. graminearum*, y tomando en cuenta observaciones realizadas en un estudio *in vitro* por Marín *et al.* (1998b) donde determinaron que la velocidad de crecimiento de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* decreció en presencia de *F. graminearum*, y que la velocidad de crecimiento de este último no se vio afectada en presencia de estas especies de la sección Liseola; podríamos sugerir que *F. graminearum* tiene cierta ventaja competitiva frente a *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en las condiciones ensayadas.

Efecto de la competencia fúngica en la producción de micotoxinas

La producción de metabolitos secundarios también se ve afectada, y puede contribuir al éxito de una especie en particular, por la exclusión de otras especies competidoras del nicho ecológico. Las fumonisinas, como todas las demás micotoxinas, son metabolitos secundarios, lo que sugiere que si *F. verticillioides* y *F. proliferatum* están como endófitos en el maíz, la producción de fumonisinas podría ser en un principio más importante para retener el nicho que para ocupar el mismo. Sin embargo, si la contaminación proviene de las hojas o del suelo, la producción de micotoxinas ayudaría a colonizar el grano por primera vez.

Nuestros resultados indican que la producción de FB₁ por *F. proliferatum* o por *F. verticillioides* en presencia de *F. graminearum* no presentó un patrón definido, habiéndose observado estimulación, inhibición e incluso ningún cambio significativo al compararlo con la concentración de FB₁ en cultivos puros (cap.V y cap. VI). Marín *et al.* (1998a y 1998c) tampoco encontraron correlación alguna entre la concentración de FB₁ y las poblaciones de *Aspergillus* y *Penicillium* cuando éstos crecieron en cultivos mixtos junto a *F. verticillioides* y *F. proliferatum*. Estos resultados nos impiden asociar la producción de FB₁ con el papel de estrategia de competición. Los resultados de Reid *et al.* (1999) apoyan esta hipótesis, ya que no encontraron ninguna relación directa entre la producción de FB₁ y la infección de las mazorcas o de los granos de maíz con *F. graminearum* y *F. verticillioides*. La ventaja competitiva de *F. verticillioides* frente a *F. graminearum* no parece depender de la producción de fumonisinas. Es necesario tener en cuenta que estas especies producen varias toxinas y la bioactividad de ellas no ha sido estudiada con profundidad, por lo que la idea de un antagonismo químico no puede ser aún descartado (Reid *et al.*, 1999).

En cultivo mixto la producción de DON presenta una correlación positiva con el número de UFC de las especies de *Fusarium* sección Liseola estudiadas; la producción de esta toxina fue potenciada por la presencia de *F. verticillioides* y de *F. proliferatum*, lo que podría implicar que la producción de DON es una estrategia de defensa contra otros mohos competidores (cap.VI). Esta hipótesis debería ser comprobada mediante la realización de más estudios de este tipo. Por otra parte, la producción de ZEA por las cepas de *F. graminearum* estudiadas no fue modificada significativamente por la presencia ni de *F. verticillioides* ni de *F. proliferatum* (cap.V y cap.VI). Etcheverry *et al.* (1998) tampoco encontraron que la producción de esta micotoxina se viera afectada por la presencia de *A. parasiticus* a 28 °C y 0,97 a_w. No obstante, Cuero *et al.* (1988) determinaron una reducción en la producción de esta toxina por *F. graminearum* cuando estaba frente a *A.*

flavus a 16 °C pero no a 25 °C. A partir de estos resultados, podríamos sugerir que la producción de ZEA por *F. graminearum* no tendría un papel importante a la hora de competir con otros mohos.

Los datos obtenidos de nuestros estudios sugieren, que la coinoculación de estas tres especies de *Fusarium* en maíz no sería apropiada para conseguir un control de la producción de micotoxinas. Es más, se observa cierta estimulación de la producción de DON, lo que podría sugerir que esta micotoxina pudiera tener alguna función en la estrategia de competición. De todas formas, la producción de micotoxinas parece estar más relacionada con factores abióticos, como la temperatura y la a_w .

Aceites esenciales como inhibidores del crecimiento fúngico

Dentro del gran reservorio de fungicidas naturales que existen en plantas y microorganismos, es razonable pensar que existan compuestos que podrían servir como alternativas efectivas y seguras, desde el punto de vista de la salud, a los fungicidas de síntesis. Desde hace años se conoce que los aceites esenciales contienen compuestos con algún efecto antifúngico que podrían proveer una alternativa a los fungicidas sintéticos pero, aún no han sido desarrollados como productos que puedan aplicarse a los granos (pre o post cosecha). Este hecho puede ser debido a que a la industria le resulta más fácil crear y patentar nuevos compuestos sintéticos que hacerlo con los productos naturales de plantas (Wilson *et al.*, 1997).

Al realizar una evaluación *in vitro* de 37 aceites esenciales con el fin de determinar si alguno de ellos posee actividad antifúngica como inhibidor del crecimiento de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum*, se observó que 5 de los aceites estudiados fueron capaces de inhibir significativamente el crecimiento de los tres mohos (cap. VII). Dada la importancia de los factores abióticos, principalmente a_w y temperatura, en el crecimiento y en la producción de micotoxinas, el efecto de los aceites esenciales se estudió a dos niveles de a_w (0,995 y 0,95) y a dos temperaturas (20 y 30 °C). Los resultados mostraron que la temperatura no poseía una influencia importante en la actividad antifúngica de los aceites en este estudio *in vitro* y aunque el efecto de la a_w tampoco fue claro, sí que se observó una cierta tendencia a potenciar su actividad inhibitoria a bajas a_w (cap. VII).

Las dosis elegidas para realizar nuestros estudios (500 y 1000 μg aceite esencial ml^{-1} de medio de cultivo o g^{-1} grano de maíz) se encuentran

entre los valores utilizados por otros investigadores (Salmeron y Pozo, 1991; Sinha *et al.*, 1993; Mahmoud, 1994; Mishra y Dubey, 1994). Debemos tener presente que la metodología empleada en los diferentes estudios existentes, así como los microorganismos y los aceites esenciales utilizados, son factores importantes a tener en cuenta en el momento de comparar nuestros resultados; principalmente, el comparar las dosis de aceite puede ser problemático debido a las posibles diferencias tanto del método como de la composición del aceite. La elección de las dosis de aceites esenciales empleada estaría limitada principalmente por las características intrínsecas de los aceites de poseer fuerte olor y sabor, por lo que, existen limitaciones desde el punto de vista de aplicación práctica, en término de no sobrepasar los límites sensoriales aceptables, de manera que no sean rechazados por los potenciales consumidores, tanto humanos como animales, además de la posible limitación económica.

Los aceites esenciales que mostraron mayor actividad antifúngica *in vitro* fueron los de canela, clavo, lemongrass, orégano y palmarosa (cap. VII). El estudio sobre granos de maíz irradiados (cap. VIII, IX y X) determinó que los aceites de orégano, clavo y lemongrass inhibían 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 incubaban tanto a 20 como a 30 °C. Los aceites de canela y palmarosa también inhibieron el crecimiento de *F. proliferatum* y *F. graminearum* en estas condiciones, pero *F. verticillioides* fue inhibido sólo a 20 °C. Cuando los granos de maíz tenían una a_w inicial de 0,95, y se incubaban a 20 °C, los aceites de clavo, canela y orégano inhibieron el crecimiento de las tres especies de *Fusarium* estudiadas. Es de destacar que a 30 °C y 0,95 a_w el crecimiento de *F. graminearum* se vio potenciado al agregar los aceites de clavo y canela y que todos los aceites esenciales potenciaron el crecimiento de *F. proliferatum*.

Estudios realizados por otros investigadores ponen de manifiesto que la acción inhibitoria de los aceites estudiados no está restringida a las especies de *Fusarium*. Las semillas de cereales contienen una gran variedad de micoflora que va cambiando a lo largo del desarrollo de la semilla; las condiciones ecofisiológicas de los cultivos, así como los fungicidas utilizados determinan las especies dominantes. Como ya hemos observado en capítulos anteriores (cap. V y VI), son muchos los factores que influyen en el momento de predecir qué especie fúngica dominará en un determinado sustrato, cómo se comportará frente a especies competidoras y qué estrategias de competición utilizará. Al agregar aceites esenciales, con el fin

de inhibir el crecimiento y la producción de micotoxinas, estamos sumando otro factor en el nicho ecológico y seguramente influirá en el momento de definir las especies dominantes. Es importante por lo tanto, que los aceites utilizados tengan un espectro de especies microbiológicas inhibidas lo más amplio posible.

La naturaleza fungistática del aceite de lemongrass fue sugerida por un grupo de investigadores al agregar 1500 μg del aceite ml^{-1} de medio de cultivo y observar inhibición en el crecimiento de 47 especies fúngicas entre las que se encuentra *F. verticillioides*, varias especies más de *Fusarium* así como también especies de *Aspergillus* y de *Penicillium*. Además, el potencial fungitóxico del aceite permaneció durante 210 días, después de los cuales comenzó a decaer (Mishra y Dubey, 1994). Adegoke y Odesola (1996) estudiaron el efecto del aceite de lemongrass en granos de maíz, observando una inhibición en el crecimiento de varias especies fúngicas al agregar el aceite a los granos. En otro estudio en granos de maíz, donde éstos fueron sumergidos en los aceites esenciales durante 30 minutos, se observó una inhibición total de *A. flavus* por varios aceites, entre ellos, el de clavo, canela y orégano (Montes-Belmont y Carvajal, 1998). La actividad del aceite esencial de orégano también fue estudiada al ser pulverizado sobre granos de trigo. Este aceite fue altamente efectivo en controlar la flora interna de los granos, y el carvacrol, su principal constituyente, también mostró cierta actividad antimicrobiana, aunque ésta fue menor que la del aceite completo (Paster *et al.*, 1995).

Aceites esenciales como inhibidores de la producción de micotoxinas.

La producción de fumonisinas por *F. verticillioides* y *F. proliferatum* fue significativamente inhibida por los cinco aceites estudiados cuando los granos de maíz presentaban una a_w inicial de 0,995 y se incubaban a 30 °C pero, al incubarlos a 20 °C, los aceites de canela, orégano y palmarosa inhibieron significativamente la producción de FB_1 por *F. proliferatum* pero no por *F. verticillioides*. Más aún, al agregar los aceites de clavo y orégano a los granos de maíz en estas condiciones (0,995 a_w y 20 °C), se observó cierta estimulación en la producción de FB_1 por *F. verticillioides* (cap. VII y IX). Este resultado es muy significativo, ya que la estimulación probablemente se deba a que el hongo se encontró en situación de estrés lo cual provocó el aumento de la producción de toxina. En estas condiciones el crecimiento fue inhibido por estos aceites, probablemente *F. verticillioides* pasó de la fase de crecimiento vegetativo a la fase

estacionaria, donde la producción de toxinas es mayor. Sin embargo, es el único caso donde se observó una estimulación de la producción de FB_1 a alta a_w (0,995) y, siguiendo este razonamiento, también podría esperarse una estimulación de la producción de FB_1 por *F. proliferatum* en estas condiciones, lo cual no fue observado (cap. IX).

La producción de DON por *F. graminearum* fue inhibida por los cinco aceites estudiados a 0,995 a a_w y 30 °C, y la producción de zearalenona fue significativamente inhibida por el aceite de palmarosa, a las dos temperaturas, cuando la a_w inicial del maíz era de 0,995 a_w (cap. X). Estos resultados sugieren que tanto la acción antimicótica como antimicotoxigénica de los aceites es mayor cuando el grano presenta la máxima a_w estudiada (0,995). En el desarrollo del grano de maíz y al empezar la etapa de madurez del cultivo, la humedad declina desde un 80 % (=1,0 a_w) hasta un 15 % ó 30 % (aprox. 0.90 a_w) en el momento de la cosecha (Bilgrami y Choudharry, 1998). Por lo tanto, en el campo, cuando la a_w del grano es mas alta y el crecimiento y la producción de micotoxinas de las especies de *Fusarium* es máxima (cap. VI y VII), es cuando los aceites tendrían mayor actividad. De todas maneras, no se puede descartar que la acción inhibitoria de los aceites también tenga algún efecto en las condiciones de almacenamiento de los granos o en el período que transcurre desde la cosecha al almacenamiento; una vez que los granos son cosechados es importante bajar, lo más rápido posible, el contenido de humedad y este proceso no debe exceder las 24-48 horas después de la cosecha. Este período es crítico si no se controla bien; el utilizar aceites esenciales como medio de control podría ser una medida útil también en este período. De todas formas, hay que tener en cuenta que se observó cierta estimulación en el crecimiento de *F. proliferatum* y de *F. graminearum* al agregar los aceites esenciales a los granos de maíz cuando éstos tenían una a_w de 0,95. Se ha asumido que la penetración del aceite a la parte interna de los granos está ayudada por la presencia del agua, y por lo tanto el patógeno podría ser más fácilmente controlado en la parte interna de los granos que presentan a_w más alta (Paster *et al.*, 1995).

La composición de los aceites esenciales está determinada principalmente por la especie y por la variedad, pero también las condiciones agroclimáticas, el tiempo de la cosecha y el tipo de procesamiento son factores que la afectan (Guillén *et al.*, 1996). Algunos constituyentes de los aceites esenciales tienen un papel importante en la acción antifúngica. De 30000 componentes diferentes que han sido aislados de aceites de plantas, los compuestos que contienen grupos fenólicos son los más usados en la

industria alimentaria (Meeker y Linke, 1988). El análisis químico de los cinco aceites esenciales que utilizamos en nuestros estudios (cap. VII, VIII, IX y X) reveló que el eugenol es el componente principal del aceite de canela y de clavo, y el carvacrol del aceite de orégano, ambos compuestos fenólicos. La presencia del grupo hidroxilo y de un sistema deslocalizado de electrones parecen ser las causas de la acción antimicótica de estos compuestos (Ultee *et al.*, 2002). Se ha propuesto que el carvacrol actuaría como transportador de cationes monovalentes transmembrana, intercambiando dentro de las células el protón de su grupo hidroxilo por otro catión monovalente, por ejemplo el ion potasio, y de esta forma desestabilizando la membrana citoplasmática, e impidiendo la síntesis de ATP, lo que en última instancia causaría la muerte celular (Ultee *et al.*, 2002). Es de destacar que los otros componentes minoritarios de los aceites esenciales también juegan un papel importante en la acción antifúngica, dado que el aceite completo presenta mayor actividad que cada compuesto por separado (Milos *et al.*, 2000).

Por otra parte, Inouyen *et al.* (1998) sugieren que el grupo aldehído de los componentes de muchos aceites esenciales podría actuar irreversiblemente al perturbar la estructura de la membrana celular, lo que causa una fuga de electrolitos y también reduce el nivel de azúcar y aminoácidos, como se vio en *Rhizopus stolonifer*. Los componentes principales del aceite de lemongrass que hemos utilizado son geranial (52 %) y neral (28 %) ambos compuestos presentan un grupo aldehído.

El estudio del modo de acción de los diferentes compuestos es muy complejo y no existen estudios suficientes acerca del modo de acción del componente principal de la palmarosa que es el geraniol. El mecanismo por el cual ejerce su acción antifúngica probablemente sea diferente, pudiendo interrumpir la acción de una variedad de sistemas enzimáticos involucrados tanto en la producción de energía celular como en la síntesis de compuestos estructurales, así como inactivar o destruir el material genético (Kim *et al.*, 1995). También es posible que el mecanismo por el cual inhiben el crecimiento sea diferente al mecanismo que afecta la síntesis de micotoxinas. Ambos procesos involucran diferentes rutas metabólicas y además las distintas micotoxinas se sintetizan utilizando diferentes vías. Esto podría explicar los resultados obtenidos; no todos los aceites que inhibieron el crecimiento también inhibieron la síntesis de micotoxinas y además, mientras que la producción de DON fue inhibida por los 5 aceites estudiados, tres de ellos inhibieron la síntesis de fumonisinas y solo uno la de zearalenona.

Estudiar el efecto de diferentes combinaciones de estos aceites sería muy útil. Por un lado se podría lograr una mezcla de aceites que inhibiera tanto el crecimiento fúngico como la producción de las diferentes micotoxinas y, por otro lado, se podría estudiar el posible efecto sinérgico con el fin de aumentar el efecto inhibitorio de los aceites y posiblemente bajar la dosis empleada de cada aceite.

A partir de los resultados obtenidos se podría concluir que los aceites esenciales estudiados tendrían mayor aplicabilidad como fungicidas precosecha. De todas formas, hemos observado cierta estimulación de la producción de toxinas en estas condiciones. Por lo tanto, es imprescindible seleccionar adecuadamente los aceites a utilizar con el fin de asegurar que no se producirá estimulación bajo ninguna condición.

Bibliografía

- Adegoke, G.O. y 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*. pp: 81-84.
- 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.
- Blaney, B.J.; Ramsey, M.D. y Tyler, A.L. 1986. Mycotoxins and toxigenic fungi in insect-damaged maize harvested during 1983 in Far North Queensland. *Australian Journal of Agriculture Research*. vol. 37 pp: 235-244.
- 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.
- 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. and Cabañes, F.J. 1999. Surveillance of fumonisins in maize-based feed and cereals from Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol. 47 pp: 4707-4710.

- 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.
- Cook, R.J. y Christen, A.A. 1976. Growth of cereal root-rot fungi as affected by temperature-water potencial interactions. *Phytopathology*. vol. 66 pp: 193-197.
- 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.
- 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.; 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.
- Etcheverry, M.; Magnoli, C.; Dalcerro, 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.
- 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.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F. y Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. vol. 86 pp: 985-990.
- Inouye, S.; Watabable, M.; Nishiyama, Y.; Takeo, K.; Akao, M. y Yamaguchi, H. 1998. Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*. vol. 41 pp: 403-410.

- Jarvis, B.; Selier, D.A.L.; Ould, A.J.L. y Williams, A.P. 1983. Observations of the enumeration of moulds in food and feeding stuffs. *Journal of Applied Bacteriology*. vol. 55 pp: 325-336.
- Kim, J.M.; Marshall, M.R.; Cornell, A.J.; Preston III, J.F. y Wei, C.I. 1995. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. *Journal of Food Science*. vol. 60 pp: 1364-1368.
- Magan, N. 1997. Fungi in extreme environments. En: The Mycota IV, Environmental and Microbial Relationships, capítulo 7. pp: 99-114. Wicklow, D.T.; Soderstrom, B. (eds.), Springer Verlag, Berlin/Heldelberg.
- 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. 1985. Interactions between field and storage fungi on wheat grain. *Transactions of British Mycological Society*. vol. 85 pp: 29-37.
- Mahmound, A.-L. E. 1994. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 19 pp: 110-113.
- Marín, S. 1998. Ecofisiología de cepas de *Fusarium* productoras de fumonisinas. Tesis Doctoral. Universitat de Lleida, España.
- Marín, S.; Magan, N.; Serra, J.; Ramos, A.J. y Sanchis, V. 1999a. Fumonisin B₁ production and growth of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* on maize, wheat and barley grain. *Journal Food Science*. vol. 64 pp: 921-924.
- Marín, S.; Sanchis, V. y Magan, N. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliefratum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology*. vol. 41 pp: 1063-1070.
- Marín, S.; Sanchis, V.; Arnau, F.; Ramos, A.J. y Magan, N. 1998a. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *International Journal Food Microbiology*. vol. 45 pp: 107-117.

- Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A.J.; Vinas, I. y Magan, N. 1998b. 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*. vol. 102 pp: 831- 837.
- Marín, S.; Sanchis, V.; Rull, F.; Ramos, A.J.y Magan, N. 1998c. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *Journal of Food Protection*. vol. 61 pp: 1489- 1496.
- Marín, S.; Sanchis, V.; Sanz, D.; Castel, I.; Ramos, A.J.; Canela, R. y Magan, N. 1999b Control of growth and fumonisin B₁ production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* isolates in moist maize with propionate preservatives. *Food additives and Contaminants*. vol. 16 pp: 555- 563.
- Marín, S.; Sanchis, V.; Teixido, R.; Saenz, I. Ramos, A.J. y Magan, N. 1996. Water and temperatures relations and microconidial germination of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from maize. *Canadian Journal of Microbiology*. vol. 42 pp: 1045-1050.
- Maruzzella, J.C. y Balter, J. 1959. The action of essential oils on phytopathogenic fungi. *Plant Disease*. vol. 43 pp: 1143-1147.
- Meeker, H.G. y Linke, H.A.B. 1988. The antibacterial action of eugenol, thyme oil, and related essential oils used in dentistry. *Compendium Continental Education Dentriphical*. XI (1) pp: 32-38.
- 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.; Savard, M.E.; Schaafsma, A.W.; Serfert, K.A. y Reid, L.M. 1995. Mycotoxin production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* from Ontario and occurrence of fumonisin in the 1993 corn crop. *Canadian Journal of Plant Pathology*. vol. 17 pp: 233-239.
- Milos, M.; Mastelic, J. y Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry*. vol. 71 pp: 79-83.

- Mishra, A.K. y Dubey, N.K. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 60 pp: 1101-1105.
- 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.
- 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.
- Norred, W.P. y Voss, K.A. 1994. Toxicity and Role of Fumonisin in Animal Diseases and Human Esophageal Cancer. *Journal of Food Protections*. vol. 57 pp: 522-527.
- Paster, N.; Menasherov, M.; Ravid, U. y Juven, B.J. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*. vol. 58 pp: 81-85.
- Ramakrishna, N.; Lacey, J. y Smith, E. 1993. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. *Mycological Research*. vol. 97 pp: 1393-1402.
- 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.
- Rheeder, J.P.; Marasas, W.F.O.; Van Wyk, P.S. y Van Schalkwyk, D.J. 1990. Reaction of South African maize cultures to ear inoculation with *Fusarium moniliforme*, *F. graminearum* and *Diplodia maydis*. *Phytophylactic*. vol. 22 pp: 213-218.
- Sala, N. 1993. Contaminació fúngica i de micotoxines de grans destinats a l'alimentació animal a Catalunya. Capacitat toxicogènica de les soques. Tesis Doctoral, Universitat de Lleida, Spain.
- Salmeron, 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.



- Sanchis, V.; Abadias, M.; Oncins, L.; Sala, N.; Viñas, I. and 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.
- 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.
- Sinha, K.K.; Sinha, A.K. y Prasad, G. 1993 The effect of clove and cinnamon oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 16 pp: 114-117.
- 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.
- Sung, J. y Cook, R.J. 1981. Effect of water potential on reproduction and spore germination by *Fusarium roseum* 'Graminearum', 'Culmorum', and 'Avenaceum'. *Phytopathology*. vol. 71 pp: 499-504.
- Trucksess, M.W. 1996. Committee on Natural Toxins. Mycotoxins. *Journal of AOAC International*. vol. 79 pp: 200-205.
- Ultee, A.; Bennik, M.H.J. y Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 68 pp: 1561-1568.
- Van Wyk, P.S.; Scholtz, D.J. y Marasas, W.F.O. 1988. Protection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* against infection by *Fusarium graminearum* in the soil. *Plant Soil*. vol. 107 pp: 251-257.
- Wilson, C.L.; Solar, M.J.; Ghaouth, A.E. y Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extract and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. vol. 81 pp: 204-210.

CONCLUSIONES

- El 86 % de las muestras recolectadas durante los años 1998-2000, destinadas al consumo animal contienen FB₁ en un intervalo de 89-8760 ng g⁻¹. Cuatro de estas muestras presentaron niveles de FB₁ superiores a 5000 ng g⁻¹, que es el límite recomendado por el comité de micotoxinas de la Asociación Americana de Diagnóstico de Laboratorio Veterinario para caballos u otros equinos. Por otra parte, el 23 % de las muestras destinadas al consumo humano estuvieron contaminadas con FB₁, pero los valores encontrados generalmente fueron bajos. En general, los productos de maíz que han sido sometidos a algún tipo de procesado, principalmente térmico, presentan valores menores de contaminación.

- La máxima velocidad de crecimiento de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* se determinó a la máxima a_w (0,98) y temperatura ensayada (25 °C). La velocidad de crecimiento de *F. graminearum* fue superior a la de *F. verticillioides* y *F. proliferatum* en todas las condiciones estudiadas. En cultivos mixtos, el número de UFC de *F. verticillioides* y de *F. proliferatum* fue menor en presencia de *F. graminearum* que en cultivo puro en todas las condiciones. Las diferencias entre las cepas de *F. graminearum* utilizadas fueron importantes, lo que en este caso, nos impide generalizar acerca del comportamiento de *F. graminearum* frente a otras especies competidoras.



- En ningún caso se observó inhibición de la producción de micotoxinas por ninguna de las cepas estudiadas al estar frente a otra especie competidora. Por lo tanto, la coinoculación de estas tres especies de *Fusarium* en maíz, no sería apropiada para conseguir un control de la producción de micotoxinas. Es más, cierta estimulación de la producción de DON fue observada, lo que podría sugerir que esta micotoxina podría tener alguna función en la estrategia de competición. De todas formas, la producción de micotoxinas parece estar más relacionada con factores abióticos como la temperatura y la a_w .

- Los aceites esenciales que mostraron mayor actividad antifúngica fueron los de canela, clavo, lemongrass, orégano y palmarosa.

- La acción antimicótica y antimicotoxigénica de los aceites fue mayor cuando el grano presentaba la máxima a_w estudiada (0,995). Los aceites 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 estudiados cuando los granos de maíz presentaban una a_w inicial de 0,995 y se incubaban a 30 °C, aunque al incubarlos a 20 °C, la producción de FB₁ por *F. verticillioides* fue estimulada por los aceites de clavo y orégano. Por otra parte, la producción de zearalenona fue inhibida por el aceite de palmarosa, a las dos temperaturas, cuando la a_w inicial del maíz era de 0,995 a_w .

- Los aceites esenciales estudiados tendrían mayor efecto antimicótico y antimicotoxigénico si se utilizaran como fungicidas precosecha, aunque son necesarios estudios previos antes de utilizarlos como tales.

FUTURAS INVESTIGACIONES

- Sería interesante incluir, vistos los resultados del capítulo IV acerca del riesgo potencial de contaminación con micotoxinas en alimentos, un sistema de control de la contaminación por micotoxinas en alimentos a base de maíz destinados al consumo humano y animal.
- Si bien los resultados obtenidos en la presente tesis contribuyen a ampliar el conocimiento del efecto de los aceites esenciales sobre los mohos, son muchos los interrogantes que quedan aún por despejar. Por ejemplo, conocer el efecto de los aceites seleccionados sobre granos de maíz naturalmente contaminados. También elucidar el efecto global sobre la microflora del maíz, nos permitiría minimizar riesgos tanto de estimulación de la producción de otras toxinas como de una posible inhibición selectiva, por ejemplo de las especies de *Fusarium*. Es posible que si los aceites inhiben selectivamente a las especies de *Fusarium*, éstas se encuentren en desventaja competitiva y otras especies igualmente patógenas o productoras de micotoxinas puedan dominar el ecosistema si no son inhibidas por los aceites utilizados.
- Estudiar diferentes combinaciones de los aceites para lograr una mezcla de aceites que fuera efectiva tanto en el control del crecimiento fúngico como de la producción de diferentes micotoxinas y por otro lado, estudiar el posible efecto sinergista con el fin de bajar la dosis empleada de cada aceite.
- Evaluar la idoneidad de los aceites, en función de sus características organolépticas y toxicológicas, para el uso en la alimentación animal y humana.



- Dado que los requerimientos hídricos necesarios para el crecimiento y producción de micotoxinas por *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. graminearum* se dan en el campo durante un cierto período de tiempo, el control en el campo adquiere una importancia capital. Por lo tanto, realizar una monitorización de la temperatura y de las precipitaciones durante el crecimiento del cultivo, nos permitiría efectuar una serie de recomendaciones de tratamientos a seguir. Tanto el uso de fungicidas precosecha, como podrían ser los aceites esenciales, así como la implementación de un sistema integrado, lo que consistiría 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.

