

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

ESTUDIO DE ESPECIES MICOTOXÍGENAS DEL GÉNERO *Penicillium*:
Penicillium verrucosum Dierckx

Memoria presentada para
optar
al grado de doctor

Eva Martínez Benítez

MARIA ROSA BRAGULAT i ARARÀ y FRANCISCO JAVIER CABAÑES SAENZ,
profesores titulares del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de
Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFICAN:

que Doña EVA MARTÍNEZ BENÍTEZ ha realizado el presente trabajo sobre 'Estudio
de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx'
bajo nuestra dirección en el Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la
Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste, a efectos de ser presentada como Memoria de Tesis para optar al
grado de Doctor en Veterinaria, firmamos el presente certificado en Bellaterra a 11 de
Marzo de 2003.

M.R. Bragulat i Ararà

F.J. Cabañes Saenz

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El género <i>Penicillium</i>	3
1.1.1. Importancia.....	3
1.1.1.1. <i>Penicillium</i> spp. en alimentos.....	3
1.1.1.2. Uso industrial de <i>Penicillium</i> spp.	5
1.1.1.3. Patogenicidad de <i>Penicillium</i> spp.	7
1.1.2. Características morfológicas	8
1.1.3. Micotoxinas en <i>Penicillium</i> spp. y su toxicidad.....	12
1.1.4. Taxonomía.....	16
1.1.4.1. Situación taxonómica del género.....	16
1.1.4.2. Clasificación del género <i>Penicillium</i>	16
1.1.4.2.1. Antecedentes históricos	16
1.1.4.2.2. Situación actual.....	19
1.2. Subgénero <i>Penicillium</i>	24
1.2.1. Taxonomía.....	29
1.2.1.1. Criterios morfológicos.....	29
1.2.1.2. Criterios de metabolismo secundario	31
1.2.1.3. Criterios fisiológicos y bioquímicos	34
1.2.1.4. Biología molecular	38
1.2.2. Complejo <i>P. aurantiogriseum</i>	41
1.3. <i>Penicillium verrucosum</i>	44
1.4. Ocratoxinas	49
1.4.1. Hongos productores.....	50
1.4.2. Presencia en alimentos	52
1.4.3. Factores que influyen en la producción de la OA.....	55
1.4.3.1. Factores abióticos	55
1.4.3.1.1. Sustrato.....	55
1.4.3.1.2. Actividad de agua	57
1.4.3.1.3. Temperatura	57
1.4.3.1.4. pH.....	58
1.4.3.1.5. Atmósfera	58
1.4.3.2. Factores bióticos	59

1.4.3.3. Otros factores	59
1.4.4. Metabolismo y mecanismo de acción	60
1.4.5. Ocratoxicosis natural	61
1.4.5.1. Ocratoxicosis en los animales	61
1.4.5.2. Ocratoxicosis en el hombre	62
1.4.6. Ocratoxicosis experimental.....	64
1.4.7. Métodos analíticos	66
1.4.7.1. Extracción	66
1.4.7.2. Detección y cuantificación	67
1.4.8. Prevención y detoxificación	69
1.4.9. Legislación.....	71
2. OBJETO E INTERÉS.....	73
3. PLAN DE TRABAJO.....	77
4. MATERIAL Y MÉTODOS	81
4.1. ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y EL RECuento DE <i>Penicillium</i> spp. EN MUESTRAS DE PIENSO Y MATERIAS PRIMAS.....	83
4.1.1. Muestras estudiadas	83
4.1.2. Procesado de las muestras	83
4.1.3. Identificación hasta nivel de especie de las cepas de <i>Penicillium</i> spp.	84
4.2. ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y MICOTOXÍGENO DE <i>Penicillium</i> spp.	86
4.2.1. Cepas estudiadas.....	86
4.2.2. Estudio fisiológico y bioquímico de <i>Penicillium</i> spp.	86
4.2.3. Estudio micotoxígeno de <i>Penicillium</i> spp.	91
4.2.3.1. Extracción de micotoxinas	91
4.2.3.2. Preparación de los patrones de micotoxinas	91
4.2.3.3. Detección de micotoxinas mediante cromatografía en capa fina (TLC)	92
4.2.3.3.1. Detección de las micotoxinas: AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , CIT, STE, OA y ZEA mediante TLC... ..	93
4.2.3.3.2. Detección de las micotoxinas: AP y PEN A mediante TLC.....	95

4.2.3.4. Detección y cuantificación de OA mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	96
4.3. ESTUDIO MOLECULAR DE <i>P. verrucosum</i>	97
4.3.1. Cepas estudiadas.....	97
4.3.2. Extracción del DNA fúngico	97
4.3.3. Amplificación mediante PCR del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2	98
4.3.4. Secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2	99
4.3.5. Análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)	100
4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE OA Y CIT EN CEPAS DE <i>P. verrucosum</i>	101
4.4.1. Técnicas comunes empleadas en los cuatro estudios.....	101
4.4.1.1. Cepas ensayadas	101
4.4.1.2. Técnica de siembra	102
4.4.1.3. Características morfológicas	102
4.4.1.4. Extracción, detección y cuantificación de micotoxinas (OA y CIT)	102
4.4.1.4.1. Extracción de micotoxinas (OA y CIT)	102
4.4.1.4.2. Preparación de los patrones de OA y de CIT	103
4.4.1.4.3. Detección de OA y de CIT mediante cromatografía en capa fina (TLC)	103
4.4.1.4.4. Detección y cuantificación de OA mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	103
4.4.2. Técnicas específicas empleadas en los cuatro estudios.....	103
4.4.2.1. Estudio del efecto de la fuente de carbono	103
4.4.2.2. Estudio del efecto de la actividad de agua (a_w)	104
4.4.2.3. Estudio del efecto del pH	104
4.4.2.4. Estudio del efecto de la temperatura de incubación.....	105
4.5. MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES, COLORANTES Y REACTIVOS	106
4.5.1. Medios de cultivo	106
4.5.2. Diluyentes	113

4.5.3. Colorantes y reactivos	113
4.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO. GRÁFICAS	117
5. RESULTADOS	119
5.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y EL RECuento DE <i>Penicillium</i> spp. EN MUESTRAS DE PIENSO Y MATERIAS PRIMAS	121
5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y MICOTOXÍGENO DE <i>Penicillium</i> spp.	132
5.2.1. Resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de <i>Penicillium</i> spp.	132
5.2.2. Resultados correspondientes al estudio micotoxígeno de <i>Penicillium</i> spp.	146
5.2.2.1. Resultados correspondientes a la detección de las micotoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AP, CIT, STE, OA, PEN A y ZEA mediante TLC	146
5.2.2.2. Resultados correspondientes a la detección y cuantificación de OA mediante HPLC	146
5.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MOLECULAR DE <i>P. verrucosum</i>	156
5.3.1. Resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2	156
5.3.2. Resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD).....	158
5.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE OA Y CIT EN CEPAS DE <i>P. verrucosum</i>	167
5.4.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono	167
5.4.1.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre las características morfológicas macroscópicas.....	167
5.4.1.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la detección de OA y CIT mediante TLC.....	169
5.4.1.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC.....	170

5.4.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w	179
5.4.2.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre las características morfológicas macroscópicas.....	179
5.4.2.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre la detección de OA y CIT mediante TLC.....	180
5.4.2.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC	180
5.4.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH	188
5.4.3.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre las características morfológicas macroscópicas.....	188
5.4.3.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre la detección de OA y CIT mediante TLC.....	189
5.4.3.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC	189
5.4.4. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación	198
5.4.4.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre las características morfológicas macroscópicas.....	198
5.4.4.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la detección de OA y CIT mediante TLC.....	199
5.4.4.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC	199
6. DISCUSIÓN	207
6.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y EL RECuento DE <i>Penicillium</i> spp. EN MUESTRAS DE PIENSO Y MATERIAS PRIMAS.....	209
6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y MICOTOXÍGENO DE <i>Penicillium</i> spp.	213
6.2.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de <i>Penicillium</i> spp.	213
6.2.1.1. Discusión de los resultados correspondientes a la identificación hasta nivel de especie de las cepas de <i>Penicillium</i> spp.	213

6.2.1.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de <i>Penicillium</i> spp.	216
6.2.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio micotoxígeno de <i>Penicillium</i> spp.	223
6.2.2.1. Discusión de los resultados correspondientes a la detección de las micotoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AP, CIT, STE, OA, PEN A y ZEA mediante TLC	223
6.2.2.2. Discusión de los resultados correspondientes a la detección y cuantificación de OA mediante HPLC	230
6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MOLECULAR DE <i>P. verrucosum</i>.....	232
6.3.1. Discusión de los resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2.....	232
6.3.2. Discusión de los resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD).....	233
6.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE OA Y CIT EN CEPAS DE <i>P. verrucosum</i>	236
6.4.1. Discusión de los métodos empleados.....	236
6.4.1.1. Discusión de los métodos empleados: medios de cultivo	236
6.4.1.2. Discusión de los métodos empleados: TLC	237
6.4.1.3. Discusión de los métodos empleados: técnica de extracción (valoración según los resultados obtenidos mediante HPLC)	237
6.4.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de diversos factores abióticos sobre la morfología en cepas de <i>Penicillium verrucosum</i>	238
6.4.3. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de diversos factores abióticos sobre la producción de OA y CIT	240
6.4.3.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de OA y CIT	240
6.4.3.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de la a _w sobre la producción de OA y CIT	242

6.4.3.3. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre la producción de OA y CIT	244
6.4.3.4. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de OA y CIT	246
6.4.4. Discusión de la relación existente entre los resultados correspondientes al estudio de diversos factores abióticos sobre la morfología de <i>P. verrucosum</i> y sobre la producción de OA y CIT	247
7. CONCLUSIONES	251
8. BIBLIOGRAFÍA	255
9. ANEXOS	287
9.1. ANEXO 1. Abreviaturas	289
9.2. ANEXO 2. Colores.....	292
9.3. ANEXO 3. Láminas.....	295

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El género *Penicillium*

El género *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en 1809. Thom, en el año 1910, consideró a *P. expansum* como la especie tipo del género. Las especies que incluye el género *Penicillium* son ubicuas, de amplia distribución por todo el mundo y consideradas saprófitas. Muchas de ellas viven en suelo o en materia orgánica en descomposición (350, 360).

2.1.1. Importancia

1.1.1.1. *Penicillium* spp. en alimentos

En muchas ocasiones los alimentos destinados al consumo humano o animal son el hábitat de *Penicillium* spp. Algunas especies son consideradas patógenas de frutas y algunas verduras frescas (sobre todo especies de los subgéneros *Penicillium* y *Biverticillium*) y cereales (algunas especies del subgénero *Penicillium*) (40, 360). Así, algunas *Penicillium* spp. tienen asociaciones específicas con alimentos, lo que permite identificaciones presuntivas, como algunas de las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* en los cereales, o como otras que presentan un mayor grado de especialización: los patógenos de frutas *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos y *P. expansum* en manzana, pera, cereza y otras frutas (40, 139, 360, 366). Desde el punto de vista económico, las especies de este género causan importantes pérdidas al deteriorar cereales, frutas y otros alimentos durante su almacenamiento. Muchas especies del género son psicrotóficas y pueden producir el deterioro de diferentes alimentos a bajas temperaturas, suponiendo un posible problema para alimentos que se conservan en refrigeración (40, 360).

El almacenamiento de frutas, al tratarse de productos frescos, puede presentar importantes pérdidas debido al crecimiento de *Penicillium* spp. El control de estos posibles problemas se lleva a cabo mediante prevención de daños físicos en la fruta, tratamientos diversos y un almacenamiento a bajas temperaturas lo más corto posible. Los tratamientos seguidos suelen ser mediante fungicidas, lavados con agua o con

soluciones desinfectantes o tratamientos térmicos (360). Técnicas propuestas recientemente utilizan pulverizaciones con bacterias o levaduras como agentes de biocontrol (129, 140, 209, 324). Estas inoculaciones pueden ser combinadas con calor (219, 256) o con el uso de atmósferas modificadas y fungicidas (101, 453, 487). Estudios recientes demuestran que es posible inducir una mayor resistencia de los cítricos frente a la infección por *P. digitatum* mediante tratamientos con reguladores de crecimiento, agua caliente, con el agente de biocontrol *Candida oleophila* o mediante irradiación con UV (121, 342, 372). También existen propuestas para la utilización de sustancias alternativas como aceites esenciales o peróxido de hidrógeno (500, 520), carbonato sódico y bicarbonato sódico (449) o molibdato de amonio (325). Moodley y colaboradores demuestran la efectividad del polietileno, utilizado como material de envasado, para inhibir el crecimiento y sobretodo la producción de patulina por *P. expansum* en manzanas (305).

Uno de los mayores problemas que generan las *Penicillium* spp. para el hombre y los animales radica en la posible producción de micotoxinas, con diferentes efectos tóxicos, en alimentos (46, 246, 510). Algunos autores consideran que el mayor avance que podría hacerse en la nutrición actual sería el control de la presencia de estos metabolitos fúngicos. El creciente interés en controlar y reducir esta presencia en alimentos queda reflejado en la reciente publicación de normativa europea reguladora de los niveles de distintas micotoxinas en alimentos (22).

Tradicionalmente, los hongos micotoxígenos se habían dividido en hongos de campo y de almacenamiento. Las *Penicillium* spp. pueden considerarse hongos colonizadores tanto en condiciones de campo como de almacenamiento (293). Las micotoxinas producidas por *Fusarium* spp. se elaboran en productos agrícolas mayoritariamente antes de la cosecha, ya que las especies de este género son las principales especies fúngicas que se desarrollan durante el crecimiento de la planta en el campo. Las toxinas elaboradas por *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. se producen tanto en condiciones de campo como de almacenamiento. Las principales toxinas que producen estas especies son las aflatoxinas, la ocratoxina A (OA) y la citrinina (CIT). Las dos últimas pueden ser producidas por *Penicillium* spp. (159, 162, 293, 360, 366).

Generalmente, los cereales que se han mantenido en peores condiciones de almacenamiento se destinan al consumo animal (294, 430). Además, y dependiendo de cómo se haya realizado este almacenamiento, el propio pienso puede ser sustrato para la formación de las micotoxinas (308). Así, los niveles de micotoxinas son más altos en general en los alimentos destinados a las distintas especies de abasto. Sin embargo, la estabilidad de algunas de estas moléculas, como sucede con la OA, hace que sigan la cadena alimenticia hasta llegar finalmente al hombre (308, 347, 356).

Los niveles de micotoxinas en alimentos han de ser controlados mediante programas de prevención que incluyan legislación de concentraciones máximas aceptadas (22, 46, 308) y mediante un uso seguro de las especies que se utilizan para la obtención de distintos alimentos (40, 172, 246).

1.1.1.2. Uso industrial de *Penicillium* spp.

El primer y mayor uso industrial de *Penicillium* spp. ha sido la producción de penicilina. El descubrimiento de este metabolito de *P. notatum* (actualmente *P. chrysogenum*) por Alexander Fleming fue en 1928. El estudio del género aumentó en años posteriores en busca de cepas que presentaran una gran producción de penicilina y en busca de nuevos antibióticos (350, 386). Ningún otro metabolito aislado en la época, sin embargo, presentó actividad contra bacterias sin presentar toxicidad para el hombre. El uso de la penicilina como agente terapéutico comenzó a llevarse a cabo en los años 40. A partir de entonces, y hasta nuestros días, se han utilizado cepas de esta especie en procesos industriales para producir el antibiótico (350). El estudio del metabolismo de la producción de la penicilina todavía es motivo de investigación (340, 494). La especie de reciente descripción *P. nalgiovense*, considerada una forma domesticada de *P. chrysogenum*, también posee la capacidad de producir penicilina (360). En este caso es necesaria la selección de cepas no productoras del antibiótico ya que esta especie se utiliza como cultivo iniciador en la producción de embutidos (21). La producción de antibióticos, como sucede con la de micotoxinas, ha de ser evitada en cualquier tipo de alimentos (162). Recientemente se ha citado la producción de penicilina también por parte de *P. griseofulvum* (239).

Algunas *Penicillium* spp. son utilizadas para la elaboración de quesos. Las especies utilizadas con este fin son *P. roqueforti* para la producción de queso Roquefort y quesos azules, y *P. camemberti* para la de Camembert y similares. Debido a la producción de enzimas lipo y proteolíticos, el crecimiento del hongo aporta al queso la textura característica. El aroma y sabor se deben a los ácidos grasos libres producto de la lipólisis, a los productos obtenidos de la proteólisis y a la formación de otros compuestos aromáticos, entre los que destacan cetonas y alcoholes (40). Algunas *Penicillium* spp. son utilizadas también como cultivos iniciadores en la producción de derivados cárnicos, sobretudo en productos fermentados y desecados como salchichones y chorizos. Este uso se reserva básicamente a las especies *P. nalgiovense* y *P. chrysogenum* (172, 268, 295). Como en el caso de la producción de quesos, la difusión en el embutido de enzimas lipo y proteolíticos, hace mejorar sus características organolépticas (61, 168, 172, 268, 295). En países orientales y de África y América del Sur se elaboran productos fermentados a partir de cereales que utilizan *Penicillium* spp., entre otras, como fermento natural. El producto obtenido es denominado koji como término general, y éste puede ser utilizado a su vez como fermento iniciador en la elaboración de otros productos tradicionales (40).

Otras especies del género *Penicillium* son también utilizadas industrialmente para la obtención de enzimas, principalmente, pectinasas, glucosa oxidasa y catalasa (40).

Las especies del género *Penicillium*, así como sucede en otros géneros de hongos microscópicos, comparten muchas rutas metabólicas con animales y plantas y poseen la capacidad de sintetizar metabolitos muy complejos, como las benzodiazepinas (60, 195). Muchos de estos metabolitos son similares a moléculas presentes en organismos superiores y algunos son utilizados como fármacos. Un estudio reciente cita la detección de un compuesto de *P. aurantiogriseum* que es capaz de inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon humanas (208). La especie *P. citrinum* puede sintetizar un precursor de la pravastatina, fármaco utilizado como tratamiento para la hipercolesterolemia (204, 290). Las estatinas se obtienen de forma natural, semisintética o totalmente sintética y son moléculas capaces de inhibir la síntesis de colesterol endógeno (290).

1.1.1.3. Patogenicidad de *Penicillium* spp.

La única especie de *Penicillium* spp. considerada patógena para el hombre y los animales es *P. marneffeii*. Esta especie presenta dimorfismo, característica única en el género, de manera que cuando se desarrolla a 37°C su crecimiento es levaduriforme (114, 356). Esta micosis es endémica en Asia tropical, especialmente en el norte de Tailandia, China, Hong Kong y Taiwan (102, 463, 496, 509). Los casos de la enfermedad detectados en Europa son básicamente en inmigrantes de las zonas endémicas (28, 389, 509), aunque también se citan esporádicamente casos sin relación aparente con las zonas endémicas (261). Esta micosis provoca un cuadro de fiebre y pérdida de peso acompañado frecuentemente de erupciones cutáneas en forma de pápula (237, 296, 463). Las infecciones producidas por esta especie están generalmente relacionadas con pacientes inmunodeprimidos (28, 114, 389, 463, 509). En los últimos años ha aumentado el número de pacientes que presentan inmunodeficiencias debido básicamente al incremento de infecciones por el HIV y a tratamientos que disminuyen la respuesta inmunitaria (296, 502).

Son pocas las especies del género *Penicillium* que puedan desarrollarse a 37°C. La mayoría de las que presentan esta capacidad pertenecen, como *P. marneffeii*, al subgénero *Biverticillium* (350, 356, 360). Así, han sido descritas esporádicamente otras *Penicillium* spp., sobretodo pertenecientes al citado subgénero, como causantes de infecciones sistémicas en hombre y animales (356). La especie *P. piceum* ha sido descrita recientemente como causante de un cuadro sistémico en el hombre (203). Samson y Hoekstra citan otras especies de este subgénero, como *P. purpurogenum* y *P. funiculosum*, como patógenas para el hombre (401). Sin embargo, se han descrito casos causados por otras especies del género. Estos cuadros de infección por *Penicillium* spp. son esporádicos y suelen ir relacionados con pacientes inmunodeprimidos o con algún otro tipo de factor predisponente (306), tanto en hombre (114, 237, 306, 307) como en animales (35, 43, 114).

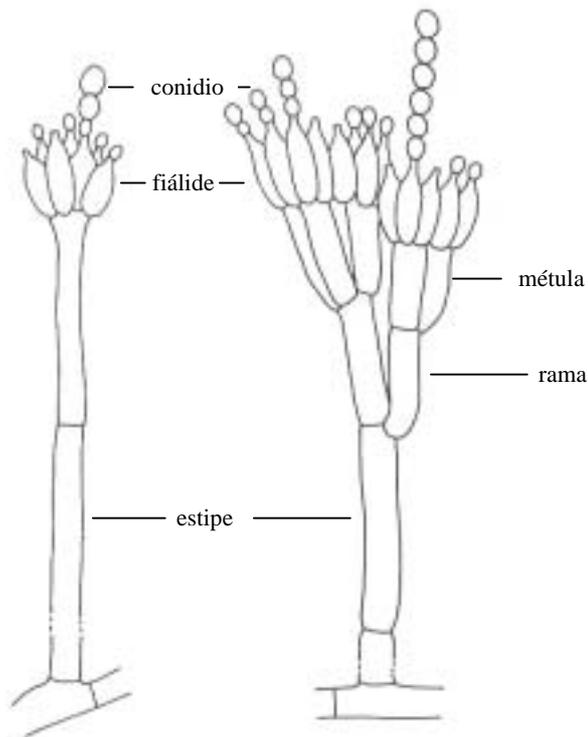
Otras patologías que pueden ocasionar los hongos son las reacciones de hipersensibilidad. En el caso de *Penicillium* spp., se han publicado casos de neumonía alérgica en trabajadores de fábricas de queso expuestos a una gran carga de conidios de *P. roqueforti* (126) y *P. verrucosum* (182).

Un problema que está adquiriendo relevancia los últimos años es el de los cuadros respiratorios acompañados de fatiga, dolores de cabeza y mucosas irritadas que se producen en trabajadores o personas que habitan en edificios en los que existe un crecimiento fúngico masivo. Excepto para los casos de alergia específica a algún hongo, existen varias hipótesis para explicar estos cuadros, denominados ‘síndrome del edificio enfermo’. Los metabolitos fúngicos posiblemente relacionados con este problema son proteínas, glucanos, compuestos volátiles y micotoxinas (316). Se han descrito casos posiblemente relacionados con la presencia de OA (388) y de tricotecenos producidos por *Fusarium* spp. (192, 479). Existen numerosos estudios respecto a la producción de diferentes micotoxinas (316, 481) y de compuestos volátiles (317, 512) por hongos que crecen en edificios o en materiales de construcción con excesiva humedad.

1.1.2. Características morfológicas

La estructura que caracteriza a *Penicillium* spp. es el conidióforo que presenta en forma de pincel. A la morfología de esta estructura es a la que debe el nombre el género (del latín *Penicillus*, ‘pincel pequeño’). Los conidios se presentan en cadenas y son originados a partir de una célula especializada: la fiálide. El conidióforo está unido al micelio mediante la estipe. Entre ésta y las fiálides pueden aparecer diferentes células. Estas células se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto desde el que se originan. Aparte del de las fiálides, los puntos de ramificación son uno, dos o excepcionalmente, tres, a lo largo del conidióforo. La célula de soporte de la fiálide se denomina métula y la célula de soporte de la métula se denomina rama, en las especies que las presentan. Estas ramas parten de la estipe, aunque pueden partir, a su vez, de otras ramas (Figura 1).

Figura 1. Nombre de las estructuras del conidióforo de *Penicillium* spp. Adaptado de Samson y colaboradores (403).



En el año 1985 fue propuesto un cambio en la nomenclatura de las estructuras que conforman el conidióforo de *Penicillium* y *Aspergillus* spp. (302). Se propuso el uso de terminología no latina, que permitiera su traducción a diferentes lenguas, y la sustitución de términos que, por haber tenido diferentes significados, pudieran inducir a error. Los autores recomendaban el uso de los términos ‘célula conidiógena’ (‘conidiogenous cell’) y ‘célula que soporta a la célula conidiógena’ (‘cell supporting conidiogenous cell’) o simplemente ‘célula soporte’ (‘supporting cell’) en sustitución de ‘fiálide’ y ‘métula’, respectivamente. Para el resto de estructuras del conidióforo recomendaron el término ‘rama’ (‘branch’), siendo la ‘célula rama’ (‘branch cell’) la más próxima a la métula o célula soporte en caso de presentarse más de un punto de ramificación por debajo de ésta. El término ‘estipe’ también quedaría sustituido por el de ‘porción basal del conidióforo’. Sin embargo, estas recomendaciones no han sido seguidas por otros autores y en la mayoría de trabajos se sigue utilizando la terminología descrita anteriormente (351, 360, 403).

La ontogenia en el género *Penicillium* es holoblástica. Por lo tanto, todas las capas de la pared de la célula conidiógena están implicadas en la formación del conidio y la secesión conidial es esquizolítica, lo que implica que el conidio, al madurar, se libera de la célula conidiógena por escisión del septo de separación creado entre ésta y el conidio (223).

La morfología del conidióforo determina la clasificación de *Penicillium* spp. en los cuatro subgéneros en los que se divide el género. De esta manera, el conidióforo más simple, que presenta un único punto de ramificación desde el conidio hasta la estipe (monoverticilado) pertenece al subgénero *Aspergilloides* (Figura 2). Estas especies presentan varias fiálides que parten directamente de la estipe. Por otro lado, el conidióforo más complejo (terverticilado, en la mayoría de casos, o cuaterverticilado) pertenece al subgénero *Penicillium*. Las especies pertenecientes a este subgénero presentan todas las estructuras descritas: fiálides, métulas, ramas, con o sin ramas intermedias, y la estipe. Los restantes tipos de conidióforos son los llamados biverticilados. Este tipo de conidióforos presentan, entre el conidio y la estipe y en este orden, fiálides y métulas. Los biverticilados engloban dos subgéneros. Las especies de *Biverticillium* presentan fiálides acerosas (Figura 3), más estrechas y delicadas que las que presentan el resto de subgéneros, de tamaño similar, en longitud y anchura, al de las métulas. Los conidios en este subgénero suelen ser elípticos, a diferencia de los de la mayoría de especies de los restantes subgéneros. Los conidióforos en el subgénero *Furcatum* presentan las métulas de mayor longitud que las fiálides y las fiálides son ampulliformes (como en los subgéneros *Penicillium* y *Aspergilloides*) (Figuras 2 y 3).

estructuras similares llamadas esclerocios. Son masas formadas por hifas endurecidas y no presentan ningún tipo de espora en su interior. Su función es desconocida, aunque se les relaciona con cleistotecios abortados.

1.1.3. Micotoxinas en *Penicillium* spp. y su toxicidad

El mayor riesgo de la contaminación alimentaria por hongos miceliares es la posible formación de micotoxinas. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos para mamíferos y otros animales al ser introducidos en el organismo por una ruta natural, fundamentalmente la vía oral a través de los alimentos (162). El género *Penicillium* contiene un gran número de especies toxígenas y la capacidad que tienen las *Penicillium* spp. de producir diferentes micotoxinas es superior a la existente en cualquier otro género fúngico (87, 363, 465). Las principales micotoxinas producidas por *Penicillium* spp. son las presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales micotoxinas producidas por *Penicillium* spp. (162).

Micotoxina	Subgénero	Principales especies productoras
Ácido ciclopiazónico	<i>Penicillium</i>	<i>P. camemberti</i> , <i>P. commune</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Ácido penicílico (AP)	<i>Penicillium</i>	<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. viridicatum</i>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. simplicissimum</i> ^a
Citrinina (CIT)	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>
	<i>Furcatum</i>	<i>P. citrinum</i>
Ocratoxina A (OA)	<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i> ^b
Patulina	<i>Penicillium</i>	<i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>
Penitrens	<i>Penicillium</i>	<i>P. crustosum</i> , <i>P. glandicola</i> ^c
	<i>Furcatum</i>	<i>P. canescens</i> ^a , <i>P. janczewskii</i> ^{ac}
Roquefortina C	<i>Penicillium</i>	<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. expansum</i>
		<i>P. griseofulvum</i> , <i>P. hirsutum</i> , <i>P. hordei</i>
		<i>P. roqueforti</i>
Toxina PR	<i>Penicillium</i>	<i>P. roqueforti</i>

^a Adaptado de Pitt y Hocking (360).

^b Adaptado de Larsen y colaboradores (244).

^c Adaptado de Frisvad y Samson (159).

El ácido ciclopiazónico está clasificado dentro de las neurotoxinas (508). Es moderadamente tóxico, con una LD₅₀ con administración enteral de 36 mg/kg en rata macho y de 63 mg/kg en la hembra (360, 472, 508). Diversos estudios han revelado lesiones en tracto intestinal, cuando se administra de forma enteral, y sintomatología nerviosa (desde ataxia a muerte por parálisis espástica) (508). Aunque no existe evidencia de toxicidad en humanos, su presencia en alimentos debería ser evitada. El uso de *P. camemberti* en la elaboración de quesos de distinto tipo puede suponer una fuente de la toxina. En diversos trabajos no se ha logrado encontrar cepas naturales de *P. camemberti* libres de esta capacidad productora (360, 410). Sin embargo, diversos autores coinciden en que la producción de la micotoxina en queso es muy baja o inexistente (188, 360).

El ácido penicílico (AP) fue la primera micotoxina descrita por Alsberg y Black en 1913 (360). El AP tiene actividad antibiótica, aunque también tiene efectos hepatotóxicos y carcinogénicos (472, 508). La LD₅₀ en un estudio en ratón fue de 100 mg/kg (472). En Estados Unidos, desde principios de siglo XX, se producía con frecuencia un cuadro de toxicidad en animales domésticos al alimentarlos con maíz del que se aislaba *P. puberulum* (actualmente *P. aurantiogriseum*) (360). Diversos trabajos documentan, hasta el día de hoy, la presencia de esta micotoxina de forma natural en distintos cereales y leguminosas (360, 370). Existen citas de numerosas especies con capacidad de producir AP (162) que se englobarían en la especie *P. aurantiogriseum* actualmente aceptada (366). La especie *P. viridicatum* también produce AP (159, 162), aunque otros autores no la consideran productora (84, 352, 360). El conflicto puede no ser tanto a nivel de metabolismo como taxonómico, al tratarse de especies muy relacionadas. Ambas pertenecen al denominado complejo *P. aurantiogriseum* y comparten también la capacidad de formación de compuestos nefrotóxicos como la xantomegnina y la viomelleína, entre otros (87, 162, 360).

La citrinina (CIT) es un tóxico renal para los animales monogástricos (363). También se han observado efectos parasimpático-miméticos en rata y ratón (508). Su LD₅₀ es de 35 mg/kg en ratón con administración intraperitoneal y de 110 mg/kg con administración oral (363). Su ingestión provoca diarrea y pérdida de peso debida a una degeneración renal (360, 363). La CIT se aísla de diversos tipos de cereales (97, 227, 318, 420, 522) y

otros sustratos vegetales como semillas de plantas oleaginosas, utilizadas frecuentemente como materias primas en la elaboración de piensos (424). En productos elaborados esta micotoxina no se suele detectar ya que se degrada fácilmente con elevadas temperaturas, dando lugar a metabolitos mucho menos tóxicos (199,227). En cerveza su presencia es muy baja ya que no parece resistir durante la formación de la malta y no supera el triturado de ésta (326, 413). Parte de la importancia de esta micotoxina es su presencia junto a la ocratoxina A (OA) en cereales, principalmente trigo y cebada (8, 231, 301, 360, 363, 424, 506). Debido a que ambas micotoxinas presentan toxicidad renal, se han valorado sus posibles efectos sinérgicos. Se ha demostrado un efecto sinérgico de ambas micotoxinas en cuanto a la LD₅₀, a cambios patológicos en riñón y a carcinogénesis, en estudios realizados en rata y ratón (218, 230). En otros estudios los efectos de la combinación de la OA y la CIT presentan cierto sinergismo aunque la sintomatología observada es intermedia entre ambas toxicosis. Así, se presenta una menor pérdida de peso que en la ocratoxicosis y un menor incremento en el consumo de agua del que se produce en la toxicosis por CIT (518). La producción de CIT en cereales en países de clima frío, junto con la de la OA, se relaciona mayoritariamente con la especie *P. verrucosum* (158, 198, 231, 360, 363, 419, 423, 522). La especie *P. citrinum*, de amplia distribución, elabora esta micotoxina por un gran número de sus cepas y además la produce en grandes cantidades (159, 162, 360). A esta especie se la relaciona con la aparición de niveles de CIT en arroz y maíz, así como en otros cereales y legumbres (110, 227, 361, 477). La especie *P. expansum* no suele aislarse de cereales, sino de una gran variedad de frutas y hortalizas (360). Aparte de las *Penicillium* spp., recientemente se ha descubierto la producción de CIT por varias especies del género *Monascus*, contaminantes de cereales y utilizadas tradicionalmente en Japón para la elaboración un pigmento rojo natural, incubando el hongo en arroz (42).

La ocratoxina A (OA) será tratada con más detalle en el apartado 1.4.

La patulina no parece tener efectos crónicos en el hombre, pero su importancia radica en la elevada frecuencia y cantidad con qué se detecta en zumos y otros productos derivados de manzana (360). La LD₅₀ en rata con administración intravenosa es de 25,5 mg/kg y con administración subcutánea de 15 a 25 mg/kg. En ratón la LD₅₀ con administración intravenosa es de 16 a 25 mg/kg y con administración subcutánea es de

8 a 15 mg/kg. La intoxicación aguda en estas especies provoca lesiones en sistema nervioso y zonas congestivas y edematosas en distintas localizaciones (508). Estudios de inoculación subcutánea de la toxina en rata demostraron cierto poder carcinogénico (472, 508). El uso de fruta deteriorada con *P. expansum* en la elaboración de zumos, principalmente de manzana, llevaría a la presencia de la micotoxina en el producto final (14, 36, 69, 179). De esta manera, el nivel de patulina en zumo y sidra refleja el grado de calidad de la materia prima inicial. Por esta razón, muchos países regulan el límite máximo de esta toxina en zumos de manzana (46, 130). *Penicillium griseofulvum* también puede causar lesiones cuando se inocula en manzanas y peras, pero no es una causa común de deterioro en estas frutas. Su presencia es mucho más frecuente en cereales y frutos secos, productos en los que no se ha detectado nunca patulina (360, 367, 510).

Los penitrems son micotoxinas tremorgénicas (neurotoxinas). La neurotoxicosis que causan provoca temblores en animales de laboratorio. Existen diferentes tipos de penitrems; los primeros descritos fueron el penitrem A, penitrem B y penitrem C. El penitrem A (PEN A) es el más tóxico de los tres, seguido del penitrem B (LD₅₀ en ratón de 1,05 y 5,84 mg/kg, respectivamente) (508). El penitrem C presenta una toxicidad mucho menor. Posteriormente se describieron hasta el penitrem F (289). La principal especie productora de PEN A es *P. crustosum* (289, 360), con cerca de un 100% de cepas toxígenas. Así, la sola presencia de esta especie en un alimento debería ser una señal de probabilidad de encontrar la toxina. Sin embargo, no se conocen casos de este tipo de toxicidad por ingestión de alimentos donde se aísla *P. crustosum*. Ésto puede ser debido a que la micotoxina sólo se produce a altos niveles de humedad (la a_w mínima requerida para su producción es de 0,92 y la óptima alrededor de 0,995). Las especies *P. janczewski* y *P. glandicola*, también productoras de PEN A, no son de aparición frecuente en alimentos, aunque la segunda sí se aísla con relativa frecuencia de muestras de cereales (360).

La toxicidad de la roquefortina C es baja: su LD₅₀ en rata es de 15 a 20 mg/kg mediante administración intraperitoneal (126), pero los valores de LD₅₀ en ratón, según distintos estudios son, como mínimo, unas 10 veces superiores (126, 363). La sintomatología obtenida en distintos estudios fue nerviosa, con convulsiones o parálisis. La importancia de esta micotoxina radica en que la produce la especie *P. roqueforti*, utilizada para la

producción de quesos azules. De hecho esta toxina se encuentra en estos productos, en los que además presenta una importante estabilidad. La búsqueda de cepas de *P. roqueforti* que no produzcan esta toxina ha resultado, por el momento, infructuosa. Sin embargo, no han sido descritos efectos adversos del consumo de quesos azules (126). La aparición de roquefortina C de forma natural se ha observado en otros productos, como granos de cereal (162).

La toxina PR presenta una LD₅₀ en rata es de 115 mg/kg tras administración oral. Este valor es de 6 mg/kg en ratón tras administración intraperitoneal. Esta toxina presenta una toxicidad aguda: dosis ligeramente superiores a la descrita resultaron letales para ratas, que presentaban congestión, edema y hemorragias en diferentes localizaciones (126, 363). Un elevado número de cepas de *P. roqueforti* son capaces de producir la toxina PR, así como la roquefortina C. La producción de la toxina PR se ha observado en cantidades considerables en cultivo puro. En la fabricación de quesos, en los que la molécula parece ser muy inestable, se ha encontrado únicamente en cantidades muy bajas (126, 360, 363, 508). En vacas se ha descrito un cuadro abortivo que se relacionó con un ensilado contaminado por esta toxina (126, 426). En otro tipo de sustratos no ha sido descrita la formación de esta micotoxina.

1.1.4. Taxonomía

1.1.4.1. Situación taxonómica del género

El género *Penicillium* incluye especies mitospóricas cuyas formas perfectas se incluyen en la familia *Trichocomaceae*, del orden *Eurotiales*, perteneciente al *phylum Ascomycota* (223). Estos teleomorfos se engloban en los géneros *Eupenicillium* y *Talaromyces* (223, 350, 366).

1.1.4.2. Clasificación del género *Penicillium*

1.1.4.2.1. Antecedentes históricos

El nombre genérico *Penicillium* fue descrito por primera vez por Link en 1809 en su 'Observationes in Ordines plantarum naturales'. Link describió tres especies: *P.*

glaucum, *P. candidum* y *P. expansum*. Sin embargo, en 1824, abandonó el término *P. expansum* y agrupó todas las *Penicillium* spp. de color verde bajo el nombre *P. glaucum*. Este hecho marcó profundamente la taxonomía de *Penicillium* spp. Durante años, la mayoría de especies del género fueron englobadas en *P. glaucum*, nombre sin equivalencia alguna en ningún otro sistema taxonómico (350, 386).

Brefeld, en 1874, publicó el estudio ‘Life history of *Penicillium*’, con descripciones e ilustraciones de *P. glaucum*, que corresponde, según algunas interpretaciones (386), con la especie *P. expansum*. En el mismo trabajo describió e ilustró el primer teleomorfo relacionado con *Penicillium* spp., ahora clasificable como perteneciente a *Eupenicillium* spp. Actualmente no se conoce ninguna especie que contemple todas las características descritas en esta obra, de manera que no se sabe si el autor trabajaba con una o diferentes cepas de *Penicillium* spp. o si se trataba de cultivos no puros (350, 386). Van Tieghem, en 1877, publicó descripciones de una forma perfecta en una especie actualmente clasificable como un *Talaromyces*. Por medio de siembras separadas de conidios y ascosporas, van Tieghem demostró el ciclo vital completo de las formas perfectas de *Penicillium* spp. (350).

Dierckx estudió ampliamente el género *Penicillium*, aunque sólo realizó una publicación sobre sus estudios en 1901: ‘Un essai de révision du genre *Penicillium* Link’. En ésta realzaba la necesidad de trabajar con cultivos puros y de realizar descripciones de colonias obtenidas bajo condiciones de cultivo estandarizadas. Dierckx describió 25 nuevas especies, la mayor aportación realizada hasta la fecha. La mayoría de su colección de cultivos se perdió mientras viajaba, lo que le hizo abandonar el estudio del género. Biourge, estudiante de Dierckx, continuó con su trabajo, neotipificando la mayoría de especies descritas por Dierckx y describiendo 60 nuevas especies en su publicación ‘Liste Onomastique du genre *Penicillium* (sensu latissimo)’. Era un amplio estudio que abarcaba especies cuya conidiogénesis presentaba forma de pincel, recordando a *Penicillium* spp. Entre ellas se encontraban especies actualmente incluidas en *Scopulariopsis*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Oidium* y otros géneros. En este trabajo se describía la primera división subgenérica de *Penicillium* spp. (350, 386).

Otros micólogos han realizado aportaciones importantes a *Penicillium* spp. Así, Bainier, Sartori, Westling, Zaleski y Sopp, entre otros, dieron nombres a especies del género

utilizados actualmente. Bainier, en 1907, separó algunas especies del género englobándolas en géneros de morfología de conidióforo similar. Así, describió los géneros *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* y *Citromyces* (386). Este último género incluía especies que presentaban un conidióforo monoverticilado. Estas especies fueron incluidas, en tratados posteriores, en el subgénero *Aspergilloides* de *Penicillium* (366, 386).

Thom publicó varios trabajos sobre los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. En su 'Fungi in cheese ripening' (1906) describió por primera vez las especies *P. roqueforti* y *P. camemberti*, relacionadas con la producción de quesos. En 1910 publicó un estudio sobre el género, 'Cultural studies of species of *Penicillium*'. En él volvía a destacar la importancia del uso de medios de cultivo estandarizados y aportaba los primeros datos acerca de la temperatura como factor de control de crecimiento. En esta obra se publicaba la primera clave de identificación para el género y se describían 13 nuevas especies. Thom afirmó la imposibilidad de adecuar dos de las tres primeras especies descritas por Link (*P. glaucum* y *P. candidum*) con las especies de su tratado. Sin embargo, debido a la especificidad del hábitat de *P. expansum* en fruta en mal estado, esta especie mantuvo clara su identidad, por lo que la propuso como especie tipo del género (350, 386). Este lectotipo se sigue aceptando en la actualidad (191). En 1930 publicó 'The Penicillia', una completa revisión donde se clasificaban todas las especies descritas hasta el momento en 4 divisiones subgenéricas. Estos subgéneros se dividían, a su vez, en secciones y subsecciones, dando lugar a la primera clasificación sistemática completa del género. Los géneros *Scopulariopsis*, *Gliocladium* y *Paecilomyces* fueron separados de *Penicillium* spp. pero tratados como géneros relacionados (350, 386).

En 1949, debido al interés creado por el comienzo del uso de *Penicillium chrysogenum* para la obtención de penicilina, se publicó la revisión del género 'A manual of the Penicillia' (386). Fue escrita fundamentalmente por Raper y Fennell, basándose en los estudios, observaciones y cultivos de Thom, aunque los autores que aparecen en la obra son Raper y Thom (350). Este manual supuso un gran avance en el estudio del género. En éste se clasificaron 137 especies en 4 secciones y 41 series. Se redujeron un gran número de especies creando sinonimias entre ellas. *Scopulariopsis*, *Gliocladium* y *Paecilomyces* aparecen, como en el manual de Thom, tratados como géneros distintos pero relacionados con *Penicillium*. Otro importante avance de estos autores fue la

conservación de las cepas mediante liofilización, lo que ha permitido conservar hasta hoy las cepas descritas en el trabajo. La clasificación realizada en este manual se basaba principalmente en la morfología macro y microscópica y en la textura de las colonias (350, 386, 400).

Poco después, en el año 1956, Abe publicó una revisión basada en el trabajo de Raper y Thom, añadiendo algunas características morfológicas y bioquímicas (350).

Las formas perfectas de *Penicillium* spp. se engloban en dos géneros: *Eupenicillium* Ludwig y *Talaromyces* Benjamin. El nombre *Eupenicillium* para las especies de *Penicillium* que presentaban cleistotecios fue utilizado por Ludwig en 1892. En 1922, Langeron utilizó el nombre genérico *Carpenteles* para estas especies. Este último nombre comenzó a tener mayor aceptación tras restablecerlo Benjamin en 1955. Sin embargo, Stolk y Scott, en 1967, demostraron que *Eupenicillium* era el nombre correcto para estos ascomicetos al ser el primero postulado. Benjamin introdujo el nombre *Talaromyces* en 1955 (351, 364).

1.1.4.2.2. Situación actual

Durante muchas décadas, el manual de Raper y Thom fue aceptado como el único tratado descriptivo estandarizado. Sin embargo, debido a que la clasificación estaba basada, en gran parte, en la textura de la colonia, la identificación mediante este manual era problemática (400). Tratados posteriores como el de Fassatióvá en 1977 o Ramírez en el 1982 (379) se basaban en criterios básicamente morfológicos (400). Este último describió un gran número de especies, tanto antes (379, 382, 383, 384) como después de la publicación del manual (381). Samson y colaboradores (404) revisaron la subsección *Fasciculata* y especies afines (la mayor parte del subgénero *Penicillium*) clasificando las especies mediante criterios de micromorfología de conidióforos y conidios. Esta revisión sigue la de Raper y Thom para la subsección y la simplifica ligeramente creando sinónimos. Sin embargo, presentaron especies de amplitud muy distinta entre sí: algunas especies estaban muy claramente definidas mientras otras tenían un concepto muy amplio e incluso aceptaban diversas variedades (como *P. verrucosum*, que incluía 5 subespecies distintas, correspondientes a 19 especies de Raper y Thom) (351, 364, 400). Las especies de *Eupenicillium* fueron revisadas por Stolk y Samson en un tratado

que relaciona los teleomorfos con sus formas imperfectas dando prioridad a las características del primero (con lo que pone en equivalencia anamorfos considerados como especies distintas) e incluye en sus claves de identificación *Penicillium* spp. que presentan esclerocios (351, 400).

En 1979, Pitt publicó la siguiente gran revisión del género, 'The genus *Penicillium*' (350). Está basada en el sistema taxonómico de Raper y Thom, aunque desenfatisa la textura como criterio taxonómico y utiliza otros criterios en las agrupaciones taxonómicas. Éste es el primer tratado del género en el que se utiliza una clasificación taxonómica válida según el código internacional de nomenclatura botánica (364). En él se distinguen 4 subgéneros y 10 secciones basándose en la morfología microscópica. Para la clasificación de las diferentes especies se tienen en cuenta criterios fisiológicos como el crecimiento a altas y bajas temperaturas (5 y 37°C) y a bajas actividades de agua (en el medio G25N). Un aspecto criticado de esta obra es la importancia que otorga el autor a los valores de los diámetros de las colonias desarrolladas en los distintos medios empleados. Esto llevó a diferenciar, en este tratado, especies que clásicamente se habían considerado relacionadas (como *P. verrucosum* y *P. viridicatum*, situadas en este tratado incluso en series distintas). Sin embargo, otras especies, principalmente *P. chrysogenum*, aceptaban según Pitt una gran variabilidad de diámetros de la colonia desarrollada en cada uno de los medios de cultivo empleados (400).

Todos los tratados taxonómicos descritos se basaban principalmente en características morfológicas y en algunos casos también fisiológicas. Desde los años 70 comenzaron a publicarse estudios utilizando otras propiedades de *Penicillium* spp. como herramienta taxonómica. Algunos de ellos se basaron en estudios de cromatografía y diferencias en ácidos grasos de cadena larga y de constituyentes de la pared celular (353, 400). No fueron estudios muy concluyentes ni aportaron resultados importantes para un género tan amplio como *Penicillium*.

Ciegler y colaboradores (83) sugirieron que los metabolitos secundarios, y en particular las micotoxinas, podrían tener valor taxonómico. Este concepto fue aplicado por estos autores para la taxonomía de *P. viridicatum* (83, 84). Estudios similares que abarcaban gran parte de especies del género fueron publicados en los siguientes años, sobretodo

por el equipo de Filtenborg y Frisvad. En ellos se realizaban cromatografías (TLC) en las que se aplicaba un bocado de agar con la colonia directamente sobre la cromatoplaque, sin necesidad de extracción con solventes de las micotoxinas (135, 137). Frisvad realizó otros trabajos similares dirigidos, sobretudo, a la taxonomía de los terverticilados (144, 146, 151, 152), aunque también revisó el subgénero *Furcatum* (153). Posteriormente publicó trabajos en los que utilizaba, tras la extracción de las toxinas, cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), detectando gran cantidad de metabolitos (147, 161). Estos trabajos aportaron mucha información pero fueron criticados por la complejidad de su interpretación (353). Estas técnicas, además de necesitar un equipo muy especializado, presentan el peligro de confiar demasiado en sus resultados sin buscar una correlación con características morfológicas o de otro tipo que los apoyen. Sin embargo, un estudio integrado de diferentes fuentes de información puede dar resultados de gran valor taxonómico (48, 83, 244, 352).

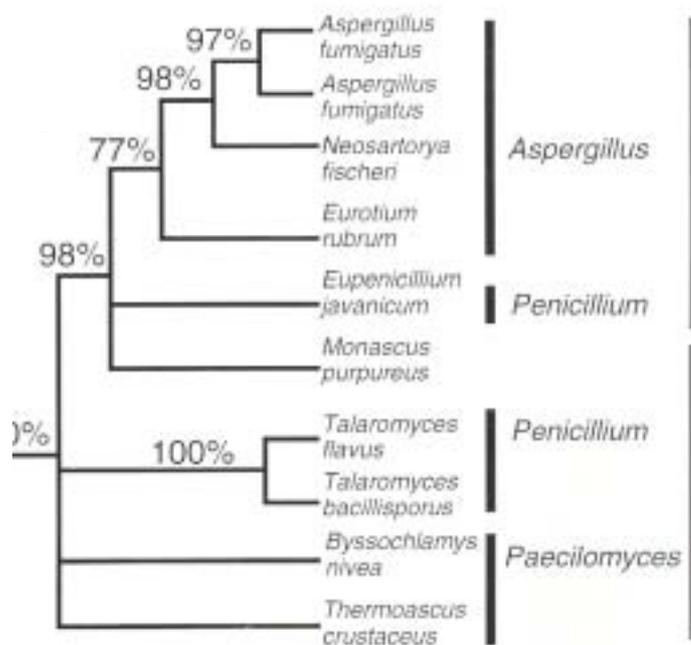
Otra de las características fisiológicas a las que se le propuso una utilización con fin taxonómico es la producción de enzimas por las diferentes especies del género.

Diversos estudios obtuvieron resultados prometedores, al seguir patrones similares al de las especies descritas por Pitt en 1979 (55, 95, 337). El estudio de Cruickshank y Pitt en 1987 (95) apoyó la clasificación taxonómica del subgénero *Penicillium* de Pitt en su mayor parte. Sin embargo, no se obtuvieron patrones diferentes para las especies *P. aurantiogriseum* y *P. viridicatum*, demostrando la excesiva confianza depositada por la taxonomía clásica en la coloración de los conidios. La aplicabilidad de estas técnicas, más allá de un apoyo a la clasificación taxonómica, es baja.

Algunos estudios moleculares han ayudado a resolver algunos problemas en *Penicillium* spp. Logrieco y colaboradores, analizando secuencias de RNA ribosómico corroboraron la identidad de muchas especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* (265). La filogenia de *Penicillium* spp. respecto a sus teleomorfos y a otros géneros relacionados también ha sido estudiados mediante diversas técnicas. Así, Taylor y colaboradores (471) demostraron, mediante restricción de la secuencia de DNA ribosómico, que *Talaromyces* spp. contiene anamorfos de *Penicillium* spp. y de *Paecilomyces* spp. Berbee y colaboradores (38) demostraron el origen polifilético de *Penicillium* spp. Con su estudio de las secuencias 18S, 5.8S, un fragmento de la 28S y las secuencias espaciadoras ITS 1 e ITS 2, vieron que el origen de los 2 géneros de ascomicetos que

presentan *Penicillium* spp. en su anamorfo es distinto, aunque relacionado. También concluyeron que la evolución en *Penicillium* spp. ha sido desde holomorfo hacia anamorfo. Así, *Eupenicillium* spp. está filogenéticamente más cerca de *Eurotium* y *Neosartorya*, holomorfos de *Aspergillus* spp., entre otros, mientras que *Talaromyces* se asemeja más a *Byssochlamys* y *Thermoascus*, holomorfos (junto a *Talaromyces*) de *Paecilomyces* spp. Esta clasificación corresponde con las características morfológicas de las ascosporas que presentan estos géneros, es decir, con la morfología de la forma perfecta (Figura 4). Resultados similares obtuvieron recientemente Ogawa y Sugiyama en un estudio más amplio analizando el fragmento 18S del DNA ribosomal (327).

Figura 4. Relación filogenética y tipo de ascosporas de los anamorfos de *Penicillium* y de *Aspergillus* y *Paecilomyces*. Adaptado de Berbee y colaboradores (38).



Los estudios basados en biología molecular han ayudado a entender las clasificaciones realizadas en los diversos tratados, o a descartar otras erróneas. Diversos estudios han demostrado que los holomorfos de las especies del subgénero *Biverticillium* tienen su ancestro en *Talaromyces* (262, 264, 471). Por otro lado, las especies pertenecientes a los otros 3 subgéneros parecen provenir de *Eupenicillium* (263, 346, 356). En el trabajo de Peterson (346), analizando DNA ribosomal de *Eupenicillium* spp. y *Penicillium* spp. de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Penicillium*, se relacionan *Eupenicillium*

spp. con especies de los tres subgéneros. Estudios basados en el sistema de ubiquinonas del género dieron unos resultados similares, al demostrar que el sistema mayoritario presente en el subgénero *Biverticillium* (Q10H₂) era diferente al de mayor presencia en el resto de los subgéneros (Q9; y Q10 en menor medida) (338, 398, 431). La clásica división en subgéneros según la complejidad del conidióforo parece no corresponder siempre con las relaciones filogenéticas según los resultados obtenidos por Peterson (346). Por ejemplo, la especie *P. vulpinum*, de fiálides acerosas, fue clasificada por Pitt como perteneciente al subgénero *Biverticillium* (350). Estudios basados en la secuencia del DNA ribosómico (263), en patrones de RAPD (521) y en tipos de ubiquinonas (431) la sitúan, sin embargo, entre los terverticilados. Estos estudios se ven confirmados, además, con los patrones de metabolitos secundarios producidos por la especie (152, 461).

Otros estudios realizados en *Penicillium* spp. con fines taxonómicos se basan en la asimilación de ciertas fuentes de carbono o nitrógeno (19, 20, 142, 432), diferencias en algunos componentes, como los ácidos grasos (266) o los polisacáridos de la pared celular (247), similitudes antigénicas (164) o resistencia a ciertos antibióticos como la cicloheximida (433). Algunos de estos datos, junto con los más clásicamente empleados de morfología o fisiología han sido incluidos en diversos sistemas informáticos de identificación rápida propuestos para el género (54, 225, 226, 354, 514). Estos sistemas informáticos para la identificación de *Penicillium* spp. fueron los primeros creados en micología (435). Recientemente se ha descrito un sistema de identificación informatizado basado en asimilación de fuentes de carbono (222) y otro de captación y análisis de imágenes digital en la que todo el proceso hasta obtener la identificación es informatizado (120). Estos sistemas descritos no suelen contar con demasiado éxito debido a la complejidad taxonómica del género y a que los parámetros que se evalúan no se puedan tomar con total objetividad en muchas ocasiones.

Pitt y Samson propusieron una lista de nombres para la familia Trichocomaceae en el 'Fifteenth International Botanical Congress' (365) con 223 nombres de *Penicillium* spp. y de 61 holomorfos de los géneros *Eupenicillium* y *Talaromyces*. Esta lista no fue finalmente aprobada, pero quedó como referencia para los géneros de esta familia. Recientemente, Pitt, Samson y Frisvad han publicado una lista de especies aceptadas pertenecientes a los géneros de la citada familia (366) que incluye 225 *Penicillium* spp.

y 61 nombres de sus holomorfos en los géneros *Eupenicillium* y *Talaromyces*. Esta lista incluye también los nombres no vigentes de uso más frecuente, junto con su sinónimo correspondiente en cada caso. Para *Penicillium* spp. existen más nombres de sinónimos no vigentes, cerca de 350, que de especies aceptadas.

1.2. Subgénero *Penicillium*

Las especies incluidas en el subgénero *Penicillium* por Pitt en su tratado del año 1979 presentan la característica de poseer al menos tres puntos de ramificación en su conidióforo (350). Estas especies comparten otras características fisiológicas, como presentar un diámetro generalmente superior a 18 μm en el medio de cultivo G25N, no presentar crecimiento a 37°C (a excepción de *P. chrysogenum*) y presentarlo con relativa frecuencia a 5°C, según la definición del citado trabajo (350). La especie tipo del género, *P. expansum* Link, pertenece a este subgénero.

Según Pitt, Samson y Frisvad (366), actualmente se aceptan 38 especies pertenecientes al subgénero *Penicillium*. La Tabla 2 detalla estas especies junto a sus sinónimos más frecuentes, según los autores. El subgénero *Penicillium* incluye la mayor parte de las especies productoras de micotoxinas importantes para el hombre y los animales (Tabla 1).

Tabla 2. Especies y sinónimos aceptados del subgénero *Penicillium* (366).

Espece	Sinónimos	Espece	Sinónimos
<i>P. aethiopicum</i> Frisvad, 1990		<i>P. brevicompactum</i> Dierckx, 1901	<i>P. bailowiezense</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. biourgeaneum</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. brunneostoloniferum</i> S. Abe ex Ramírez, 1982 <i>P. griseobrunneum</i> Dierckx, 1901 <i>P. hagemii</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. monstrosum</i> Sopp, 1912 <i>P. patris-mei</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. stoloniferum</i> Thom, 1910 <i>P. szaferi</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. tabescens</i> Westling, 1911
<i>P. allii</i> Vincent & Pitt, 1989	<i>P. hirsutum</i> var. <i>allii</i> (Vincent & Pitt) Frisvad, 1989		
<i>P. arenicola</i> Chalab. , 1950	<i>P. canadense</i> G. Sm., 1956		
<i>P. atramentosum</i> Thom, 1910			
<i>P. aurantiogriseum</i> Dierckx, 1901	<i>P. aurantio-albidum</i> Biourge, 1923 <i>P. aurantiocandidum</i> Dierckx, 1901 <i>P. aurantiovirens</i> Biourge, 1923 <i>P. brunneoviolaceum</i> Biourge, 1923 <i>P. carneolutescens</i> G. Sm., 1939 <i>P. conditaneum</i> Westling, 1911 <i>P. cordubense</i> C. Ramírez & A.T. Martínez, 1981 <i>P. cyclopium</i> Westling, 1911 <i>P. cyclopium</i> var. <i>aurantiovirens</i> (Biourge) Fassatióvá, 1977 <i>P. johanniolii</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. martensii</i> Biourge, 1923 <i>P. ochraceum</i> Bainier, 1930 <i>P. polonicum</i> K.M. Zalesky, 1927 <i>P. porraceum</i> Biourge, 1923 <i>P. puberulum</i> Bainier, 1907 <i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (Westling) Samson <i>et al.</i> , 1976 <i>P. verrucosum</i> var. <i>ochraceum</i> (Bainier) Samson <i>et al.</i> , 1976	<i>P. camemberti</i> Thom, 1906	<i>P. album</i> Epstein, 1902 <i>P. biforme</i> Thom, 1910 <i>P. candidum</i> Roger, 1923 <i>P. camemberti</i> Sopp, 1912 <i>P. camemberti</i> var. <i>rogeri</i> (Wehmer) Thom, 1910 <i>P. caseicola</i> Bainier, 1907 <i>P. epsteinii</i> Lindau, 1904 <i>P. paecilomyceforme</i> Szilvinyi, 1941 <i>P. rogeri</i> Wehmer, 1906

(sigue)

(Tabla 2, continúa)

Especie	Sinónimos	Especie	Sinónimos
<i>P. chrysogenum</i> Thom, 1910	<i>P. aromaticum</i> f. <i>microsporum</i> Romankova, 1955 <i>P. brunneorubrum</i> Dierckx, 1901 <i>P. camerunense</i> R. Heim, 1949 <i>P. chlorophaeum</i> Biourge, 1923 <i>P. cyaneofulvum</i> Biourge, 1923 <i>P. flavidomarginatum</i> Biourge, 1923 <i>P. griseoroseum</i> Dierckx, 1901 <i>P. harmonense</i> Baghdadi, 1968 <i>P. meleagrinum</i> Biourge, 1923 <i>P. notatum</i> Westling, 1911 <i>P. roseocitreum</i> Biourge, 1923 <i>P. rubens</i> Biourge, 1923	<i>P. confertum</i> (Frisvad <i>et al.</i>) Frisvad, 1989 <i>P. coprobium</i> Frisvad, 1990 <i>P. coprophilum</i> (Berk. & M.A. Curtis) Seifert & Samson, 1985 <i>P. crustosum</i> Thom, 1930	<i>P. glandicola</i> var. <i>confertum</i> Frisvad <i>et al.</i> , 1987 <i>P. aurantiogriseum</i> var. <i>poznaniense</i> K. M. Zalesky, 1927 <i>P. expansum</i> var. <i>crustosum</i> Fassat., 1977 <i>P. farinosum</i> Novobranova, 1974 <i>P. pseudocasei</i> S. Abe, 1963 <i>P. schmidtii</i> Szilvinyi, 1941 <i>P. solitum</i> var. <i>crustosum</i> (Thom) Bridge <i>et al.</i> , 1989
<i>P. clavigerum</i> Demelius, 1923		<i>P. digitatum</i> (Pers.: Fr.) Sacc., 1881	<i>P. digitatoides</i> Peyronel, 1913 <i>P. lanosogrisellum</i> Biourge, 1923 <i>P. olivaceum</i> Sopp, 1912 <i>P. olivaceum</i> Wehmer, 1895 <i>P. olivaceum</i> var. <i>italicum</i> Sopp, 1912 <i>P. olivaceum</i> var. <i>norvegicum</i> Sopp, 1912 <i>P. terraconense</i> C. Ramírez & A.T. Martínez, 1980
<i>P. commune</i> Thom, 1910	<i>P. australicum</i> Sopp ex J.F.H. Beyma, 1944 <i>P. cyclopium</i> var. <i>album</i> G. Sm., 1951 <i>P. lanoso-coeruleum</i> Thom, 1930 <i>P. lanosogriseum</i> Thom, 1930 <i>P. lanosoviride</i> Thom, 1930 <i>P. majusculum</i> Westling, 1911 <i>P. ochraceum</i> var. <i>macrosporum</i> Thom, 1930	<i>P. echinulatum</i> Raper & Thom ex Fassat., 1977	<i>P. crustosum</i> var. <i>spinulosporum</i> Yugi Sasaki, 1950 <i>P. cyclopium</i> var. <i>echinulatum</i> Raper & Thom, 1949 <i>P. palitans</i> var. <i>echinoconidium</i> S. Abe, 1956
<i>P. concentricum</i> Samson <i>et al.</i> , 1976	<i>P. coprophilum</i> (Berk. & M.A. Curtis) Seifert & Samson, 1985		

(sigue)

(Tabla 2, continúa)

Especie	Sinónimos	Especie	Sinónimos
<i>P. expansum</i> Link, 1809	<i>P. aeruginosum</i> Demelius, 1923 <i>P. elongatum</i> Dierckx, 1901 <i>P. janthogenum</i> Biourge, 1923 <i>P. kap-laboratorium</i> Sopp, 1925 <i>P. leucopus</i> (Pers.) Biourge, 1919 <i>P. musae</i> Weidemann, 1907 <i>P. plumiferum</i> Demelius, 1923 <i>P. resticulosum</i> Birkinshaw <i>et al.</i> , 1942 <i>P. variable</i> Wehmer, 1913	<i>P. griseofulvum</i> Dierckx, 1901 <i>P. hirsutum</i> Dierckx, 1901 <i>P. hordei</i> Stolk, 1969 <i>P. italicum</i> Wehmer, 1894	<i>P. duninii</i> Sidibe, 1974 <i>P. flexuosum</i> E. Dale, 1923 <i>P. patulum</i> Bainier, 1906 <i>P. urticae</i> Bainier, 1907 <i>P. corymbiferum</i> Westling, 1911 <i>P. verrucosum</i> var. <i>corymbiferum</i> (Westling) Samson <i>et al.</i> , 1976 <i>P. hirsutum</i> var. <i>hordei</i> (Stolk) Frisvad, 1989 <i>P. aeruginosum</i> Dierckx, 1901 <i>P. italicum</i> var. <i>album</i> C.T. Wei, 1940 <i>P. italicum</i> var. <i>avellaneum</i> Samson & Gutter, 1976 <i>P. japonicum</i> G. Sm., 1963 <i>P. ventruosum</i> Westling, 1911 <i>P. kojigenum</i> G. Sm., 1961 <i>P. glandicola</i> var. <i>mononematosum</i> Frisvad <i>et al.</i> , 1985
<i>P. fennelliae</i> Stolk, 1969		<i>P. lanosum</i> Westling, 1911	
<i>P. formosanum</i> H.M. Hsieh, <i>et al.</i> , 1987		<i>P. mononematosum</i> (Frisvad <i>et al.</i>) Frisvad, 1990	
<i>P. gladioli</i> McCulloch & Thom, 1928	<i>P. rolfsii</i> var. <i>sclerotiale</i> Novabranova, 1974	<i>P. nalgiovense</i> Laxa, 1932	
<i>P. glandicola</i> (Oudem.) Seifert & Samson, 1985	<i>P. divergens</i> Bainier & Sartory, 1912 <i>P. granulatum</i> Bainier, 1905 <i>P. granulatum</i> var. <i>globosum</i> Bridge <i>et al.</i> , 1989 <i>P. schneeggii</i> Boas, 1914	<i>P. olsonii</i> Bainier & Sartory, 1912	<i>P. brevicompactum</i> var. <i>magnum</i> C. Ramírez, 1982 <i>P. volgaense</i> Beliakova & Milko, 1972

(sigue)

(Tabla 2, continúa)

Especie	Sinónimos	Especie	Sinónimos
<i>P. palitans</i> Westling, 1911		<i>P. solitum</i> Westling, 1911	<i>P. casei</i> var. <i>compactum</i> S. Abe, 1956 <i>P. mali</i> Gorlenko & Novobr., 1983 <i>P. melanochlorum</i> (Samson <i>et al.</i>) Frisvad, 1985 <i>P. verrucosum</i> var. <i>melanochlorum</i> Samson <i>et al.</i> , 1976
<i>P. roqueforti</i> Thom, 1906	<i>P. aromaticum</i> Sopp, 1912 <i>P. aromaticum-casei</i> Sopp ex Sacc., 1913 <i>P. atroviride</i> Sopp, 1912 <i>P. biourgei</i> Arnaud, 1928 <i>P. conservandi</i> Novobr., 1974 <i>P. gorgonzolae</i> Weidemann, 1923 <i>P. roqueforti</i> Sopp, 1912 <i>P. roqueforti</i> var. <i>viride</i> Dattilo-Rubbo, 1938 <i>P. roqueforti</i> var. <i>weidemannii</i> Westling, 1911 <i>P. stilton</i> Biourge, 1923 <i>P. suaveolens</i> Biourge, 1923 <i>P. vesiculosum</i> Bainier, 1907 <i>P. virescens</i> Sopp, 1912 <i>P. weidemannii</i> (Westling) Biourge, 1923 <i>P. weidemannii</i> var. <i>fuscum</i> Arnaud, 1928	<i>P. ulaiense</i> Hsieh <i>et al.</i> , 1987 <i>P. verrucosum</i> Dierckx, 1901	<i>P. casei</i> Staub, 1911 <i>P. flavoglaucum</i> Biourge, 1923 <i>P. mediolanense</i> Dragoni & Cantoni, 1979 <i>P. nordicum</i> Dragoni & Cantoni ex C. Ramírez, 1986
<i>P. scabrosum</i> Frisvad <i>et al.</i> , 1990.		<i>P. viridicatum</i> Westling, 1911	<i>P. blakesleei</i> K.M. Zalessky, 1927 <i>P. ochraceum</i> Bainier, 1930 <i>P. olivicolor</i> Pitt, 1980 <i>P. olivinoviride</i> Biourge, 1923 <i>P. psittacinum</i> Thom, 1930 <i>P. stephaniae</i> K.M. Zalessky, 1927
		<i>P. vulpinum</i> (Cooke & Masee) Seifert & Samson, 1985	<i>P. claviforme</i> Bainier, 1905 <i>P. silvaticum</i> (Wehmer) Biourge, 1923 <i>P. silvaticum</i> (Wehmer) Gäumann, 1926

1.2.1. Taxonomía

1.2.1.1. Criterios morfológicos

El subgénero *Penicillium* de Pitt (350) corresponde con la mayor parte de la sección *Assymetrica* de Raper y Thom, a excepción de la subsección *Divaricata* y de *P. citrinum* y *P. oxalicum* de la subsección *Velutina* (386).

Raper y Thom clasificaron la sección *Assymetrica* en 5 subsecciones basándose en la textura de la colonia. Sin considerar las series que no corresponderían con el subgénero *Penicillium* de Pitt, encontramos 17 series entre las cuatro subsecciones.

Samson y colaboradores en su revisión de las subsecciones *Fasciculata*, *Lanata* y *Funiculosa* de la sección *Asymmetrica* de Raper y Thom (404) desenfataron el criterio de la textura de la colonia. La clasificación se basaba en criterios morfológicos microscópicos, como la ornamentación de las diferentes estructuras del conidióforo. Este trabajo parecía disminuir el problema taxonómico existente al reducir el número de especies respecto a las de Raper y Thom. Sin embargo, el resultado fue más complejo ya que no todas las especies fueron tratadas de igual forma. Así, en *P. verrucosum* se agruparon la mayoría de cepas terverticiladas asignándoles el rango de variedad (350, 353).

El subgénero *Penicillium* según Pitt (350) se divide, en base a diferencias en la morfología microscópica, en 4 secciones: la sección *Coronatum*, sección *Inordinate*, sección *Cylindrosporum*, cada una con una única serie, y la sección *Penicillium*, con 4 series, haciendo un total de 7 series en el subgénero. La sección *Coronatum* y la sección *Inordinate* acomodan una especie cada una. La especie *P. olsonii*, cuyo conidióforo presenta más de dos ramas en un mismo punto de ramificación, está incluido en la primera y *P. arenicola*, cuyos conidióforos presentan ramificaciones irregulares, en la segunda. La sección *Cylindrosporum* incluye 4 especies con conidios cilíndricos, como *P. italicum* y *P. digitatum*. Las restantes especies, que son la mayoría de las que incluye el subgénero, pertenecen a la sección *Penicillium* y producen un conidióforo terverticilado con una o dos ramas y conidios esferoidales a elípticos. Así, en el tratado de Pitt, el hecho de desenfatar la textura como criterio taxonómico llevó a una

reducción del número de series en el subgénero y a considerar algunas especies sinónimas, reduciendo en 19 las especies aceptadas por Raper y Thom (350).

Las descripciones de secciones y series que conforman el subgénero *Penicillium* y de las especies que constituyen las series varían mucho entre los diferentes tratados, al basarse en distintas características en cada caso. Generalmente, las especies que conforman una misma serie tienen características morfológicas en común, como sucede en los tratados de Raper y Thom (386) y Pitt (350), aunque en el segundo la clasificación también se había realizado priorizando la simplificación en la identificación de sus cepas (155, 350).

Así, a pesar de haber llegado a un sistema de clasificación aceptable para el subgénero *Penicillium* (350), la identificación de este grupo continuaba siendo complicada. La similitud morfológica y fisiológica entre muchas de las especies que conforman el subgénero en los medios utilizados por Pitt llevó a investigar otros campos para aumentar la fiabilidad de los sistemas de identificación. Por ello, en revisiones posteriores se han aplicado, junto con los morfológicos, nuevos criterios para realizar las clasificaciones específicas y supraespecíficas. Stolk y colaboradores propusieron, en 1990, una nueva subdivisión en series de las especies terverticiladas basada en micromorfología, metabolismo secundario y hábitat de las especies (461). Recientemente, se ha publicado un trabajo similar de Frisvad y colaboradores (155) en el que se presenta una nueva clasificación en series de un gran número de especies terverticiladas basándose en similitudes de metabolismo secundario, hábitat y características nutricionales y fisiológicas. En este trabajo se consideran 15 series, un mayor número que en los anteriores, y se relacionan las especies con sus teleomorfos y su hábitat de origen. Así, según estos autores, las especies del subgénero *Penicillium* se relacionan con alimentos o desechos de mamíferos, mientras las de *Aspergilloides* y *Furcatum* lo hacen con plantas y las de *Biverticillium* con madera y derivados como el papel, telas y plumas de aves. Las agrupaciones de especies suelen compartir patrón metabólico y origen, generalmente. Estos últimos trabajos han sido el resultado de la investigación en distintos campos, destacando el del metabolismo secundario, aplicada a la taxonomía de *Penicillium* spp.

1.2.1.2. Criterios de metabolismo secundario

Desde el trabajo de Ciegler (83), se comenzaron a considerar las posibilidades del metabolismo secundario como herramienta taxonómica. Diversos estudios han aportado un gran número de posibilidades en este campo en los últimos años. En los primeros trabajos se relacionaba la producción de las micotoxinas más importantes con algunas de sus especies productoras de distintos géneros mediante TLC (135, 137). Ciegler centró parte de sus estudios en aclarar la taxonomía de *P. viridicatum* basándose en el patrón de micotoxinas producidas por diferentes cepas de esta especie (83, 84).

Los patrones de micotoxinas de las distintas cepas fueron utilizados rápidamente como posible método de caracterización del difícil grupo de las especies terverticiladas (142, 146). La utilización de estos patrones llevó a la descripción de taxones de categoría supraespecífica que los autores denominaron grupos, variedades (144, 146, 151, 154) y quimiotipos (152, 153) y que, generalmente, compartían perfil metabólico.

Esta situación complicó la sistemática del subgénero, dando cada vez más alternativas a las claves de identificación clásicas. Sin embargo, a pesar de haber estudios que demuestran la variabilidad que existe, entre otras características, en la producción de micotoxinas por una misma cepa (59), Frisvad y Filtenborg defienden la reproducibilidad de esta propiedad en diferentes estudios (146, 152, 153). Estos autores demuestran la posibilidad de un cambio cuantitativo en la producción de micotoxinas, pero no cualitativo (152). Sin embargo, en otro trabajo estos autores recomiendan diferentes métodos para mejorar la reproducibilidad de la detección de estos metabolitos secundarios en condiciones laborales (153).

Existen ciertos metabolitos cuya producción es ciertamente consistente para una especie, es decir, que la inmensa mayoría de cepas presentan capacidad de producirlos, con lo que parece adecuado asignarle un valor taxonómico a su detección. Éste sería el caso de la producción de patulina por *P. expansum*, la de PEN A y roquefortina C por *P. crustosum* (142, 144, 146, 151, 152) o como la de CIT por *P. citrinum* (142, 144), esta última no perteneciente al subgénero *Penicillium*. Sin embargo, existen metabolitos cuya producción sólo se detecta en un bajo número de cepas, como la producción de AP por *P. aurantiogriseum* y *P. viridicatum* (142, 151). En este último caso, además, cabe

tener en cuenta la similitud y posible confusión entre ambas especies. Así, algunos autores consideran a *P. viridicatum* productora de esta micotoxina (159, 162), mientras otros no lo hacen (84, 352, 360).

Frisvad y colaboradores (142, 151, 152) realizaron agrupaciones de cepas por similitud de patrones de metabolitos secundarios que ayudaron mucho en la clasificación de las especies terveticiladas. En el año 1981, Frisvad (142) describió 4 grupos con un patrón de producción de metabolitos y unas características morfológicas y fisiológicas constantes. Así, 'P. crustosum pA' producía penitrem A, 'P. cyclopium p' producía ácido penicílico y 'P. viridicatum o-c' producía ocratoxina A y/o citrinina, en un alto porcentaje de cepas de cada grupo. También describió en este trabajo el grupo 'P. melanochlorum', para el que no describieron patrón de metabolitos secundarios. Estos grupos fueron aceptados posteriormente como las especies *P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. verrucosum* y *P. solitum*, respectivamente (152, 352, 353). Dos años más tarde, Frisvad y Filtenborg describieron agrupaciones supraespecíficas según similitudes morfológicas y de metabolismo secundario para las especies *P. camemberti*, *P. aurantiogriseum*, *P. roqueforti* y *P. concentricum*, de 2 subgrupos por especie, y de 4 subgrupos para las especies *P. hirsutum* y *P. viridicatum* (151). Algunos de estos subgrupos han acabado definiéndose como especies distintas, como *P. allii* y *P. hordei*, que se separaron de la especie *P. hirsutum* y como los subgrupos II y III de *P. viridicatum* que correspondieron a *P. verrucosum* (360, 366).

En el año 1989, Frisvad y Filtenborg hicieron una amplia revisión de un gran número de especies terveticiladas (152) en la que asignaban a los grupos descritos en los trabajos anteriores (142, 151) la categoría de especie o variedad y proponían nuevas especies, variedades y quimiotipos, concepto introducido en este estudio. Para la especie *P. aurantiogriseum*, por ejemplo, se describieron 5 variedades: *P. aurantiogriseum* var. *aurantiogriseum*, *P. aurantiogriseum* var. *melanoconidium*, *P. aurantiogriseum* var. *neoechinulatum*, *P. aurantiogriseum* var. *polonicum* y *P. aurantiogriseum* var. *viridicatum*. Como en los casos anteriores, algunas de las variedades propuestas se consideraron después como especies distintas, como *P. commune* y *P. solitum*, nombres que se habían abandonado desde las revisiones de Pitt (350) y de Samson y colaboradores (404), respectivamente, mientras otras variedades y quimiotipos propuestos en este trabajo quedaron como agrupaciones subespecíficas.

De los resultados de diversos trabajos realizados por Frisvad y colaboradores, los autores han buscado distintas aplicaciones a la obtención del perfil metabólico de *Penicillium* spp. En 1990 desarrollaron un método de identificación rápida basado en el patrón de metabolitos presentes en las placas de siembra de la muestra, previo incluso al aislamiento de las cepas (136). Unos años más tarde realizaron estudios sobre distancias filogenéticas basados en los perfiles de metabolitos secundarios, principalmente (148, 464). En otros trabajos llegaron a determinar, mediante HPLC, 134 (147) y 182 (161) metabolitos fúngicos simultáneamente. Los autores proponían la técnica como herramienta quimiotaxonómica. Aunque estos trabajos aportaron una valiosa cantidad de información, la infraestructura necesaria y la complejidad de interpretación hace que este tipo de estudios no se lleve a cabo en otros laboratorios de forma rutinaria. También han abordado la producción de metabolitos secundarios por las especies de *Talaromyces* spp. (157), especies para las que se ha obtenido una mayor concordancia entre los patrones metabólicos y la sistemática morfológica existente.

De esta manera, gracias a estos criterios y a otros como son los morfológicos, fisiológicos, genéticos y ecológicos que se mantienen constantes en un número de cepas considerable, se han llegado a establecer nuevas especies o a aclarar la identidad de otras que presentaban problemas de forma clásica (83, 84, 142, 151, 152, 158, 352, 353).

La detección de micotoxinas por parte de cepas fúngicas se realiza en el laboratorio inoculándolas en el propio sustrato natural (98, 188, 322, 339, 385, 409), generalmente cereales, o en medios de cultivo. Los medios de cultivo empleados han ido variando a lo largo de los años. En los años 70 y 80, principalmente, se utilizaban medios de cultivo semisintéticos realizados a partir de arroz, maíz, cebada o trigo (66, 283, 322, 385) o imitando sustratos naturales como el queso o el pan (188, 322, 339), ya que clásicamente se considera que estos sustratos estimulan la producción de micotoxinas. Después se comenzaron a utilizar, por motivos prácticos, los medios de cultivo empleados para identificación. Así, se han detectado micotoxinas a partir de CYA (137, 144, 151, 152, 153) y MEA (137, 144, 152, 153, 322). El medio YES fue descrito para promover la producción de aflatoxinas (111); unos años más tarde se comenzaría a utilizar para la detección de otros metabolitos secundarios (418). El uso del YES como medio de cultivo promotor del metabolismo secundario se ha generalizado, junto con el

del CYA, y estos medios son los más empleados actualmente para la detección de micotoxinas (49, 137, 142, 144, 151, 152).

Para potenciar la formación de metabolitos secundarios, entre ellos los pigmentos y las micotoxinas, se propuso la adición de sales de cobre y zinc al medio CYA (151). Esta adición de sales fue también adaptada, años más tarde, para el medio YES (152). La adición de estas sales al medio CYA ha sido bien acogida (360, 403) mientras para YES no se ha instaurado (138, 403). Filtenborg y colaboradores no obtuvieron cambios en el cultivo de cepas de *P. verrucosum* en YES con y sin estas sales (138). Sin embargo, al contener el medio YES gran cantidad de un componente indefinido, el extracto de levadura, puede llegar a ser muy variable entre laboratorios. En el mismo estudio se obtuvieron importantes diferencias entre las marcas comerciales de extracto de levadura existentes. Según sus resultados, estas diferencias se podían corregir seleccionando ciertas marcas comerciales o mediante la adición de sulfato magnésico al medio. Esta sal parece mejorar la producción de metabolitos secundarios, así como algunas características morfológicas y de coloración. Al contrario de lo sucedido con los sulfatos de zinc y cobre, la adición de sulfato magnésico se recomienda para la detección de micotoxinas en el medio de cultivo YES (138, 403).

1.2.1.3. Criterios fisiológicos y bioquímicos

A la vez que se asumía la utilidad taxonómica del metabolismo secundario o quimiotaxonomía, se enfocó también el estudio de *Penicillium* spp. hacia otro tipo de características. Frisvad, en 1981 (142), propuso el crecimiento en diferentes medios de cultivo como criterio taxonómico en el subgénero *Penicillium*, restando así importancia a la morfología en los medios de cultivo empleados por Pitt (350). En este trabajo, Frisvad analizaba el crecimiento de las cepas en medios con diferente fuente de nitrógeno, con diferentes fungicidas y en un medio en el que se evaluaba la producción del enzima extracelular tricaproinasa. Concluyeron que mediante algunas características fisiológicas (crecimiento en agar nitrito sacarosa (NSA), en agar creatina sacarosa (CREA), a 37°C en agar glucosa extracto de levadura (GY) y crecimiento con los fungicidas pentacloronitrobenceno (PCNB) y ácido acético) y el patrón de metabolitos secundarios obtenido se podía llegar a una clasificación satisfactoria de las especies de *Penicillium* terverticiladas. En este trabajo se reclasificó las especies *P. cyclopium*, *P.*

viridicatum y *P. expansum* de Raper y Thom (386) en cuatro nuevos grupos cuya nomenclatura hacía referencia a las micotoxinas producidas por cada taxón (“*P. crustosum* pA”, “*P. melanochlorum*”, “*P. cyclopium* p” y “*P. viridicatum* o-c”). Sin embargo, este trabajo fue seguido de otros en los que se realizaba la revisión de especies terverticiladas únicamente bajo criterios de metabolismo secundario y micotoxinas (151, 152).

En 1985, Frisvad propuso el medio de cultivo CREA como diferencial para las *Penicillium* spp. terverticiladas (145). Este medio contiene creatina como única fuente de nitrógeno y púrpura de bromocresol como indicador de pH. El autor realizaba un amplio estudio de la capacidad de crecimiento y de la posible formación de ácido y/o base utilizando un gran número de especies terverticiladas según nomenclatura del trabajo de Frisvad y Filtenborg del año 1983 (151). Propuso descartar como criterios taxonómicos para el subgénero el crecimiento a 5° C, 37°C y a baja actividad de agua (en el medio G25N) que realizaba Pitt (350) y presentó una tabla para diferenciar las especies productoras de micotoxinas según su respuesta en los medios sólidos YES y CREA. Años más tarde Frisvad publicó varias modificaciones del medio CREA en las que se cambiaba ligeramente su composición, se acidificaba el pH o se añadían ciertos inhibidores (149). El estudio se aplicó a un mayor número de especies del género, esta vez siguiendo la nomenclatura de Frisvad y Filtenborg en el trabajo de 1989 (152), así como a algunas *Aspergillus* spp.

Pitt propuso el medio agar creatina sacarosa neutro (CSN), una modificación del medio CREA de Frisvad (355). Éste contiene, como el medio CREA, creatina como única fuente de nitrógeno y púrpura de bromocresol como indicador de pH. La principal diferencia entre ambos medios radica en el pH inicial. Mientras el CREA presenta un pH ligeramente básico (de alrededor de 8,0), el CSN se prepara con pH de 5,5 a 6,8. De esta manera, el pH inicial del medio corresponde con el rango neutro del colorante (el medio inicial es de color gris, a diferencia del lila intenso del CREA). Así se facilita la observación de la producción de metabolitos ácidos (lo que daría coloración amarilla al medio) y básicos (lo que daría coloración violeta al medio). Pitt también ajustó la proporción de sacarosa y creatina de manera que se obtuviera una combinación en que se facilitaran ambos tipos de reacciones frente al medio, remarcando las diferencias entre especies.

En la descripción del CREA, Frisvad no citaba la razón por la que se presentaba un buen crecimiento de algunas *Penicillium* spp. mientras otras parecían inhibidas (145). En trabajos posteriores se sugirió que la creatina en el medio permitía separar las *Penicillium* spp. que presentaban mejor crecimiento en sustratos ricos en proteína de las especies que se desarrollan mejor en medios más ricos en carbohidratos (149, 156, 355, 360). Sin embargo, algunos autores han considerado que no existía esta relación entre la utilización de la creatina y la de proteínas (19). De hecho, esta relación no se corresponde para especies como *P. verrucosum* o *P. nalgiovense*, capaces de desarrollarse en derivados cárnicos o queso, pero que presentan mal crecimiento en CREA (145, 149). También existe el caso contrario: algunas especies que presentan buen crecimiento en los medios con creatina no se suelen aislar de sustratos ricos en proteína, como *P. expansum* o *P. crustosum* (145, 355). Algunos autores sugieren que existe una relación filogenética más próxima entre las especies que presentan el mismo tipo de crecimiento en los medios con creatina (357).

Los virajes a ácido y básico obtenidos en los medios con creatina se deben al diferente metabolismo de la sacarosa y de la creatina que tiene cada *Penicillium* spp. (355). La producción de metabolitos ácidos en estos medios se debe a la utilización de la sacarosa como fuente de carbono (360). Por otro lado, el viraje básico del medio se relaciona con la liberación de amoníaco (53), aunque su origen no se sabía a qué respondía exactamente. Pitt y Hocking citaron que esta producción de base se debía a la liberación de iones de amoníaco a partir de la creatina (360). Es posible, como demuestran Adour y colaboradores respecto al crecimiento de *P. camemberti* y de *Geotrichum candidum* en un medio con peptona (18), que la liberación de amoníaco provenga de la desaminización de los aminoácidos (la creatina en este caso) al utilizarlos como fuente de carbono.

Bridge y colaboradores, a través de diversos estudios, aportaron gran cantidad de información fisiológica, bioquímica y morfológica de *Penicillium* spp. terverticiladas (53, 56, 57, 58, 337). Los resultados obtenidos confirmaron, en general, las especies aceptadas por Pitt en sus revisiones (350, 351). En estos trabajos se recomendó el uso de la creatina, de los nitritos, y el de la urea como fuentes de nitrógeno útiles en la diferenciación de las especies de *Penicillium* subgénero *Penicillium*. Los autores afirmaban que los caracteres que presentan menor variabilidad intraespecífica y, por lo

tanto, mayor valor taxonómico son los fisiológicos y morfológicos, mientras no destacaba la producción de metabolitos secundarios para diferenciar las especies (56, 57). Estos estudios demostraron que era útil realizar estudios basados en diferentes criterios taxonómicos para la clasificación de *Penicillium* spp.

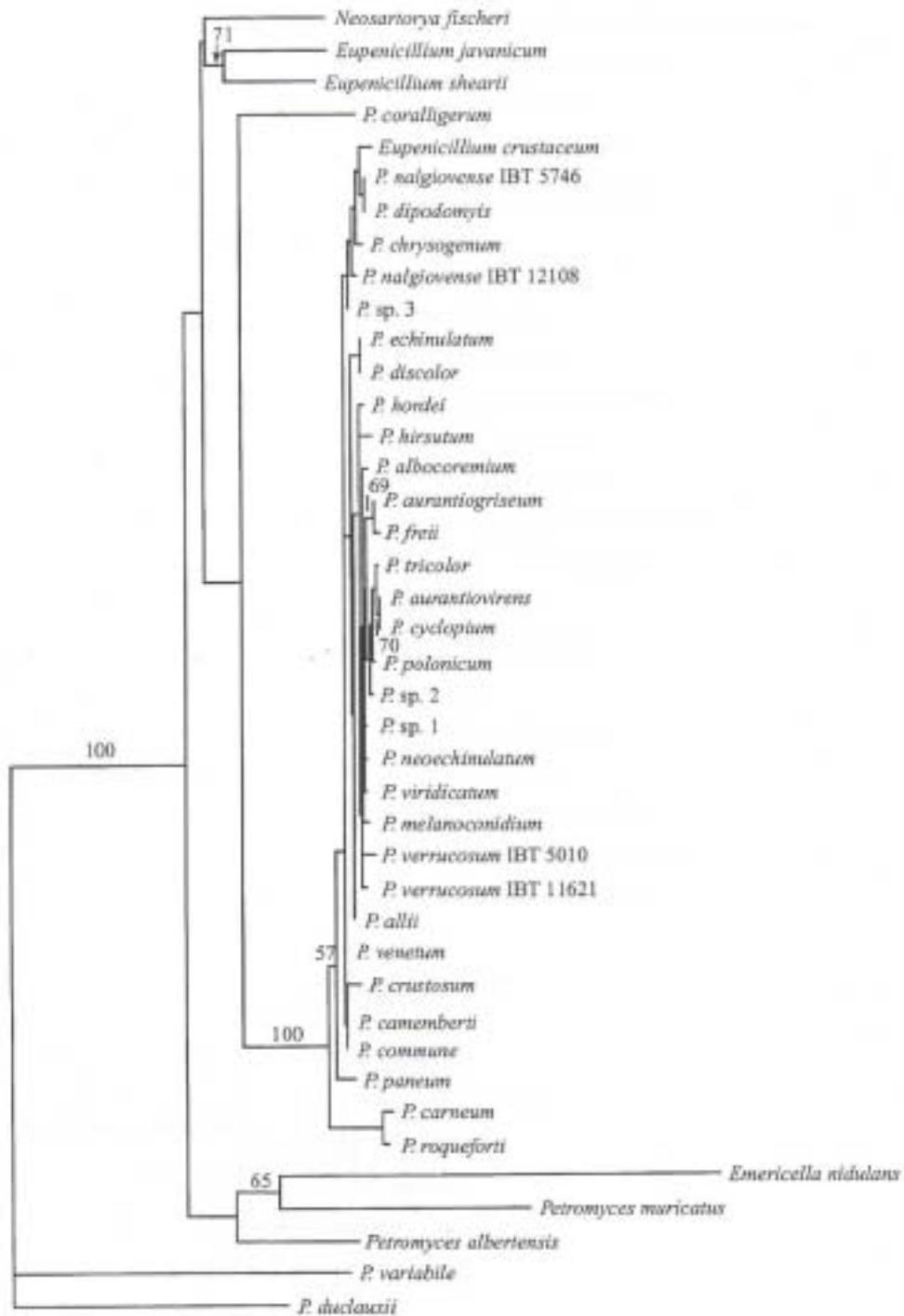
A pesar de que en los últimos años la tendencia es a restar importancia a las características morfológicas como criterio taxonómico, existe una característica macroscópica que se relaciona específicamente con *P. verrucosum*. Frisvad (142) describió la producción de un reverso marrón rojizo en el medio YES en cepas de 'P. viridicatum o-c'. Esta característica fue confirmada en un estudio posterior (143) en el que en el que 187 cepas que presentaron pigmento no difusible (reverso) de color marrón violeta en PRYES fueron identificadas como *P. viridicatum* grupo II (*P. verrucosum*). Este medio, un derivado del YES que contiene varios inhibidores, fue descrito como diferencial para *P. verrucosum* ya en la siembra directa de la muestra. En otro medio selectivo, el DYSG, descrito por los mismos autores (156) también se destacó esta característica para *P. verrucosum*. La coloración del reverso de la colonia también se empleó para la diferenciación de otras especies del subgénero *Penicillium* (142, 143). Los autores comentaron que esta coloración del reverso en el medio YES era potenciada por la adición de sulfato magnésico (138).

Lund propuso, en 1995, la utilización de un método rápido de detección del indol o de metabolitos relacionados estructuralmente con el indol (como ácido ciclopiazónico, quetoglobosina C, isofumigaclavina A y rugulovasina A y B) como herramienta taxonómica para *Penicillium* spp. (270). La producción de estos metabolitos se detecta en 10 minutos como una coloración violeta al aplicar un reactivo a un bocado de agar con la colonia. Algunas de las especies que presentaron una reacción positiva a esta prueba también presentan un buen crecimiento en CREA y son frecuentes contaminantes de sustratos como el queso (*P. commune*), pan de centeno (*P. roqueforti* var. *roqueforti*) y manzana (*P. expansum*). Así, el trabajo estaba encaminado a una rápida identificación de estas especies. Pero también se contemplaba la posible aplicación taxonómica para otras especies que presentan similitudes morfológicas entre ellas. Esta aplicación ha sido una de las más útiles, al permitir una rápida identificación de *P. commune* (272) y su diferenciación de *P. solitum*, con la que tiene gran similitud morfológica (360).

1.2.1.4. Biología molecular

Las especies del subgénero *Penicillium* presentan pequeñas distancias filogenéticas (Figura 5) y pocos cambios en cuanto a sus secuencias más conservadas (346, 444, 445). Sin embargo, estudios basados en la biología molecular de este grupo han permitido conocer algo más las relaciones interespecíficas. Las regiones ITS (internal transcribed spacer) han sido unas de las primeras a estudiar para establecer la filogenia de *Penicillium* spp. y sus relaciones interespecíficas (62). Desde que White y colaboradores propusieran los cebadores específicos para esta región del DNA ribosómico fúngico (511), se han llevado a cabo diferentes trabajos sobre esta región con *Penicillium* spp. Con algunos de ellos se ha conseguido separar las distintas especies usadas como cultivos iniciadores en la industria: *P. chrysogenum* y *P. nalgiovense* (122), o identificar *P. roqueforti*, *P. carneum* y *P. paneum*, muy relacionadas entre sí (47, 48, 344). En algunos casos se diseñaron cebadores específicos para las especies tratadas (47, 48). Las especies *P. roqueforti* y sus 2 afines son de las que más diferencias presentan respecto al resto de especies del subgénero *Penicillium* (344, 444). La gran mayoría presentan muy pocas diferencias entre sí (Figura 5) (346, 444, 445), incluso algunas tienen unas regiones ITS idénticas, como *P. solitum*, *P. echinulatum* y *P. discolor* (445), *P. commune* y *P. camemberti* (444), o *P. chrysogenum* y *P. nalgiovense* (122). Se considera que cepas que contienen 5 o más sustituciones en las regiones ITS pertenecen a distintas especies (346). Así, según el análisis de esta región, muchas especies del subgénero *Penicillium* no cumplirían los requisitos para poderlas considerar especies distintas.

Figura 5. Distancias filogenéticas de distintas especies terverticiladas de *Penicillium* (444).



El análisis mediante marcadores RAPD del DNA genómico es una herramienta útil para estudios tanto a nivel específico como subespecífico en hongos (62). A nivel específico, esta técnica ha proporcionado información filogenética para las especies del subgénero *Penicillium*. Los resultados de Yoon y Bae (521) apoyaban la clasificación de Pitt (350) en cuanto a las especies que conforman el subgénero (a excepción de *P. vulpinum*) y al concepto de especie, situando a *P. cyclopium* en sinonimia con *P. aurantiogriseum*. Estos autores demostraron también que las especies del subgénero *Furcatum* son más similares filogenéticamente a las de *Aspergilloides* que a las del subgénero *Penicillium* (521). Además del estudio de relaciones filogenéticas, el estudio mediante RAPD ha contribuido a distinguir a *P. carneum* y *P. paneum* de *P. roqueforti* (47, 48), a distinguir las especies *P. nalgiovense* y *P. chrysogenum*, utilizadas como cultivos iniciadores en la industria alimentaria (122, 173) y a confirmar las identificaciones de cepas de *P. nalgiovense* y *P. griseofulvum* (239). A nivel subespecífico se ha empleado para distinguir cepas del patógeno *P. marneffei*, del subgénero *Biverticillium* (205).

Peterson (346) agrupó especies de *Penicillium* de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Penicillium* y de *Eupenicillium* basándose en sus secuencias de un fragmento de la LSU ('large subunit', subunidad 28S) del DNA ribosomal y de las secuencias de los ITS. Según sus resultados, las agrupaciones obtenidas para las especies de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Penicillium* no se corresponden con la clasificación subgenérica existente, basada en la complejidad del conidióforo. Obtuvo, como en el trabajo anterior, una mayor similitud entre las especies de los subgéneros *Aspergilloides* y *Furcatum*, que se encontraban repartidas en distintos grupos. Sin embargo, las del subgénero *Penicillium* se encontraban todas agrupadas y presentando pocas diferencias entre ellas. En el grupo en el que se localizan las especies del subgénero *Penicillium*, también se encuentran algunas *Eupenicillium* spp., algunas especies del subgénero *Furcatum* y las especies *Aspergillus malodoratus*, *A. crystallinus* y *Hemicarpaceles paradoxus*, incluidas clásicamente en el género *Aspergillus*. De las especies del subgénero *Penicillium*, *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum* y *P. polonicum* y *P. crustosum*, *P. echinulatum* y *P. camemberti* presentan una gran similitud entre ellas. Muchas de las especies del subgénero aceptadas actualmente serían indistinguibles basándose en su secuencia de DNA ribosomal. El

autor cita que las agrupaciones realizadas por Frisvad y Filtenborg (152) deberían ser tomadas como quimiotipos más que como especies distintas.

Los estudios de biología molecular están ayudando a comprender la filogenia de las especies del género *Penicillium*, pero llegar a establecer una clasificación monofilética de los hongos mitospóricos, como sugieren algunos autores que debería realizarse (346, 436), sería complicado ya que ésta no correspondería, en muchas ocasiones, con la clasificación morfológica existente (346). Además de los problemas en la clasificación, un cambio tan importante en los criterios taxonómicos puede implicar problemas al establecer el concepto de especie, ya que el que se obtenga basándose en datos puramente genéticos puede diferir mucho del que se tiene en la clasificación actual a partir de criterios morfológicos (436).

1.2.2. Complejo *P. aurantiogriseum*

El ‘complejo *P. aurantiogriseum*’ es un término creado para agrupar a las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* que mayores similitudes morfológicas presentan entre sí. Además, estas especies presentan interés no sólo por ser las más frecuentes en cereales almacenados sino también por la posible formación de micotoxinas (201, 301). Antes de la utilización de este término, ya existía cierta tendencia a agrupar estas especies tan similares. Samson y colaboradores (404) agruparon a muchas especies terverticiladas en alguna de las 5 variedades de *P. verrucosum*. Según algunos autores (434), esta especie, tal como fue descrita por Samson y colaboradores (404), incluía lo que después se denominó complejo *P. aurantiogriseum*.

Sin embargo, a pesar de ser un concepto creado con un criterio puramente práctico, no existe unidad entre los distintos autores al describir las especies que lo forman. Lund y Frisvad (274) realizaron el primer trabajo experimental en el que se trataba a las especies del ‘complejo *P. aurantiogriseum*’ como tal, considerando un concepto muy restringido del mismo (Tabla 3). En este trabajo partieron de un concepto amplio de *P. aurantiogriseum* (correspondiendo a las series *P. cyclopium* y *P. viridicatum* de Raper y Thom (386) pero excluyendo a las cepas pertenecientes a *P. solitum*, *P. crustosum*, *P. commune* y *P. verrucosum*) y la separaron en 9 grupos diferentes basándose en patrones

de micotoxinas y otros metabolitos secundarios. A estos grupos les asignaron el nivel de especie. Sin embargo, Samson y colaboradores (402) consideraron un concepto de complejo *P. aurantiogriseum* más amplio, al que denominaban ‘complejo *P. aurantiogriseum*’ o ‘complejo *P. aurantiogriseum/verrucosum*’ indistintamente. Consideraron como pertenecientes al complejo las 9 especies de Lund y Frisvad (274) y 6 más (Tabla 3), con lo que se asemejaba a la especie *P. verrucosum* tal y como la definieron Samson y colaboradores 20 años atrás (404). En la última edición del tratado de Samson y colaboradores (403), sin embargo, incluyen en el complejo a especies como *P. allii*, *P. hirsutum*, *P. hordei*, *P. nordicum* o *P. palitans*.

Tabla 3. Especies pertenecientes al complejo *P. aurantiogriseum* según distintos autores.

Lund y Frisvad (274)	Samson y colaboradores (402)
<i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>
<i>P. aurantiovirens</i>	<i>P. aurantiovirens</i>
<i>P. cyclopium</i>	<i>P. cyclopium</i>
<i>P. freii</i>	<i>P. freii</i>
<i>P. melanoconidium</i>	<i>P. melanoconidium</i>
<i>P. neoehinulatum</i>	<i>P. neoehinulatum</i>
<i>P. polonicum</i>	<i>P. polonicum</i>
<i>P. tricolor</i>	<i>P. tricolor</i>
<i>P. viridicatum</i>	<i>P. viridicatum</i>
	<i>P. aethiopicum</i>
	<i>P. commune</i>
	<i>P. crustosum</i>
	<i>P. echinulatum</i>
	<i>P. solitum</i>
	<i>P. verrucosum</i>

Las especies citadas por Lund y Frisvad como componentes del complejo *P. aurantiogriseum* (Tabla 3) (274) son morfológicamente muy difíciles de diferenciar. En un estudio colaborativo se realizó la identificación de cepas pertenecientes a estas 9 especies por 6 expertos internacionales en taxonomía de *Penicillium* spp. (399). Se citaba, por ejemplo, que se identificaron cepas de *P. aurantiogriseum* como *P.*

cyclopium, *P. crustosum*, *P. verrucosum*, *P. aurantiovirens*, *P. commune*, *P. solitum*, *P. polonicum* y como desconocido, por los diferentes investigadores.

Frisvad presentó en el año 1997 en el 'Third International Workshop on *Penicillium* and *Aspergillus*' (150) un trabajo sobre las 9 especies pertenecientes al complejo *P. aurantiogriseum* según Lund y Frisvad (274). Mantenía que existían muchas similitudes entre estas especies pero que un análisis de las micotoxinas producidas por cada una de ellas indicaba que se trataba de especies distintas, siendo *P. aurantiovirens* y *P. cyclopium* las más relacionadas entre sí. Frisvad postuló, también en este trabajo, el uso del medio Raulin-Thom (RT) (386) para distinguirlas, y también para diferenciarlas de otras especies no pertenecientes al complejo. El RT fue descrito a principios de siglo buscando un medio totalmente definido y reproducible (20, 386). A pesar de tener una fórmula más completa, según algunos autores (20), que el Czapek/Dox Agar (del que se originó el medio CYA) este medio no triunfó al no ser utilizado por Raper y Thom en el mayor tratado sobre *Penicillium* spp. realizado hasta la fecha (386). Así, según Frisvad, en el medio RT las especies citadas (a excepción de *P. melanoconidium* y *P. tricolor*) presentarían un halo difusible de color marrón oscuro. Según sus resultados, ninguna otra especie del subgénero presentaría dicha característica.

Seifert y Louis-Seize (434) analizaron una región de 360 pares de bases del gen de la β -tubulina de especies del complejo *P. aurantiogriseum* y otras especies de interés del subgénero *Penicillium*. Consideraron como parte del complejo *P. aurantiogriseum* a *P. aurantiogriseum*, *P. freii*, *P. melanoconidium*, *P. polonicum*, *P. verrucosum* y *P. viridicatum*. Analizando las similitudes en el gen estudiado agruparon las cepas ensayadas en 5 grupos: un grupo quedó formado por las especies de conidios de mayor tamaño y formación de base en los medios con creatina *P. commune*, *P. crustosum* y *P. solitum*; otro grupo lo formaron *P. polonicum* y *P. cyclopium* y las especies *P. verrucosum* y *P. melanoconidium* formaron grupos distintos. La última agrupación, que incluía a las especies *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum* y *P. freii*, no tenía un origen monofilético, con lo que las relaciones entre estas especies no fueron resueltas mediante este análisis.

Recientemente se ha descrito un método de PCR-RFLP que permite, mediante digestión con el enzima de restricción *HaeIII* del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 del DNA que

codifica para el RNA ribosomal, identificar a la especie *P. aurantiogriseum* (86). Los autores obtuvieron un patrón distinto para esta especie, que presentaba una banda característica de 300 pares de bases, diferenciándose de cepas de *P. chrysogenum*, *P. solitum* y *P. commune*.

Actualmente, de las 9 especies citadas por Lund y Frisvad en el año 1994 (274) como componentes del complejo *P. aurantiogriseum*, sólo 2 aparecen en la lista de especies aceptadas: *P. aurantiogriseum* y *P. viridicatum* (366). Otras 3 especies, *P. aurantiovirens*, *P. cyclopium* y *P. polonicum*, aparecieron citadas como sinónimas de *P. aurantiogriseum*. Las 4 especies restantes no aparecen en la publicación de normalización de nombres del año 2000 (366). Así como ha sucedido con trabajos publicados durante los últimos años (48, 151, 152, 271), los estudios que se realicen sobre metabolismo secundario o biología molecular provocarán cambios en las especies aceptadas de esta lista, aunque las diferencias morfológicas entre ellas sean mínimas.

La tendencia general, en los últimos años, es considerar con rango de especie a las cepas de *Penicillium* spp. que presentan algunos parámetros fisiológicos, morfológicos, moleculares y/o metabólicos característicos que las agrupen y separen del resto (48, 155, 244, 274, 434). En algunos casos estas especies propuestas son aceptadas en trabajos posteriores y tratados generales (360, 366), mientras en otros casos quedan como propuestas, no aceptadas por la comunidad científica. Este sistema presenta la ventaja de evitar las diferentes nomenclaturas que han sido utilizadas para las especies pertenecientes al género *Penicillium* (142, 152, 404), complicando su identificación.

1.3. *Penicillium verrucosum*

Penicillium verrucosum Dierckx fue descrita en 1901. Se consideró como neotipo la cepa tipo depositada por Biourge en 1923 (350). En la Tabla 4 se refleja la nomenclatura que han seguido *P. verrucosum* y *P. viridicatum*, según distintos autores, desde la publicación del tratado de Raper y Thom (386), junto con la especie ocratoxígena recientemente descrita *P. nordicum* (244).

Tabla 4. Nomenclatura seguida para las especies *P. verrucosum* y *P. viridicatum* en los distintos tratados taxonómicos o estudios experimentales.

Nombre asignado a las cepas en los distintos trabajos			
Raper y Thom, 1949 (386)	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. viridicatum</i>
Ciegler y colaboradores, 1973 (83)	<i>P. viridicatum</i> I	<i>P. viridicatum</i> II	<i>P. viridicatum</i> III
Samson y colaboradores, 1976 (404)	<i>P. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>	<i>P. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>	<i>P. verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>
Pitt, 1979 (350)	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. verrucosum</i>
Pitt, 1987 (352)	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. verrucosum</i> quimiotipo CIT	<i>P. verrucosum</i>
Frisvad y Filtenborg, 1989 (152)	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. verrucosum</i> quimiotipo II	<i>P. verrucosum</i> quimiotipo I
Larsen y colaboradores, 2001 (244) ^a	<i>P. viridicatum</i>	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. nordicum</i>

^a *P. viridicatum*, especie no productora de OA ni CIT; *P. verrucosum*, especie productora de OA y CIT; *P. nordicum*, especie productora de OA.

Así, en el tratado de Raper y Thom (386) se consideró a *P. verrucosum* dentro de la serie *P. viridicatum*, pero sin reconocerla como especie ni situarla en sinonimia. En la revisión de Samson y colaboradores la especie *P. viridicatum* se situó como sinónima de *P. verrucosum* var. *verrucosum* (404). Ciegler y colaboradores (83) dividieron la especie *P. viridicatum* en 3 subgrupos basándose en la capacidad de producir OA y/o CIT, así como en la morfología y el origen de las cepas. Dentro de las cepas del grupo II se encontrarían las cepas capaces de producir OA y CIT, mientras que las del grupo I no presentaban esta capacidad. Las cepas del grupo III formaban un grupo heterogéneo con capacidad de producir OA (pero no CIT) que difería de los dos anteriores también en el origen, al provenir de productos cárnicos. Tras la revisión de *P. viridicatum* realizada por Ciegler, en el trabajo de Pitt (350) se consideró a ambas especies por separado. Sin embargo, *P. viridicatum* según Pitt (350) seguía conteniendo cepas ocratoxígenas (ya que sólo el grupo III de Ciegler fue introducido en *P. verrucosum*). En el año 1987 se aceptó definitivamente la subdivisión de *P. viridicatum* en dos especies: *P. verrucosum* y *P. viridicatum* (352). En este trabajo, Pitt demostró que los aislamientos de *P. viridicatum* relacionados con la producción de OA y/o CIT coincidían con la descripción de la especie *P. verrucosum*. Relacionó los grupos II y III de Ciegler (83) con *P. verrucosum* y el grupo I con *P. viridicatum*. Los diversos trabajos basados en metabolismo secundario realizados por Frisvad y colaboradores (142, 151, 152) coincidían con la descripción de las especies de Pitt (352).

Recientemente se ha propuesto la clasificación de las cepas de *Penicillium* spp. productoras de OA en dos especies distintas. Larsen y colaboradores (244) realizaron un completo estudio quimiotaxonómico de diferentes cepas de *P. verrucosum* mediante HPLC y cromatografía de gases y lo relacionaron con datos morfológicos y ecológicos. Propuso el nombre *P. nordicum*, especie descrita por primera vez en 1979 y validada por Ramírez el año 1985 (380), para las especies que presentaban ciertas características (Tabla 5). En este estudio no todas las cepas de cada grupo producían todos los metabolitos descritos, pero ninguna de ellas producía metabolitos característicos del perfil del otro grupo.

Tabla 5. Características de las especies ocratoxígenas *P. verrucosum* y *P. nordicum* según Larsen y colaboradores (244).

	<i>P. nordicum</i>	<i>P. verrucosum</i>
Metabolitos producidos	OA	OA
	Verruculonas	Ocratoxina B
	Anacinas	CIT
	Esclerotigenina Lumpidina ^a	Verruculonas Verrucinas
OA	Alta producción	Baja producción
Color del reverso en el medio YES ^b	Crema o amarillo pálido	Marrón rojizo
Origen ^b	Derivados cárnicos Queso	Sustratos vegetales

^a las cepas productoras de lumpidina la elaboraban como metabolito mayoritario; para el resto de cepas de *P. nordicum* la OA es el metabolito producido en mayor cantidad.

^b características descritas para la mayoría de las cepas de cada especie.

Los autores obtuvieron un tercer pequeño subgrupo con perfil diferente, siendo las verruculonas y anacinas los únicos metabolitos compartidos con los grupos anteriores. Estas cepas no producían ni OA ni CIT y presentaban un reverso en YES de amarillo a naranja. Estos aislamientos quedaron como en un tercer grupo en el análisis realizado sin asignarlos a ninguna de las 2 especies (244).

Larsen y colaboradores (244) propusieron que la mayor producción de OA por *P. nordicum* se puede deber a que en *P. verrucosum* exista una competencia de precursores para la biosíntesis de la OA, al incorporar también las verrucinas una molécula de fenilalanina. Algo similar sucedería con las cepas de *P. nordicum* que elaboran lumpidina, que también incorpora fenilalanina, en las que la cantidad de OA producida es también inferior (Tabla 5). Los autores citan que también puede existir esta competencia de precursores con la isocumarina, que comparte la OA con la CIT, dos moléculas nuevamente producidas por *P. verrucosum* (Tabla 5).

Ya en algunos estudios previos, presentados en la Tabla 4, se consideraron 2 subgrupos en la especie *P. verrucosum* (83, 152, 352). Larsen y colaboradores (244) describieron que las agrupaciones descritas por estos autores en base a la capacidad de elaborar CIT (83, 152, 352) y a algunas características morfológicas y ecológicas (83), correspondían con sus descripciones de *P. verrucosum* y *P. nordicum* (Tabla 5).

Castellá y colaboradores (79) confirmaron los resultados de Larsen y colaboradores (244). Mediante estudios moleculares (RAPD y AFLP) los autores obtuvieron una división en dos grupos de las cepas ocratoxígenas. La secuenciación del fragmento ITS1-5.8S-ITS2 resultó prácticamente idéntica para ambos grupos. Realizaron un estudio metabólico de algunas de las cepas analizadas mediante técnicas moleculares y el resultado obtenido correspondía con las características fenotípicas descritas por Larsen y colaboradores para *P. verrucosum* y *P. nordicum*. Por lo tanto, aceptaron la correlación entre los datos fenotípicos y las agrupaciones obtenidas mediante los estudios de RAPD y AFLP y consideraron la división de las cepas ocratoxígenas en grupos I y II, coincidiendo con las especies *P. nordicum* y *P. verrucosum* de Larsen y colaboradores (244), respectivamente.

La especie *P. verrucosum* se aísla frecuentemente de cereales, mayoritariamente cebada y trigo, cultivados en países de clima frío (9, 83, 244, 301). Algunos autores (356) consideran una asociación específica entre esta especie y la cebada. También se ha aislado *P. verrucosum* de productos cárnicos y queso (83, 236, 244, 251, 273, 323, 345, 410, 478) y de otros sustratos como legumbres, frutos secos y hortalizas como la cebolla o la patata (83, 244). El aislamiento de cepas ocratoxígenas ha incrementado su importancia debido a la reciente detección de OA en diversos y numerosos productos alimenticios.

En productos alimenticios españoles, se han aislado cepas de *P. verrucosum* de quesos (273, 478). Bajo el nombre de *P. viridicatum*, sin embargo, han sido también aisladas cepas productoras de OA de frutos secos (212), quesos (498) y de maíz procedente de Argentina y los Estados Unidos (406). En productos españoles se han aislado también cepas productoras de OA no identificadas como *P. verrucosum* o *P. viridicatum* (Tabla 6) (212, 406, 498).

1.4. Ocratoxinas

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La OA es la más tóxica de ellas, con efectos nefrotóxicos, carcinogénicos, teratógenos e inmunosupresores. Está formada por una dihidroisocumarina unida por el grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. Su estructura química es: (R)-N-((5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil)-L-fenilalanina (Figura 6). La ocratoxina B (OB) es el derivado dicloro de la OA y la ocratoxina C (OC) es su etil éster. La OA, su metil éster y la 4-hidroxi-OA, junto con la OB, sus metil y etil ésteres y la OC son metabolitos fúngicos. La ocratoxina α (Oα) y la ocratoxina β (Oβ) son productos de la hidrólisis de la OA y la OB, respectivamente, no poseen la molécula de fenilalanina y no son tóxicos (234). La Oα ha sido aislada de la orina de animales de experimentación a los que se administró OA (454). La OA está estructuralmente relacionada con la CIT (Figura 6) (234), también producida por *P. verrucosum* (360).

Figura 6. Estructura química de la OA.

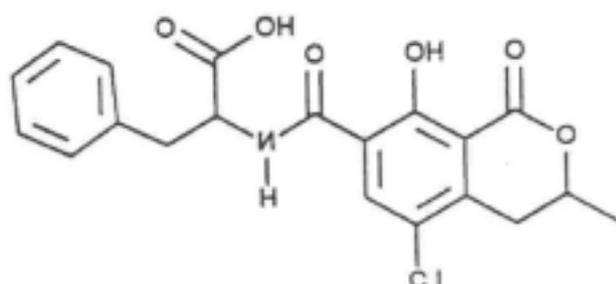
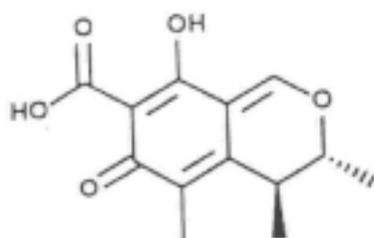


Figura 7. Estructura química de la CIT.



1.4.1. Hongos productores

La ocratoxina A (OA) fue aislada por primera vez en Sudáfrica en 1965 a partir de un cultivo de *A. ochraceus* (491). Posteriormente se demostró la producción de esta toxina

por parte de otras especies de *Aspergillus* también pertenecientes a la sección *Circumdati* (197, 497). Dentro de este género es importante destacar la producción de OA por parte del agregado *A. niger* (3, 193, 474) y *A. carbonarius* (193, 202, 474), especies pertenecientes a la sección *Nigri*. Las especies del agregado *A. niger* presentan una amplia distribución, además de ser utilizadas en diferentes procesos industriales, por lo que supone un riesgo potencial muy importante (40, 360). *Aspergillus carbonarius*, sin embargo, no presenta tan amplia distribución, pero un gran porcentaje de sus cepas son productoras de la micotoxina (73, 193, 202, 360, 474). Otras especies de este género son también capaces de producir OA (2, 474, 484).

La primera descripción de la producción de OA por parte de *Penicillium* spp. fue en 1969 (495). Dicha producción se relacionó con la especie *P. viridicatum*. Tras las revisiones de Ciegler (83) y Pitt (352), se asumió que la producción de OA por *Penicillium* spp. se restringía a *P. verrucosum*. Así, durante más de una década, se consideró erróneamente como productora de OA a una especie no ocratoxígena. Durante los últimos años algunos autores han continuado citando a *P. viridicatum* como productora de OA (24, 100, 119, 200, 287, 413, 498, 516). Actualmente se considera la posible división de *P. verrucosum* en 2 especies ocratoxígenas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (244).

Sin embargo, existen numerosas referencias bibliográficas acerca de la producción de OA por *Penicillium* spp., algunas de las cuáles se reflejan en la Tabla 6. Salvo *P. purpurescens*, *P. purpurogenum* y *P. variable*, las especies más frecuentemente citadas como productoras de OA pertenecen al subgénero *Penicillium*. Cabe tener en cuenta que es en este subgénero donde más dificultades taxonómicas existen, por lo que es posible que se den errores de identificación.

Tabla 6. Referencias bibliográficas en las que se cita la producción de OA por parte de especies del género *Penicillium* (diferentes de *P. verrucosum*-y *P. viridicatum*-).

Subgénero	Especie	Referencia
<i>Aspergilloides</i>		
	<i>P. glabrum</i>	498
	<i>P. frequentans</i>	176, 177
	<i>P. purpurescens</i>	123, 229, 253, 258
	<i>P. sclerotiorum</i>	484
	<i>P. implicatum</i>	484
	<i>P. montanense</i>	484
<i>Biverticillium</i>		
	<i>P. rugulosum</i>	176
	<i>P. funiculosum</i>	176
	<i>P. variabile</i>	24, 144, 176, 213, 253, 406
	<i>P. pinophilum</i>	29
	<i>P. purpurogenum</i>	176, 178, 484
	<i>P. verruculosum</i>	258, 484
<i>Furcatum</i>		
	<i>P. oxalicum</i>	176, 178
	<i>P. citrinum</i>	176, 177
	<i>P. canescens</i>	176, 484
	<i>P. janczewskii</i>	484
	<i>P. melinii</i>	484
	<i>P. raistrickii</i>	484
	<i>P. miczynskii</i>	484
	<i>P. corylophilum</i>	484
<i>Penicillium</i>		
	<i>P. atramentosum</i>	57
	<i>P. aurantiogriseum</i>	228, 300, 446
	<i>P. brevicompactum</i>	226
	<i>P. chrysogenum</i>	100, 229, 253, 299, 300, 447, 498
	<i>P. commune</i>	93, 447
	<i>P. cyclopium</i>	100, 253, 299, 322, 498
	<i>P. expansum</i>	57, 226, 229, 300
	<i>P. glandicola</i>	11
	<i>P. griseofulvum</i>	176, 287
	<i>P. nordicum</i>	240
	<i>P. palitans</i>	406, 420
	<i>P. solitum</i>	57, 287
	<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	447

1.4.2. Presencia en alimentos

Debido a la amplia distribución de los hongos productores, principalmente de las especies del género *Aspergillus* en los climas más cálidos y de la especie *P. verrucosum* en los países de clima frío, la OA presenta una distribución mundial. Se detecta principalmente en sustratos vegetales, como cereales, y con menor frecuencia en leguminosas (74, 165, 196, 200, 201, 216, 234, 367, 371, 418, 421, 424, 430, 448, 499, 506, 515, 522), así como en productos de cerdo y aves (75, 96, 169, 170, 201, 211, 215, 234, 252, 276, 347, 371, 416, 448, 488). Estos animales se contaminan al ser alimentados con piensos que contienen OA (9, 165, 170, 201, 371, 425). En los últimos años ha adquirido una gran importancia la presencia de OA en otro tipo de alimentos, detallados en la Tabla 7, de entre los cuáles cabe destacar el vino, el café y la cerveza. Los trabajos citados en la tabla son de muy reciente aparición, más del 80% han sido publicados desde del año 1997.

Tabla 7. Presencia de OA en alimentos: nuevos hallazgos.

Substrato	País	Fuente
Café	Alemania	51, 194, 330
	Bélgica	441
	Brasil	255
	Dinamarca	215
	España	70
	Estados Unidos	480
	Europa	493
	Holanda	492
	Hungría	131, 473
	Italia	298
	Japón	314, 484, 485
	Reino Unido	141, 335
	Suiza	42, 63, 64, 214, 368, 369, 462, 501, 525
	Cerveza	Alemania
Canadá		415, 450
Dinamarca		215
España		249
Italia		505
Japón		313, 483
Sudáfrica		326
Suiza		525

(sigue)

(Tabla 7, continúa)

Substrato	País	Fuente
Chocolate y cacao	Alemania	125 ^a
Especias	Bélgica	475
	Reino Unido	336 ^b
Galletas y bizcochos	Alemania	125 ^a
Leche de vaca	Noruega	443
Pan	España ^c	250
	Italia	503
Pasas	Alemania	125 ^a
	Reino Unido	279
Queso	Alemania	125 ^a
Regaliz	Alemania	52
Salsa de soja	Japón	483
Salsas	Alemania	285 ^d , 336 ^{be}
Té	Alemania	51
Uva	Italia	29
Vinagres	Alemania	285
	Francia	292
Vino y mosto	Alemania	285, 286, 329
	Canadá	450
	España	72, 267
	Francia	292, 394
	Italia	29, 80, 243, 349, 469, 470, 504, 505
	Japón	483
	Marruecos	134
	Suiza	525, 526
Zumo de grosella	Alemania	285
Zumo de tomate	Alemania	285
Zumo de zanahoria	Alemania	285

^a También se detectó una pequeña cantidad de OA en otras frutas desecadas (higos, ciruelas y otros), así como en frutos diversos frutos secos, cremas y semillas de oleaginosas.

^b También se detecta OA en semillas de oleaginosas y alimentos enlatados.

^c También se detectó OA en muestras de pan de Francia, Holanda, Bélgica, Italia, Alemania, Irlanda, Austria, Suiza, Hungría, EUA, Túnez y Brasil.

^d Ketchup, mostaza, salsa de pimienta y salsa barbacoa.

^e Salsas de ají, curry y ajo.

Según los trabajos sobre la OA en vinos, la frecuencia de detección y la cantidad de OA presente son mayores en vinos tintos, seguidos de los rosados, siendo los vinos blancos los que presentan una cantidad de OA inferior (72, 285, 330, 450, 483, 504, 526). Esta diferencia se debe al distinto proceso de elaboración de cada uno de ellos. Durante la producción de los vinos tintos se pela la uva y se deja en contacto con las pieles para extraer los pigmentos naturales. En este periodo se cree que se produce la contaminación por la toxina presente en la parte externa de la uva, donde se han desarrollado los hongos. Los vinos dulces presentan una cantidad de OA mayor incluso

que los tintos (72, 526), al realizarse una vendimia más tardía para obtener una uva más dulce. Los vinos procedentes de países mediterráneos presentan un acúmulo mayor de OA que los de países del norte de Europa (200, 285, 292, 526). Esta diferencia existe también entre los vinos producidos al norte y al sur de países como Francia o Italia (330, 349). En un estudio portugués no encontraron OA en vino de Porto ni en vino Verde (132). La presencia de OA en mostos y uvas parece ser debida a *Aspergillus* spp., principalmente *A. carbonarius* (29, 73, 394), mientras contribuyen también *A. niger* (29, 106, 523) y, en menor grado, *A. ochraceus* (106). Sin embargo, algunos autores no aislaron ninguna cepa ocratoxígena de uvas (14). Las *Penicillium* spp. aisladas de vino y mosto en diversos trabajos no incluyen la especie ocratoxígena *P. verrucosum* (73, 106, 304, 394, 523).

La presencia de OA en café se detectó por primera vez en 1974 (65). Desde entonces se han realizado multitud de estudios en diferentes países (Tabla 7), no existiendo muchas diferencias en cuanto a presencia y cantidad de OA entre ellos (369, 462). Los cafés solubles presentan una cantidad de OA superior (41, 255, 335, 501), aunque al ser un producto más concentrado, la OA ingerida en una taza de café preparada a partir de café normal y de café soluble es similar (448). La producción de OA en café parece ser debida a *Aspergillus* spp., principalmente *A. niger*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus* (63, 64, 65, 214, 314, 441, 473). Aunque la mayoría de trabajos identifican a las *Penicillium* spp. sólo a nivel de género (64, 214, 441), en el trabajo de Sibanda y colaboradores (441) aislaron de muestras de café cepas pertenecientes al género *Penicillium* capaces de producir OA.

En el caso de las cervezas, no parecen haber diferencias entre los distintos tipos ni entre los distintos países productores (51, 210, 313). La producción de OA en cerveza, al contrario que en los casos anteriores, parece deberse al crecimiento de *P. verrucosum* en la cebada durante el almacenamiento o en la formación de la malta (34).

Diversos estudios tratan la exposición del hombre a esta micotoxina, destacando los cereales y sus derivados como principal fuente de ingestión de OA por su alto nivel de consumo. Productos de consumo inferior pero habitual como el vino, el café, el cacao, las pasas y el zumo de uva suponen una fuente adicional de aportación de OA. Los zumos, principalmente que contengan zumo de uva, se han de tener en cuenta al

considerar la ingesta de OA por la población infantil. Productos como las pasas o el vino dulce, al presentar un alto nivel de toxina, pueden suponer un incremento considerable de la ingesta de OA si se consumen en gran cantidad (71, 72, 105, 167, 200, 448).

1.4.3. Factores que influyen en la producción de OA

1.4.3.1. Factores abióticos

La fisiología de la producción de la OA ha sido ampliamente estudiada, sobretodo para la especie *Aspergillus ochraceus* (25, 238, 322, 385), aunque también para *P. verrucosum* (68, 185, 322). Estos estudios se han realizado en sustratos muy distintos, como grano de cereal (12, 104, 185, 186, 385), productos naturales como el queso (188, 322) o los derivados cárnicos (452), así como en medios semisintéticos, como un medio análogo de queso (188) o de pan (339), o sintéticos (322, 456). Además del sustrato empleado, las condiciones ambientales empleadas son también factores de variación. Así, los resultados de los diferentes estudios son, a veces, difíciles de extrapolar o comparar entre ellos.

1.4.3.1.1. Sustrato

El sustrato es un factor determinante en la posible formación de micotoxinas, tanto en productos naturales como en medios sintéticos. Así, el estudio de Madhyastha y colaboradores (282) demostró que la síntesis de OA por *P. verrucosum* es superior en cereales que en leguminosas. Lo mismo ocurrió con la CIT, que únicamente se detectó en maíz y trigo. La producción de OA fue mayor en trigo que en maíz, mientras la de CIT fue similar en ambos cereales. Sin embargo, para *A. ochraceus* la producción de OA se vio favorecida por leguminosas como el cacahuete o la soja. En un estudio de Abramson y colaboradores la producción de OA por cepas de *P. verrucosum* de la propia microbiota de las muestras fue superior en cebada que en trigo, mientras no se detectaba en avena (12). En otro trabajo del mismo grupo, esta producción (por cepas de *P. glandicola*, procedentes de la microbiota de las muestras) resultó ligeramente superior en maíz respecto a la obtenida en cebada, mientras no se detectó OA en trigo (11). Para cada cereal existen, además, diferencias en cuanto al acúmulo de OA entre sus distintas

variedades (23, 104, 186). Así, las variedades de cebada que presentan menos proteína alrededor de los gránulos de almidón y mayor cantidad de amilosa parecen acumular mayor concentración de OA (23). Sin embargo, según este mismo estudio, en trigo parece que el acúmulo de OA es mayor en las variedades con más contenido proteico.

La contaminación por diferentes especies fúngicas en los granos de cereales puede comportar cambios en su calidad nutricional. En el estudio de Madhyastha y colaboradores (281) se analizaron los cambios en la composición química de granos de trigo y cebada infectados por *A. alutaceus* (*A. ochraceus*) y *P. verrucosum*, y observaron que la contaminación implicaba un descenso importante de la cantidad de lípidos del grano, a la vez que disminuía, en menor medida, la cantidad de almidón y variaba la proporción de aminoácidos. Así, puede ser a nivel de alguno de estos componentes donde se hallen las diferencias que provocan la distinta producción de OA en cada cereal.

El tipo de componentes nutricionales de un sustrato ejercen un claro efecto sobre la producción de OA. Así, un alto nivel de proteína, según el estudio de Häggblom y Ghosh (186), y en concreto de los aminoácidos prolina y ácido glutámico, hacen aumentar la producción de OA por *A. ochraceus* y *P. viridicatum* tanto en cebada como en medio sintético. Davis y colaboradores (112) probaron diferentes concentraciones de sacarosa y de extracto de levadura, obteniendo una máxima producción de OA por *A. ochraceus* con un 4% de sacarosa y un 2% de extracto de levadura. Lai y colaboradores probaron el efecto de diferentes fuentes de carbono, en un medio líquido, sobre la producción de OA por varias especies de *Aspergillus* (*A. ochraceus*, *A. sulphureus* y *A. melleus*) (238). Obtuvieron mayor producción de OA cuando utilizaban glucosa o sacarosa en el medio que al añadir otros azúcares como la maltosa, manosa, galactosa, xilosa o arabinosa.

La composición del medio de cultivo es un factor que afecta tanto al crecimiento del hongo como a la producción de micotoxinas. Sin embargo, las condiciones que favorecen a uno u otro no siempre coinciden (112, 186, 238, 322, 456). Mientras algunos componentes del medio hacen aumentar el crecimiento proporcionalmente a su concentración, dejando la producción de OA prácticamente estable o disminuyéndola, como sucedió con la concentración de extracto de levadura para *A. ochraceus* (112),

otros factores, como el nivel de proteína y de los aminoácidos prolina y ácido glutámico, tienen un efecto inverso, aumentando la producción de OA y manteniendo el crecimiento del hongo más o menos estable (186). Una concentración óptima de sales de zinc, cobre, y hierro (0,055 a 2,2 mg/l; 0,004 a 0,04 mg/l y 1,2 a 24 mg/l, respectivamente) generan un máximo de producción de OA por parte de *A. ochraceus*, dejando, a excepción del zinc, el crecimiento prácticamente constante (456).

1.4.3.1.2. Actividad de agua

La actividad de agua (a_w) del sustrato tiene una gran importancia tanto para el crecimiento de las diferentes especies fúngicas como para la producción de sus metabolitos (90, 322, 339, 385). En sustratos naturales y medios sintéticos se han determinado rangos y máximos de producción de OA para *A. ochraceus* y *P. verrucosum*. Así, *A. ochraceus* produce OA desde una a_w de 0,83 a 0,87, variando según la cepa (322), con un óptimo de producción de 0,98 a 0,99 (322, 385). La producción de OA por *P. verrucosum* se encuentra desde una a_w mínima de entre 0,80 (339) o 0,85 a 0,90 (319, 322), según los diferentes estudios, y presenta un óptimo de producción de 0,92 según el estudio de Patterson y Damoglou realizado sobre un análogo de pan (339) y de 0,95 a 0,99 en medio sintético según Northolt y colaboradores (322).

1.4.3.1.3. Temperatura

La temperatura de incubación utilizada en ensayos *in vitro* o la temperatura de almacenamiento de los alimentos también determina la población fúngica presente y la posible formación de micotoxinas (25, 185, 320, 322, 385). Se trata de un factor muy condicionante para la producción de OA y que permite una identificación presuntiva de la especie ocratoxígena. Así, se asocia la producción de OA en climas fríos a *P. verrucosum* (158, 201, 301, 360, 422, 465), ya que es capaz de crecer a una temperatura mínima de 0°C (68, 319, 322) y de producir OA desde 4°C (68, 185, 319, 322). Resultados de diversos autores coinciden en situar en 25°C la temperatura óptima de producción de OA por *P. verrucosum* (185, 322, 446) o alrededor de los 20°C (358), aunque Bullerman obtuvo una mayor producción de OA a 12°C que a 25°C (68). En cambio, en los países de clima cálido y templado, esta producción de OA se ve relacionada con las especies productoras del género *Aspergillus*: *A. carbonarius*, *A.*

niger y *A. ochraceus* (15, 193, 486). *Aspergillus ochraceus* produce OA desde 12°C, presentando su máximo de producción sobre los 30°C (25, 185, 319, 322, 385). Existen pocos datos en la bibliografía acerca de la fisiología de la producción de OA por parte de *A. niger* y *A. carbonarius*, debido a su reciente descubrimiento como especies ocratoxígenas (4, 202). En un estudio reciente, las 18 cepas ensayadas de *A. carbonarius* aisladas de muestras de uva produjeron OA tras 10 días de incubación a 35°C (73).

1.4.3.1.4. pH

El pH también puede influir en el crecimiento del hongo y la producción de micotoxinas. Sin embargo, su efecto no parece ser tan limitante como el de otros factores abióticos, por lo que se suele estudiar en modelos multifactoriales (68, 283, 319, 339). La producción de OA por una cepa de *Penicillium* no identificada presentó su óptimo a pH 6,5, mientras no se detectó a pH 3,5 que fue el mínimo ensayado (68). En otro trabajo esta óptima se presentó a un pH de 6 y sí se detectó al mínimo pH ensayado (de 4) por *P. viridicatum* (339). En este último trabajo la producción de CIT presentó unos valores de pH mínimo y óptimo para su producción similares a los de la OA. En la bibliografía consultada no hemos encontrado referencias al efecto de los valores básicos de pH sobre la producción de estas toxinas.

1.4.3.1.5. Atmósfera

Factores como la composición gaseosa de la atmósfera pueden también influir en la posible presencia de OA y en el crecimiento de las diferentes especies productoras (124, 319, 334). Es posible reducir el crecimiento y la producción de micotoxinas mediante la alteración de la atmósfera gaseosa de los alimentos, pero se han de aplicar condiciones muy extremas para llegar a inhibirlos totalmente con este método: es necesario un 30% de CO₂, independientemente del nivel de O₂, para inhibir completamente la producción de OA por parte de *A. ochraceus* (334).

1.4.3.2. Factores bióticos

La presencia en el campo de las especies ocratoxígenas viene muy determinada por las condiciones ambientales (sobretudo humedad y temperatura) y varía enormemente por zonas y años de cosecha (257). Sin embargo, el crecimiento junto a determinadas especies fúngicas puede influir en el acúmulo de OA en el producto final. Tanto para *A. ochraceus* como para *P. verrucosum* se ha estudiado el efecto de la presencia de microbiota competidora sobre su crecimiento y producción de OA. Lee y Magan obtuvieron una cierta inhibición de *A. ochraceus* al cultivarla junto con especies de *Aspergillus*, *Alternaria* y *Eurotium* (248). Sin embargo, sólo se produjo un estímulo de la producción de OA con la especie *Alternaria alternata* y con las *Eurotium* spp. en determinadas condiciones de a_w y temperatura. Ramakrishna y colaboradores (378) obtuvieron también inhibición del crecimiento de *P. verrucosum* por *A. flavus* y *Hyphopichia burtonii*, mientras ésta fue muy ligera con *Fusarium sporotrichioides*. La producción de OA disminuyó al crecer con estas especies competidoras, aunque lo hizo en menor proporción con *F. sporotrichioides*. En ambos estudios destacan que el efecto de la flora competidora sobre la producción de OA dependía fundamentalmente de los factores abióticos, como la temperatura o la a_w .

1.4.3.3. Otros factores

Cabe tener en cuenta el efecto de la base genética de las diferentes cepas de una especie ante condiciones ecológicas idénticas. Así, gran número de estudios citan la importancia de la cepa escogida para valorar o comparar los resultados obtenidos (1, 2, 319, 322, 359, 385).

Las interacciones entre los factores abióticos citados resultan complejas, aunque en general al alejar uno de ellos de su punto óptimo, se disminuye el rango en el que se produce crecimiento y producción de OA del resto de variables valoradas (25, 124, 283, 322).

1.4.4. Metabolismo y mecanismo de acción

La mayor absorción de la OA tiene lugar en el estómago y yeyuno proximal. Esta absorción es alta (del 40 al 60%) en cerdo, rata, ratón y pollo. Los rumiantes absorben muy poca OA, ya que la flora ruminal la transforma rápidamente a $O\alpha$ (234, 454). No

obstante, en alguna ocasión se ha detectado presencia de OA en leche de vaca (166, 443). La OA tiene una eficiente circulación enterohepática (234, 347). En el torrente sanguíneo se encuentra unida a la albúmina y a otras proteínas sanguíneas (166, 234, 454).

La OA se hidroliza convirtiéndose en O α en distintos lugares del organismo. En los rumiantes esta transformación la llevan a cabo los microorganismos, principalmente los protozoos, del rumen (221, 234). En roedores la hidrólisis se produce en el duodeno, íleon y páncreas, y también la realizan las bacterias del ciego. Las enzimas carboxipeptidasa A y quimiotripsina son las responsables de dicha hidrólisis tanto en rumiantes como en roedores (234).

Tanto la excreción biliar como la filtración glomerular juegan un papel importante en la eliminación de la OA del plasma en las ratas. En éstas el metabolito mayoritario (tanto en heces como en orina) es la O α , seguida de la propia OA y la 4-hidroxi-OA (234). En terneros, un 80-90% de la OA se elimina en forma de O α , mayoritariamente por la orina (454).

La mayor persistencia de la OA en sangre parece darse en cerdo y en el hombre (348). La OA en el hombre presenta una excreción excepcionalmente lenta, debido a la reabsorción durante la circulación enterohepática, a la reabsorción que se efectúa también en la orina tras la secreción tubular y a una fuerte unión a las proteínas plasmáticas (347). La vida media de la OA en sangre es de 35 días tras una dosis única como contaminante en alimentos. Así, la OA es la micotoxina más frecuentemente detectada en sangre de individuos sanos en los distintos estudios realizados a nivel mundial. Esta toxina también ha sido detectada en riñón y en leche de mujer (348). En los distintos estudios realizados, se detectó OA en un 50 a 100% de las muestras humanas analizadas en concentraciones de ppb (71, 133, 331, 348, 391, 417, 451, 485, 525).

La OA actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, como se ha demostrado en bacterias, levaduras y cultivos de células de mamíferos (234, 315, 482), por lo que la síntesis de RNA y DNA también podrían estar inhibidas (234). La inhibición de la síntesis proteica es específica y tiene lugar a nivel post-transcripcional, donde la OA tiene un efecto directo en la traducción de las proteínas. La fenilalanina-tRNA sintetasa reconoce la

mitad fenilalanina de la OA y se produce una inhibición competitiva, parando la aminoacetilación y bloqueando la elongación del péptido. Los análogos de la OA en los que la fenilalanina ha sido substituida por otro aminoácido tienen un efecto inhibitor similar sobre la respectiva tRNA sintetasa específica de cada aminoácido (234, 482).

La OA induce la formación de aductos OA-DNA en ratas y ratones, con una importante presencia y vida media de los mismos en el riñón (118, 315). Estos aductos han sido localizados en células tumorales de riñón y vejiga urinaria de hombres procedentes del área de la nefropatía endémica de los Balcanes (BEN) (118, 315). Inicialmente la OA fue considerada como no mutagénica basándose en los resultados obtenidos en el test de Ames (482). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado el poder mutagénico de la OA en roedores y en cultivos celulares (113, 118). Diversos estudios han comprobado que la OA afecta tanto a la inmunidad humoral como a la celular a distintos niveles, probablemente debido a la inhibición de la síntesis proteica en los linfocitos (234, 482).

1.4.5. Ocratoxiosis natural

1.4.5.1. Ocratoxiosis en los animales

La nefropatía porcina es una enfermedad no infecciosa descrita por primera vez en Dinamarca en 1928 (230). La enfermedad se describió posteriormente en otros países como Alemania (230), Bélgica (230), Bulgaria (460), Estados Unidos (88), Hungría (230), Polonia (180, 230) y Suecia (230, 393). La nefropatía porcina se asoció, desde un principio, al consumo de cereales enmohecidos (230). Krogh y colaboradores (231) aislaron cepas de *P. viridicatum* productoras de OA y CIT de muestras de cereales recogidas en las zonas con elevada incidencia de la enfermedad, asociando el consumo de cereales contaminados con OA y CIT con la nefropatía porcina. La OA es la principal causa de la enfermedad, aunque la acción de la CIT puede colaborar en su aparición (230). Los signos clínicos en la nefropatía porcina son: polidipsia, poliuria, disminución de la producción, depresión, apatía y ocasionalmente la muerte (88). A veces no se observan estos síntomas y la enfermedad es un hallazgo de matadero, presentándose unos riñones pálidos y aumentados de tamaño (363, 460). Histopatológicamente se observa degeneración de los túbulos proximales, seguida de

una atrofia del epitelio tubular, hialinización de los glomérulos y fibrosis intersticial del córtex renal (88, 230, 234).

La nefropatía aviar asociada a OA se describió por primera vez en 1975 en Dinamarca a partir de pollos y gallinas decomisados en el matadero por sufrir lesiones renales. Los riñones de las aves estaban pálidos y presentaron un tamaño superior al normal. En dichos riñones se observó una fibrosis intersticial y una degeneración de los túbulos proximales y distales de las nefronas (230). La ocratoxicosis aviar también se detectó en otros países como Estados Unidos, Israel, Italia, Hungría y Bulgaria afectando a gansos, pavos, broilers y gallinas ponedoras. La sintomatología en la ocratoxicosis aviar es inespecífica: anorexia, diarrea, pérdidas en la producción (retraso en el crecimiento, bajo índice de conversión, disminución de la producción de huevos...), problemas respiratorios y muerte (187, 439, 459, 503).

A pesar de que los rumiantes sean generalmente considerados resistentes a la intoxicación por OA, se han descrito casos esporádicos de una supuesta ocratoxicosis bovina. Los animales murieron tras presentar un cuadro clínico específico y tras la necropsia se detectaron túbulos dilatados y fibrosis cortical renal y degeneración grasa hepática. En el pienso de dichos animales se detectó la presencia de OA y CIT (377).

Se han descrito casos puntuales de ocratoxicosis en perros, asociados al consumo de alimentos enmohecidos en los que posteriormente se detectó la presencia de OA (260, 503).

En nuestro país no se han encontrado casos, según la bibliografía consultada, de ocratoxicosis o de sospecha de ella en los animales domésticos.

1.4.5.2. Ocratoxicosis en el hombre

La nefropatía endémica de los Balcanes (BEN), descrita en los años 50, es una enfermedad renal crónica observada únicamente en zonas rurales de Bulgaria, Rumanía, Croacia, Bosnia y Serbia. La enfermedad, que evoluciona lentamente hasta la muerte, se observa generalmente en individuos con edades comprendidas entre los 30 y 50 años, afectando más frecuentemente a mujeres que a hombres (230). Inicialmente, la

sintomatología de la BEN es muy vaga: debilidad, palidez, polidipsia y poliuria. Más tarde aparecen los síntomas típicos de una insuficiencia renal: náuseas, vómitos, convulsiones y otros síntomas característicos de uremia crónica. Los riñones sufren una marcada reducción de tamaño y presentan degeneración tubular, hialinización de los glomérulos en la zona superficial del córtex y fibrosis intersticial. Cabe destacar que la BEN está asociada también a una alta incidencia de tumores del tracto urinario (234, 442). Como agentes etiológicos de la BEN se habían propuesto desde infecciones por bacterias o virus, problemas de autoinmunidad o defectos genéticos, hasta intoxicaciones por metales pesados, plantas o micotoxinas. En el año 1974, Krogh propuso la implicación de la OA en la etiología de la BEN, debido a la similar afección renal que comparte con la nefropatía porcina (234). Diversos estudios destacaron que los niveles de OA en suero humano así como en alimentos destinados al consumo animal y humano fueron más elevados en las zonas endémicas de BEN que en las zonas no endémicas (230, 232, 234, 341, 376, 442, 458). Otros autores consideraron que la OA es ubicua en los alimentos y que debía existir algún factor de tipo hereditario, hipótesis que tampoco ha sido demostrada (99). Así, hasta la fecha no se ha podido establecer una relación de causalidad clara entre la OA y la BEN. Por otra parte, diversos autores apuntaron a una nefrotoxina producida por *P. aurantiogriseum* como posible causa de la BEN (280, 287, 288, 519), sin obtener resultados concluyentes.

En Túnez (26, 277, 278) y Egipto (507) se han descrito casos de nefropatías asociadas a la OA. Los casos ocurridos en Túnez fueron mayoritariamente en zonas rurales y los autores demostraron, en estos estudios, una relación entre el consumo de alimentos con un alto contenido en OA con elevados niveles de la toxina en suero y con la aparición de la enfermedad. Algunos autores (277) consideran como un posible riesgo adicional la presencia de análogos naturales de la OA, con otros aminoácidos en lugar de fenilalanina, algunos de los cuáles son tan tóxicos *in vitro* y en cultivo celular como la OA. Esta presencia se detectó tanto en alimentos como en sangre humana. En los casos descritos en Egipto se detectaron concentraciones de OA en suero y orina superiores en los individuos afectados que en los individuos control. También se detectó la presencia de OA en las muestras de suero, orina y tejido obtenidas de pacientes con carcinoma renal. Wafa y colaboradores (507) concluyeron que, si bien la OA parece estar implicada en dichos casos de nefropatía, se necesitan más estudios epidemiológicos para establecer una relación de causalidad.

1.4.6. Ocratoxycosis experimental

Se han realizado estudios de intoxicación experimental por OA en muchas especies animales. Los animales más sensibles, en cuanto a la intoxicación aguda, son el perro y el cerdo y los menos sensibles la rata y el ratón (Tabla 8). Estas diferencias pueden ser debidas a que los enlaces de la albúmina y otras macromoléculas séricas son más fuertes en los primeros, como parece suceder también en el hombre (234, 347).

Tabla 8. Toxicidad aguda de la OA (230, 294)

Animal	LD ₅₀ mg/kg	Administración
Ratón, hembra	22	Intraperitoneal
Rata, macho	28-30,3	Oral
Rata, hembra	21,4	Oral
Rata, macho	12,6	Intraperitoneal
Rata, hembra	14,3	Intraperitoneal
Cobaya, macho	9,1	Oral
Cobaya, hembra	8,1	Oral
Gallina	3,4	Oral
Pavo	5,9	Oral
Codorniz	16,5	Oral
Trucha	4,7	Intraperitoneal
Perro	0,2	Oral
Cerdo	1-6	Oral

La nefropatía porcina ha sido reproducida en diversos estudios experimentales, obteniendo las mismas lesiones renales y sintomatología de la enfermedad (88, 230). Al administrar a estos animales dosis superiores a las detectadas en la nefropatía natural, se encuentran también lesiones hepáticas, esplénicas, intestinales, de tejidos linfoides y a nivel leucocitario (294, 230). La nefropatía aviar también ha sido reproducida en estudios experimentales en aves, produciéndose de nuevo las lesiones renales y la sintomatología de la enfermedad (88, 206, 230, 375). Al administrar dosis superiores a las que provocan la nefropatía aviar natural se observaron lesiones hepáticas, gota visceral y alteraciones del sistema inmunitario y de la hematopoyesis (230, 343).

A pesar de la resistencia de los rumiantes a los efectos de la intoxicación aguda por OA, esta capacidad disminuye al incrementar la OA en la ración, como demostraron en un estudio realizado en ovejas (221).

Estudios realizados en perros de raza Beagle demostraron que los animales intoxicados experimentalmente con OA mostraron síntomas propios de una afectación renal. Histopatológicamente, se observó necrosis renal y degeneración grasa hepática, con necrosis centrilobular (224, 467, 468).

En la especie humana no existen estudios que demuestren de forma definitiva una causalidad directa entre la OA y el cáncer de riñón, con lo que la OA fue clasificada en el grupo 2B (posible carcinógeno humano) por la “International Agency for Research on Cancer” (IARC) (76, 233). Sin embargo, algunos autores (118) recomendaron su inclusión en el grupo 2A (probable carcinógeno humano) por su demostrada carcinogenicidad en rata y ratón (siendo los machos más sensibles que las hembras) y por la relación existente entre la BEN y la mayor incidencia de tumores del tracto urinario en las zonas endémicas (118, 230, 233, 234).

La OA inhibe la respuesta inmunitaria celular y humoral, actuando en varios niveles del sistema inmunitario (45). Diversos estudios realizados con gallinas, perros, ratas y ratones obtuvieron una depleción de las células linfoides en distintas localizaciones, junto a una disminución de la respuesta de hipersensibilidad retardada tras la ingesta de OA (190, 294, 328). En ratones, la OA tiene un efecto mielotóxico, disminuyendo el número de células precursoras de células de la serie blanca, eritrocitos y megacariocitos (328). En perro, la OA produjo necrosis de los tejidos linfoides del bazo, tonsilas y timo y de los ganglios linfáticos del yeyuno, íleon, ciego, colon y recto (224, 467, 468). En un estudio reciente, Petzinger y Weidenbach han demostrado la liberación de las citoquinas TNF α por un hígado de rata tras exposición a OA (347).

La OA es un potente teratógeno en ratón, rata, hámster y pollo (234), sin embargo, en un estudio realizado en cerdas en las primeras semanas de gestación, la OA no fue capaz de cruzar la barrera placentaria (440).

1.4.7. Métodos analíticos

1.4.7.1. Extracción

La OA es un compuesto cristalino incoloro de características ligeramente ácidas. Es soluble en solventes orgánicos polares y soluciones acuosas de bicarbonato y ligeramente soluble en agua. Así, puede ser extraída de una fase acuosa mediante un solvente menos polar, inmiscible en agua, solamente en condiciones ácidas, mientras que bajo condiciones neutras o básicas se encuentra en forma disociada (488). Los métodos de extracción existentes combinan mezclas de solventes orgánicos, agua, ácidos y agitación mecánica para conseguir la extracción de la OA.

La extracción de OA a partir de muestras de piensos, cereales, etc. se realiza mediante combinaciones de varios solventes y mezclas de éstos en agua, como acetonitrilo-solución acuosa de KCl, cloroformo-agua acidificada con HCl 1N, cloroformo-metanol u otras mezclas de solventes orgánicos con ácido fosfórico diluido (39). En algunos métodos (175), el extracto de acetonitrilo-solución acuosa de KCl obtenido se lava una o más veces con isooctano para eliminar los lípidos de la muestra.

De las muestras de sangre o de tejidos animales, la OA se extrae mediante cloroformo acidificado (75, 416, 488). Otros investigadores (241), extrajeron OA de plasma utilizando metanol. La OA se extrae de riñón con cloroformo, previa acidificación con ácido fosfórico (437) o con diclorometano y ácido cítrico (488). En leche, orina y heces se realiza la extracción con métodos similares a los anteriormente descritos (489, 490).

Para purificar los extractos obtenidos se usan los métodos de partición líquido-líquido (LLP) y los que emplean una columna de extracción de fase sólida (SPE). La LLP se basa en cambios en el pH de los solventes utilizados en la extracción, eliminando sustancias que pueden interferir en la detección de la OA, mientras que la SPE consiste en la utilización de unos cartuchos, rellenos con gel de sílice o C₁₈ que retienen las impurezas cuando se hacen pasar los extractos de las muestras (o en algún caso la propia muestra) a través de ellos (488). El avance más importante en los métodos de purificación en los últimos años ha sido la aparición de las columnas de inmunoafinidad (IAC). En el interior de las IAC se fijan anticuerpos monoclonales específicos contra la OA. El extracto de la muestra a analizar se pasa por la columna y la OA queda unida a dichos anticuerpos (488). Las IAC cada vez son más utilizadas, siendo el método de elección para la extracción de OA de muestras de cereales (427, 428, 437), café (70, 335, 369, 483), cerveza (215, 249, 313, 483), vino (72, 483, 504, 526) o plasma (71, 417, 483, 488).

1.4.7.2. Detección y cuantificación

Los métodos más comúnmente utilizados para detectar la presencia de OA a partir de un extracto de una muestra son las técnicas de cromatografía en capa fina (TLC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La TLC es una buena técnica para

realizar analíticas rutinarias de bajo coste debido a que no precisa un equipamiento excesivamente caro. Esta técnica permite, además, realizar el análisis de otras micotoxinas junto con el de la OA (175, 234, 457). El límite de cuantificación de la técnica para cereales y muestras de tejidos está alrededor de los 10 ng/g (234). Para la detección de la OA en TLC se usan placas de gel de sílice comerciales sin indicador de fluorescencia. Los extractos de las muestras se inoculan en la placa procurando que el diámetro del inóculo sea el menor posible y que nunca exceda de 2 mm (457). Como fase móvil se usan combinaciones de solventes orgánicos ligeramente acidificados, como tolueno:acetato de etilo:ácido acético (5:4:1, V/V), tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico (6:3:1, V/V), tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico:cloroformo (7:5:2:5, V/V), acetona:ácido acético (3:1, V/V), entre otros (39, 175).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección fluorimétrica ha sido el método más utilizado en los últimos diez años para la determinación de OA, debido principalmente a su alta sensibilidad, reproducibilidad y a que puede ser fácilmente automatizado. El límite de cuantificación es de 0,02-0,03 µg/Kg en tejidos animales (215) y de 0,001 µg/l en cerveza (313), aunque puede variar dependiendo de la técnica de extracción utilizada.

Para la detección de la OA generalmente se utilizan columnas de fase reversa. Debido a las características ligeramente ácidas de la OA, la fase móvil empleada en el HPLC de fase reversa debe ser ácida para evitar una adsorción inespecífica a la columna. En la mayoría de los casos se usan mezclas de acetonitrilo o metanol con ácido acético diluido o ácido fosfórico. La utilización del acetonitrilo es más frecuente, debido a que las mezclas de éste con agua tienen una menor viscosidad y mejor eficacia en la separación que las mezclas de metanol con agua. De forma general se utiliza una elución isocrática y las longitudes de onda de excitación y emisión son de 330 nm y 460 nm, respectivamente. La confirmación se realiza mediante derivatización de la OA en su metil-éster tras un tratamiento con trifluoroboro al 14% en metanol o bien mediante técnicas de ELISA (488).

La detección y cuantificación conjunta de OA y CIT mediante HPLC sería interesante al ser ambas metabolitos de *P. verrucosum*. Sin embargo, estas dos moléculas presentan características muy distintas que dificultan la puesta a punto de la técnica. Mientras la

afinidad de la OA a la columna de fase reversa no se ve influida por las características de la fase móvil, la CIT tiene una gran afinidad a fases hidrofóbicas y su índice de retención, al contrario de lo que sucede con la OA, varía mucho en función de la fase estacionaria empleada (387).

La cromatografía de gases no es un método empleado en la detección de OA ya que ésta no es volátil (412, 488). Sin embargo, a veces se utiliza detectando un derivatizado de la OA para la confirmación de resultados positivos (488).

Los métodos inmunoquímicos para la detección de OA han recibido una gran aceptación debido a su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de analizar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. Desde la descripción del primer ELISA para la detección de OA en 1981 (234), se han puesto a punto diversos métodos ELISA y RIA para la detección de OA en cereales (6, 27), sangre (451, 485), productos cárnicos (513) y riñón (85, 163) y suero (484) porcinos. El límite de cuantificación de la técnica de ELISA en muestras de plasma humano es de 4 pg/ml (485). Los antisueros utilizados se obtenían inicialmente a partir de conejo y gallina, hasta que las técnicas de anticuerpos monoclonales facilitaron la producción de anticuerpos de alta especificidad (513).

1.4.8. Prevención y detoxificación

La mejor manera de controlar la presencia de ocratoxinas en piensos preparados a partir de cereales y leguminosas es prevenir y evitar su formación, ya sea en el campo, antes de la cosecha o durante el almacenamiento (411).

Según la FAO, los métodos de detoxificación deben destruir, inactivar o desplazar la micotoxina; no producir o dejar residuos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos; mantener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto; no alterar propiedades tecnológicamente importantes del producto y destruir las esporas y el micelio fúngicos para evitar la producción de más micotoxinas. La FDA añade también como requisito el respeto al medio ambiente (414).

La OA en cereales almacenados se puede ir descomponiendo lentamente. En centeno contaminado de forma natural, la OA disminuyó en un 63% en 2 años; en harinas de trigo, cebada y maíz entre un 71-79% en periodos de 4 días a 6 meses. Esto sucede, lógicamente, si el almacenamiento se realiza en buenas condiciones, ya que si el grano no está lo suficientemente seco pueden desarrollarse cepas ocratoxígenas y aumentar el contenido en OA de nuevo (411).

La OA no se elimina del grano ni con un lavado húmedo ni con un lavado en seco. Al descascarillar la cebada, la cáscara resultó tener un contenido de OA superior (de 3 a 24 veces más) que la cebada descascarillada (411). La OA parece ser destruida con mayor facilidad en el cereal seco que en el cereal húmedo (410). El proceso de ensilado tampoco destruye la OA (414).

La OA es estable a la irradiación con rayos gamma a dosis de 7,5 Mrad (396). También es moderadamente estable a los tratamientos con calor (411). De los tratamientos realizados en el grano de café, el tostado es el que supone una mayor disminución de la cantidad de OA en el producto final (41, 194, 330, 492). La mayoría de estudios publicados hasta la fecha obtienen una reducción del 70% al 90% de la concentración de OA durante el tostado del café (492). Otro tratamiento al que se somete el café que reduce significativamente los niveles de OA es la descafeinización con solventes (194). La degradación de la OA durante la elaboración de la cerveza varía entre un 70 y 90% entre los distintos trabajos publicados (33, 34, 410, 411).

La amonización, tratamiento con solución acuosa de amonio, descompone la OA en maíz, trigo y cebada. La degradación de la micotoxina es mayor a altas temperaturas, por encima de 45°C y con substratos que contengan bajas concentraciones de OA. Concentraciones de 1,2 µg OA/g en maíz fueron completamente eliminadas tras una amonización a 20°C durante 6 semanas. Sin embargo, en el experimento disminuyó la palatabilidad del pienso y la utilización de la proteína por las ratas. En otro estudio se consiguió una buena eliminación de la OA de cebada para la alimentación de cerdos mediante amonización, aunque los resultados no mejoraron notablemente la productividad y se obtuvieron residuos de OA en riñón más altos de lo esperado. En estos estudios no se tuvo en cuenta los productos obtenidos de la detoxificación, que

probablemente continuaban siendo tóxicos. Otros tratamientos han sido probados sin éxito, con lo que son necesarios nuevos avances en este campo (234, 411).

La adición de carbón no tuvo ningún efecto sobre la toxicidad de la OA en gallinas (411). El aluminosilicato de calcio y sodio hidratado (HSCAS®), potente adsorbente muy efectivo con las aflatoxinas, no funciona con la OA (414). Sin embargo, un estudio reciente cita buenos resultados para el caseinato potásico y el carbón activado como adsorbentes de la OA en vino (80).

Debido a la dificultad de evitar completamente la presencia de OA en alimentos, se han estudiado métodos para limitar su toxicidad. Compuestos con estructura análoga y/o alta afinidad por las proteínas plasmáticas, que presentan inhibición competitiva con la OA, han dado resultados prometedores. El aspartamo, análogo estructural tanto de la OA como de la fenilalanina, previno parcialmente la nefro y genotoxicidad de la OA, cuando se administraba conjuntamente. Además, al administrarlo a animales ya intoxicados con OA, consiguió que se eliminara un 80% de la toxina respecto a los valores que presentaban animales no tratados con aspartamo. Presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas *in vitro* y no es tóxico, por lo que los autores recomiendan su utilización (30, 92). Otros estudios citan que la fenilalanina revierte la inhibición de la síntesis proteica que produce la OA, debido a la competencia que se establece entre ambas para unirse a distintas enzimas (94, 524).

1.4.9. Legislación

Recientemente, la Unión Europea ha fijado unos niveles máximos de OA en distintos productos (22). Este máximo fijado es de 5 µg/Kg (ppb) para cereales en grano sin transformar (incluyendo el arroz y el alforfón), de 3 µg/Kg para productos derivados de los cereales (incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano destinados al consumo humano directo) y de 10 µg/Kg para las uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas). El 31 de Diciembre de 2003 está propuesta la revisión del valor máximo aceptado para uvas pasas y la asignación de un valor máximo para productos como el café, vino, cerveza, zumo de uva, cacao y productos del cacao y especias. Estos límites máximos siguen las recomendaciones de la

OMS, que establecía un nivel máximo de 5 μg OA/Kg para cereales y productos a base de cereales en países europeos (200). Algunos países de la Unión Europea tienen normativa propia más restrictiva (Tabla 9). Otros países también han establecido niveles máximos de OA permitidos en los alimentos (Tabla 9).

Tabla 9. Niveles máximos tolerados de OA en alimentos y piensos (91, 130, 293).

País	Substrato	Límite máximo	Comentarios
Brasil	Arroz, cebada, judías y maíz	50 µg/Kg	
Canadá	Piensos para animales reproductores	0 µg/Kg*	
Rep. Checa	Alimentos para niños	1 µg/Kg	
	Resto de alimentos	20 µg/Kg	
Chipre	En leche y productos lácteos	0,5 µg/Kg*	
Dinamarca	Riñón de cerdo	10 µg/Kg	decomiso de las vísceras
	Riñón de cerdo	25 µg/Kg	decomiso de la canal
Francia	Todos los alimentos y piensos	5 µg/Kg ¹	
Grecia	Todos los alimentos	20 µg/Kg	
Holanda	Cereales, leguminosas y sus derivados	0 µg/Kg*	
Hungría	Alimentos en conserva	0 µg/Kg*	
Israel	Cereales y leguminosas para alimentación animal	300 µg/Kg	
	Cereales, leguminosas y sus derivados	50 µg/Kg ¹	
Rumanía	Todos los alimentos y piensos	5 µg/Kg	
Suecia	Piensos completos para cerdos	100 µg/Kg	
	Piensos completos para aves	200 µg/Kg	
Suiza	Cereales y sus derivados	2 µg/Kg	
	Pienso para cerdos	100 µg/Kg	
	Pienso para aves	1000 µg/Kg	
Trinidad y Tobago	Helados	0 µg/Kg*	
Uruguay	Arroz, cebada, judías, café y maíz	50 µg/Kg	

*Límite máximo para todas las micotoxinas.

¹Propuesta de reglamentación.

OBJETO E INTERÉS

2. OBJETO E INTERÉS

Los hongos tienen una gran capacidad de adaptación y desarrollo en sustratos muy diversos entre los que se encuentran los alimentos destinados al consumo humano y animal. Entre los distintos problemas que se derivan de esta relación, destacan por una parte el deterioro del producto por un exceso de desarrollo de estos organismos, y por otra la posible presencia de metabolitos secundarios tóxicos que se pueden generar durante su crecimiento. Actualmente existe un creciente interés en conocer la capacidad potencial de determinadas especies aisladas de alimentos y sus materias primas de elaborar micotoxinas, así como los factores que pueden afectar en estos sustratos la producción de las mismas.

Las especies del género *Penicillium*, junto con las de *Aspergillus* y *Fusarium*, suelen ser mayoritarias en los alimentos y son también las que elaboran un mayor número de micotoxinas. De éstas, la ocratoxina A es una de las que actualmente está recibiendo más atención, debido fundamentalmente a su elevada toxicidad y amplia distribución. Por esta razón, no es de extrañar que muy recientemente en Europa haya aparecido legislación para intentar controlarla en distintos tipos de alimentos. Su producción está asociada a diversas especies del género *Aspergillus*, y en principio a una única especie del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum*. Esta especie se asocia fundamentalmente a cereales y tiene una mayor distribución en países de climas templados o fríos.

En nuestro país existen pocas citas sobre la presencia de *P. verrucosum* en este tipo de productos. Este hecho puede deberse, a parte de la distribución climática particular de esta especie, a la dificultad que presenta su identificación. En efecto, si ya de por sí la identificación de *Penicillium* spp. es complicada, la de las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium*, grupo que incluye a *P. verrucosum*, es la más difícil del género. Esto se debe, entre otras razones, a que morfológicamente sus conidióforos son más complejos y a que la descripción de muchas especies morfológicas se ha basado en diferencias poco consistentes. Con el fin de facilitar el estudio de estas especies, en los últimos años se están utilizando otros criterios para intentar clasificarlas, entre los que destacan los quimiotaxonómicos y los que emplean técnicas de biología molecular.

Por todo ello, consideramos de interés conocer la presencia y distribución de *Penicillium* spp. en este tipo de productos en nuestras latitudes, profundizando en el estudio de las especies del subgénero *Penicillium*, y en especial de *P. verrucosum*. Para lograr este fin, nos proponemos estudiar no sólo las características morfológicas de las especies, sino también las fisiológicas y las relacionadas principalmente con el metabolismo secundario. En el caso de *P. verrucosum*, debido a su complejidad taxonómica e importancia, nos parece de interés utilizar para su estudio técnicas de biología molecular.

Para finalizar, también consideramos interesante estudiar la influencia que presentan diferentes factores abióticos en la elaboración de ocratoxina A y citrinina por parte de distintas cepas de *P. verrucosum*.

PLAN DE TRABAJO

3. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo a seguir deberá contemplar los siguientes puntos:

- Elección y obtención de piensos y materias primas. Toma de muestras.
- Recuento, aislamiento e identificación de los hongos presentes en los diferentes sustratos.
- Recuento, aislamiento e identificación de las cepas pertenecientes al género *Penicillium* presentes en los diferentes sustratos.
- Selección y obtención de cepas de colección de *Penicillium verrucosum* y otras *Penicillium* spp.
- Estudio fisiológico, bioquímico y micotoxigénico de las cepas de *Penicillium* spp.
- Estudio molecular de las cepas pertenecientes a *P. verrucosum* mediante secuenciación del fragmento de DNA que codifica el gen 5.8s del RNA ribosomal y los ITS1 y 2 y mediante técnica de RAPD.
- Estudio del efecto de la fuente de carbono, de la actividad de agua, del pH y de la temperatura sobre la morfología y producción de ocratoxina A y citrinina en cepas de *P. verrucosum*.
- Lectura y tratamiento de los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y EL RECuento DE *Penicillium* spp. EN MUESTRAS DE PIENSO Y MATERIAS PRIMAS

4.1.1. Muestras estudiadas

Para llevar a cabo este estudio se han analizado 178 muestras para el recuento, aislamiento e identificación de *Penicillium* spp. De las muestras analizadas, 90 fueron de cereales (44 de maíz, 29 de cebada y 17 de trigo) y 88 de piensos o compuestos destinados a la alimentación animal (58 de cerdo, 15 de caballo y 15 de aves).

4.1.2. Procesado de las muestras

Se tomaron, en condiciones de asepsia, 10 g de cada muestra y se realizó un banco de diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} en suero fisiológico estéril con Tween 80 al 0,05% (SFW), cuya composición se detalla en el apartado 4.5.2. Las materias primas se molieron durante 15 segundos antes de realizar el banco de diluciones.

Con una pipeta estéril se tomaron 0,1 ml de cada dilución y se inocularon 6 placas de Petri, 3 de ellas conteniendo 20 ml del medio de cultivo agar extracto de malta al 2% (MEA) (apartado 4.5.1.) adicionado de 100 ppm de cloranfenicol y 50 ppm de estreptomicina y las otras 3 conteniendo agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (apartado 4.5.1.).

Las placas se sembraron en superficie, mediante asa de Digralsky, y se incubaron en oscuridad a 28°C durante 7 días.

El recuento total se determinó a los 7 días de incubación, escogiendo la dilución a partir de la cual se desarrollaron entre 1 y 100 colonias por placa (403). Las unidades formadoras de colonias por gramo de pienso (UFC/g) se determinaron calculando la media aritmética del número de colonias desarrolladas a partir de la dilución adecuada, teniendo en cuenta el factor de dilución y el volumen del inóculo empleados.

Paralelamente, se realizó el recuento, aislamiento e identificación de aquellas colonias que, a simple vista o mediante su observación al microscopio estereoscópico, se consideraron pertenecientes al género *Penicillium* o sus teleomorfos. También se realizó el aislamiento y la identificación de las colonias de *Penicillium* spp. presentes en diluciones no seleccionadas para efectuar el recuento.

Estas cepas se aislaron en tubos conteniendo 3 ml de medio MEA y se conservaron en cultivos axénicos para proceder a su identificación hasta nivel de especie.

Las cepas de *Penicillium* spp. fueron conservadas también mediante liofilización. Para ello se realizó una suspensión de conidios en leche descremada estéril a partir de un cultivo de 7 días en MEA. La suspensión se repartió en viales de conservación de plástico. Los viales, conteniendo 0,5 ml de suspensión, fueron congelados a -80°C durante una hora. Posteriormente se liofilizaron a -40°C con un liofilizador Lio-Alpha 6 (Telstar, Terrassa), aplicando un vacío de 100 micrones durante 24 horas. Una vez liofilizadas, las cepas fueron conservadas a -80°C .

4.1.3. Identificación hasta nivel de especie de las cepas de *Penicillium* spp.

Para la identificación hasta nivel de especie de las cepas pertenecientes al género *Penicillium* aisladas de las muestras de piensos y cereales, y a partir de un cultivo incubado en MEA durante 7 días a 28°C , se realizó una suspensión de conidios en tubos de 3 ml de SFW. A partir de dicha suspensión y mediante una asa de nicrom doblada, se efectuaron siembras en 3 puntos en placas de Petri conteniendo 20 ml de agar Czapek extracto de levadura (CYA) (apartado 4.5.1.), MEA, y agar nitrato 25% glicerol (G25N) (apartado 4.5.1.). La siembra en CYA se realizó por triplicado. La incubación se llevó a cabo durante 7 días en oscuridad a 25°C , excepto 2 de las placas de medio CYA, que fueron incubadas a 37°C y a 5°C , respectivamente. La identificación hasta nivel de especie de las cepas pertenecientes al género *Penicillium* se hizo siguiendo los tratados de Pitt (350) y Pitt & Hocking (360).

Para realizar una preparación microscópica se separaron fragmentos de la periferia de los cultivos de CYA y de MEA con la ayuda de un asa de nicrom. Dichos fragmentos se colocaron sobre un portaobjetos y se le añadieron unas gotas de alcohol con el fin de

dispersar los conidios y poder observar con claridad el conidióforo de la cepa en estudio. A continuación se montó la preparación entre portaobjetos y cubreobjetos, añadiendo unas gotas de lactofenol o de azul algodón (apartado 4.5.3.) para proceder a la observación microscópica.

Para la identificación se consideraron, de forma minuciosa, las características macroscópicas y microscópicas que se citan a continuación.

Las principales características macroscópicas son:

- Diámetro de las colonias.
- Coloración del anverso y del reverso de la colonia.
- Textura de la colonia.
- Presencia de surcos.
- Presencia de gotas de exudado.
- Presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo.
- Presencia de esclerocios.

Las principales características microscópicas son:

- Número de puntos de ramificación presentes en los conidióforos.
- Longitud y textura del estipe.
- Número, disposición, longitud y textura de las ramas (en su caso).
- Número, disposición, longitud y textura de las métulas (en su caso).
- Número, forma, longitud y textura de las fiálides.
- Forma, tamaño, textura y color de los conidios.
- Forma, tamaño, textura y color de los esclerocios (en su caso).
- Forma, tamaño, textura y color de los cleistotecios (en su caso).
- Forma, tamaño, textura y color de las ascas (en su caso).
- Forma, tamaño, textura y color de las ascosporas (en su caso).

4.2. ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y MICOTOXÍGENO DE *Penicillium* spp.

4.2.1. Cepas estudiadas

Para realizar este estudio se han utilizado 152 cepas aisladas de las muestras de piensos y cereales analizadas (apartado 4.1.1.), 84 cepas aisladas en nuestro laboratorio de otros sustratos y 62 cepas procedentes de colecciones de cultivo. Todas estas cepas fueron identificadas hasta nivel de especie siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.1.3. En el caso de las cepas procedentes de colecciones de cultivo se confirmó la identificación original. La relación de las cepas estudiadas, su origen y referencia se detallan en la Tabla 10.

4.2.2. Estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp.

Además de la identificación por criterios morfológicos llevada a cabo para *Penicillium* spp. (apartado 4.1.3.), se valoró el crecimiento a los 7 días de incubación a 25°C en los medios de cultivo CREA (apartado 4.5.1.) (145), CSN (apartado 4.5.1.) (355), YES (apartado 4.5.1.) (138), NSA (apartado 4.5.1.) (142), RT (apartado 4.5.1.) (386) y en el medio líquido de Urea (apartado 4.5.1.) (53). En todos los medios sólidos ensayados se valoraron, a los 7 días de incubación, las características macroscópicas descritas en el apartado 4.1.3. Se realizó, asimismo, la prueba del Indol (apartado 4.5.3.) (270) a partir de las colonias presentes en los medios CYA, CREA y CSN.

La valoración del crecimiento en los medios sólidos, a excepción del NSA y RT, y la realización de la prueba del indol se efectuaron también tras 14 días de incubación a 25°C.

Tabla 10. Cepas de *Penicillium* spp. estudiadas y su origen.

Especie	Subgénero	Origen	Nº	Referencia cepa	
<i>P. aurantiogriseum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Maíz	13	P271, P272, P278, P310, P311, P315, P317, P323, P328, P330, P349, P361, P442
			Cebada	8	P296, P345, P396, P404, P411, P412, P417, P433
			Trigo	7	P292, P343, P347, P420, P422, P424, P426
		Piensos	Cerdo	13	P450, P453, P458, P459, P460, P468, P474, P476, P477, P479, P481, P486, P494
			Caballo	3	P357, P362, P367
			Ave	3	P265, P429, P431
		Otros ^a	Avena	1	P359
			Maíz	1	P270
			Pienso oveja	2	P394, P401
			Pienso vaca	1	P483
			Salvado	1	P374
			Colección cultivo	2	CECT 2264 ^b , NRRL 971
		<i>P. bilaii</i>	<i>Aspergilloides</i>	Piensos	Cerdo
<i>P. brevicompactum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Trigo	3	P291, P348, P423
		Otros	Maíz	1	P267
		Colección cultivo		1	NRRL 859
<i>P. canescens</i>	<i>Furcatum</i>	Cereales	Maíz	1	P266
		Otros	Tierra	1	P406
<i>P. capsulatum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Cereales	Cebada	1	P289
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Cebada	1	P439
		Piensos	Cerdo	6	P258, P260, P261, P445, P493, P515
			Ave	1	P434
		Otros	Desconocido	1	P314
			Goma	1	P518
			Guisante forrajero	1	P264
			Piel axila cabra	1	P499
			Piel oído humano	1	P497
			Pienso cerdo	1	P513
			Pienso oveja	1	P393
		Queso	1	P496	
		Tierra	2	P500, P510	
		Uva	6	P522, P523, P524, P525, P526, P527	
	Colección cultivo	1	NRRL 807		
<i>P. citreonigrum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Otros	Tierra	1	P408
<i>P. citrinum</i>	<i>Furcatum</i>	Cereales	Maíz	3	P268, P280, P332
		Piensos	Caballo	1	P335
		Otros	Piel axila cabra	2	P402, P403
			Soja	2	P273, P274
		Tierra	1	P509	
		Colección cultivo	1	CECT 2274	

(sigue)

(Tabla 10, continúa)

Especie	Subgénero	Origen		Nº	Referencia cepa
<i>P. commune</i>	<i>Penicillium</i>	Piensos	Cerdo	1	P516
		Colección cultivo		1	NRRL 890
<i>P. corylophilum</i>	<i>Furcatum</i>	Piensos	Cerdo	4	P446, P466, P480, P482
<i>P. crustosum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Maíz	6	P269, P320, P329, P331, P390, P444
		Piensos	Caballo	1	P339
		Otros	Alimento caballo	1	P351
			Castaña	1	P397
			Desconocido	1	P495
			Tierra	1	P414
<i>P. decumbens</i>	<i>Aspergilloides</i>	Cereales	Trigo	1	P425
		Piensos	Cerdo	3	P257, P449, P454
		Otros	Avena	1	P366
<i>P. digitatum</i>	<i>Penicillium</i>	Otros	Naranja	1	P521
			Pasas	1	P470
<i>P. donkii</i>	<i>Aspergilloides</i>	Otros	Tierra	1	P505
<i>P. duclauxii</i>	<i>Biverticillium</i>	Otros	Tierra	1	P413
<i>P. echinulatum</i>	<i>Penicillium</i>	Piensos	Cerdo	2	P461, P463
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Cebada	1	P435
			Trigo	1	P342
		Colección cultivo		1	NRRL 974
<i>P. fellutanum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Piensos	Cerdo	1	P478
<i>P. funiculosum</i>	<i>Biverticillium</i>	Cereales	Maíz	1	P369
<i>P. glabrum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Piensos	Cerdo	2	P255, P256
			Otros	Castaña	1
		Colección cultivo	Goma	1	P464
			Uva	2	P299, P300
				1	NRRL 766
<i>P. glandicola</i>	<i>Penicillium</i>	Colección cultivo		1	NRRL 2036
<i>P. griseofulvum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Maíz	2	P294, P471
			Cebada	2	P415, P432
		Piensos	Cerdo	3	P455, P467, P514
			Caballo	1	P485
		Otros	Avena	2	P360, P365
			Salvado	1	P372
			Uva	1	P528
		Colección cultivo		1	NRRL 2300

(sigue)

(Tabla 10, continúa)

Especie	Subgénero	Origen	Nº	Referencia cepa	
<i>P. hirsutum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Cebada	2	P416, P436
			Trigo	1	P427
			Colección cultivo	1	CECT 2812
<i>P. humuli</i>	<i>Furcatum</i>	Otros	Uva	3	P302, P303, P305
<i>P. implicatum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Piensos	Cerdo	2	P452, P517
<i>P. islandicum</i>	<i>Biverticillium</i>	Piensos	Cerdo	1	P456
		Otros	Salvado	1	P373
<i>P. italicum</i>	<i>Penicillium</i>	Piensos	Cerdo	1	P511
		Otros	Uva	1	P529
<i>P. janczewskii</i>	<i>Furcatum</i>	Otros	Tierra	1	P409
<i>P. janthinellum</i>	<i>Furcatum</i>	Cereales	Maíz	1	P281
		Piensos	Cerdo	1	P290
		Otros	Tierra	1	P501
<i>P. melinii</i>	<i>Furcatum</i>	Otros	Tierra	2	P502, P507
<i>P. minioluteum</i>	<i>Biverticillium</i>	Cereales	Maíz	4	P276, P284, P312, P333
			Trigo	1	P344
		Piensos	Caballo	1	P340
		Otros	Paté	1	P519
<i>P. nalgiovense</i>	<i>Penicillium</i>	Otros	Jamón	1	P462
			Paté	1	P520
<i>P. oxalicum</i>	<i>Furcatum</i>	Cereales	Maíz	6	P279, P286, P295, P309, P316, P322
		Piensos	Caballo	1	P363
<i>P. paxilli</i>	<i>Furcatum</i>	Otros	Tierra	2	P503, P504
<i>P. pinophilum</i>	<i>Biverticillium</i>	Colección cultivo		2	CECT 2911, CECT 2912
<i>P. puberulum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Cebada	2	P287, P288
		Piensos	Caballo	1	P259
		Otros	Vaca	1	P484
<i>P. purpurogenum</i>	<i>Biverticillium</i>	Cereales	Maíz	2	P324, P337
		Piensos	Caballo	1	P371
			Ave	1	P275
		Otros	Pasas	4	P469, P552, P553, P554
			Uva	2	P301, P306

(sigue)

(Tabla 10, continúa)

Especie	Subgénero	Origen	Nº	Referencia cepa	
<i>P. raistrickii</i>	<i>Furcatum</i>	Cereales	Trigo	1	P419
		Piensos	Caballo	1	P338
		Otros	Maíz	1	P368
			Pienso cerdo	1	P512
<i>P. restrictum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Colección cultivo	4	FRR 1748, IBT 20396, IMI 071626, IMI 151749	
<i>P. roqueforti</i>	<i>Penicillium</i>	Piensos	Caballo	1	P356
		Otros	Alimento Caballo	1	P352
			Cerdo	1	P392
			Colección cultivo	1	NRRL 849
<i>P. roseopurpureum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Otros	Tierra	1	P506
<i>P. rugulosum</i>	<i>Biverticillium</i>	Cereales	Maíz	1	P318
<i>P. sclerotiorum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Otros	Tierra	1	P508
			Uva	1	P530
<i>P. solitum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Maíz	2	P285, P308
		Piensos	Cerdo	2	P447, P448
		Otros	Maíz	1	P283
			Soja	1	P262
			Yogurt	1	P399
			Colección cultivo	1	NRRL 937
<i>P. spinulosum</i>	<i>Aspergilloides</i>	Piensos	Cerdo	1	P488
		Otros	Salsa pimienta	1	P498
<i>P. variabile</i>	<i>Biverticillium</i>	Cereales	Trigo	1	P418
		Otros	Uva	1	P298
<i>P. verrucosum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Cebada	6	P297, P346, P410, P437, P438, P440
			Trigo	1	P293
		Piensos	Caballo	1	P364
		Otros	Guisante forrajero	1	P198
			Maíz	1	P194
			Soja	1	P105
			Colección cultivo	41	BFE 487 – 507, BFE 514, BFE 520 – 522, BFE 524, BFE 526, BFE 527, BFE537, BFE 538, BFE 540, BFE 542, BFE 549, CECT 2320 ^b , FRR 1690, FRR 2940, IBT 12803, IBT 20850, IBT 21550, IBT 21573, IMI 200.310
<i>P. viridicatum</i>	<i>Penicillium</i>	Cereales	Maíz	1	P395
			Cebada	5	P370, P389, P400, P441, P443
			Trigo	1	P421
		Piensos	Caballo	1	P358
			Colección cultivo	2	NRRL 958, NRRL 961

^a Otros: cepas aisladas de otros sustratos o de muestras de cereales o piensos no incluidas en el estudio de la presencia y el recuento de *Penicillium* spp.

^b Cepas en origen: CECT 2264, *P. aurantiogriseum* var. *aurantiogriseum*; CECT 2320, *P. aurantiogriseum* var. *viridicatum*.

4.2.3. Estudio micotoxígeno de *Penicillium* spp.

Las toxinas ensayadas fueron: aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁), aflatoxina G₂ (AFG₂), citrinina (CIT), esterigmatocistina (STE), ocratoxina A (OA), zearalenona (ZEA), ácido penicílico (AP) y penitrem A (PEN A). El estudio de todas estas micotoxinas se realizó mediante TLC y el de la OA también mediante HPLC.

4.2.3.1. Extracción de micotoxinas

De las placas de CYA y YES utilizadas para la identificación y el estudio fisiológico de *Penicillium* spp. se realizó una extracción de micotoxinas. La extracción se realizó de las colonias obtenidas a los 7 días de incubación en estos medios a 25°C mediante un método descrito previamente en nuestro laboratorio (49). Mediante una campana de Durham, utilizada como sacabocados, se realizaron 3 bocados de agar del centro de la colonia, de la periferia y de la zona intermedia, una de cada colonia respectivamente de las tres desarrolladas en la placa de Petri. Los bocados de agar obtenidos se retiraron de la placa con la ayuda de una aguja enmangada y se introdujeron dentro de un vial de vidrio topacio de 4 ml con tapón de rosca y teflón. A cada vial se le añadieron 500 µl de metanol y se dejó reposar durante una hora. El extracto obtenido se filtró a través de un filtro Millex®-HV₁₃ (Millipore, Bedford, EUA) y se recogió en un vial de vidrio topacio idéntico al anterior. El filtrado se mantuvo hasta su posterior análisis a 4°C. Esta extracción de micotoxinas se realizó por triplicado para cada placa de medio de cultivo.

4.2.3.3. Preparación de los patrones de micotoxinas

Los patrones de las diferentes micotoxinas ensayadas fueron suministrados por Sigma (Sigma, Alcobendas, España). Se prepararon soluciones de las toxinas en cloroformo. Las soluciones patrón se conservaron a 4°C en viales de vidrio topacio con tapón de rosca y teflón. Las concentraciones de cada micotoxina en la solución patrón son las que se especifican en la Tabla 11.

Tabla 11. Concentraciones empleadas en las soluciones patrón de cada micotoxina ensayada.

Micotoxina	Concentración de la solución patrón
AFB ₁	3 µg/ml
AFB ₂	0,8 µg/ml
AFG ₁	3 µg/ml
AFG ₂	0,8 µg/ml
CIT	100 µg/ml
STE	20 µg/ml
OA	5 µg/ml
ZEA	40 µg/ml
AP	300 µg/ml
PEN A	100 µg/ml

4.2.3.3. Detección de micotoxinas mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Se determinó la presencia de las citadas micotoxinas mediante TLC en los extractos obtenidos de los medios CYA y YES de cada una de las cepas de *Penicillium* spp. Para ello se utilizaron cromatoplasmas de aluminio (Merck 5553) con silicagel 60 como fase estacionaria y sin indicador de fluorescencia. Se dividieron en carriles de 1 cm de anchura, dejando 0,5 cm libre por cada lado de la placa y un frente de 15 cm en el que se desarrolló la carrera de los extractos.

Para la confirmación de la CIT se utilizaron el mismo tipo de cromatoplasmas pero impregnadas previamente con ácido oxálico al 10% en metanol y desecadas a temperatura ambiente durante una noche (175).

Las placas (a excepción de las impregnadas con ácido oxálico) fueron posteriormente activadas a 110°C durante 30 minutos (175) y mantenidas en un desecador.

La inoculación de las cromatoplasmas se realizó en una línea trazada a 4 cm de la base de la placa. Mediante una microjeringa se depositaron 10 µl de cada extracto en el punto central del carril. Se depositaron, asimismo, en 2 ó 3 carriles de cada placa 5 µl de cada una de las soluciones patrón correspondientes (patrón externo). En el caso de detectar una micotoxina en el extracto de una cepa, se realizaba una comprobación posterior inoculando la muestra por duplicado y superponiendo, en uno de los carriles, el patrón correspondiente (patrón interno).

4.2.3.3.1. Detección de las micotoxinas: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, CIT, STE, OA y ZEA mediante TLC (175)

La cámara de desarrollo para estas micotoxinas se preparó con 190 ml de una solución de tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico al 99%:cloroformo a proporción 70:50:20:50 como fase móvil. Las placas se introdujeron en la cubeta en posición vertical, de una en una, con la línea de inoculación de los extractos en su parte baja y paralela a la base de la cubeta, y se dejaron desarrollar hasta que el frente del disolvente alcanzó la línea trazada a lápiz que indicaba los 15 cm de frente. Una vez desarrolladas las cromatoplasmas, se extrajeron de la cubeta y se dejó evaporar el exceso de solvente de la fase móvil en una campana extractora de gases.

Las cromatoplasmas se observaron bajo luz ultravioleta a 365 y 254 nm. Todas las toxinas, a excepción de la STE, fueron visibles a estas longitudes de onda antes de su revelado. Todas las manchas fluorescentes observadas susceptibles de ser alguna de las micotoxinas buscadas fueron marcadas. El color de cada micotoxina y su frente de resolución (R_f) son los especificados en la Tabla 12. Para confirmar la presencia de las diferentes micotoxinas se realizó el revelado de las mismas. El color que presentaba cada micotoxina después de su revelado se detalla, también, en la Tabla 12.

Para revelar las diferentes aflatoxinas se pulverizó la zona dónde éstas se encontraban con una solución de ácido sulfúrico al 25% en agua destilada. Posteriormente se observó la placa de nuevo bajo luz ultravioleta a 365 y 254 nm.

Tabla 12. Frentes de resolución (R_f) de las micotoxinas ensayadas y aspecto bajo luz UV de 366 y 254 nm antes y después del revelado.

Micotoxina	R_f	Antes del revelado		Después del revelado	
		UV 366nm	UV 254 nm	UV 366nm	UV 254 nm
AFB ₁ /B ₂	0,19/0,14	Azul	– ^a	Amarillo intenso	–
AFG ₁ /G ₂	0,10/0,08	Verde	–	Amarillo intenso	–
CIT ^b	0,37	Amarillo intenso		Amarillo azulado	
STE	0,80	–	–	Amarillo rojizo	Amarillo
OA	0,52	Azul verdoso		Azul intenso	
ZEA	0,78	Azul	Azul-verde	Azul	Azul-verde

^a micotoxina no visible a esa longitud de onda.

^b El R_f de la CIT en las placas impregnadas con ácido oxálico fue de 0,65. La coloración de la CIT en estas placas fue la misma que la descrita en la tabla.

Para el revelado de la OA y de la ZEA, se pulverizaron las zonas correspondientes con una solución de cloruro de aluminio al 20% en etanol y se observó bajo luz ultravioleta.

Para el revelado de la CIT se pulverizó la zona en la que ésta se encuentra con una solución de cloruro de aluminio al 20% en etanol y se calentó la placa a 110°C durante 5 a 10 minutos. Después se observó la placa bajo luz ultravioleta.

Para revelar la STE se procedió como para el revelado de la CIT. Tras calentar la placa, se volvió a pulverizar de nuevo con una solución de cloruro de aluminio al 20% en etanol y se observó bajo luz ultravioleta.

El límite de detección de la técnica de cromatografía en capa fina para las diferentes micotoxinas fue de 0,0003 µg para las diferentes aflatoxinas, de 0,002 µg para la CIT (0,0007 µg en las placas previamente impregnadas con ácido oxálico), de 0,005 µg para la STE, de 0,0016 µg para la OA y de 0,02 µg para ZEA.

4.2.3.3.2. Detección de las micotoxinas: AP y PEN A mediante TLC (175)

Se determinó la presencia de AP y PEN A mediante TLC en los extractos obtenidos de los medios CYA y YES de cada una de las cepas de *Penicillium* spp.

La cámara de desarrollo se preparó con 202 ml de una solución de acetato de etilo: cloroformo:ácido fórmico al 99% a proporción 120:80:2 como fase móvil. El desarrollo de la placa se llevó a cabo como en el apartado anterior. Una vez desarrollada la cromatoplaca, se extrajo de la cubeta y se dejó evaporar el exceso de solvente de la fase móvil en una campana extractora de gases.

Ninguna de estas dos micotoxinas es visible antes de su revelado. El R_f del AP es de 0,45 y el del PEN A de 0,83. Para el revelado del AP se pulverizó la zona correspondiente a su R_f con una solución ácida de p-anisaldehído (8,5 ml de metanol, 1 ml de ácido acético, 0,5 ml de ácido sulfúrico y 0,05 ml de p-anisaldehído) preparado en el momento de su utilización. Se calentó la placa a 130°C durante 10 minutos y posteriormente se pulverizó la misma zona con agua. El AP se observa en este paso de

color verde esmeralda observada bajo luz visible y de color azul celeste bajo luz ultravioleta de 366 nm.

El revelado del PEN A se realizó pulverizando una solución de ácido sulfúrico al 50% en etanol. Se observó la toxina, tras calentar la placa a 100°C durante 5 minutos, a la luz visible como una mancha de color azul-violeta oscuro. Bajo luz ultravioleta (de 366 y 254 nm) esta mancha presentó coloración gris-negra.

El límite de detección de la técnica de TLC empleada fue de 0,05 µg para el AP y de 0,1 µg para el PEN A.

4.2.3.4. Detección y cuantificación de OA mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se realizó la detección y cuantificación de OA mediante HPLC en los extractos obtenidos de cada cepa en CYA y en YES. Empleamos un cromatógrafo tipo Konik 500 B-G (Konik, Barcelona) equipado con un detector de fluorescencia Konik Linear LC304 (excitación: 330 nm; emisión: 460 nm) y una columna C₁₈ Spherisob S5 ODS2, de 250 x 4,6 mm, y de 5 µm de tamaño de partícula.

Se inyectaron 20 µl de cada extracto. La fase móvil, con flujo de 1 ml/minuto, consistía en el siguiente gradiente lineal: acetonitrilo, 57 %; agua, 41 % y ácido acético, 2 % (32). Los extractos que presentaban un tiempo de retención idéntico al del patrón de la OA (alrededor de 6,4 minutos), se consideraron positivos. La confirmación de los extractos, en caso de duda, se realizó mediante derivatizaciones de la OA en su metil-éster tras tratamiento con trifluoroboro al 14 % en metanol (207). La OA se cuantificó por comparación con la respuesta fluorimétrica producida por la solución valorada de patrón.

El límite de detección de la técnica de HPLC para la OA fue de 0,02 ng. El límite de cuantificación mediante la técnica de extracción (apartado 4.2.3.1.) y la detección con HPLC fue de 0,01 µg/g para esta toxina.

4.3. ESTUDIO MOLECULAR DE *P. verrucosum*

4.3.1. Cepas estudiadas

Se realizó el estudio molecular de las siguientes cepas de *P. verrucosum*: P293, P297, P346, P364, P410, P437, P438 y P440, aisladas e identificadas en el presente trabajo; BFE 487, BFE 488, BFE 496, BFE 500, y BFE 506, cepas utilizadas en los modelos de producción de OA y CIT; IMI 200.310, cepa tipo de la especie e IBT 12803, identificada como *P. nordicum* en el estudio de Larsen y colaboradores (244).

Se realizó, asimismo, el estudio de secuenciación del fragmento ITS 1-5.8S-ITS 2 del rDNA de otras especies pertenecientes al subgénero *Penicillium*. Las cepas estudiadas fueron: *P. viridicatum* NRRL 958 y NRRL 961, *P. solitum* NRRL 937 y *P. glandicola* NRRL 2036. También se secuenció una cepa de *P. glabrum*, NRRL 766, perteneciente al subgénero *Aspergilloides*, que fue utilizada como control externo para el estudio.

El análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) fue también realizado a partir de las cepas de *P. verrucosum*: P105, P194, P198, aisladas e identificadas en nuestro laboratorio, y de las cepas de colección BFE 514, BFE 520-522, BFE 524, BFE 526-527, BFE 537-538, BFE 540, BFE 542, BFE 549 y CECT 2320.

4.3.2. Extracción del DNA fúngico

Las extracciones de DNA se hicieron siguiendo el método realizado por Accensi y colaboradores (16). A partir de un cultivo de 7 días en MEA, las cepas fueron inoculadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían 500 µl de caldo Sabouraud con un 1 mg/l de cloranfenicol (apartado 4.5.1.) y se incubaron en un agitador orbital (Modelo 4581) (Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA) durante un periodo comprendido entre 36 y 48 horas a una temperatura de 25°C y una velocidad de 300 rpm. Tras la incubación, se centrifugó a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante mediante una micropipeta y el micelio obtenido se lavó (volviendo a agitar y eliminar sobrenadante en las mismas condiciones) con 500 µl de suero fisiológico (SF) (apartado 4.5.2.). Posteriormente, este micelio se congeló con

nitrógeno líquido y se homogeneizó hasta obtener un polvo fino con una punta de micropipeta de 1 ml previamente deformada al calor. Se añadieron 500 µl de tampón de extracción (apartado 4.5.3.) al micelio y se mantuvo durante una hora en un baño a 65°C. Posteriormente se le añadieron 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (49,5:49,5:1 vol/vol/vol) (Fluka) y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un Eppendorf junto con 0,20 volúmenes de acetato sódico 3M y 0,23 de NaCl 1M. A continuación se agitó suavemente por inversión y se dejó reposar en hielo durante una media hora. Después de centrifugar a 12000 rpm y 4°C durante 10 minutos, se recogieron 500 µl del sobrenadante y se traspasaron a otro tubo Eppendorf de 1 ml, junto con 0,54 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA extraído. Este tubo se agitó suavemente por inversión y se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 10 minutos. Tras el centrifugado se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Tras agitarlo por inversión, se centrifugó a 10000 rpm y 4°C durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío en un Speed Vac DNA 120 (Savant, Nueva York, EUA), a unos 50°C. A continuación se le añadieron 20 µl de tampón TE (apartado 4.5.3.) y se resuspendió mediante micropipeta. La comprobación de la extracción se realizó en un gel de agarosa (Molecular biology certified agarose, Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona) (apartado 4.5.1.) al 0,8%. La electroforesis del gel se desarrolló en tampón TBE 1x (apartado 4.5.3.) en una cubeta de electroforesis submarina a un voltaje constante de 90 V (397). El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (apartado 4.5.3.) durante 20 minutos y el exceso de bromuro de etidio fue eliminado sumergiendo el gel en agua 20 minutos más. Una vez teñido, el gel se fotografió bajo luz UV mediante el sistema de análisis de imágenes GelDoc 2000 y el programa 'Quantity One' versión 4.1.1 (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona).

4.3.3. Amplificación mediante PCR del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2

La región 5,8S del DNA ribosomal y los fragmentos ITS 1 y 2 se amplificaron según el método descrito por Gené y colaboradores (174). Los cebadores usados para la reacción fueron el ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') y el ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), descritos por White y colaboradores (511). En

tubos MicroAmp (Perkin Elmer) de 0,2 ml se dispensaron los siguientes reactivos para conseguir una concentración final de: 10 mM de tampón 10x (BioTherm); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 μM de cada cebador ITS4 y ITS5; 200 μM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP); 2,5 U de DNA polimerasa (BioTherm) y entre 0,1 y 10 ng del DNA a amplificar. La reacción se llevó a cabo en un termociclador 'Perkin Elmer GeneAmp 2400' (Perkin Elmer Cetus Corporation, Emeryville, EUA). En cada reacción de amplificación se dispusieron tubos control en los que no se añadió DNA y el volumen final fue ajustado con agua desionizada estéril. El programa de amplificación constó de un paso de pre-desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, alineamiento durante un minuto a 50°C y extensión durante un minuto a 72°C. Para finalizar el proceso se realizó una extensión final a 72°C, durante 7 minutos. La comprobación de la reacción de PCR se realizó en un gel de agarosa al 2%. La electroforesis del gel se desarrolló en tampón TBE 1x (apartado 4.5.3.) en una cubeta de electroforesis submarina a un voltaje de 60 V (397). Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con el '100bp molecular ruler' (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona). La tinción del gel y su observación se efectuaron como en el apartado 4.3.2.

4.3.4. Secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2

Para realizar la reacción de secuenciación se aisló la banda de interés, obtenida de la amplificación descrita en el apartado 4.3.3., mediante un sistema de purificación de productos de PCR ('GFX PCR DNA and gel band purification kit', Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), según las instrucciones del fabricante. La reacción de secuenciación se llevó a cabo mediante el sistema comercial de secuenciación 'ABI Prism Big Dye Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit' (Applied Biosystems, Gouda, Holanda). Se obtuvo la secuencia de ambas cadenas con los mismos cebadores utilizados en la fase de amplificación, ITS4 y ITS5. El producto de la reacción fue precipitado con una solución de acetato sódico en etanol y resuspendido en la solución TSR (Template Suppression Reagent), según las recomendaciones del fabricante del kit comercial. Se utilizó el secuenciador de Applied Biosystems 'ABI Prism 310 Genetic Analyzer', y las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa 'Clustal X' versión 1.81 (476). Una vez alineadas, éstas se

analizaron mediante el método de Neighbor-Joining (395) del programa 'Mega' versión 2.1 (235).

4.3.5. Análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)

Se realizó un estudio mediante RAPD de las cepas de *P. verrucosum* descritas en el apartado 4.3.1. según el protocolo descrito por Castellá y colaboradores (79). En tubos MicroAmp (Perkin Elmer) de 0,2 ml se dispensaron los siguientes reactivos para conseguir una concentración final de: 10 mM de tampón 10x (BioTherm); 3 mM de MgCl₂; 280 µM de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP y dGTP); 0,55 µM del cebador ari1 (5'TGCTTGGCACAGTTGGCTTC3'); 1 U de DNA polimerasa (BioTherm) y entre 0,1 y 10 ng del DNA a amplificar. La reacción se llevó a cabo en un termociclador 'Perkin Elmer GeneAmp 2400' (Perkin Elmer Cetus Corporation, Emeryville, EUA). En cada reacción de amplificación se dispusieron tubos control en los que no se añadió DNA y el volumen final fue ajustado con agua desionizada estéril. El programa de amplificación constó de un paso de pre-desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 44 ciclos de desnaturalización de un minuto a 95°C, alineamiento durante un minuto a 36°C y extensión durante 4 minutos a 72°C. Para finalizar el proceso se realizó una extensión final a 72°C, durante 7 minutos. Los productos de la amplificación fueron separados en un gel de agarosa al 2%. La electroforesis del gel se desarrolló en tampón TBE 1x en una cubeta de electroforesis submarina a un voltaje de 45 V (397). Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con el '100bp molecular ruler' (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona). La tinción del gel y su observación se efectuaron como en el apartado 4.3.2. Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados mediante el método UPGMA (332) del programa 'Diversity Database' versión 2.2.0 (Bio-Rad Laboratories S.A., Barcelona).

4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE OA Y CIT EN CEPAS DE *P. verrucosum*

Se llevaron a cabo cuatro modelos distintos modificando un factor abiótico en cada uno de ellos. Los factores estudiadas fueron la fuente de carbono, la actividad de agua (a_w), el pH y la temperatura de incubación.

Las cepas ensayadas, la técnica de siembra y las determinaciones efectuadas han sido comunes en los cuatro modelos. En primer lugar se exponen las técnicas comunes empleadas en los cuatro estudios y a continuación las técnicas específicas empleadas en cada uno de ellos.

4.4.1. Técnicas comunes empleadas en los cuatro estudios

4.4.1.1. Cepas ensayadas

A partir de los resultados obtenidos en el estudio micotoxígeno de *Penicillium* spp. (apartado 5.2.2.), se escogieron 5 cepas de *Penicillium verrucosum* con diferente capacidad de producción de las micotoxinas OA y CIT (Tabla 13). Estas cepas proceden de la colección de cultivos del BFE ('Bundesforschungsanstalt für Ernährung', del 'Institut für Hygiene und Toxikologie', Karlsruhe, Alemania).

Tabla 13. Origen y producción de OA y CIT de las cepas utilizadas en el estudio.

Cepa	Origen ^a	OA ^b	CIT ^b
BFE 487	Lentejas, Suecia	++	-
BFE 496	Judías, Suecia	+	+
BFE 500	Cereal, Suecia	(+)	-
BFE 488	Cebada, Suecia	-	+
BFE 506	Cereal, Suecia	-	-

^a Origen, tipo de muestra y país de origen de la cepa.

^b Producción de toxinas: ++, cepa con elevada capacidad productora; +, cepa con capacidad productora media; (+), cepa con baja capacidad productora; -, cepa no productora.

4.4.1.2. Técnica de siembra

A partir de un cultivo de 7 días de incubación a 28°C en tubo MEA, se realizó una suspensión de conidios en 3 ml de SFW (apartado 4.5.1.). De esta suspensión y mediante una asa de nicrom doblada, se realizaron siembras en tres puntos en placas de Petri conteniendo 30 ml del medio de cultivo. Cada cepa se sembró por duplicado. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a una temperatura de 25°C para los modelos de fuente de carbono, actividad de agua (a_w) y pH.

4.4.1.3. Características morfológicas

Se realizó un estudio morfológico macroscópico de las colonias obtenidas en cada una de las dos réplicas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Las características morfológicas macroscópicas valoradas fueron:

- Diámetro de las colonias.
- Coloración del anverso y del reverso.
- Textura de la colonia.
- Presencia de surcos.
- Presencia de gotas de exudado.
- Presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo.

4.4.1.4. Extracción, detección y cuantificación de micotoxinas (OA y CIT)

4.4.1.4.1. Extracción de micotoxinas (OA y CIT)

Se realizó una extracción de micotoxinas de las colonias obtenidas en cada una de las dos réplicas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación. La extracción de OA y de CIT se realizó siguiendo un método descrito previamente en nuestro laboratorio (49), detallado en el apartado 4.2.3.1. Se realizó una extracción de cada réplica efectuada.

4.4.1.4.2. Preparación de los patrones de OA y de CIT

Los patrones de OA y de CIT fueron suministrados por Sigma (Sigma, Alcobendas, España). Se prepararon soluciones de las toxinas en cloroformo de concentración 5 µg/ml y 100 µg/ml, respectivamente. Las soluciones patrón se conservaron a 4°C en viales de vidrio topacio con tapón de rosca y teflón.

4.4.1.4.3. Detección de OA y de CIT mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Se determinó la presencia de OA y de CIT en cada uno de los extractos obtenidos mediante TLC. Para ello se procedió como en los apartados 4.2.3.3. y 4.2.3.3.1., inoculando únicamente las soluciones patrón de OA y CIT.

4.4.1.4.4. Detección y cuantificación de OA mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para realizar la detección y cuantificación de la OA mediante HPLC procedimos como se detalla en el apartado 4.2.3.4.

4.4.2. Técnicas específicas empleadas en los cuatro estudios

4.4.2.1. Estudio del efecto de la fuente de carbono

Se ensayaron 7 medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono y un medio control. El medio de cultivo utilizado como control para los modelos de producción de OA y de CIT fue el CYA (apartado 4.5.1.). El resto de medios de cultivo se prepararon añadiendo al medio base 30 g de una de las diferentes fuentes de carbono probadas. El medio base consistía en: extracto de levadura (Difco), 5 g; NaNO₃ (Panreac), 3 g; K₂HPO₄ (Panreac), 1 g; KCl (Panreac), 0,5 g; MgSO₄ (Scharlau), 0,5g; FeSO₄ (Probus), 0,01 g; ZnSO₄·7H₂O (Panreac), 0,01 g; CuSO₄·5H₂O (Scharlau), 0,005 g; agar (Biolife), 20 g; agua, 1000 ml. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: sacarosa, fructosa, glucosa y almidón de patata, maíz, arroz y trigo, obtenidas todas ellas de Sigma (Sigma, Alcobendas).

4.4.2.2. Estudio del efecto de la actividad de agua (a_w)

Se ensayaron diferentes valores de actividad de agua (a_w) mediante la adición de glicerol en el medio de cultivo CYA (apartado 4.5.1.). Estos valores de a_w fueron: 0,88; 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98 y 0,99. Las cantidades de agua y glicerol añadidas por litro de medio de cultivo para cada valor de a_w son las que se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Cantidades de agua (ml) y glicerol (g) empleadas por litro de medio de cultivo para elaborar los medios de cultivo con distinta a_w ensayados.

a_w	0,88	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99
Glicerol	339,1	302,25	253,4	197,33	132,28	55,91	0
Agua	660,9	697,75	746,6	802,67	867,73	944,09	1000

La determinación de la a_w del medio de cultivo se realizó mediante el higrómetro eléctrico Novasina TH 200 (Novasina, Pfäffikon, Suiza). Paralelamente, se determinó el valor de la a_w al inicio y al final del estudio (tras 28 días a 25°C) en placas control de medio de cultivo sin inocular la cepa fúngica.

4.4.2.3. Estudio del efecto del pH

Se han ensayado diferentes valores de pH en el medio de cultivo CYA. El pH se ajustó antes de esterilizar el medio de cultivo mediante la adición de HCl (1N y 10N) y NaOH (1N), según fuera necesario. Los valores de pH ensayados han sido: 2; 3; 4; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 8; 9 y 10. La determinación del pH se realizó mediante el pH-metro GLP 21 (Crison, Carpi, Italia). Los medios de cultivo con pH final inferior a 5 se prepararon separando sus componentes en dos matraces para evitar la hidrólisis ácida del agar (184, 188). De esta manera, el agar, junto con el extracto de levadura y el 30% del agua del medio, se preparaba por separado y se ajustaba el pH de la mezcla a 5. El pH del resto de los componentes con el agua restante se ajustaba proporcionalmente para conseguir el pH final deseado.

4.4.2.4. Estudio del efecto de la temperatura de incubación

Se ha valorado el efecto de las diferentes temperaturas de incubación sobre la morfología y la producción de OA y de CIT. Las placas de medio de cultivo CYA fueron incubadas a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C.

4.5. MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES, COLORANTES Y REACTIVOS

4.5.1. Medios de cultivo

Agar extracto de malta al 2% (MEA) (360)

Extracto de malta	20 g
Glucosa	20 g
Peptona	1 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El pH final del medio es de 5,6.

Agar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (360)

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
KH_2PO_4	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
Dicloran	0,002 g
Rosa de bengala	0,025 g
Cloranfenicol	0,1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El pH final del medio oscila entre 5,5 y 5,8.

Agar Czapek extracto de levadura (CYA) (360)

‘Czapek-Dox Broth‘ (DIFCO)	35 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El pH final del medio es de 6,7.

El ‘Czapek-Dox Broth‘ (DIFCO) contiene:

Sacarosa	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g

Agar extracto de levadura sacarosa (YES) (138)

Sacarosa	150 g
Extracto de levadura (DIFCO)	20 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El pH final del medio es de 6,5.

Agar creatina sacarosa (CREA) (145)

Creatina	1 g
Sacarosa	30 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,3 g
Púrpura de bromocresol	0,05 g
Solución mineral	10 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

El pH final del medio se ajusta a $8,0 \pm 0,2$ y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Agar creatina sacarosa neutro (CSN) (355)

Creatina	5 g
Sacarosa	10 g
KH ₂ PO ₄ ·3H ₂ O	1,0 g
Púrpura de bromocresol	0,05 g
Concentrado de creatina sacarosa	10 ml
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

El pH final se ajusta a 5,5-6,8 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

La utilización de la creatina como fuente de nitrógeno en estos dos medios (CREA y CSN) por el hongo produce una alcalinización del medio. El indicador de pH púrpura de bromocresol se torna violeta en estos casos. Si la cepa no utiliza creatina como fuente de carbono, puede presentar un viraje a ácido (el medio se torna amarillo) por la utilización de la sacarosa.

Agar nitrato 25% glicerol (G25N) (350)

Solución Czapek concentrada	7,5 ml
Extracto de levadura (DIFCO)	3,7 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,75 g
Glicerol	250 g
Agar	12 g
Agua destilada	750 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El pH final del medio es de 7,0 (360).

Agar nitrito sacarosa (NSA) (142)

NaNO ₂	3 g
Sacarosa	30 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	1,3 g
Solución mineral	10 ml
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Medio de Raulin-Thom (RT) (386)

Carbonato magnésico 0,40 g

Ácido tartárico 0,71 g

Se calienta el carbonato magnésico junto con el ácido tartárico en 100 ml de agua para que se forme tartrato magnésico.

Sacarosa 46,6 g

NH_4NO_3 2,66 g

$(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,4 g

K_2CO_3 0,4 g

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,16 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g

Solución de tartrato magnésico 67 ml

Agar 20 g

Agua destilada 1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Según Frisvad (150), las especies del complejo *P. aurantiogriseum* (según Lund y Frisvad (274)) a excepción de *P. melanoconidium* y *P. tricolor* presentan en el medio RT un halo difusible de color marrón oscuro, mientras ninguna otra especie del subgénero *Penicillium* lo presentaría.

Medio líquido de Urea (53)

Sacarosa	10 g
KH_2PO_4	1 g
KCl	0,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Púrpura de bromocresol	0,05 g
Agua destilada	1000 ml

El pH final del medio se ajusta a 4,5 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Tras el autoclavado se añaden 2 g/l de urea (300 µl/tubo de 3 ml de solución al 2% esterilizada previamente por filtración).

La utilización de la urea como fuente de nitrógeno por el hongo produce una alcalinización del medio. El indicador de pH púrpura de bromocresol se torna violeta en estos casos. Si la cepa no utiliza urea como fuente de carbono, puede presentarse un viraje a ácido (el medio se torna amarillo) por la utilización de la sacarosa del medio.

Solución Czapek concentrada (350)

NaNO_3	30 g
KCl	5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Agua destilada	100 ml

Solución mineral (142)

KCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
Agua destilada	100 ml

Concentrado de creatina sacarosa (355)

KCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,05 g
Agua destilada	100 ml

Caldo Sabouraud-cloranfenicol (127)

Glucosa	20 g
Peptona	10 g
Cloranfenicol	0,001 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El pH final del medio es de 6,8.

Gel de agarosa (397)

Se mezclan la agarosa y el TBE 1x según la concentración de agarosa necesaria y se calienta hasta ebullición.

4.5.2. Diluyentes

Suero fisiológico (SF) (402)

NaCl	9 g
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Suero fisiológico con Tween 80 al 0,05% (SFW) (402)

NaCl	9 g
Tween 80	0,5 ml
Agua destilada	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

4.5.3. Colorantes y reactivos

Lactofenol de Amman (254)

Fenol	100 g
Ácido láctico	100 ml
Glicerol	200 ml
Agua destilada	100 ml

Se mezcla el ácido láctico y la glicerina con el agua destilada. Se añaden los cristales de fenol, calentando suavemente el agua hasta la completa disolución.

Lactofenol-azul algodón (254)

A la solución de lactofenol de Amman, se añaden dos mililitros de una solución de azul de algodón al 1% y se mezcla cuidadosamente.

Prueba del indol (270)

Mediante una campana de Durham flameada, utilizada como sacabocados, se realiza un bocado de agar del centro de la colonia. Se retira el bocado de agar obtenido con la ayuda de una aguja enmangada y se deposita sobre un portaobjetos. Sobre la parte superior del bocado de agar, en contacto con el micelio, se deposita un trozo rectangular (6x12 mm, aproximadamente) de papel de filtro previamente impregnado con el reactivo de Ehrlich. La presencia del enzima triptofanasa y la formación, como consecuencia, de metabolitos de indol (tales como ácido ciclopiazónico o quetoglobosina C) se revela por el viraje del reactivo a un color rosado o violeta durante los diez minutos siguientes a la aplicación del papel con el reactivo.

Reactivo de Ehrlich (270)

Dietilaminobenzaldehido	2 g
Etanol 96%	85 ml
HCl 37%	15 ml

Se disuelve el aldehído en el alcohol y se añade posteriormente el ácido lentamente. Se conserva a 4°C (360).

Tampón de extracción (127)

Tris-HCl 1M	7,5 ml
EDTA 0,5M	15 ml
SDS 10%	45 ml
2-mercaptoetanol 1%	1,5 ml

Se añade agua destilada hasta enrasar a 150 ml en un matraz aforado. Se ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. El mercaptoetanol se añade después de autoclavar la solución.

Tampón Tris borato, solución concentrada (TBE 5X) (397)

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA 0,5M	20 ml

Se disuelve en 700 ml de agua destilada y se enrasa a 1000 ml en un matraz aforado. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Tampón Tris borato, solución de trabajo (TBE 1X) (397)

Se realiza una dilución 1:5 de TBE 5X en agua destilada.

Tampón TE (397)

Tris-HCl 1M	1 ml
EDTA 0,5M	0,2 ml
Agua destilada	98,8 ml

Se ajusta el pH a 8,0. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Solución de bromuro de etidio

Bromuro de etidio (Fluka)	45 µl
Agua destilada	300 ml

4.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO. GRÁFICAS

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows. Los procedimientos empleados se indican a continuación:

-Análisis de la varianza con los datos que presentan homogeneidad de varianzas, realizando a continuación un contraste con el método Student-Newman-Keuls para determinar los grupos que presentaban diferencias significativas.

-Prueba de t-Student.

Las gráficas se han realizado mediante el el paquete estadístico SPSS versión 10.0 para Windows y el programa Microsoft Excel 2000.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y EL RECuento DE *Penicillium* spp. EN MUESTRAS DE PIENSO Y MATERIAS PRIMAS

La Tabla 15 muestra los valores medios e intervalos de los recuentos totales y parcial de *Penicillium* spp., así como la frecuencia de aislamiento de *Penicillium* spp. para cada tipo de alimento en el total de las 178 muestras analizadas. Al realizar la prueba de t-Student, no se observaron diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados, MEA y DRBC, respecto a los valores de recuento total obtenidos ($p=0,982$) ni a los de recuento parcial de *Penicillium* spp. ($p=0,484$). Se decidió utilizar el medio MEA para realizar los recuentos parciales de las *Penicillium* spp., ya que las colonias desarrolladas en DRBC pueden presentar alteradas sus características morfológicas, dificultando su identificación. Estas cepas de *Penicillium* spp. desarrolladas en DRBC fueron asimismo identificadas hasta nivel de especie.

Los recuentos totales obtenidos en MEA para las muestras de cereales no presentaron diferencias significativas respecto a los obtenidos para las muestras de pienso ($p=0,492$). El recuento fúngico total obtenido para las muestras de maíz resultó significativamente superior al obtenido para las muestras de trigo y cebada ($p=0,010$), mientras que no se obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos totales de los distintos tipos de piensos ($p=0,502$).

Los recuentos parciales de *Penicillium* spp. en MEA no presentaron diferencias significativas entre las muestras de cereales y de piensos analizadas ($p=0,302$). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre los recuentos parciales de *Penicillium* spp. entre los distintos tipos de cereales ($p=0,642$) ni de piensos ($p=0,529$) analizados.

De las 178 muestras analizadas, se obtuvieron aislamientos de *Penicillium* spp. en 95 de ellas. Este resultado supone una presencia de *Penicillium* spp. en el 53,4% de las muestras analizadas.

Las Tablas 16 y 17 muestran el recuento fúngico total, el recuento parcial de *Penicillium* spp. y el recuento de las diferentes especies aisladas obtenidos en el medio MEA de cada una de las muestras de cereales y piensos, respectivamente, que presentaron *Penicillium* spp. en su micobiota. También se detallan, en su caso, las *Penicillium* spp. desarrolladas en DRBC y en las diluciones distintas a la empleada para realizar el recuento.

La Tabla 18 resume la presencia y la frecuencia de aparición de las *Penicillium* spp. aisladas en las muestras de cereales y de piensos analizados, así como en el total de las muestras. Se han aislado e identificado un total de 34 especies de *Penicillium*, 15 de las cuáles pertenecen al subgénero *Penicillium* según Pitt (Pitt, 79). El aislamiento de *P. chrysogenum* fue significativamente superior en muestras de piensos ($p=0,028$), mientras que el de las especies *P. verrucosum* y *P. viridicatum* lo fue en muestras de cereales ($p=0,033$ en ambos casos). *Penicillium verrucosum* se aisló con una frecuencia significativamente superior ($p=0,000$) en muestras de cebada que en el resto de sustratos analizados.

La Tabla 19 resume los recuentos parciales medios de las *Penicillium* spp. aisladas respecto al recuento medio total de *Penicillium* spp. obtenidos en las muestras de cereales y piensos analizadas.

La Gráfica 1 muestra, en forma de porcentaje, la frecuencia de aparición y los recuentos parciales respecto al recuento medio total de *Penicillium* spp. de las 34 especies aisladas en las muestras de cereales y piensos analizadas.

En la Tabla 20 se resumen los recuentos obtenidos por tipo de alimento en las 95 muestras que presentaron *Penicillium* spp. Se detalla el rango y la media del recuento total, del recuento parcial de *Penicillium* spp. y de las especies de mayor frecuencia de aparición. El recuento parcial del género también se expresa como porcentaje del recuento total que corresponde a *Penicillium* spp. en estas muestras. Este porcentaje fue superior para las muestras de cereales (7,2%) que para las de piensos (1,2%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,207$).

Tabla 15. Valores medios e intervalos de los recuentos totales y de *Penicillium* spp. expresados en UFC/g x 10⁻² y frecuencia de aislamiento de *Penicillium* spp. en las muestras analizadas.

Muestra	Nº	Micobiota total				Frecuencia de aislamiento (%)	<i>Penicillium</i> spp.			
		Rango MEA	RT ^a MEA	Rango DRBC	RT ^a DRBC		Rango MEA	RP ^b MEA ^c	Rango DRBC	RP ^b DRBC ^c
Maíz	44	4,0 – 7660,0	1153,4	1,3 – 7500,0	1190,4	56,8	<0,3 – 873,3	24,0 (2,1)	<0,3 – 1066,7	26,0 (2,2)
Cebada	29	9,0 – 2430,0	305,1	5,0 – 3400,0	352,6	62,1	<0,3 – 127,0	8,9 (2,9)	<0,3 – 80,0	6,1 (1,7)
Trigo	17	2,0 – 96,0	35,1	3,0 – 108,7	39,4	58,8	<0,3 – 11,7	1,4 (4,0)	<0,3 – 3,0	0,5 (1,3)
Cereales	90	2,0 – 7660,0	668,8	1,3 – 7500,0	703,0	58,9	<0,3 – 873,3	14,9 (2,2)	<0,3 – 1066,7	14,8 (2,1)
Cerdo	58	0,7 – 30300,0	852,1	<0,3 – 25460,0	755,3	53,4	<0,3 – 100,0	3,1 (0,4)	<0,3 – 107,7	2,9 (0,4)
Caballo	15	2,0 – 14100,0	2040,8	2,0 – 14900,0	2203,8	46,7	<0,3 – 44,7	5,1 (0,2)	<0,3 – 16,0	1,2 (0,1)
Aves	15	<0,3 – 2800,0	419,6	<0,3 – 3000,0	416,1	26,7	<0,3 – 110,0	8,7 (2,1)	<0,3 – 36,7	2,6 (0,6)
Piensos	88	<0,3 – 30300,0	981,0	<0,3 – 25460,0	944,4	47,7	<0,3 – 110,0	4,4 (0,4)	<0,3 – 107,7	2,6 (0,3)
Total	178	<0,3 – 30300,0	823,2	<0,3 – 25460,0	822,4	53,4	<0,3 – 873,3	9,7 (1,2)	<0,3 – 1066,7	8,7 (1,1)

^a RT, valor medio del recuento total.

^b RP, valor medio del recuento parcial.

^c Se refleja entre paréntesis el recuento parcial medio de *Penicillium* spp. respecto al recuento total medio, expresado en porcentaje.

Tabla 16. Recuento total (RT) y recuento parcial (RP) de *Penicillium* spp. (expresados en UFC/g x 10⁻²) de las muestras de cereales analizadas que contienen *Penicillium* spp.

Ref. ^a	Tipo cereal	RT	RP <i>Penicillium</i> spp.	RP especies	Otras especies ^b
80	Maíz	72,0	42,0	42,0 <i>P. citrinum</i>	
81	Maíz	16,7	4,3	4,3 <i>P. minioluteum</i>	<i>P. canescens</i>
82	Maíz	5,7	0		<i>P. crustosum</i>
85	Maíz	7433,3	66,7	66,7 <i>P. aurantiogriseum</i>	
87	Maíz	86,0	0		<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. minioluteum</i>
88	Maíz	17,0	0,7	0,7 <i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. oxalicum</i>
89	Maíz	64,7	0,3	0,3 <i>P. oxalicum</i>	<i>P. citrinum</i> , <i>P. solitum</i>
90	Maíz	39,7	1,0	1,0 <i>P. janthinellum</i>	
91	Cebada	41,7	0,7	0,7 <i>P. puberulum</i>	
93	Cebada	30,7	0,7	0,4 <i>P. capsulatum</i> , 0,3 <i>P. puberulum</i>	
98	Trigo	10,0	2,0	1,0 <i>P. brevicompactum</i> , 0,7 <i>P. verrucosum</i> , 0,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
99	Maíz	24,3	0		<i>P. griseofulvum</i> , <i>P. oxalicum</i>
100	Cebada	156,7	63,3	33,3 <i>P. verrucosum</i> , 30,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	
102	Maíz	98,0	1,0	0,7 <i>P. solitum</i> , 0,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. oxalicum</i> , <i>P. purpurogenum</i>
104	Maíz	823,3	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
105	Maíz	55,0	4,3	2,7 <i>P. aurantiogriseum</i> , 1,6 <i>P. minioluteum</i>	
106	Maíz	48,0	3,9	3,6 <i>P. aurantiogriseum</i> , 0,3 <i>P. oxalicum</i>	
107	Maíz	22,3	5,9	5,6 <i>P. aurantiogriseum</i> , 0,3 <i>P. rugulosum</i>	<i>P. crustosum</i> , <i>P. oxalicum</i>
108	Maíz	72,3	6,6	4,3 <i>P. purpurogenum</i> , 2,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
109	Maíz	115,3	3,4	1,9 <i>P. aurantiogriseum</i> , 1,5 <i>P. crustosum</i>	
110	Maíz	68,3	3,3	3,0 <i>P. citrinum</i> , 0,3 <i>P. crustosum</i>	<i>P. minioluteum</i>
111	Trigo	31,0	11,7	6,0 <i>P. aurantiogriseum</i> , 5,4 <i>P. expansum</i> , 0,3 <i>P. minioluteum</i>	
112	Cebada	129,0	127,0	126,4 <i>P. aurantiogriseum</i> , 0,6 <i>P. verrucosum</i>	
113	Trigo	96,0	4,0	2,3 <i>P. brevicompactum</i> , 1,7 <i>P. aurantiogriseum</i>	
114	Maíz	11,7	0,3	0,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
118	Maíz	40,0	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
126	Maíz	356,7	6,7	6,7 <i>P. funiculosum</i>	

(sigue)

(Tabla 16, continúa)

Ref. ^a	Tipo cereal	RT	RP <i>Penicillium</i> spp.	RP especies	Otras especies ^b
129	Cebada	34,0	1,3	1,3 <i>P. viridicatum</i>	
131	Cebada	49,0	1,0	1,0 <i>P. viridicatum</i>	
133	Maíz	1200,0	873,4	873,4 <i>P. crustosum</i>	
139	Maíz	12,0	0,3	0,3 <i>P. viridicatum</i>	
142	Cebada	206,7	3,3	3,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
146	Cebada	85,0	0		<i>P. viridicatum</i>
147	Cebada	86,3	3,0	3,0 <i>P. griseofulvum</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>
149	Cebada	840,0	3,0	3,0 <i>P. verrucosum</i>	<i>P. aurantiogriseum, P. griseofulvum</i>
150	Cebada	500,0	3,0	3,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	
152	Cebada	110,7	3,0	3,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. hirsutum</i>
153	Cebada	115,3	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
154	Trigo	33,3	0		<i>P. variable</i>
155	Trigo	95,3	0,3	0,3 <i>P. raistrickii</i>	
156	Trigo	17,0	0		<i>P. aurantiogriseum, P. viridicatum</i>
157	Trigo	82,0	0,3	0,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
158	Trigo	53,3	5,0	4,7 <i>P. aurantiogriseum</i> , 0,3 <i>P. brevicompactum</i>	
160	Trigo	53,3	0		<i>P. aurantiogriseum, P. decumbens</i>
161	Trigo	23,0	0		<i>P. hirsutum</i>
168	Cebada	40,0	0		<i>P. viridicatum</i>
171	Cebada	14,0	0,3	0,3 <i>P. hirsutum</i>	<i>P. verrucosum</i>
172	Cebada	10,7	1,3	1,3 <i>P. verrucosum</i>	<i>P. expansum</i>
173	Cebada	1856,7	46,7	46,7 <i>P. chrysogenum</i>	
175	Cebada	19,7	0,7	0,7 <i>P. verrucosum</i>	<i>P. viridicatum</i>
177	Maíz	18,7	0		<i>P. griseofulvum</i>
178	Maíz	36,0	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
195	Maíz	2933,3	33,3	33,3 <i>P. crustosum</i>	

^a Ref., referencia de la muestra de cereal analizado.^b Otras especies, cepas aisladas de DRBC o de diluciones diferentes a la utilizada para efectuar el recuento.

Tabla 17: Recuento total (RT) y recuento parcial (RP) de *Penicillium* spp. (expresados en UFC/g x 10⁻²) de las muestras de piensos analizadas que contienen *Penicillium* spp.

Ref. ^a	Especie destino	RT	RP <i>Penicillium</i> spp.	RP especies	Otras especies ^b
68	Ave	66,3	6,0	6,0 <i>P. purpurogenum</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>
72	Caballo	2,0	0		<i>P. puberulum</i>
74	Cerdo	21,0	0,3	0,3 <i>P. chrysogenum</i>	
76	Cerdo	1,0	0		<i>P. chrysogenum</i>
97	Cerdo	1,0	0		<i>P. janthinellum</i>
37/95	Caballo	746,6	44,7	40,0 <i>P. minioluteum</i> , 4,7 <i>P. citrinum</i>	<i>P. crustosum</i> , <i>P. raistrickii</i>
116	Caballo	12300,0	0		<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>P. viridicatum</i>
119	Caballo	333,0	3,0	3,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. oxalicum</i> , <i>P. verrucosum</i>
124	Caballo	966,7	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
127	Caballo	323,3	27,7	27,7 <i>P. purpurogenum</i>	
162	Ave	223,3	14,0	14,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	
163	Ave	423,3	110,0	103,3 <i>P. aurantiogriseum</i> , 6,7 <i>P. chrysogenum</i>	
202	Cerdo	3,3	0		<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. corylophilum</i>
203	Cerdo	16,7	0,3	0,3 <i>P. chrysogenum</i>	<i>P. aurantiogriseum</i>
209	Cerdo	91,0	1,0	1,0 <i>P. solitum</i>	
211	Cerdo	2,7	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
212	Cerdo	19,0	0		<i>P. solitum</i>
213	Cerdo	1,7	0,3	0,3 <i>P. decumbens</i>	
215	Cerdo	170,0	23,3	23,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
219	Cerdo	5,3	0,3	0,3 <i>P. glabrum</i>	
220	Cerdo	28,3	0,3	0,3 <i>P. glabrum</i>	<i>P. implicatum</i>
221	Cerdo	140,0	0,3	0,3 <i>P. decumbens</i>	
223	Cerdo	373,3	36,6	36,6 <i>P. chrysogenum</i>	
224	Cerdo	6,7	2,3	2,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. spinulosum</i>

(sigue)

(Tabla 17, continúa)

Ref. ^a	Especie destino	RT	RP <i>Penicillium</i> spp.	RP especies	Otras especies ^b
225	Cerdo	836,7	0		<i>P. decumbens</i> , <i>P. griseofulvum</i>
226	Cerdo	13966,6	100,0	66,7 <i>P. islandicum</i> , 33,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
227	Cerdo	42,0	2,0	1,7 <i>P. aurantiogriseum</i> , 0,3 <i>P. echinulatum</i>	
229	Cerdo	350,0	3,0	3,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. bilaii</i> , <i>P. echinulatum</i>
230	Cerdo	49,7	2,7	2,7 <i>P. corylophilum</i>	
231	Cerdo	44,0	4,7	2,7 <i>P. griseofulvum</i> , 2,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	
232	Cerdo	15,3	0		<i>P. aurantiogriseum</i>
233	Cerdo	11,3	3,3	3,3 <i>P. aurantiogriseum</i>	
234	Cerdo	3,3	0		<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. fellutanum</i>
235	Cerdo	26,7	0		<i>P. corylophilum</i>
237	Cerdo	5,0	0		<i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. corylophilum</i>
244	Caballo	13,0	1,0	1,0 <i>P. griseofulvum</i>	
245	Cerdo	8,0	1,0	1,0 <i>P. aurantiogriseum</i>	
428	Cerdo	6,3	0		<i>P. italicum</i>
466	Cerdo	1,3	0,3	0,3 <i>P. griseofulvum</i>	
486	Cerdo	2,3	0,3	0,3 <i>P. chrysogenum</i>	
490	Cerdo	5,0	0,3	0,3 <i>P. commune</i>	
493	Ave	23,6	0,6	0,6 <i>P. implicatum</i>	

^a Ref., referencia de la muestra de pienso analizado.^b Otras especies, cepas aisladas de DRBC o de diluciones diferentes a la utilizada para efectuar el recuento.

Tabla 18: Presencia y frecuencia de aparición de las distintas *Penicillium* spp. aisladas de las muestras analizadas que contienen *Penicillium* spp.

Especie	Subgénero ^a	Cereales (%)	Piensos (%)	Total
<i>P. aurantiogriseum</i>	P	28 (52,8)	19 (45,2)	47
<i>P. bilaii</i>	A	-	1 (2,4)	1
<i>P. brevicompactum</i>	P	3 (5,7)	-	3
<i>P. canescens</i>	F	1 (1,9)	-	1
<i>P. capsulatum</i>	A	1 (1,9)	-	1
<i>P. chrysogenum</i>	P	1 (1,9)	7 (16,7)	8
<i>P. citrinum</i>	F	3 (5,7)	1 (2,4)	4
<i>P. commune</i>	P	-	1 (2,4)	1
<i>P. corylophilum</i>	F	-	4 (9,5)	4
<i>P. crustosum</i>	P	6 (11,3)	1 (2,4)	7
<i>P. decumbens</i>	A	1 (1,9)	3 (7,1)	4
<i>P. echinulatum</i>	P	-	2 (4,8)	2
<i>P. expansum</i>	P	2 (3,8)	-	2
<i>P. fellutanum</i>	A	-	1 (2,4)	1
<i>P. funiculosum</i>	B	1 (1,9)	-	1
<i>P. glabrum</i>	A	-	2 (4,8)	2
<i>P. griseofulvum</i>	P	4 (7,5)	4 (9,5)	8
<i>P. hirsutum</i>	P	3 (5,7)	-	3
<i>P. implicatum</i>	A	-	2 (4,8)	2
<i>P. islandicum</i>	B	-	1 (2,4)	1
<i>P. italicum</i>	P	-	1 (2,4)	1
<i>P. janthinellum</i>	F	1 (1,9)	1 (2,4)	2
<i>P. minioluteum</i>	B	5 (9,4)	1 (2,4)	6
<i>P. oxalicum</i>	F	6 (11,3)	1 (2,4)	7
<i>P. puberulum</i>	P	2 (3,8)	1 (2,4)	3
<i>P. purpurogenum</i>	B	2 (3,8)	2 (4,8)	4
<i>P. raistrickii</i>	F	1 (1,9)	1 (2,4)	2
<i>P. roqueforti</i>	P	-	1 (2,4)	1
<i>P. rugulosum</i>	B	1 (1,9)	-	1
<i>P. solitum</i>	P	2 (3,8)	2 (4,8)	4
<i>P. spinulosum</i>	A	-	1 (2,4)	1
<i>P. variable</i>	B	1 (1,9)	-	1
<i>P. verrucosum</i>	P	7 (13,2)	1 (2,4)	8
<i>P. viridicatum</i>	P	7 (13,2)	1 (2,4)	8
Total		89	63	152

^a P, *Penicillium*; A, *Aspergilloides*; F, *Furcatum*; B, *Biverticillium*.

- No presencia.

Tabla 19: Recuentos parciales medios de las distintas especies aisladas respecto al recuento medio de *Penicillium* spp. (%).

Especie	Subgénero ^a	Cereales	Piensos	Total
<i>P. aurantiogriseum</i>	P	19,6	48,9	26,2
<i>P. bilaii</i>	A	-	-	-
<i>P. brevicompactum</i>	P	0,3	-	0,2
<i>P. canescens</i>	F	-	-	-
<i>P. capsulatum</i>	A	-	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	P	3,5	11,4	5,3
<i>P. citrinum</i>	F	3,4	1,2	2,9
<i>P. commune</i>	P	-	-	-
<i>P. corylophilum</i>	F	-	0,7	0,2
<i>P. crustosum</i>	P	67,8	-	52,6
<i>P. decumbens</i>	A	-	0,2	-
<i>P. echinulatum</i>	P	-	-	-
<i>P. expansum</i>	P	0,4	-	0,3
<i>P. fellutanum</i>	A	-	-	-
<i>P. funiculosum</i>	B	0,5	-	0,4
<i>P. glabrum</i>	A	-	0,2	-
<i>P. griseofulvum</i>	P	0,2	1,0	0,4
<i>P. hirsutum</i>	P	-	-	-
<i>P. implicatum</i>	A	-	0,2	-
<i>P. islandicum</i>	B	-	17,1	3,9
<i>P. italicum</i>	P	-	-	-
<i>P. janthinellum</i>	F	-	-	-
<i>P. minioluteum</i>	B	0,5	10,3	2,7
<i>P. oxalicum</i>	F	-	-	-
<i>P. puberulum</i>	P	-	-	-
<i>P. purpurogenum</i>	B	0,3	8,7	2,2
<i>P. raistrickii</i>	F	-	-	-
<i>P. roqueforti</i>	P	-	-	-
<i>P. rugulosum</i>	B	-	-	-
<i>P. solitum</i>	P	-	0,3	0,1
<i>P. spinulosum</i>	A	-	-	-
<i>P. variabile</i>	B	-	-	-
<i>P. verrucosum</i>	P	3,0	-	2,3
<i>P. viridicatum</i>	P	0,2	-	0,2

^a P, *Penicillium*; A, *Aspergilloides*; F, *Furcatum*; B, *Biverticillium*.

- Recuento parcial medio de la especie inferior al 0,1%.

Gráfica 1. Frecuencia de aparición y recuentos parciales, expresados en porcentaje, de *Penicillium* spp. en las muestras analizadas.

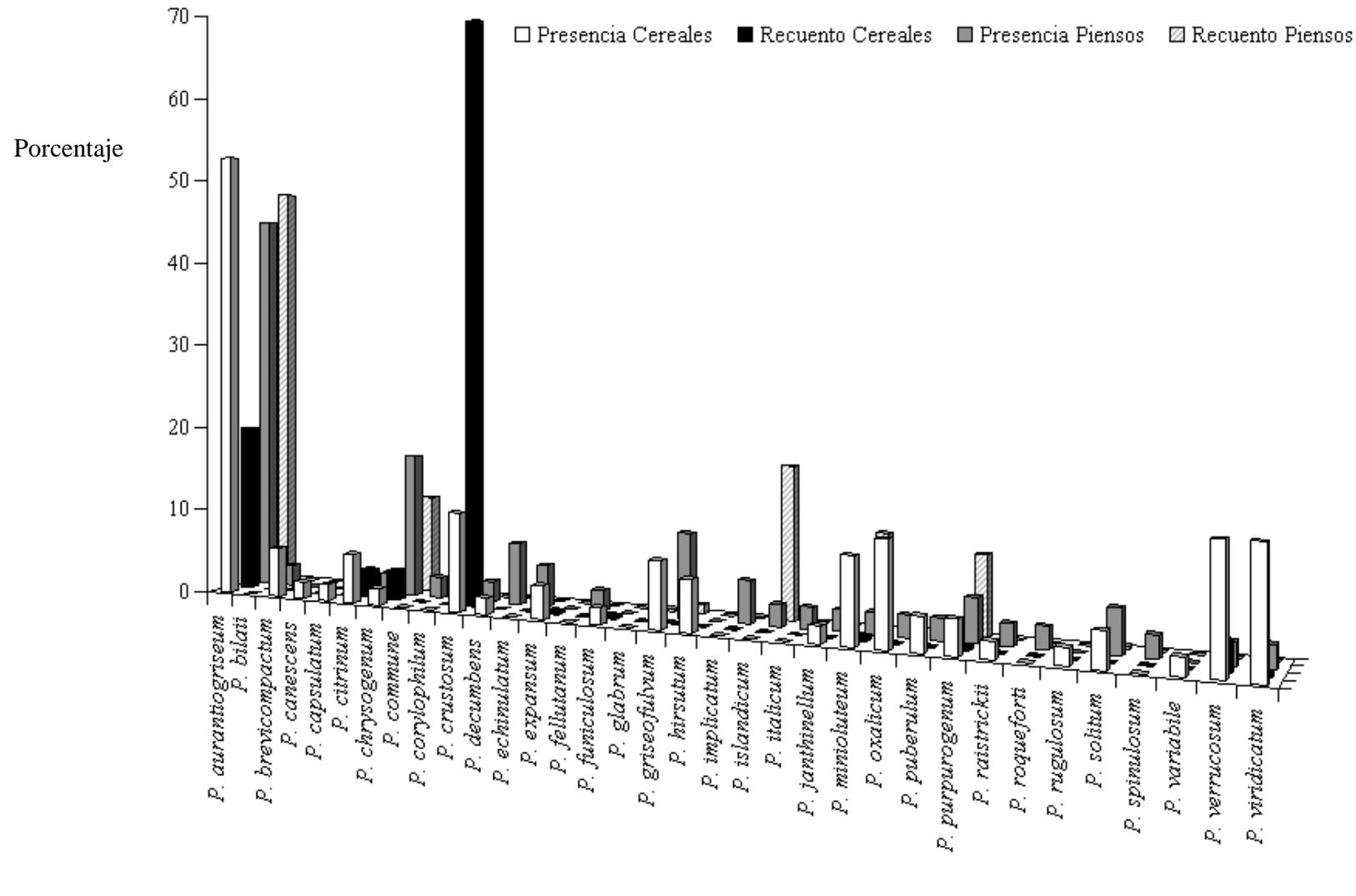


Tabla 20. Valores medios e intervalos de los recuentos (expresados en UFC/g x 10⁻²) totales, parciales de *Penicillium* spp. y parciales de las especies con mayor frecuencia de aparición en las muestras que contienen *Penicillium* spp.

Muestra	N°	Recuento Total		Recuento <i>Penicillium</i> spp.		<i>P. aurantiogriseum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>P. crustosum</i>	<i>P. griseofulvum</i>	<i>P. oxalicum</i>	<i>P. verrucosum</i>	<i>P. viridicatum</i>
		Intervalo	Media	Intervalo	Media / % ^a	Media ^b	Media	Media	Media	Media	Media	Media
Maíz	25	5,7 – 1200,0	546,8	<0,3 – 873,4	42,3 / 7,7	3,4 (13) ^c	-	36,3 (6) ^c	(2) ^c	0,02 (6) ^c	-	0,01 (1)
Cebada	18	10,7 – 1856,7	240,3	<0,3 – 127,0	14,3 / 5,9	9,2 (8) ^c	2,6 (1)	-	0,2 (2) ^c	-	2,2 (6) ^c	0,1 (5) ^c
Trigo	10	10,0 – 96,0	49,4	<0,3 – 11,7	2,3 / 4,7	1,3 (7) ^c	-	-	-	-	0,07 (1)	(1) ^c
Cereales	53	5,7 – 1856,7	348,9	<0,3 – 873,4	25,3 / 7,2	5,0 (28) ^c	0,9 (1)	17,1 (6) ^c	0,06 (4) ^c	0,01 (6) ^c	0,7 (7) ^c	0,05 (7) ^c
Cerdo	31	1,0 – 13966,6	524,4	<0,3 – 100,0	5,9 / 1,1	2,2 (13) ^c	1,2 (6) ^c	-	0,1 (3) ^c	-	-	-
Caballo	7	2,0 – 12300,0	2097,8	<0,3 – 44,7	10,9 / 0,5	0,4 (3) ^c	-	(1) ^c	0,1 (1)	(1) ^c	(1) ^c	(1) ^c
Aves	4	23,6 – 423,3	184,1	0,6 – 110,0	32,6 / 17,1	29,3 (3) ^c	1,7 (1)	-	-	-	-	-
Piensos	42	1,0 – 13966,6	754,2	<0,3 – 110,0	9,3 / 1,2	4,5 (19) ^c	1,0 (7) ^c	(1) ^c	0,1 (4) ^c	(1) ^c	(1) ^c	(1) ^c
Total	95	1,0 – 13966,6	528,1	<0,3 – 873,4	18,2 / 3,4	4,8 (47) ^c	1,0 (8) ^c	9,6 (7) ^c	0,07 (8) ^c	0,006 (7) ^c	0,4 (8) ^c	0,02 (8) ^c

^a porcentaje del recuento parcial medio de *Penicillium* spp. respecto al recuento total medio para cada tipo de muestra.

^b Entre paréntesis se señala el número de aislamientos obtenidos de cada especie para cada tipo de muestra.

^c Se incluyen aislamientos obtenidos de las diluciones o medio de cultivo no utilizados para el recuento.

- Especie no detectada en ese tipo de muestra.

5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y MICOTOXÍGENO DE *Penicillium* spp.

5.2.1. Resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp.

En las Tablas 21 a 24 se detallan los resultados obtenidos del estudio fisiológico y bioquímico realizado a las *Penicillium* spp., agrupadas en los 4 subgéneros *Penicillium*, *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Biverticillium*, respectivamente. Estas tablas reflejan ‘+’ cuando un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas estudiadas de la especie presentan una respuesta positiva y ‘-’ cuando un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas estudiadas de la especie presentan una respuesta negativa. Todas las cepas ensayadas se desarrollaron en los medios CREA y CSN, para los que se detalla como ‘+’ cuando un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas estudiadas de la especie presentan un crecimiento abundante y ‘w’ cuando un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas estudiadas de la especie presentan un crecimiento escaso. Los resultados obtenidos por un 11 a un 89% de las cepas se reflejan como un resultado variable (d).

La Tabla 25 refleja los porcentajes de cepas con resultado positivo a las pruebas correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* de las que se han estudiado 10 o más cepas.

En la Tabla 26 se detalla el resultado de las pruebas correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico para cada una de las 49 cepas de *Penicillium verrucosum* ensayadas.

Tabla 21. Respuesta de las especies del subgénero *Penicillium* a las pruebas fisiológicas en diferentes medios: YES, CREA, CSN, NSA, RT, medio líquido con urea, y respuesta a la prueba del indol.

Especie	N°	YES		CREA		CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días			
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B				14 días A/B	CYA	CREA	CSN
<i>P. aurantiogriseum</i>	55	-	-	d	+/d	+/d	d	+/d	d/d	+	d	d/d	d/d	d/d	d/d
<i>P. brevicompactum</i>	5	-	-	w	d/-	+/d	w	d/-	+/d	+	-	d/d	d/d	-/d	d/d
<i>P. chrysogenum</i>	25	-	d	d	d/-	+/d	d	+/d	d/d	+	-	d/d	d/d	-/-	-/-
<i>P. commune</i>	2	-	-	+	+/-	+/d	+	+/+	*/+	+	-	d/+	d/+	-/-	d/+
<i>P. crustosum</i>	11	-	-	+	+/d	d/+	+	+/+	*/+	+	-	d/d	-/d	-/-	-/-
<i>P. digitatum</i>	2	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. echinulatum</i>	2	-	-	+	+/-	+/d	+	-/+	*/+	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-
<i>P. expansum</i>	3	-	-	d	+/-	+/+	d	+/d	+/+	+	d	d/+	d/d	-/-	-/-
<i>P. glandicola</i>	1	-	-	+	+/+	*/+	+	+/+	*/+	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. griseofulvum</i>	13	-	-	w	d/-	d/-	w	d/-	d/d	+	-	d/+	d/d	-/-	-/-

(sigue)

(Tabla 21, continúa).

Especie	Nº	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. hirsutum</i>	4	-	-	d	d/-	+/d	d	d/-	+/d	+	-	d/d	d/d	d/d	d/d
<i>P. italicum</i>	2	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. nalgiovense</i>	2	-	-	w	+/-	+/-	w	d/-	d/-	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-
<i>P. puberulum</i>	4	-	-	w	+/-	+/d	w	+/-	+/d	+	+	d/-	+/+	-/-	-/d
<i>P. roqueforti</i>	4	-	-	+	d/d	d/d	+	d/+	*/+	+	d	+/+	+/+	d/d	+/+
<i>P. solitum</i>	8	-	-	+	+/d	d/d	+	d/-	*/+	+	d	d/d	-/-	d/-	-/-
<i>P. verrucosum</i>	52	d	d	w	-/-	d/-	w	-/-	d/-	+	-	+/+	d/d	-/-	-/-
<i>P. viridicatum</i>	10	-	-	w	+/-	+/-	d	+/-	+/d	+	d	d/d	d/d	-/-	-/d

Nº: número de cepas ensayadas.

YES: presencia (+,-) de coloración marrón-rojiza en el reverso de las colonias, ya sea en todo el reverso (columna 'Todo') o en zonas (columna 'zona'): radios, anillos concéntricos.

CREA: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

CSN: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

NSA: valoración (+,-) del crecimiento en este medio.

RT: valoración de la producción (+,-) de pigmento difusible marrón en el medio.

Urea: formación (+,-) de metabolitos básicos a los 7 y 14 días de incubación.

Indol: respuesta a la prueba del indol a los 7 y 14 días de incubación a partir de las colonias desarrolladas en los medios CYA, CREA y CSN.

+, -, w: resultado obtenido por un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas de la especie ensayadas.

d, resultado variable, obtenido por un porcentaje inferior al 90% de las cepas ensayadas. Se detalla entre paréntesis el porcentaje de cepas que presentan resultado positivo.

*, prueba no valorable, la formación de base enmascara la posible acidificación del medio.

Tabla 22. Respuesta de las especies del subgénero *Aspergilloides* a las pruebas fisiológicas en diferentes medios: YES, CREA, CSN, NSA, RT, medio líquido con urea, y respuesta a la prueba del indol.

Especie	N°	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. bilaii</i>	1	-	-	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. capsulatum</i>	1	-	-	w	-/-	-/-	w	+/-	+/-	-	-	-/-	+/+	-/-	-/+
<i>P. citreonigrum</i>	1	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	+/-	-/-	-/-
<i>P. decumbens</i>	5	-	-	w	d/-	d/-	w	d/-	d/-	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-
<i>P. donkii</i>	1	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. fellutanum</i>	1	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. glabrum</i>	7	d	d	w	d/-	d/-	w	+/-	+/d	d	-	d/d	-/-	-/-	-/-
<i>P. implicatum</i>	2	-	-	w	d/-	+/-	w	d/-	d/-	+	-	d/d	d/d	-/d	-/-

(sigue)

(Tabla 22, continúa).

Especie	Nº	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. restrictum</i>	4	-	-	d	d/-	d/-	d	d/d	d/d	+	-	+/+	-/d	-/-	-/-
<i>P. roseopurpureum</i>	1	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. sclerotiorum</i>	2	d	d	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>P. spinulosum</i>	2	-	-	w	+/-	+/+	w	+/-	+/+	+	-	-/-	-/-	d/-	d/-

Nº: número de cepas ensayadas.

YES: presencia (+,-) de coloración marrón-rojiza en el reverso de las colonias, ya sea en todo el reverso (columna 'Todo') o en zonas (columna 'zona'); radios, anillos concéntricos.

CREA: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

CSN: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

NSA: valoración (+,-) del crecimiento en este medio.

RT: valoración de la producción (+,-) de pigmento difusible marrón en el medio.

Urea: formación (+,-) de metabolitos básicos a los 7 y 14 días de incubación.

Indol: respuesta a la prueba del indol a los 7 y 14 días de incubación a partir de las colonias desarrolladas en los medios CYA, CREA y CSN.

+, -, w: resultado obtenido por un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas de la especie ensayadas.

d, resultado variable, obtenido por un porcentaje inferior al 90% de las cepas ensayadas. Se detalla entre paréntesis el porcentaje de cepas que presentan resultado positivo.

Tabla 23. Respuesta de las especies del subgénero *Furcatum* a las pruebas fisiológicas en diferentes medios: YES, CREA, CSN, NSA, RT, medio líquido con urea, y respuesta a la prueba del indol.

Especie	N°	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. canescens</i>	2	-	-	w	-/-	d/-	w	-/-	d/-	+	-	+/+	-/-	d/d	-/d
<i>P. citrinum</i>	10	-	-	w	d/-	d/-	w	d/-	d/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. corylophilum</i>	4	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. humuli</i>	3	-	-	+	-/-	d/d	+	d/+	*/+	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-
<i>P. janczewskii</i>	1	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. janthinellum</i>	3	-	-	w	+/-	+/-	w	d/-	+/d	+	-	d/d	d/d	d/d	-/-
<i>P. melinii</i>	2	-	-	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-

(sigue)

(Tabla 23, continúa).

Especie	Nº	YES		CREA		CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días			
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B				14 días A/B	CYA	CREA	CSN
<i>P. oxalicum</i>	7	d	-	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	d/d	+/+	d/+	d/d
<i>P. paxilli</i>	2	-	-	+	*/+	*/+	+	*/+	*/+	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. raistrickii</i>	4	-	-	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-

Nº: número de cepas ensayadas.

YES: presencia (+,-) de coloración marrón-rojiza en el reverso de las colonias, ya sea en todo el reverso (columna 'Todo') o en zonas (columna 'zona'): radios, anillos concéntricos.

CREA: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

CSN: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

NSA: valoración (+,-) del crecimiento en este medio.

RT: valoración de la producción (+,-) de pigmento difusible marrón en el medio.

Urea: formación (+,-) de metabolitos básicos a los 7 y 14 días de incubación.

Indol: respuesta a la prueba del indol a los 7 y 14 días de incubación a partir de las colonias desarrolladas en los medios CYA, CREA y CSN.

+, -, w: resultado obtenido por un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas de la especie ensayadas.

d, resultado variable, obtenido por un porcentaje inferior al 90% de las cepas ensayadas. Se detalla entre paréntesis el porcentaje de cepas que presentan resultado positivo.

*, prueba no valorable, la formación de base enmascara la posible acidificación del medio.

Tabla 24. Respuesta de las especies del subgénero *Biverticillium* a las pruebas fisiológicas en diferentes medios: YES, CREA, CSN, NSA, RT, medio líquido con urea, y respuesta a la prueba del indol.

Especie	N°	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. duclauxii</i>	1	-	-	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	++	-/-	-/-	-/-
<i>P. funiculosum</i>	1	-	+	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>P. islandicum</i>	2	-	d	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-
<i>P. minioluteum</i>	8	d	d	w	d/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	d/d	-/-	-/-	-/-
<i>P. pinophilum</i>	2	-	-	w	-/-	+/-	w	+/-	+/-	+	-	++	+/-	-/-	-/-
<i>P. purpurogenum</i>	10	d	d	d	d/-	+/-	d	+/-	+/-	+	-	d/+	d/d	-/-	d/-

(sigue)

(Tabla 24, continúa)

Especie	Nº	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. rugulosum</i>	1	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	+	-	-/+	-/-	-/-	-/-
<i>P. variable</i>	2	-	-	w	d/-	+/-	w	d/-	+/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-

Nº: número de cepas ensayadas.

YES: presencia (+,-) de coloración marrón-rojiza en el reverso de las colonias, ya sea en todo el reverso (columna 'Todo') o en zonas (columna 'zona'): radios, anillos concéntricos.

CREA: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

CSN: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

NSA: valoración (+,-) del crecimiento en este medio.

RT: valoración de la producción (+,-) de pigmento difusible marrón en el medio.

Urea: formación (+,-) de metabolitos básicos a los 7 y 14 días de incubación.

Indol: respuesta a la prueba del indol a los 7 y 14 días de incubación a partir de las colonias desarrolladas en los medios CYA, CREA y CSN.

+, -, w: resultado obtenido por un porcentaje igual o superior al 90% de las cepas de la especie ensayadas.

d, resultado variable, obtenido por un porcentaje inferior al 90% de las cepas ensayadas. Se detalla entre paréntesis el porcentaje de cepas que presentan resultado positivo.

Tabla 25. Porcentaje de cepas con resultado positivo a las pruebas correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de las especies pertenecientes al subgénero *Penicillium* de las que se han estudiado 10 o más cepas.

Especie	N°	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
<i>P. aurantiogriseum</i>	55	0	0	42	98/13	98/49	49	98/38	60*/85	100	46	40/62	89/87	36/44	42/33
<i>P. chrysogenum</i>	25	0	12	36	88/0	92/12	40	96/48	68*/76	100	8	24/48	12/28	0/4	4/4
<i>P. crustosum</i>	11	0	0	100	100/55	45*/91	100	91/100	0*/100	100	0	33/36	9/18	0/0	0/0
<i>P. griseofulvum</i>	13	0	0	0	38/0	38/0	0	46/0	46/33	100	0	77/92	62/77	0/8	8/8
<i>P. verrucosum</i>	52	27	21	0	4/0	39/0	0	6/0	63/0	96	2	100/100	38/27	4/6	2/2
<i>P. viridicatum</i>	10	0	0	0	100/0	100/0	20	90/0	90/20	100	50	40/60	70/55	0/10	10/20

N°: número de cepas ensayadas.

YES: presencia de coloración marrón-rojiza en el reverso de las colonias, ya sea en todo el reverso (columna 'Todo') o en zonas (columna 'zona'); radios, anillos concéntricos.

CREA: Cr, porcentaje de cepas con crecimiento abundante, las restantes cepas presentaron crecimiento escaso; A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

CSN: Cr, porcentaje de cepas con crecimiento abundante, las restantes cepas presentaron crecimiento escaso; A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

NSA: valoración del crecimiento en este medio.

RT: valoración de la producción de pigmento difusible marrón en el medio.

Urea: formación de metabolitos básicos a los 7 y 14 días de incubación.

Indol: respuesta a la prueba del indol a los 7 y 14 días de incubación a partir de las colonias desarrolladas en los medios CYA, CREA y CSN.

*, prueba no valorable para algunas cepas de la especie, la formación de base enmascara la posible acidificación del medio.

Tabla 26. Resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de las cepas pertenecientes a la especie *Penicillium verrucosum*.

Cepa	Origen	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
P105	Soja	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	-/+	w	-	-/+	-/-	-/-	-/-
P194	Maíz	+		w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
P198	Guisante f. ^a	+		w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
P293	Trigo	-	+	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	+	+/+	+/+	+/+	-/-
P297	Cebada	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/-	-/-	-/-
P346	Cebada	-	+	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/+
P364	A. caballo ^a	+		w	+/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/+	-/+	-/+
P410	Cebada	-	+	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	-	-	+/+	+/+	-/-	+/-
P437	Cebada	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/+	-/-	-/-
P438	Cebada	+		w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
P440	Cebada	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/+	-/+	-/-
BEFE 487	Lentejas	+		w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BEFE 488	Cebada	+		w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BEFE 489	Judías	+		w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	+	-	+/+	-/-	-/-	-/-

(sigue)

(Tabla 26, continúa)

Cepa	Origen	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
BFE 490	Salvado trigo	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 491	Salvado trigo	+		w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 492	Harina trigo	+		w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 493	Judías	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
BFE 494	Judías	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 495	Judías	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 496	Judías	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 497	Judías	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/-	-/-	-/-
BFE 498	Judías	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 499	Trigo	+		w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
BFE 500	Cereal	+		w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 501	Cereal	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 502	Cereal	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 503	Cereal	+		w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 504	Cereal	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/+	-/-

(sigue)

(Tabla 26, continúa)

Cepa	Origen	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
BFE 505	Cereal	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 506	Cereal	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 507	Cereal	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 514	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/-	-/-	-/-
BFE 520	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 521	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 522	Desconocido	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/-	+/-	-/-
BFE 524	Trigo	-	-	w	+/-	+/-	w	+/-	+/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
BFE 526	Trigo	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/-	-/-	-/-
BFE 527	Trigo	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/-	-/-	-/-
BFE 537	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	+/-	w	+/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 538	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	+/-	w	+/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 540	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 542	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	+/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
BFE 549	Prod. cárnico	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	+/-	w	-	+/+	+/-	-/-	-/-

(sigue)

(Tabla 26, continúa)

Cepa	Origen	YES		CREA			CSN			NSA	RT	Urea 7/14 días	Indol 7/14 días		
		Todo	Zona	Cr	7 días A/B	14 días A/B	Cr	7 días A/B	14 días A/B				CYA	CREA	CSN
CECT 2320	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
FRR 1690	Desconocido	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
FRR 2940	Desconocido	+		w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
IBT 12803	Prod. cárnico	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	-	-	+/+	-/-	-/-	-/-
IBT 20850	Desconocido	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	+/+	-/-	-/-
IBT 21550	Desconocido	+		w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
IBT 21573	Desconocido	-	-	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-
IMI 200.310	Desconocido	-	+	w	-/-	-/-	w	-/-	-/-	w	-	+/+	-/-	-/-	-/-

YES: presencia (+,-) de coloración marrón-rojiza en el reverso de las colonias, ya sea en todo el reverso (columna 'Todo') o en zonas (columna 'zona'): radios, anillos concéntricos.

CREA: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

CSN: Cr, valoración del crecimiento (w, escaso; +, abundante); A/B formación (+,-) de ácido (A) o base (B) a los 7 y 14 días de incubación.

NSA: valoración (+,-) del crecimiento en este medio.

RT: valoración de la producción (+,-) de pigmento difusible marrón en el medio.

Urea: formación (+,-) de metabolitos básicos a los 7 y 14 días de incubación.

Indol: respuesta a la prueba del indol a los 7 y 14 días de incubación a partir de las colonias desarrolladas en los medios CYA, CREA y CSN.

^a Guisante f., guisante forrajero; A. caballo, alimento de caballo.

5.2.2. Resultados correspondientes al estudio micotoxígeno de *Penicillium* spp.

5.2.2.1. Resultados correspondientes a la detección de las micotoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AP, CIT, STE, OA, PEN A y ZEA mediante TLC

Los resultados correspondientes a la detección de AP, CIT, OA y PEN A, tanto en CYA como en YES, así como el origen de las cepas productoras de estas micotoxinas se presentan en las Tablas 27 a 30, respectivamente. No se detectaron AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, STE ni ZEA en los extractos obtenidos de los medios CYA y YES de ninguna de las 298 cepas estudiadas pertenecientes a 48 especies diferentes del género *Penicillium*. La detección de OA mediante la técnica de TLC se dio únicamente en los extractos de 40 de las 52 cepas de la especie *P. verrucosum* (Tabla 29).

5.2.2.2. Resultados correspondientes a la detección y cuantificación de OA mediante HPLC

Únicamente se detectó OA mediante la técnica de HPLC en los extractos pertenecientes a 46 de las 52 cepas de la especie *P. verrucosum*. La cuantificación de la OA obtenida en CYA y YES para todas las cepas de *P. verrucosum* ensayadas, así como el origen de las mismas, se detallan en la Tabla 31.

La Tabla 32 resume las micotoxinas que se han detectado de las distintas especies, así como el número de cepas productoras de cada especie.

La Tabla 33 resume los resultados obtenidos respecto a la presencia de reverso marrón rojizo en el medio YES, la concentración de OA producida en CYA y en YES y la detección de CIT, así como el origen de las cepas de *P. verrucosum* ensayadas.

Tabla 27. Detección de AP mediante TLC en las cepas de *Penicillium* spp. a los 7 días de incubación en los medios de cultivo CYA y YES.

Especie	Nº cepas	Subgénero	Referencia	Origen	CYA	YES
<i>P. aurantiogriseum</i>	55 ^a	<i>Penicillium</i>	P265	Pienso ave	-	+
			P270	Maíz	+	+
			P271	Maíz	-	+
			P272	Maíz	-	+
			P278	Maíz	-	+
			P323	Maíz	-	+
			P328	Maíz	-	+
			P361	Maíz	+	+
			P374	Salvado	+	+
			P394	Pienso oveja	+	+
			P396	Cebada	+	+
			P404	Cebada	+	+
			P411	Cebada	+	+
			P412	Cebada	+	+
			P417	Cebada	+	+
			P420	Trigo	+	+
			P422	Trigo	+	+
			P424	Trigo	+	+
			P426	Trigo	+	+
			P429	Pienso ave	+	+
			P431	Pienso ave	+	+
			P433	Cebada	+	+
			P442	Maíz	-	+
			P450	Pienso cerdo	+	+
			P453	Pienso cerdo	+	+
			P458	Pienso cerdo	+	+
			P459	Pienso cerdo	+	+
			P460	Pienso cerdo	+	+
			P483	Pienso vaca	-	+
			P486	Pienso cerdo	-	+
		CECT 2264	Colección cultivo	-	+	
<i>P. canescens</i>	2	<i>Furcatum</i>	P406	Tierra	-	+
<i>P. expansum</i>	3	<i>Penicillium</i>	P435	Cebada	+	+
<i>P. raistrickii</i>	4	<i>Furcatum</i>	P338	Pienso caballo	+	+
			P419	Trigo	+	-
			P512	Pienso cerdo	+	+
<i>P. viridicatum</i>	10	<i>Penicillium</i>	P370	Cebada	-	+
			P443	Cebada	-	+

^a número de cepas analizadas.

Tabla 28. Detección de CIT mediante TLC en las cepas de *Penicillium* spp. a los 7 días de incubación en los medios de cultivo CYA y YES.

Especie	Nº cepas	Subgénero	Referencia	Origen	CYA	YES
<i>P. canescens</i>	2 ^a	<i>Furcatum</i>	P266	Maíz	+	+
<i>P. chrysogenum</i>	25	<i>Penicillium</i>	P510	Tierra	(+) ^b	-
<i>P. citrinum</i>	10	<i>Furcatum</i>	P268	Maíz	+	+
			P273	Soja	+	+
			P274	Soja	+	+
			P280	Maíz	+	+
			P332	Maíz	+	+
			P335	Alimento caballo	+	+
			P402	Piel axila cabra	+	+
			P403	Piel axila cabra	+	+
			P509	Tierra	+	+
			CECT 2274	Colección cultivo	+	+
			<i>P. verrucosum</i> ^c	52	<i>Penicillium</i>	P105
P194	Maíz	+				+
P198	Guisante forrajero	+				+
P293	Trigo	-				+
P297	Cebada	+				+
P346	Cebada	-				+
P364	Alimento caballo	+				+
P437	Cebada	+ ^d				+ ^d
P438	Cebada	-				+
P440	Cebada	+				+
BFE 488	CC ^e (Cebada, Suecia)	-				+ ^d
BFE 490	CC (Salvado trigo, Suecia)	-				+ ^d
BFE 492	CC (Harina trigo, Suecia)	-				+ ^d
BFE 496	CC (Judías, Suecia)	+				+
BFE 497	CC (Judías, Suecia)	-				+ ^d
BFE 499	CC (Trigo, Suecia)	+				+
BFE 501	CC (Cereal, Suecia)	+ ^d				-
BFE 502	CC (Cereal, Suecia)	+				+
BFE 503	CC (Cereal, Suecia)	-				+
BFE 504	CC (Cereal, Suecia)	-				+ ^d
BFE 506	CC (Cereal, Suecia)	-				+ ^d
BFE 507	CC (Cereal, Suecia)	-				+ ^d
BFE 524	CC (Trigo, EUA)	+				+
BFE 527	CC (Trigo, EUA)	+	+			
FRR 2940	CC (Desconocido)	-	+			
IBT 21550	CC (Desconocido)	+	+			
IBT 21573	CC (Desconocido)	+	+			

^a número de cepas analizadas.

^b Esta cepa produjo CIT sólo en la primera siembra del medio CYA. En una posterior resiembra de comprobación no se detectó la micotoxina en ninguno de los dos medios ensayados.

^c Los resultados de *P. verrucosum* corresponden a dos repeticiones de extracción y detección independientes.

^d Resultado negativo en una de las dos repeticiones.

^e CC, colección de cultivo. Se indica entre paréntesis el tipo de sustrato del que fue aislada y el país de aislamiento.

Tabla 29. Detección de OA mediante TLC en las cepas de *Penicillium* spp. a los 7 días de incubación en los medios de cultivo CYA y YES.

Especie	Nº cepas	Subgénero	Referencia	Origen	CYA	YES
<i>P. verrucosum</i> ^a	52 ^b	<i>Penicillium</i>	P194	Maíz	+	+
			P198	Guisante forrajero	+ ^c	+ ^c
			P293	Trigo	+	+
			P297	Cebada	+	+
			P346	Cebada	+	+
			P364	Alimento caballo	+	+
			P410	Cebada	+	-
			P437	Cebada	+	+
			P438	Cebada	+	+
			P440	Cebada	+	+
			BFE 487	CC ^d (Lentejas, Suecia)	+	+
			BFE 492	CC (Harina trigo, Suecia)	+	+
			BFE 493	CC (Judías, Suecia)	+	+
			BFE 494	CC (Judías, Suecia)	-	+ ^c
			BFE 495	CC (Judías, Suecia)	+	-
			BFE 496	CC (Judías, Suecia)	+	+
			BFE 497	CC (Judías, Suecia)	+ ^c	+ ^c
			BFE 500	CC (Cereal, Suecia)	+	+
			BFE 502	CC (Cereal, Suecia)	+	+
			BFE 503	CC (Cereal, Suecia)	+	+
			BFE 507	CC (Cereal, Suecia)	+	+
			BFE 514	CC (Prod. cárnico, Italia)	+	+
			BFE 520	CC (Prod. cárnico, Italia)	+	+
			BFE 521	CC (Prod. cárnico, Italia)	-	+
			BFE 522	CC (Desconocido)	+	+
			BFE 524	CC (Trigo, EUA)	+	+
			BFE 526	CC (Trigo, EUA)	+	-
			BFE 527	CC (Trigo, EUA)	+	+
			BFE 537	CC (Prod. cárnico, Hungría)	+	+
			BFE 538	CC (Prod. cárnico, Hungría)	+	+
			BFE 540	CC (Prod. cárnico, Hungría)	+	+
			BFE 542	CC (Prod. cárnico, Hungría)	+	+
			BFE 549	CC (Prod. cárnico, Hungría)	+	+
			CECT 2320	CC (Prod. cárnico, Italia)	+	+
			FRR 1690	CC (Desconocido)	+ ^c	+
			FRR 2940	CC (Desconocido)	+	+
			IBT 12803	CC (Prod. cárnico, Italia)	+ ^c	+ ^c
			IBT 20850	CC (Desconocido)	+	+
			IBT 21550	CC (Desconocido)	+	+
			IBT 21573	CC (Desconocido)	+ ^c	+ ^c

^a Los resultados corresponden a dos repeticiones de extracción y detección independientes.

^b número de cepas analizadas.

^c Resultado negativo en una de las dos repeticiones.

^d CC, colección de cultivo. Se indica entre paréntesis el tipo de sustrato del que fue aislada y el país de aislamiento.

Tabla 30. Detección de PEN A mediante TLC en las cepas de *Penicillium* spp. a los 7 días de incubación en los medios de cultivo CYA y YES.

Especie	Nº cepas	Subgénero	Referencia	Origen	CYA	YES
<i>P. aurantiogriseum</i>	55 ^a	<i>Penicillium</i>	P374	Salvado	+	+
			P450	Pienso cerdo	+	-
<i>P. chrysogenum</i>	25	<i>Penicillium</i>	P522	Uva	+	-
			P523	Uva	+	-
			P525	Uva	+	-
			P526	Uva	+	-
			P527	Uva	+	-
<i>P. crustosum</i>	11	<i>Penicillium</i>	P269	Maíz	+	-
			P320	Maíz	+	-
			P329	Maíz	+	-
			P331	Maíz	+	-
			P339	Alimento caballo	+	-
			P351	Alimento caballo	+	-
			P390	Maíz	+	-
			P397	Castaña	+	-
			P414	Tierra	+	-
			P444	Maíz	+	-
P495	Desconocido	+	-			
<i>P. echinulatum</i>	2	<i>Penicillium</i>	P461	Pienso cerdo	+	-
<i>P. glandicola</i>	1	<i>Penicillium</i>	NRRL 2036	Colección cultivo	+	+
<i>P. janczewskii</i>	1	<i>Furcatum</i>	P409	Tierra	+	-
<i>P. viridicatum</i>	10	<i>Penicillium</i>	NRRL 958	Colección cultivo	+	+

^a número de cepas analizadas.

Tabla 31. Cuantificación (en µg/g de medio de cultivo) de OA mediante HPLC de todas las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7 días de incubación en los medios de cultivo CYA y YES.

Especie	Nº cepas	Subgénero	Referencia	Origen	CYA	YES
<i>P. verrucosum</i>	52 ^a	<i>Penicillium</i>	P105 ^b	Soja	0,3	0,03
			P194	Maíz	2,1	2,7
			P198	Guisante forrajero	1,6	1,8
			P293	Trigo	13,5	9,4
			P297	Cebada	13,4	3,9
			P346	Cebada	10,9	10,0
			P364	Alimento caballo	4,4	15,0
			P410	Cebada	0,4	0,02
			P437	Cebada	11,3	1,4
			P438	Cebada	0,3	3,4
			P440	Cebada	5,3	11,6
			BFE 487	CC ^c (Lentejas, Suecia)	90,5	213,1
			BFE 488	CC (Cebada, Suecia)	-	-
			BFE 489 ^b	CC (Judías, Suecia)	0,1	0,5
			BFE 490	CC (Salvado trigo, Suecia)	-	-
			BFE 491 ^b	CC (Salvado trigo, Suecia)	0,03	-
			BFE 492	CC (Harina trigo, Suecia)	0,7	83,3
			BFE 493	CC (Judías, Suecia)	0,8	0,2
			BFE 494	CC (Judías, Suecia)	0,02	4,2
			BFE 495	CC (Judías, Suecia)	0,2	0,2
			BFE 496	CC (Judías, Suecia)	9,7	21,2
			BFE 497	CC (Judías, Suecia)	0,2	2,2
			BFE 498 ^b	CC (Judías, Suecia)	0,05	0,04
			BFE 499	CC (Trigo, Suecia)	-	-
			BFE 500	CC (Cereal, Suecia)	6,1	12,8
			BFE 501	CC (Cereal, Suecia)	-	-
			BFE 502	CC (Cereal, Suecia)	9,2	134,3
			BFE 503	CC (Cereal, Suecia)	0,2	8,9
			BFE 504	CC (Cereal, Suecia)	-	-
			BFE 505 ^b	CC (Cereal, Suecia)	0,2	0,5
			BFE 506	CC (Cereal, Suecia)	-	-
			BFE 507	CC (Cereal, Suecia)	0,8	16,7
			BFE 514	CC (Prod. cárnico, Italia)	12,8	12,4

(sigue)

(Tabla 31, continúa)

Especie	Nº cepas	Subgénero	Referencia	Origen	CYA	YES
<i>P. verrucosum</i>	52 ^a	<i>Penicillium</i>	BFE 520	CC (Prod. cárnico, Italia)	2,4	5,8
			BFE 521	CC (Prod. cárnico, Italia)	0,2	4,0
			BFE 522	CC (Desconocido)	3,8	8,4
			BFE 524	CC (Trigo, EUA)	22,2	1,8
			BFE 526	CC (Trigo, EUA)	30,5	1,0
			BFE 527	CC (Trigo, EUA)	7,4	0,1
			BFE 537	CC (Prod. cárnico, Hungría)	34,4	44,9
			BFE 538	CC (Prod. cárnico, Hungría)	35,5	97,1
			BFE 540	CC (Prod. cárnico, Hungría)	34,5	48,8
			BFE 542	CC (Prod. cárnico, Hungría)	41,5	60,4
			BFE 549	CC (Prod. cárnico, Italia)	60,2	22,6
			CECT 2320	CC (Prod. cárnico, Italia)	2,1	-
			FRR 1690	CC (Desconocido)	-	0,9
			FRR 2940	CC (Desconocido)	9,3	3,1
			IBT 12803	CC (Prod. cárnico, Italia)	9,4	20,6
			IBT 20850	CC (Desconocido)	1,4	12,9
			IBT 21550	CC (Desconocido)	11,9	21,1
			IBT 21573	CC (Desconocido)	2,5	2,9
			IMI 200.310 ^b	CC (Desconocido)	0,6	0,1

^a número de cepas analizadas.

^b No detectada en TLC.

^c CC colección de cultivo. Se indica entre paréntesis el tipo de sustrato del que fue aislada y el país de aislamiento.

Tabla 32. Resumen de las micotoxinas que se han detectado a partir de las distintas especies. Se detalla el número de cepas productoras de cada especie y el total de cepas analizadas de cada una de ellas.

Especie	Nº cepas	AP	CIT	OA^a	PEN A
<i>P. aurantiogriseum</i>	55	31	-	-	2 ^b
<i>P. canescens</i>	2	1	1	-	-
<i>P. chrysogenum</i>	25	-	1	-	5
<i>P. citrinum</i>	10	-	10	-	-
<i>P. crustosum</i>	11	-	-	-	11
<i>P. echinulatum</i>	2	-	-	-	1
<i>P. expansum</i>	3	1	-	-	-
<i>P. glandicola</i>	1	-	-	-	1
<i>P. janczewskii</i>	1	-	-	-	1
<i>P. raistrickii</i>	4	3	-	-	-
<i>P. verrucosum</i>	52	-	27 ^c	46 ^c	-
<i>P. viridicatum</i>	10	2	-	-	1

^a Datos obtenidos mediante HPLC.

^b Estas 2 cepas produjeron también AP.

^c 21 cepas de *P. verrucosum* produjeron OA y CIT.

Tabla 33. Resumen de los resultados obtenidos respecto a la presencia de reverso marrón rojizo en el medio YES, cuantificación de OA a partir de los medios CYA y YES y detección de CIT y origen de las cepas de *P. verrucosum* ensayadas en el presente trabajo.

Cepa	Origen	Rev. ^a	OA		CIT
			CYA	YES	
P105 ^b	Soja	(+) ^b	0,3	0,03	+
P194	Maíz	+	2,1	2,7	+
P198	Guisante forrajero	+	1,6	1,8	+
P293	Trigo	(+)	13,5	9,4	+
P297	Cebada	(+)	13,4	3,9	+
P346	Cebada	(+)	10,9	10,0	+
P364	Alimento caballo	+	4,4	15,0	+
P410	Cebada	(+)	0,4	0,02	-
P437	Cebada	-	11,3	1,4	+
P438	Cebada	+	0,3	3,4	+
P440	Cebada	-	5,3	11,6	+
BFE 487	CC ^c (Lentejas, Suecia)	+	90,5	213,1	-
BFE 488	CC (Cebada, Suecia)	+	-	-	+
BFE 489	CC (Judías, Suecia)	+	0,1	0,5	-
BFE 490	CC (Salvado trigo, Suecia)	-	-	-	+
BFE 491	CC (Salvado trigo, Suecia)	+	0,03	-	-
BFE 492	CC (Harina trigo, Suecia)	+	0,7	83,3	+
BFE 493	CC (Judías, Suecia)	-	0,8	0,2	-
BFE 494	CC (Judías, Suecia)	-	0,02	4,2	-
BFE 495	CC (Judías, Suecia)	-	0,2	0,2	-
BFE 496	CC (Judías, Suecia)	-	9,7	21,2	+
BFE 497	CC (Judías, Suecia)	(+)	0,2	2,2	+
BFE 498	CC (Judías, Suecia)	(+)	0,05	0,04	-
BFE 499	CC (Trigo, Suecia)	+	-	-	+
BFE 500	CC (Cereal, Suecia)	+	6,1	12,8	-
BFE 501	CC (Cereal, Suecia)	(+)	-	-	+
BFE 502	CC (Cereal, Suecia)	-	9,2	134,3	+
BFE 503	CC (Cereal, Suecia)	+	0,2	8,9	+
BFE 504	CC (Cereal, Suecia)	-	-	-	+
BFE 505	CC (Cereal, Suecia)	-	0,2	0,5	-
BFE 506	CC (Cereal, Suecia)	-	-	-	+
BFE 507	CC (Cereal, Suecia)	(+)	0,8	16,7	+
BFE 514	CC (Prod. cárnico, Italia)	-	12,8	12,4	-

(sigue)

(Tabla 33, continúa)

Cepa	Origen	Rev. ^a	OA		CIT
			CYA	YES	
BFE 520	CC (Prod. cárnico, Italia)	-	2,4	5,8	-
BFE 521	CC (Prod. cárnico, Italia)	-	0,2	4,0	-
BFE 522	CC (Desconocido)	-	3,8	8,4	-
BFE 524	CC (Trigo, EUA)	-	22,2	1,8	+
BFE 526	CC (Trigo, EUA)	-	30,5	1,0	-
BFE 527	CC (Trigo, EUA)	-	7,4	0,1	+
BFE 537	CC (Prod. cárnico, Hungría)	-	34,4	44,9	-
BFE 538	CC (Prod. cárnico, Hungría)	-	35,5	97,1	-
BFE 540	CC (Prod. cárnico, Hungría)	-	34,5	48,8	-
BFE 542	CC (Prod. cárnico, Hungría)	-	41,5	60,4	-
BFE 549	CC (Prod. cárnico, Italia)	(+)	60,2	22,6	-
CECT 2320	CC (Prod. cárnico, Italia)	-	2,1	-	-
FRR 1690	CC (Desconocido)	-	-	0,9	-
FRR 2940	CC (Desconocido)	(+)	9,3	3,1	+
IBT 12803	CC (Prod. cárnico, Italia)	-	9,4	20,6	-
IBT 20850	CC (Desconocido)	-	1,4	12,9	-
IBT 21550	CC (Desconocido)	+	11,9	21,1	+
IBT 21573	CC (Desconocido)	-	2,5	2,9	+
IMI 200.310	CC (Desconocido)	(+)	0,6	0,1	-

^a Rev., presencia de coloración marrón rojiza en el reverso de las colonias en YES.

^b (+), cepa que presenta coloración marrón rojiza sólo en alguna zona de su reverso.

^c CC colección de cultivo. Se indica entre paréntesis el tipo de sustrato del que fue aislada y el país de aislamiento.

5.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MOLECULAR DE *P. verrucosum*

5.3.1. Resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2

Las secuencias alineadas del rDNA 5.8S y los dos espaciadores intergénicos ITS1 y 2 de las cepas de *P. verrucosum* P293, P297, P346, P364, P410, P437, P438, P440, BFE 487, BFE 488, BFE 496, BFE 500, BFE 506, IMI 200.310 e IBT 12803, de las cepas de *P. viridicatum* NRRL 958 y NRRL 961, de *P. solitum* NRRL 937, *P. glandicola* NRRL 2036 y de la cepa *P. glabrum* NRRL 766, utilizada como control externo, están representadas en la Figura 8.

El fragmento de DNA secuenciado presentó 565 pares de bases. La región ITS1 ocupó los nucleótidos 29 a 203, el gen 5.8S rDNA ocupó los nucleótidos 204 a 360 y la región ITS2 los nucleótidos 361 a 565.

Las secuencias de las distintas cepas de *P. verrucosum* resultaron muy similares entre sí. Únicamente se localizaron una transición en la región ITS1 y una inserción en la región ITS2. En la región ITS1 se presentó una transición de una guanina por una adenina en la posición 103 para algunas de las cepas de *P. verrucosum* ensayadas. De las 15 cepas secuenciadas, 9 presentaban adenina en esa posición y las 6 restantes guanina. En la región ITS2, la cepa IBT 12803 presentó la inserción de una timina en posición 560.

Las cepas NRRL 958 y NRRL 961 de *P. viridicatum* presentaron una transición timina por citosina en la posición 44, en la región ITS1. La cepa NRRL 958 presentó, además, una transición citosina por timina en la posición 405 del ITS2. La cepa NRRL 937 de *P. solitum* presentó una transversión adenina por timina en la posición 102 del ITS1 y la inserción de una base de timina en la posición 406 de la región ITS2. Estas 3 cepas presentaron adenina en la posición 103 del ITS1.

La cepa de *P. glandicola* NRRL 2036 presentó más diferencias respecto al resto de cepas estudiadas del subgénero *Penicillium*. Esta cepa presentó una delección (en la posición 74) y 4 mutaciones puntuales (en las posiciones 102, 121, 125 y 176) en la

región ITS1 y 3 transversiones más (en las posiciones 361, 374 y 442) en la región ITS2.

La secuencia de la cepa *P. glabrum* NRRL 766 presentó diferencias en 53 posiciones respecto a la de las cepas de *P. verrucosum*. Esta cepa presentó, en la región ITS1, 3 deleciones (en las posiciones 104, 105 y 191) y 24 mutaciones puntuales (incluida una en la posición 103, dónde presenta citosina) respecto a las secuencias obtenidas de *P. verrucosum*. En la región ITS2 presentó 2 inserciones (en las posiciones 518 y 519), 7 deleciones (en las posiciones 403 a 405 y 407 a 409 y en la posición 506) y 14 mutaciones puntuales (Figura 8). En el DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal también presentó diferencias. La cepa *P. glabrum* NRRL 766 presentó en esta región la inserción de una base de guanina (posición 281) y 2 transversiones (en las posiciones 265 y 266) respecto a la secuencia de *P. verrucosum*.

La Figura 9 muestra el resultado obtenido de la realización del test 'Bootstrap' de filogenia en una representación en árbol de Neighbor-Joining de las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 analizadas. En la Figura 9 se resumen también los resultados obtenidos de características morfológicas (la presencia de coloración marrón rojiza en el reverso de las colonias en YES) y micotoxígenas (la detección de OA mediante HPLC a partir de CYA y de YES y de CIT mediante TLC) de las cepas de *P. verrucosum* secuenciadas. Las cepas de *P. verrucosum* se agruparon en dos tipos en función de la base que presentan en la posición 103 (adenina o guanina). Las 6 cepas de *P. verrucosum* que aparecen en el primer subgrupo (BFE 488, BFE 496, BFE 500, BFE 506, P438 e IMI 200.310) presentaron guanina en esta posición, mientras las del segundo subgrupo presentaron adenina. La mayoría de las cepas analizadas en nuestro estudio se agruparon con las 2 correspondientes a *P. nordicum* (79, 244). Las secuencias de las cepas de *P. verrucosum*, *P. viridicatum* y *P. solitum* analizadas han resultado ser de gran similitud.

5.3.2. Resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)

El estudio mediante RAPD del DNA genómico de las cepas de *P. verrucosum* ha permitido diferenciar dos grupos que hemos denominado A y B, tal como muestra la Figura 10. En la figura se resumen también los resultados obtenidos de características morfológicas (la presencia de coloración marrón rojiza en el reverso de las colonias en YES) y micotoxígenas (la detección de OA mediante HPLC a partir de CYA y de YES y de CIT mediante TLC) de las cepas de *P. verrucosum* analizadas mediante RAPD.

Las cepas incluidas en el grupo A (BFE 487, BFE 514, BFE 520, BFE 522, BFE 537, BFE 538, BFE 540, BFE 542, BFE 549, CECT 2320 e IBT 12803) presentan el siguiente patrón: una banda de unas 2300 pares de bases, un doblete de 1600 y 1700 pares de bases respectivamente, una cuarta banda de unas 1300 pares de bases, una banda de unas 900 pares de bases, típica de este patrón, y un doblete cuyas bandas pesan entre 600 y 700 pares de bases. Las cepas incluidas en el grupo B (P105, P194, P198, P293, P297, P346, P364, P410, P437, P438, P440, BFE 488, BFE 496, BFE 500, BFE 506, BFE 521, BFE 524, BFE 526, BFE 527 e IMI 200.310) presentan el siguiente patrón: una banda de unas 2000 pares de bases, un doblete de 1800 y 1600 pares de bases respectivamente, un segundo doblete cuyas bandas pesan entre 1300 y 1400 pares de bases, una banda de unas 750 pares de bases y una última de unas 650 pares de bases.

Todas las cepas aisladas en nuestro laboratorio presentaron el patrón de bandas del grupo B (Figura 10).

La Tabla 34 resume los resultados obtenidos respecto a la presencia de reverso marrón rojizo en el medio YES, la concentración de OA producida en CYA y en YES y la detección de CIT para las cepas de *P. verrucosum* ensayadas mediante RAPD en el presente trabajo (grupos A o B), mediante RAPD y AFLP en el de Castellá y colaboradores (grupos I o II) (79) y/o mediante análisis quimiotaxonómico en el de Larsen y colaboradores (*P. nordicum* o *P. verrucosum*) (244).

Figura 8. Secuencia del fragmento de DNA ITS1-5.8S-ITS2 del rDNA de las cepas estudiadas. Las diferencias obtenidas entre las cepas de *P. verrucosum* se presentan encuadradas y las obtenidas entre las cepas de las restantes especies respecto a la secuencia de *P. verrucosum* están marcadas en negra.

	1				50				100	
<i>P. verrucosum</i> BFE 487	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> BFE 488	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> BFE 496	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> BFE 500	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> BFE 506	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P293	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P297	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P346	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P364	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P410	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P437	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P438	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> P440	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> IMI 200.310	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. verrucosum</i> IBT 12803	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. viridicatum</i> NRRL 958	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCT TT GGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. viridicatum</i> NRRL 961	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCT TT GGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. solitum</i> NRRL 937	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTTTACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. glandicola</i> NRRL 2036	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATTACC	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TTT.ACCTTG	TTGCTTCGGC	GGGCCCGCCT
<i>P. glabrum</i> NRRL 766	CGTAGGTGAA	CCTGCGGAAG	GATCATT ACT	GAGTGAGGGC	CCTCTGGGTC	CAACCTCCCA	CCCGTGTTTA	TT G TACCTTG	TTGCTTCGG T	GGGCCCGCCT

(sigue)

(Figura 8, continúa)

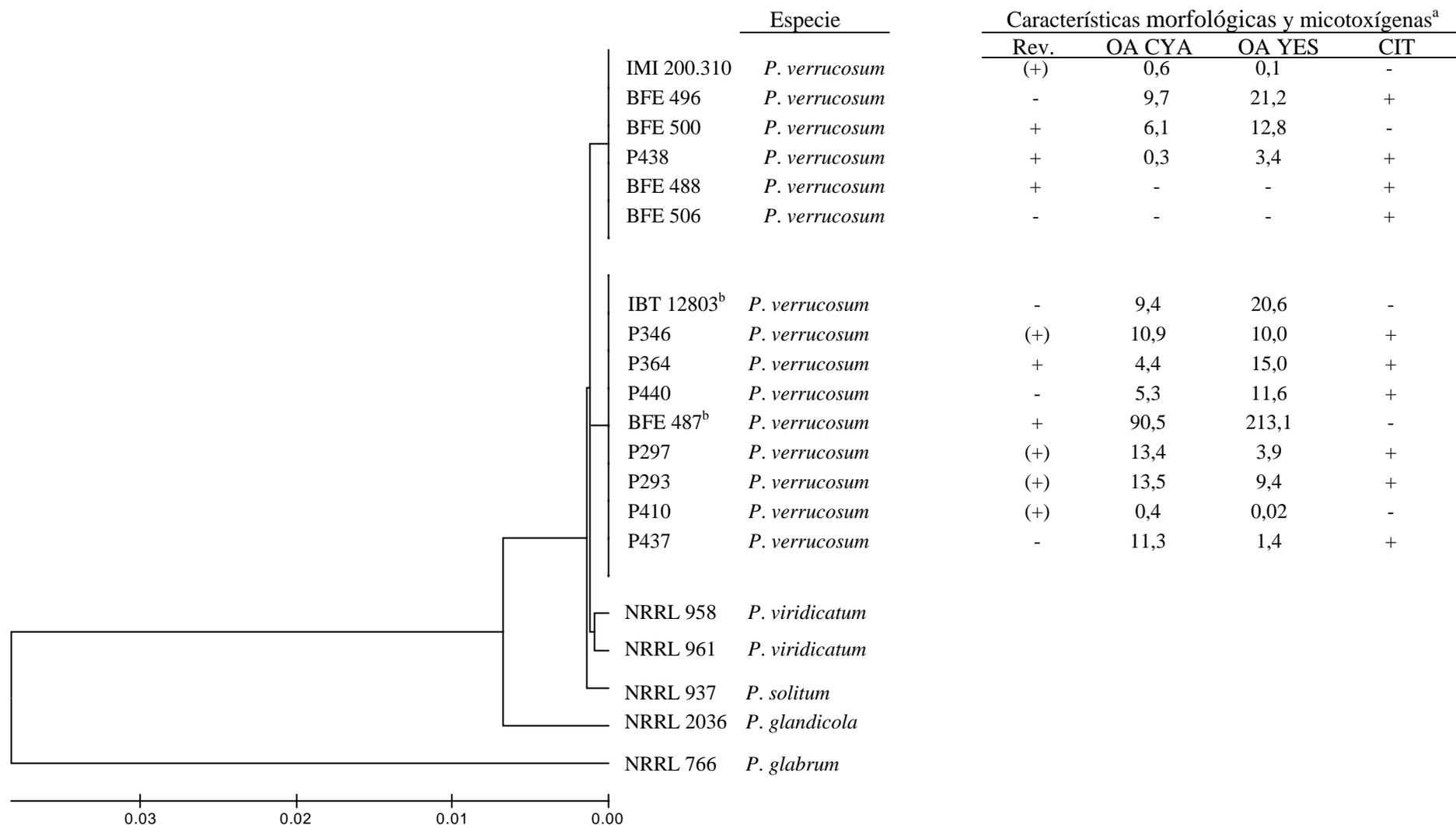
		101				150					200	
<i>P. verrucosum</i> BFE 487	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> BFE 488	TTGCTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> BFE 496	TTGCTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> BFE 500	TTGCTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> BFE 506	TTGCTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P293	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P297	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P346	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P364	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P410	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P437	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P438	TTGCTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> P440	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> IMI 200.310	TTGCTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. verrucosum</i> IBT 12803	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. viridicatum</i> NRRL 958	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. viridicatum</i> NRRL 961	TTACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT		
<i>P. solitum</i> NRRL 937	TA	ACTGGCCG	CCGGGGGGCT	CACGCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGAAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT	
<i>P. glandicola</i> NRRL 2036	TA	ACTGGCCG	CCGGGGGGCT	TAC	GTCCCCCG	GGCCCGCGCC	CGCCGAAGAC	ACCCTCGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGTAGTC	TGAGTGAAAA	TATAAATTAT
<i>P. glabrum</i> NRRL 766	CAC.	.GGCCG	CCGGGGGGCT	TCT	GGCCCCCG	GGTCCGCGCG	CACCCGAGAC	ACTATTGAAC	TCTGTCTGAA	GATTGCAGTC	TGAGCATAAA	.CTAAATAAG
		201				250					300	
<i>P. verrucosum</i> BFE 487	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> BFE 488	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> BFE 496	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> BFE 500	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> BFE 506	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P293	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P297	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P346	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P364	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P410	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P437	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P438	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> P440	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> IMI 200.310	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. verrucosum</i> IBT 12803	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. viridicatum</i> NRRL 958	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. viridicatum</i> NRRL 961	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. solitum</i> NRRL 937	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. glandicola</i> NRRL 2036	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATACGTAAT	GTGAATTGCA	.AATTCAGTG	AATCATCGAG		
<i>P. glabrum</i> NRRL 766	TTAAAAC	TTT CAACAACGGA	TCTCTTGGTT	CCGGCATCGA	TGAAGAACGC	AGCGAAATGC	GATAACTAAT	GTGAATTGCA	GAATTCAGTG	AATCATCGAG		

(sigue)

(Figura 8, continúa)

	501				550		565	
<i>P. verrucosum</i> BFE 487	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> BFE 488	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> BFE 496	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> BFE 500	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> BFE 506	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P293	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P297	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P346	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P364	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P410	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P437	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P438	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> P440	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> IMI 200.310	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. verrucosum</i> IBT 12803	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. viridicatum</i> NRRL 958	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. viridicatum</i> NRRL 961	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. solitum</i> NRRL 937	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. glandicola</i> NRRL 2036	GCCGATCAAC	CCAAATT..T	TTATCCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT
<i>P. glabrum</i> NRRL 766	GCCGA.CAAC	CAATCATCCT	TTTTTCAGGT	TGACCTCGGA	TCAGGTAGGG	ATACCCGCT.	GA	ACT

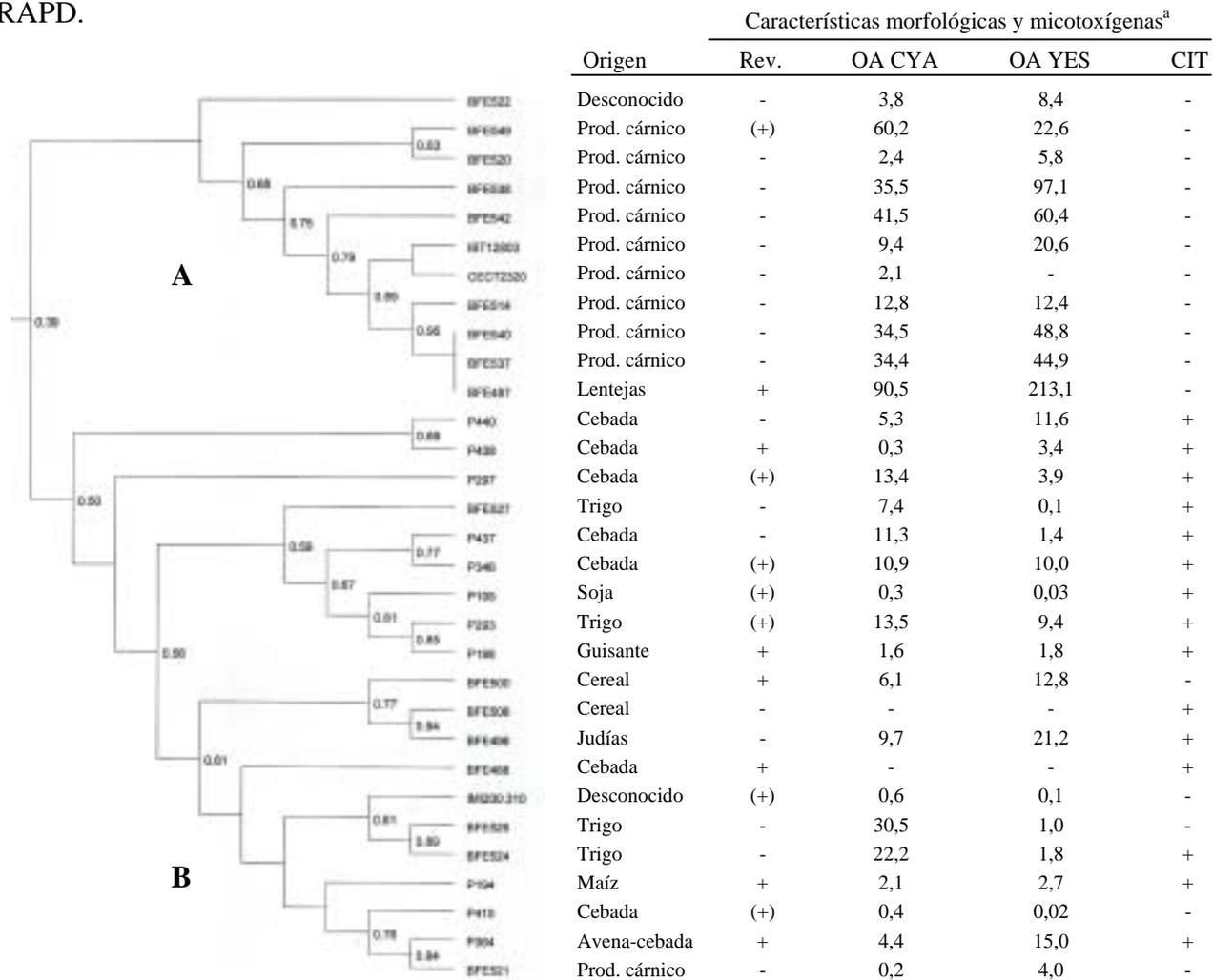
Figura 9. Representación del árbol Neighbor-Joining realizando el test 'Bootstrap' de las secuencias ITS1.5.8S-ITS2 analizadas y resumen de las características morfológicas y micotoxígenas de las cepas de *P. verrucosum* secuenciadas.



^a Rev., Presencia de coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia en YES, se indica (+) cuando la cepa presenta coloración marrón rojiza sólo en alguna zona de su reverso; OA, cuantificación ($\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo) de OA a partir de los medios CYA y YES; CIT, producción de CIT.

^b IBT 12803 clasificada como *P. nordicum* por Larsen y colaboradores (244); BFE 487 clasificada en el grupo I de Castellá y colaboradores (79).

Figura 10. Representación del árbol UPGMA y resumen de las características morfológicas y micotoxígenas de las cepas de *P. verrucosum* estudiadas mediante RAPD.



^a Rev., Presencia de coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia en YES, se indica (+) cuando la cepa presenta coloración marrón rojiza sólo en alguna zona de su reverso; OA, cuantificación ($\mu\text{g/g}$ de medio de cultivo) de OA a partir de los medios CYA y YES; CIT, producción de CIT.

Tabla 34. Resumen de los resultados obtenidos en las cepas de *P. verrucosum* ensayadas mediante RAPD, reverso en YES y producción de OA y CIT.

Cepa	Origen	Grupo ^a	RAPD	Rev. ^b	OA		CIT
					CYA	YES	
BFE 487	Lentejas	I	A	+	90,5	213,1	-
BFE 514	Prod. cárnico	I	A	-	12,8	12,4	-
BFE 520	Prod. cárnico	I	A	-	2,4	5,8	-
BFE 522	Desconocido	I	A	-	3,8	8,4	-
BFE 537	Prod. cárnico	I	A	-	34,4	44,9	-
BFE 538	Prod. cárnico	I	A	-	35,5	97,1	-
BFE 540	Prod. cárnico	I	A	-	34,5	48,8	-
BFE 542	Prod. cárnico	I	A	-	41,5	60,4	-
BFE 549	Prod. cárnico	I	A	(+) ^c	60,2	22,6	-
CECT 2320	Prod. cárnico	<i>P. nordicum</i>	A	-	2,1	-	-
IBT 12803	Prod. cárnico	<i>P. nordicum</i>	A	-	9,4	20,6	-
P105	Soja	ne	B	(+)	0,3	0,03	+
P194	Maíz	ne	B	+	2,1	2,7	+
P198	Guisante	ne	B	+	1,6	1,8	+
P293	Trigo	ne	B	(+)	13,5	9,4	+
P297	Cebada	ne	B	(+)	13,4	3,9	+
P346	Cebada	ne	B	(+)	10,9	10,0	+
P364	Avena-cebada	ne	B	+	4,4	15,0	+
P410	Cebada	ne	B	(+)	0,4	0,02	-
P437	Cebada	ne	B	-	11,3	1,4	+
P438	Cebada	ne	B	+	0,3	3,4	+
P440	Cebada	ne	B	-	5,3	11,6	+
BFE 488	Cebada	II	B	+	-	-	+
BFE 489	Judías	II	ne	+	0,1	0,5	-
BFE 490	Salvado trigo	II	ne	-	-	-	+
BFE 491	Salvado trigo	II	ne	+	0,03	-	-
BFE 492	Harina trigo	II	ne	+	0,7	83,3	+
BFE 493	Judías	II	ne	-	0,8	0,2	-
BFE 494	Judías	II	ne	-	0,02	4,2	-
BFE 495	Judías	II	ne	-	0,2	0,2	-

(sigue)

(Tabla 34, continúa)

Cepa	Origen	Grupo ^a	RAPD	Rev. ^b	OA		CIT
					CYA	YES	
BFE 496	Judías	II	B	-	9,7	21,2	+
BFE 497	Judías	II	ne	(+)	0,2	2,2	+
BFE 498	Judías	II	ne	(+)	0,05	0,04	-
BFE 499	Trigo	II	ne	+	-	-	+
BFE 500	Cereal	II	B	+	6,1	12,8	-
BFE 501	Cereal	II	ne	(+)	-	-	+
BFE 502	Cereal	II	ne	-	9,2	134,3	+
BFE 503	Cereal	II	ne	+	0,2	8,9	+
BFE 504	Cereal	II	ne	-	-	-	+
BFE 505	Cereal	II	ne	-	0,2	0,5	-
BFE 506	Cereal	II	B	-	-	-	+
BFE 507	Cereal	II	ne	(+)	0,8	16,7	+
BFE 521	Prod. cárnico	II	B	-	0,2	4,0	-
BFE 524	Trigo	II	B	-	22,2	1,8	+
BFE 526	Trigo	II	B	-	30,5	1,0	-
BFE 527	Trigo	II	B	-	7,4	0,1	+
IMI 200.310	Desconocido	<i>P. verrucosum</i>	B	(+)	0,6	0,1	-

^a Grupos I o II según los resultados de Castellá y colaboradores (79); *P. nordicum* o *P. verrucosum* según Larsen y colaboradores (244).

^b Rev., presencia de coloración marrón rojiza en el reverso de las colonias en YES.

^c (+), cepa que presenta coloración marrón rojiza sólo en alguna zona de su reverso.
ne, no ensayado.

5.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE OA Y CIT EN CEPAS DE *P. verrucosum*

5.4.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono

5.4.1.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre las características morfológicas macroscópicas

La Tabla 35 detalla la media y la desviación estándar del diámetro de las 6 colonias (3 de cada réplica) de las 5 cepas ensayadas en cada uno de los medios de cultivos empleados a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Los diámetros de las colonias desarrolladas en los diferentes medios de cultivo fueron analizados estadísticamente para cada cepa y tiempo de lectura. El resultado de este estudio estadístico mediante ANOVA se refleja en la misma tabla.

Asimismo, se detalla la media y la desviación estándar de los diámetros de las 5 cepas ensayadas. Esta media fue analizada mediante un test ANOVA para cada tiempo de lectura. A los 21 y 28 días de incubación, las colonias desarrolladas en los medios que contienen almidones como fuente de carbono presentaron mayores diámetros, en general, que las desarrolladas en medios elaborados con mono y disacáridos.

La Gráfica 2 muestra la media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en cada uno de los medios de cultivo empleados para cada tiempo de lectura.

La valoración morfológica macroscópica de las colonias a los 7 días de incubación se describe en la Tabla 36, según las abreviaciones descritas a continuación.

Colores:

A: azul	c: claro
Am: amarillo	o: oscuro
B: blanco	
Be: beige	
C: crema	

G: gris

I: incoloro (para el exudado)

M: marrón

N: naranja

Ne: negro

R: rosado

Rj: rojizo

V: verde

(Color): color presente sólo en alguna de las colonias

Micelio: Color-situación:

Situación: c: centro

t: todo

r: surcos radiales

a: anillo (de micelio estéril)

m: margen (seguido de la anchura del margen en mm.)

Textura: V: velutina

G: granular

Fl: flocosa

F: funiculosa

VG: combinación de las dos texturas en toda la colonia

VG-F(c): combinación de las dos texturas en toda la colonia y funiculosa en el centro de la colonia.

Surcos: B: botón elevado en el centro de la colonia

R: radiales

C: concéntricos

D: desorganizados

Grado de esporulación: según la proporción de superficie de la colonia que presenta esporulación, la textura de la colonia y la observación a bajos aumentos de la ésta:

-: nula

(+): baja

+: alta

++: muy alta

De las valoraciones morfológicas macroscópicas realizadas a los 14, 21 y 28 días de incubación podemos destacar la aparición de pigmento difusible entre naranja y marrón en todos los medios con mono y disacáridos a los 14 días en todas las cepas. En los medios con almidones el halo opaco presente a los 7 días de incubación se volvió transparente y apareció un ligero pigmento amarillo (rosado para la cepa BFE 506) entre los 14 y 21 días de incubación en las diferentes cepas. El grado de esporulación entre los distintos medios se fue equiparando a medida que aumentaba el tiempo de incubación. Desapareció el exudado a partir de los 21 días de incubación en todos los medios y para todas las cepas. El color de los conidios varió ligeramente entre los diferentes medios y tiempos de lectura de coloraciones mayoritariamente azules y verdes descritas a los 7 días de incubación (Tabla 36) a diferentes combinaciones de verde y gris en los posteriores tiempos de lectura.

5.4.1.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la detección de OA y CIT mediante TLC

La detección de OA y de CIT obtenida mediante TLC para 4 de las cepas de *P. verrucosum* ensayadas con diferentes fuentes de carbono a lo largo de 28 días a 25°C se reflejan en la Tabla 37. No se detectaron ninguna de las dos micotoxinas en los extractos de la cepa BFE 506. No se detectó OA en los extractos de la cepa BFE 488 ni CIT en los de las cepas BFE 487 y BFE 500. La detección de ambas micotoxinas se expresa en la tabla por comparación con la concentración de los patrones utilizados: 5 µg/ml para la OA (equivalente a 25 ng en el inóculo) y 100 µg/ml para la CIT (equivalente a 500 ng en el inóculo). Las cepas presentaron una producción de toxinas

mayor, en general, en los medios con mono y disacáridos respecto a los medios con almidones.

5.4.1.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC

En la Tabla 38 se detallan los valores obtenidos de la cuantificación (expresada en μg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA elaborada por las cepas que la han producido (BFE 487, BFE 496 y BFE 500). No se detectó presencia de OA mediante esta técnica en los extractos de las cepas BFE 488 y BFE 506 a partir de ninguna de las fuentes de carbono ensayadas. El valor presentado en la tabla corresponde a la media de 4 valores (2 cuantificaciones realizadas a cada una de las 2 réplicas). Las concentraciones de OA obtenidas por las cepas productoras fueron analizadas mediante un test de ANOVA para cada cepa y tiempo de lectura. La concentración de OA ha resultado ser significativamente diferente ($p=0,000$ para cada una de las cepas ensayadas en cada tiempo de lectura) en los distintos medios de cultivo ensayados.

Asimismo, en la Tabla 38 se detalla la media de la concentración de OA producida por las tres cepas para cada tiempo de lectura y medio de cultivo empleado. Este valor medio fue analizado, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA. Si agrupamos los resultados de los distintos mono y disacáridos y de los distintos almidones, se obtienen diferencias significativas al realizar la prueba de t-Student ($p=0,000$). Así, se obtuvo una mayor producción de OA en los medios con mono y disacáridos que en los medios con almidones. A los 28 días de incubación, las concentraciones de OA detectadas fueron significativamente superiores en el medio con sacarosa y en el CYA a las obtenidas en el resto de medios.

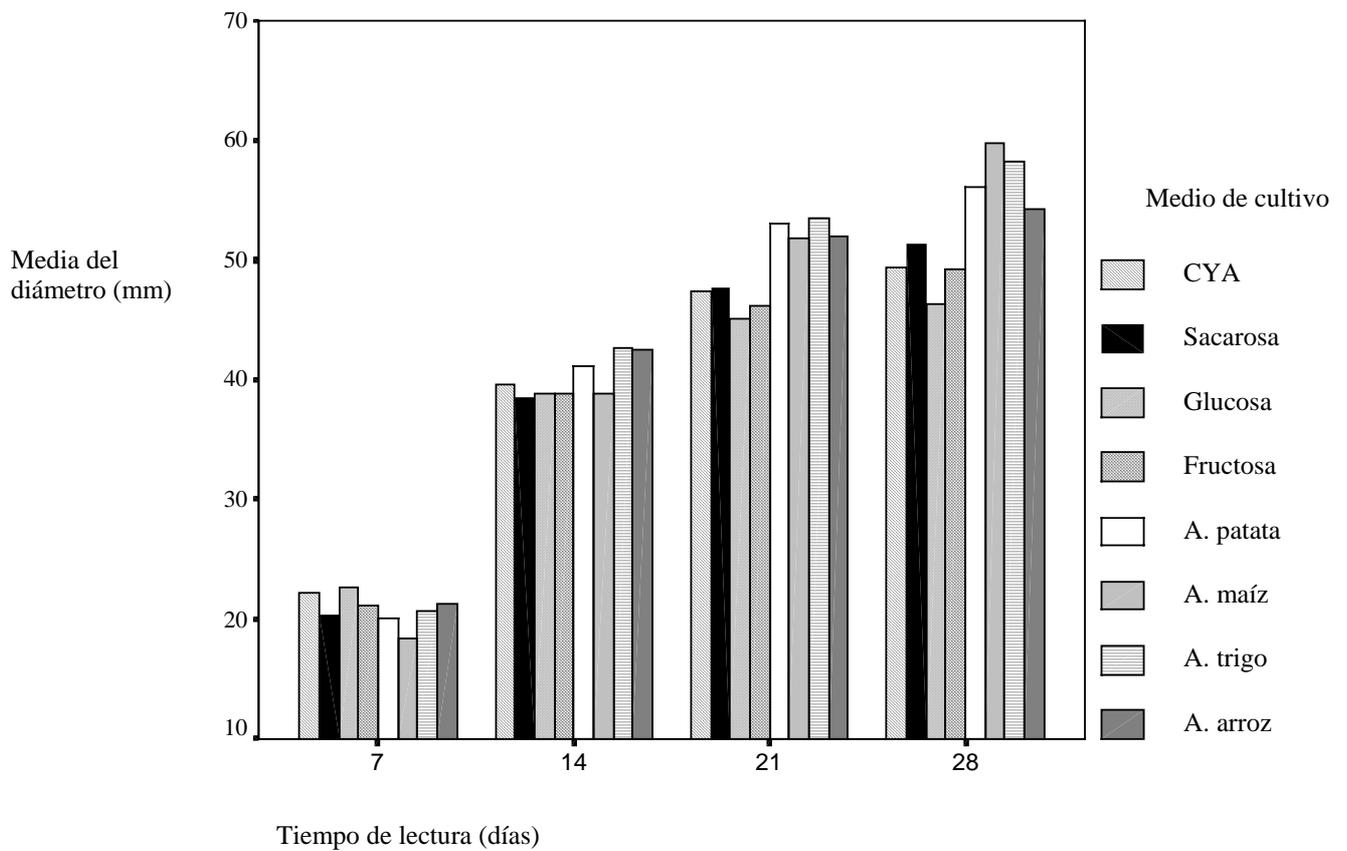
No se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,908$) entre las cuantificaciones de OA obtenidas de las 2 réplicas realizadas, según la prueba de t-Student.

La Gráfica 3 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496 y BFE 500 en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura. La cepa BFE 487 se incluyó en el estudio por producir una alta concentración de OA y realmente produjo una cantidad de OA muy superior a la obtenida por el resto

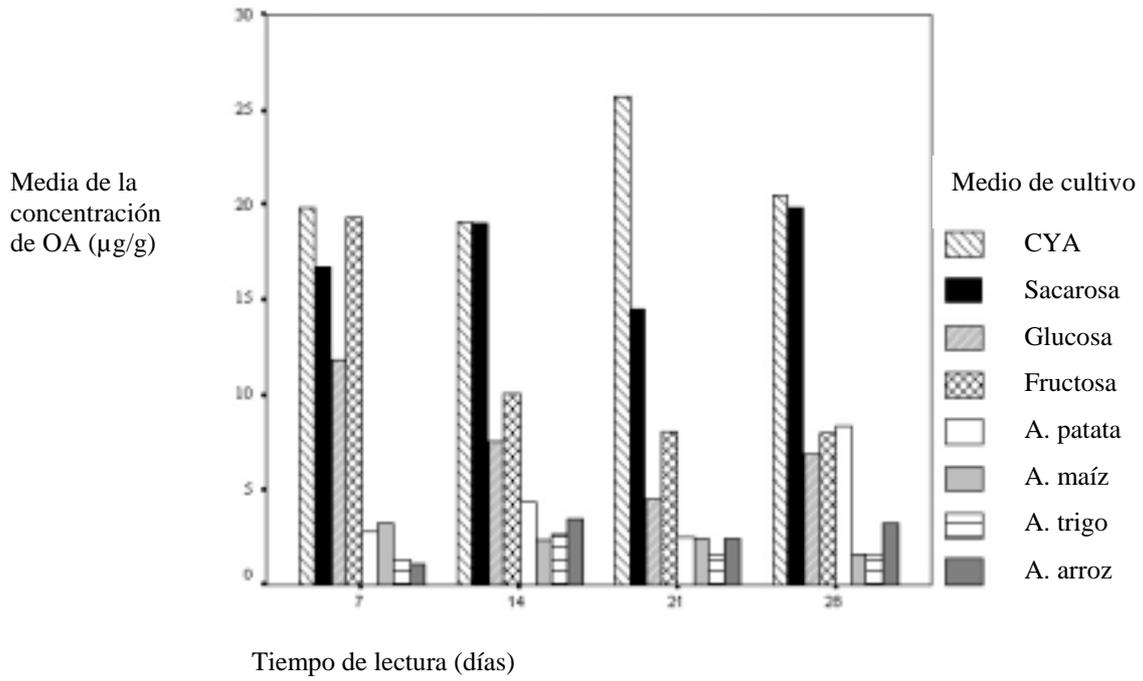
de cepas tanto en éste (Tabla 38), como en los restantes modelos (apartados 5.4.2.3., 5.4.3.3. y 5.4.4.3.). Debido a esta diferencia, los resultados de concentración media de OA producida siguen el comportamiento de esta cepa. Para valorar los efectos de cada factor sobre las cepas que producen una menor cantidad de OA, se realizó una segunda gráfica para cada ensayo con los resultados de la cuantificación de la OA eliminando los resultados de la cepa BFE 487. Así, la Gráfica 4 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496 y BFE 500 en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura.

En la Tabla 39 se resumen los valores medios de los diámetros de las cinco cepas ensayadas junto a los valores medios de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496 y BFE 500. Podemos destacar que la producción de OA en los medios con almidón es inferior, en general, a la obtenida en los medios con mono y disacáridos. Por el contrario, los diámetros de las colonias desarrolladas en estos medios son mayores que los obtenidos en los medios con mono y disacáridos a partir de los 21 días de incubación.

Gráfica 2. Media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en los medios de cultivo con diferente fuente de carbono a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.



Gráfica 3. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496 y BFE 500 en los medios de cultivo con diferente fuente de carbono a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.



Gráfica 4. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496 y BFE 500 en los medios de cultivo con diferente fuente de carbono a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.

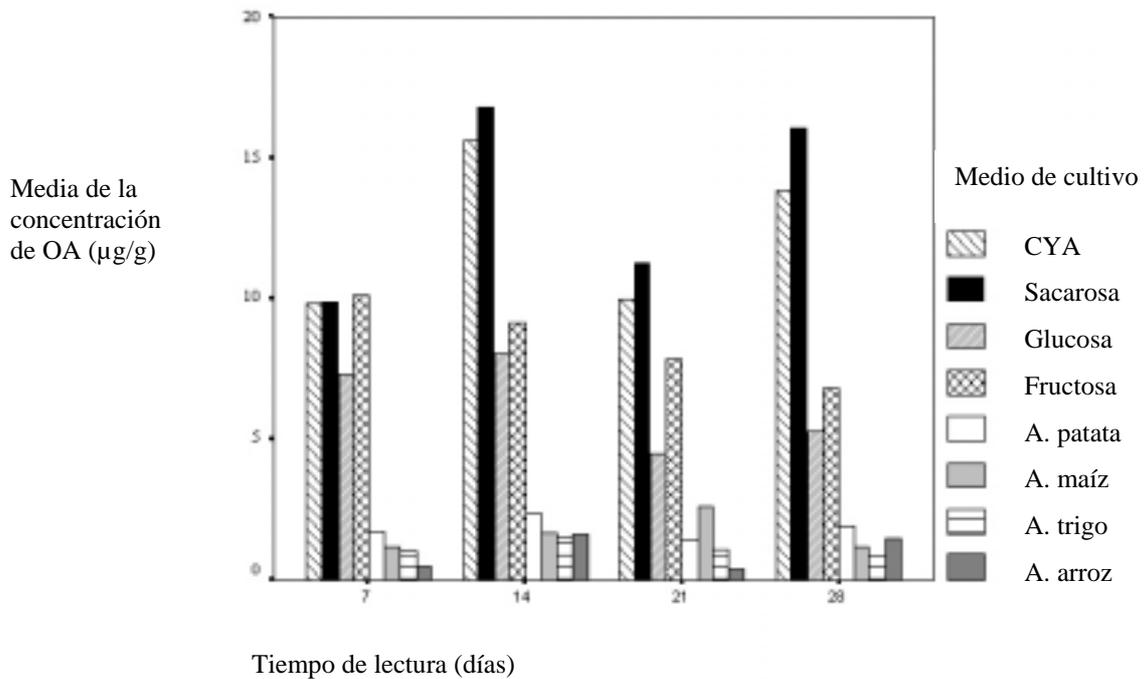


Tabla 35. Valores medios de los diámetros (en mm) y desviación típica de las colonias de *P. verrucosum* desarrolladas en los medios de cultivo con diferente fuente de carbono a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.

Cepa	Tiempo de lectura(días)	CYA	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Almidón de patata	Almidón de maíz	Almidón de trigo	Almidón de arroz	p
BFE 487	7	18,9 ± 0,8 ^a	15,8 ± 1,0 ^b	17,5 ± 0,5 ^c	15,5 ± 0,4 ^b	15,7 ± 0,1 ^b	13,6 ± 1,2 ^d	14,7 ± 0,4 ^b	17,3 ± 0,8 ^c	**
	14	34,5 ± 1,1 ^a	31,7 ± 1,1 ^b	32,0 ± 2,4 ^b	31,7 ± 0,9 ^b	33,2 ± 0,7 ^{ab}	29,5 ± 1,2 ^c	34,1 ± 0,7 ^a	38,9 ± 1,6 ^d	**
	21	47,5 ± 1,6 ^{abc}	46,8 ± 1,5 ^{abc}	42,1 ± 7,3 ^a	43,1 ± 3,6 ^{ab}	50,6 ± 2,0 ^{bc}	45,3 ± 1,3 ^{abc}	44,5 ± 6,9 ^{ab}	52,5 ± 4,1 ^c	**
	28	52,1 ± 3,0 ^{abc}	50,8 ± 2,1 ^{abc}	44,3 ± 9,4 ^a	46,1 ± 4,5 ^{ab}	57,8 ± 3,9 ^c	56,7 ± 4,4 ^c	48,7 ± 9,8 ^{abc}	55,5 ± 6,0 ^{bc}	**
BFE 496	7	18,8 ± 0,6 ^a	18,2 ± 0,7 ^a	20,7 ± 0,6 ^b	17,9 ± 0,3 ^a	18,1 ± 0,8 ^a	16,3 ± 1,0 ^c	18,5 ± 0,5 ^a	18,3 ± 1,0 ^a	**
	14	35,9 ± 2,0 ^{ab}	35,8 ± 1,7 ^{ab}	36,0 ± 3,1 ^{ab}	34,5 ± 1,9 ^a	39,6 ± 2,2 ^c	38,3 ± 3,1 ^{bc}	42,9 ± 2,0 ^d	43,0 ± 0,8 ^d	**
	21	44,0 ± 1,0 ^a	42,9 ± 3,4 ^a	43,5 ± 3,6 ^a	41,9 ± 3,4 ^a	55,0 ± 4,1 ^b	56,1 ± 4,5 ^b	60,2 ± 3,1 ^b	59,2 ± 5,0 ^b	**
	28	48,5 ± 2,6 ^a	50,9 ± 4,5 ^a	46,3 ± 5,3 ^a	46,9 ± 5,0 ^a	57,4 ± 4,8 ^b	64,2 ± 4,0 ^c	67,1 ± 2,7 ^c	63,0 ± 4,7 ^c	**
BFE 500	7	26,9 ± 0,6 ^a	24,2 ± 0,5 ^b	27,0 ± 0,5 ^a	26,5 ± 1,1 ^a	24,4 ± 0,8 ^b	22,1 ± 0,9 ^c	24,3 ± 0,7 ^b	25,3 ± 1,3 ^b	**
	14	46,5 ± 1,6 ^{abc}	44,0 ± 0,8 ^{ad}	42,9 ± 4,0 ^d	47,7 ± 1,1 ^{bce}	48,4 ± 0,9 ^{ce}	45,4 ± 1,4 ^{ab}	46,4 ± 1,1 ^{abc}	49,7 ± 0,6 ^e	**
	21	53,2 ± 2,8 ^a	52,7 ± 1,0 ^a	45,0 ± 4,4 ^b	55,3 ± 1,8 ^a	61,6 ± 1,5 ^c	60,0 ± 1,7 ^c	54,1 ± 3,0 ^a	61,4 ± 3,8 ^c	**
	28	53,4 ± 3,2 ^a	56,6 ± 1,2 ^{ab}	45,7 ± 4,3 ^c	60,0 ± 2,2 ^{bd}	66,9 ± 2,5 ^{ef}	69,4 ± 3,1 ^f	58,6 ± 6,4 ^b	64,0 ± 4,1 ^{de}	**
BFE 488	7	23,1 ± 0,9 ^a	21,6 ± 0,8 ^b	24,3 ± 0,4 ^c	22,0 ± 0,6 ^{ab}	20,5 ± 0,4 ^d	19,5 ± 1,2 ^d	20,5 ± 1,1 ^d	22,3 ± 0,5 ^{ab}	**
	14	40,8 ± 1,2 ^a	41,4 ± 1,2 ^{ab}	43,8 ± 2,1 ^b	40,3 ± 1,9 ^a	41,8 ± 2,5 ^{ab}	39,9 ± 1,9 ^a	41,7 ± 0,3 ^{ab}	41,5 ± 0,5 ^{ab}	**
	21	48,6 ± 1,6 ^a	51,5 ± 2,1 ^{ab}	53,0 ± 4,1 ^b	48,6 ± 2,8 ^a	48,9 ± 1,6 ^a	51,1 ± 2,2 ^{ab}	52,6 ± 1,0 ^b	42,2 ± 1,6 ^c	**
	28	49,2 ± 2,0 ^a	53,3 ± 2,8 ^{ab}	53,8 ± 4,7 ^{ab}	51,5 ± 3,4 ^{ab}	49,6 ± 1,8 ^a	55,0 ± 3,6 ^b	54,7 ± 2,8 ^b	43,1 ± 1,4 ^c	**
BFE 506	7	23,8 ± 1,0 ^a	22,2 ± 1,1 ^{bc}	23,8 ± 1,1 ^a	23,8 ± 0,7 ^a	21,6 ± 0,4 ^{cd}	20,6 ± 0,7 ^d	22,2 ± 0,7 ^{bc}	23,1 ± 1,1 ^{ab}	**
	14	40,7 ± 0,8 ^a	40,2 ± 0,9 ^a	39,8 ± 3,1 ^a	40,3 ± 1,3 ^a	42,9 ± 1,7 ^a	41,1 ± 1,3 ^a	45,4 ± 0,7 ^b	39,9 ± 2,7 ^a	**
	21	43,7 ± 1,7 ^{ab}	44,7 ± 1,0 ^{abc}	40,5 ± 1,6 ^a	41,9 ± 1,9 ^a	48,1 ± 3,7 ^c	46,8 ± 2,5 ^{bc}	53,0 ± 1,2 ^d	44,4 ± 4,5 ^{abc}	**
	28	43,5 ± 1,7 ^{ab}	45,0 ± 0,8 ^{bc}	39,5 ± 3,4 ^a	42,0 ± 1,9 ^{ab}	49,0 ± 4,0 ^c	54,0 ± 3,5 ^d	58,7 ± 1,8 ^e	45,6 ± 5,2 ^{bc}	**
Media	7	22,3 ± 3,3 ^{ab}	20,4 ± 3,2 ^{abc}	22,7 ± 3,5 ^a	21,2 ± 4,2 ^{ab}	20,1 ± 3,1 ^{bc}	18,4 ± 3,3 ^c	20,6 ± 3,1 ^{abc}	21,3 ± 3,2 ^{ab}	**
	14	39,7 ± 4,5 ^{ab}	38,6 ± 4,6 ^a	38,9 ± 5,0 ^a	38,9 ± 5,9 ^a	41,2 ± 5,2 ^{ab}	38,8 ± 5,6 ^a	42,1 ± 4,6 ^b	42,6 ± 4,1 ^b	**
	21	47,4 ± 3,8 ^a	47,7 ± 4,1 ^a	44,8 ± 5,7 ^a	46,2 ± 5,7 ^a	53,1 ± 5,6 ^b	51,9 ± 6,0 ^b	52,9 ± 5,9 ^b	52,0 ± 8,3 ^b	**
	28	49,3 ± 3,9 ^{ab}	51,3 ± 4,1 ^{ac}	45,9 ± 6,6 ^b	49,3 ± 7,0 ^{ab}	56,1 ± 7,1 ^{de}	59,8 ± 6,6 ^d	57,5 ± 7,7 ^{de}	54,2 ± 9,5 ^{ce}	**

a,b,c,d,e,f los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas entre ellos (p<0,05).

** diferencias significativas (p<0,01).

Tabla 36. Morfología macroscópica de las cepas de *P. verrucosum* a los 7 días de incubación en los medios con diferente fuente de carbono.

Cepa	Medio	Anverso		Reverso	Textura	Surcos	Pigmento difusible	Exudado	Grado de esporulación
		Micelio	Conidios						
BFE 487	CYA	B-c/m1	VAo	Mo-Mc	V	BRC	NM	Am	++
	Sacarosa	B-c/m1-2	VAo	Mo-Mc	V	BR	-	I	++
	Glucosa	B-c/m1	A	Mo-Mc	V	BR	NM	I	++
	Fructosa	B-t/m<1	VAc	Mo-Mc	V	BRC	-	I-Am	++
	A. patata	B-c/m<1	AV	NM-MGc	V-G(c)	R	-(h) ^a	I-Am	++
	A. maíz	B-c/m<1	AV	N-Mc	V-G(c)	RC	-(h)	I-Am-V	++
	A. trigo	B-c/m<1	AVo	NM-Mc	VG	R	-(h)	I-Am	++
	A. arroz	B-c/m<1	AVo	NM-MGc	VG-F(c)	R	-(h)	-	++
BFE 496	CYA	BC-m4	Vc	Mc	V	R-D(c)	NM	-	(+)
	Sacarosa	BC-m4	Vc	AmMc	V	R-D(c)	NM	-	(+)
	Glucosa	BR-m4	Vc	Mc	V	RC-D(c)	-	-	(+)
	Fructosa	BC-m4	Vc	MNc	V	RC-D(c)	-	-	(+)
	A. patata	BAmc-m5	VAc	Mc-Mo(c)	VFl	RC	-(h)	-	(+)
	A. maíz	BAmc-t	(VAc)	Mc-Mo(c)	V	RC-D(c)	-(h)	Am	(+)
	A. trigo	B-m4	Vc	Mc-Mo(c)	V-Fl(c)	R-D(c)	-(h)	-	(+)
	A. arroz	B-m3	VAc	Mc-Mo(c)	VFl	R-D(c)	-(h)	-	+
BFE 500	CYA	B-c	VGc	MAM-M(c)	V	BR	NM	Am	+
	Sacarosa	B	-	Am-Mc(c)	V	BRC	NM	-	(+)
	Glucosa	B	-	Am-MN(c)	V	BR	NM	I-Am	(+)
	Fructosa	BR-c/m	AGc	Am-MN(c)	V	BR	NM	I-Am	+
	A. patata	B-m4	AGc-V(c)	Mo	VG	R	-(h)	VNe	++
	A. maíz	BAm-c/m4	AGc	Mo	V	R	-(h)	Am	++
	A. trigo	B-m4	AGc-V(c)	Mo	VG	R	-(h)	Vo	++
	A. arroz	B-m4	AGc-V(c)	Mo	VG	R	-(h)	Vo	++
BFE 488	CYA	B	-	Mc-M(c)	V	BR	NM	I	(+)
	Sacarosa	B	-	Mc-MN(c)	V	R	NM	Am	(+)
	Glucosa	B/Am(c)	-	NAm	V	BRC	NM	I-Am	(+)
	Fructosa	B/Am(c)	-	NAm	V	BRC	NM	I	(+)
	A. patata	B-m3	AG	Mc-Mo(c)	V	R	-(h)	I-Am	++
	A. maíz	B-m3	Ac	Am-Mc(c)	V	R	-(h)	I-Am	++
	A. trigo	B-c/m4	AG	MG	VG	R	-(h)(t) ^b	Am-V	++
	A. arroz	B-c/m3	VG	MG	G-F(c)	R	-(h)(t)	I-Am	++
BFE 506	CYA	B-m<1	VGc	MG	V	CR	NM	Am	++
	Sacarosa	B-m1	VGAc	MG	V	CR	NM	Am	++
	Glucosa	B-m1	VGc	MRj	V	CR	NM	Am	++
	Fructosa	B-m1	VGc	MAM	V	CR	NM	Am	++
	A. patata	B-m<1	AG	MG	V-G(c)	R	-(h)	-	++
	A. maíz	B-m<1	VGA	MG	V-G(c)	R	-(h)	R	++
	A. trigo	B-a/m<1	AGV	MG	V-G(c)	R	-(h)	-	++
	A. arroz	B-a/m<1	AGVc	MG	VG	R	-(h)	-	++

^a (h), halo opaco alrededor de la colonia.

^b (t), pequeño halo transparente inmediatamente alrededor de la colonia (concéntrico e interior al halo opaco).

Tabla 37. Detección mediante TLC de OA y CIT producidas en los medios de cultivo con diferente fuente de carbono por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura (días)	CYA		Sacarosa		Glucosa		Fructosa		A. patata ^b		A. maíz		A. trigo		A. arroz	
		OA ^a	CIT ^a	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT
BFE 487	7	++ ^c	-	++	-	+	-	++	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
	14	++	-	++	-	+	-	++	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
	21	++	-	++	-	+	-	++	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
	28	++	-	++	-	+	-	++	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
BFE 496	7	+	+	+	+	+	+	+	++	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	14	++	++	++	++	++	++	++	++	(+)	++	(+)	+	(+)	+	(+)	++
	21	++	++	++	++	+	++	(+)	++	(+)	++	(+)	+	(+)	+	(+)	+
	28	++	++	++	++	+	++	+	++	(+)	++	(+)	++	(+)	++	(+)	++
BFE 500	7	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	++	-	++	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-
	21	++	-	++	-	+	-	++	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
	28	++	-	++	-	(+)	-	+	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
BFE 488	7	-	+	-	++	-	++	-	+	-	(+)	-	+	-	-	-	-
	14	-	++	-	++	-	++	-	++	-	+	-	+	-	(+)	-	+
	21	-	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)
	28	-	+	-	++	-	+	-	+	-	+	-	+	-	(+)	-	(+)

^a Detección semicuantitativa por comparación con los patrones utilizados: 25 ng de OA y 500 ng de CIT (a partir de soluciones de 5 µg/ml y de 100 µg/ml, respectivamente).

^b A. patata, almidón de patata; A. maíz, almidón de maíz; A. trigo, almidón de trigo; A. arroz, almidón de arroz.

^c ++, producción de toxina superior a la del patrón; +, producción de toxina similar a la del patrón; (+), producción de toxina inferior a la del patrón; -, no detección de toxina.

Tabla 38. Cuantificación (en µg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA producida en los medios con diferente fuente de carbono por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura(días)	CYA	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Almidón de patata	Almidón de maíz	Almidón de trigo	Almidón de arroz	p
BFE 487	7	39,7 ^a	25,3 ^b	20,9 ^c	37,9 ^a	5,2 ^{de}	6,9 ^d	1,6 ^e	2,1 ^e	**
	14	26,1 ^a	23,4 ^a	6,5 ^b	11,7 ^c	7,3 ^b	3,7 ^b	4,1 ^b	6,1 ^b	**
	21	49,1 ^a	23,1 ^b	4,7 ^c	8,4 ^c	4,3 ^c	2,3 ^c	2,0 ^c	4,1 ^c	**
	28	36,1 ^a	27,4 ^b	10,0 ^{cd}	10,4 ^{cd}	14,8 ^c	2,1 ^d	2,6 ^d	5,0 ^d	**
BFE 496	7	7,8 ^a	7,8 ^a	8,4 ^a	15,6 ^b	3,5 ^c	2,0 ^{cd}	1,9 ^{cd}	1,1 ^d	**
	14	13,4 ^a	13,4 ^a	9,6 ^b	12,6 ^a	5,2 ^c	2,7 ^c	2,5 ^c	2,8 ^c	**
	21	8,8 ^{ab}	8,4 ^{ab}	4,9 ^{bcd}	9,5 ^a	4,0 ^{cd}	5,9 ^{abc}	2,0 ^{cd}	1,0 ^d	**
	28	13,7 ^a	14,5 ^a	8,2 ^b	8,9 ^b	3,8 ^c	1,4 ^c	0,9 ^c	1,8 ^c	**
BFE 500	7	11,8 ^a	10,4 ^b	6,3 ^c	4,6 ^d	0,03 ^e	0,5 ^e	0,09 ^e	nd	**
	14	17,9 ^a	20,3 ^b	6,6 ^c	6,6 ^c	0,2 ^d	0,7 ^d	0,08 ^d	0,09 ^d	**
	21	12,4 ^a	14,1 ^b	3,9 ^c	5,8 ^d	0,2 ^e	1,0 ^e	0,2 ^e	0,1 ^e	**
	28	13,9 ^a	17,6 ^b	2,3 ^c	4,7 ^d	0,2 ^e	0,9 ^{ce}	0,4 ^e	0,07 ^e	**
Media	7	19,8 ^a	16,7 ^a	11,9 ^a	19,4 ^a	2,9 ^b	3,3 ^b	1,2 ^b	1,1 ^b	**
	14	19,1 ^a	19,0 ^a	7,6 ^b	10,1 ^b	4,4 ^c	2,4 ^c	2,7 ^c	3,5 ^c	**
	21	25,6 ^a	14,5 ^b	4,6 ^c	8,1 ^{bc}	2,6 ^c	2,5 ^c	1,6 ^c	2,5 ^c	**
	28	20,5 ^a	19,9 ^a	6,8 ^b	8,0 ^b	8,4 ^b	1,5 ^b	1,5 ^b	3,2 ^b	**

^{a,b,c,d,e} los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

** diferencias significativas (p<0,01).

nd, no detectada.

Tabla 39. Valor medio y desviación estándar de los diámetros de las cinco cepas ensayadas y valor medio de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496 y BFE 500 en cada uno de los medios ensayados a los 4 tiempos de lectura realizados.

Valor medio	Tiempo de lectura (días)	Medio de cultivo								p
		CYA	Sacarosa	Glucosa	Fructosa	Almidón de patata	Almidón de maíz	Almidón de trigo	Almidón de arroz	
Diámetro (mm)	7	22,3 ± 3,3 ^{ab}	20,4 ± 3,2 ^{abc}	22,7 ± 3,5 ^a	21,2 ± 4,2 ^{ab}	20,1 ± 3,1 ^{bc}	18,4 ± 3,3 ^c	20,6 ± 3,1 ^{abc}	21,3 ± 3,2 ^{ab}	**
	14	39,7 ± 4,5 ^{ab}	38,6 ± 4,6 ^a	38,9 ± 5,0 ^a	38,9 ± 5,9 ^a	41,2 ± 5,2 ^{ab}	38,8 ± 5,6 ^a	42,1 ± 4,6 ^b	42,6 ± 4,1 ^b	**
	21	47,4 ± 3,8 ^a	47,7 ± 4,1 ^a	44,8 ± 5,7 ^a	46,2 ± 5,7 ^a	53,1 ± 5,6 ^b	51,9 ± 6,0 ^b	52,9 ± 5,9 ^b	52,0 ± 8,3 ^b	**
	28	49,3 ± 3,9 ^{ab}	51,3 ± 4,1 ^{ac}	45,9 ± 6,6 ^b	49,3 ± 7,0 ^{ab}	56,1 ± 7,1 ^{de}	59,8 ± 6,6 ^d	57,5 ± 7,7 ^{de}	54,2 ± 9,5 ^{ce}	**
Concentración de OA (µg/g)	7	19,8 ^a	16,7 ^a	11,9 ^a	19,4 ^a	2,9 ^b	3,3 ^b	1,2 ^b	1,1 ^b	**
	14	19,1 ^a	19,0 ^a	7,6 ^b	10,1 ^b	4,4 ^c	2,4 ^c	2,7 ^c	3,5 ^c	**
	21	25,6 ^a	14,5 ^b	4,6 ^c	8,1 ^{bc}	2,6 ^c	2,5 ^c	1,6 ^c	2,5 ^c	**
	28	20,5 ^a	19,9 ^a	6,8 ^b	8,0 ^b	8,4 ^b	1,5 ^b	1,5 ^b	3,2 ^b	**

^{a,b,c,d,e} los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

** diferencias significativas (p<0,01).

5.4.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w

5.4.2.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre las características morfológicas macroscópicas

La Tabla 40 detalla la media y la desviación estándar del diámetro de las colonias de cada una de las cepas ensayadas en cada uno de los medios de cultivo empleados a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Los diámetros de las colonias desarrolladas en los diferentes medios de cultivo fueron analizados estadísticamente para cada cepa y tiempo de lectura. El resultado de este estudio estadístico mediante ANOVA se refleja en la misma tabla.

Asimismo, se detalla la media y la desviación estándar de los diámetros de las 5 cepas ensayadas. Esta media fue analizada, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA.

La Gráfica 5 muestra la media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en cada uno de los medios de cultivo empleados para cada tiempo de lectura.

La valoración morfológica macroscópica de las colonias a los 7 días de incubación se describe en la Tabla 41, según las abreviaciones descritas en el apartado 5.4.1.1.

De las valoraciones morfológicas macroscópicas realizadas a los 14, 21 y 28 días de incubación, podemos destacar la mayor presencia de pigmento en cada tiempo de lectura, presentándose en menor cantidad en los medios con menor actividad de agua. Paralelamente se observó un oscurecimiento del reverso de las colonias de todas las cepas, con colores marrones y anaranjados. Asimismo, el anverso fue pasando a colores que revelan el envejecimiento de las colonias, grises o grises verdosos. Estos cambios fueron más rápidos en los medios con mayor valor de a_w y más lentos en los que tenían menor a_w .

Como control de la evolución de la a_w del medio de cultivo a lo largo del estudio, se determinaron los valores de ésta al inicio y tras los 28 días de incubación en placas sin inocular que fueron mantenidas a 25°C. Los valores de a_w finales obtenidos fueron de

0,85; 0,87; 0,90; 0,93; 0,95; 0,98 y 0,99, para los medios que presentaban al inicio valores de a_w de 0,88; 0,90; 0,92; 0,94; 0,96; 0,98 y 0,99, respectivamente.

5.4.2.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre la detección de OA y CIT mediante TLC

En la Tabla 42 se reflejan los resultados de la producción de OA y de CIT obtenidos mediante TLC de las 5 cepas de *P. verrucosum* desarrolladas en los medios de cultivo con diferente valor de a_w a lo largo de los 28 días de incubación a 25°C. La detección de ambas micotoxinas se expresa por comparación con la concentración de los patrones utilizados: 5 µg/ml para la OA (equivalente a 25 ng en el inóculo) y 100 µg/ml para la CIT (equivalente a 500 ng en el inóculo). La cepa BFE 506, considerada como no productora de las dos micotoxinas ensayadas, produjo tanto OA como CIT en pequeñas cantidades a las actividades de agua de 0,92 a 0,96. No se detectó OA en ninguno de los extractos de la cepa BFE 488 ni CIT en los de las cepas BFE 487 y BFE 500.

5.4.2.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC

En la Tabla 43 se detallan los valores obtenidos de la cuantificación (expresada en µg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA elaborada por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506. El valor presentado corresponde a la media de cuatro valores (dos cuantificaciones realizadas a cada una de las 2 réplicas). No se detectó OA mediante esta técnica en ninguno de los extractos obtenidos para la cepa BFE 488. La cepa BFE 506, caracterizada como no productora de OA ni de CIT, ha elaborado OA durante todo el ensayo a los valores de a_w entre 0,92 y 0,96. Las concentraciones de OA obtenidas por las cepas productoras fueron analizadas estadísticamente mediante un test de ANOVA para cada cepa y tiempo de lectura.

La producción de OA ha resultado ser significativamente diferente ($p \leq 0,002$ para cada uno de los tiempos y cepas valorados) en los diferentes medios de cultivo ensayados. De las diferencias obtenidas se puede destacar que en los medios con una a_w de entre 0,94 y 0,96 se obtiene mayor producción de OA por parte de las 4 cepas. La cepa BFE 487 presentó una producción de OA similar a una a_w de 0,94 y de 0,96 (o ligeramente

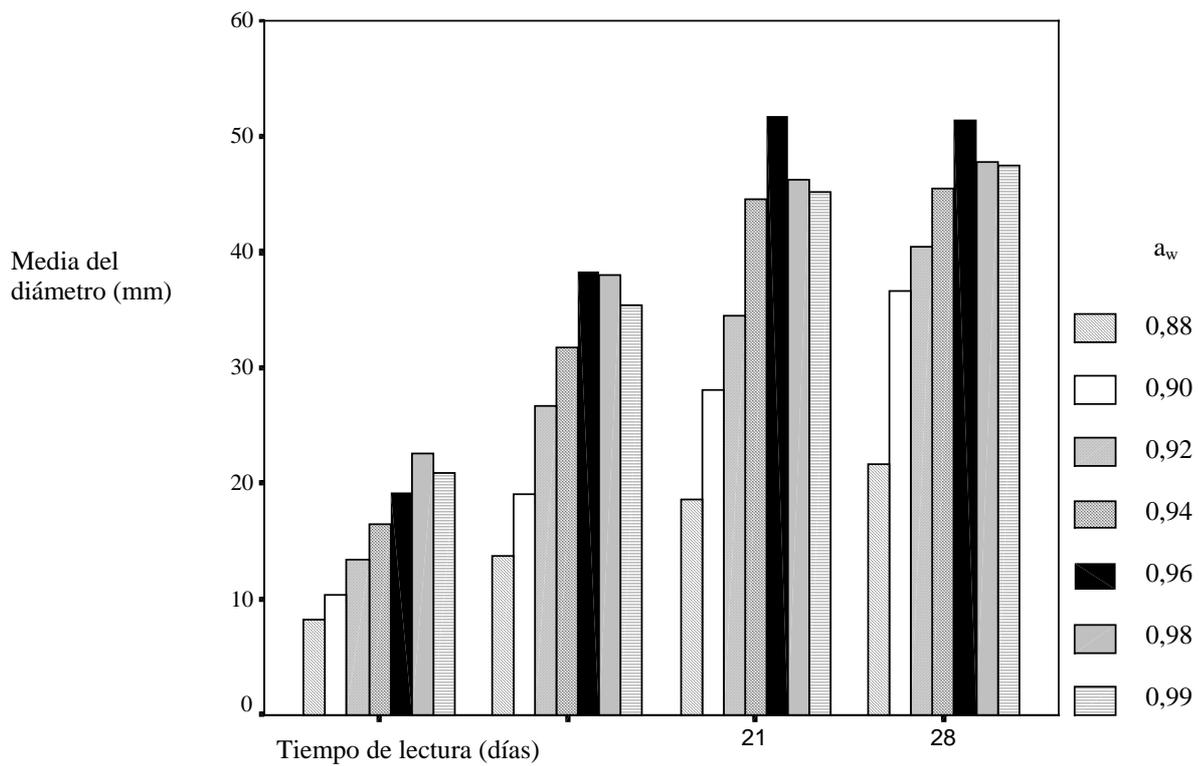
superior a 0,94), mientras la cepa BFE 496 produjo más cantidad de OA con una a_w de 0,96 que de 0,94 a lo largo de todo el ensayo. A los 7 días de incubación, sólo la BFE 487 presentó capacidad de elaborar trazas de OA en el medio con a_w de 0,88. Las cepas BFE 496 y BFE 500 también produjeron OA a esta a_w en al menos uno de los tiempos de lectura.

La media de la concentración de OA producida por las 4 cepas para cada tiempo de lectura y medio de cultivo empleado se detalla también en la Tabla 43. Este valor medio fue analizado, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA.

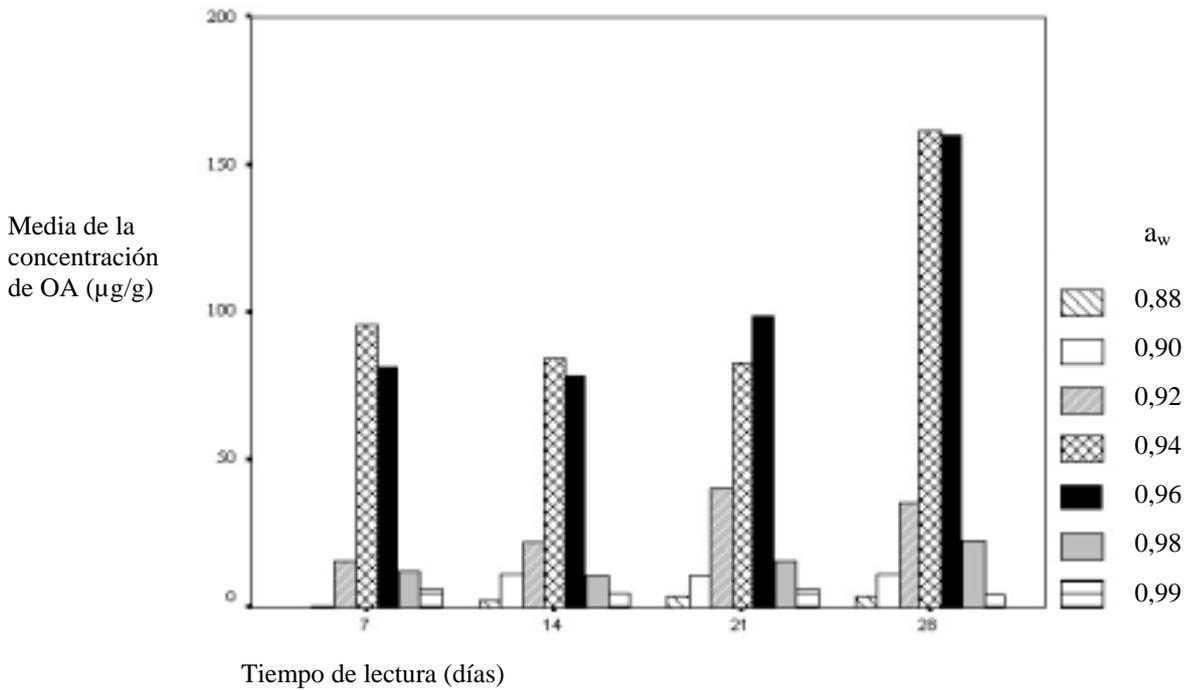
No se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,307$) entre las cuantificaciones de OA obtenidas en las 2 réplicas realizadas, según la prueba de t-Student.

La Gráfica 6 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura. La cepa BFE 487 produjo una cantidad de OA superior a la obtenida por el resto de cepas tanto en éste (Tabla 43) como en los restantes modelos (apartados 5.4.1.3., 5.4.3.3. y 5.4.4.3.). La Gráfica 7 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506, tras eliminar los resultados de la cepa BFE 487, en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura.

Gráfica 5. Media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en los medios de cultivo con diferente a_w a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.



Gráfica 6. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en los medios de cultivo con diferente a_w a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.



Gráfica 7. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en los medios de cultivo con diferente a_w a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.

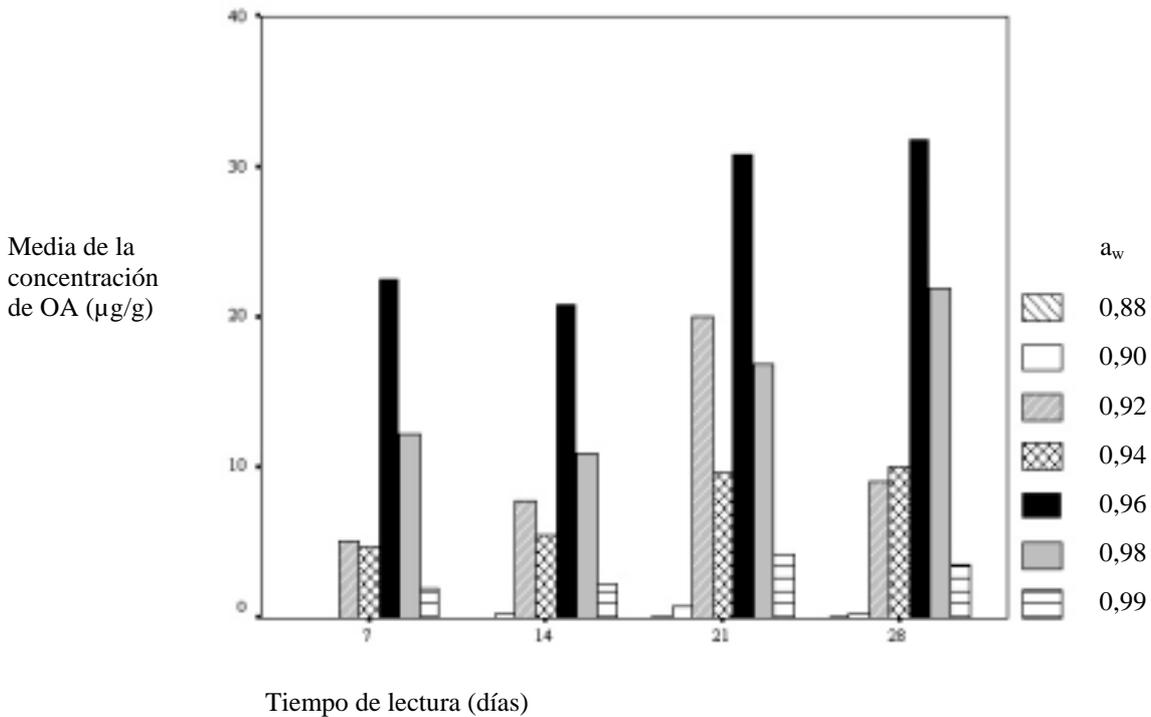


Tabla 40. Valores medios de los diámetros (en mm) y desviación típica de las colonias de *P. verrucosum* desarrolladas en los medios de cultivo con diferentes valores de a_w a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.

Cepa	Tiempo de lectura (días)	0,88	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99	p
BFE 487	7	7,9 ± 1,2 ^a	11,3 ± 0,4 ^b	15,2 ± 0,7 ^c	16,3 ± 1,0 ^d	19,2 ± 1,0 ^e	19,4 ± 0,4 ^e	19,1 ± 0,9 ^e	**
	14	15,7 ± 1,2 ^a	20,8 ± 0,8 ^b	27,6 ± 0,9 ^c	31,0 ± 1,4 ^d	39,4 ± 1,8 ^e	31,0 ± 1,3 ^d	31,1 ± 1,1 ^d	**
	21	22,5 ± 0,9 ^a	29,3 ± 0,9 ^b	45,2 ± 1,0 ^c	50,3 ± 3,2 ^d	56,4 ± 1,7 ^e	43,5 ± 2,6 ^c	45,9 ± 4,0 ^c	**
	28	26,1 ± 1,9 ^a	39,1 ± 2,5 ^b	49,7 ± 0,6 ^c	50,8 ± 4,7 ^c	54,6 ± 1,6 ^c	49,9 ± 2,4 ^c	50,1 ± 4,8 ^c	**
BFE 496	7	6,8 ± 0,5 ^a	9,5 ± 0,5 ^b	15,6 ± 0,7 ^c	17,7 ± 1,4 ^d	21,2 ± 1,9 ^e	25,6 ± 0,9 ^f	20,7 ± 1,2 ^e	**
	14	11,9 ± 1,6 ^a	18,7 ± 0,8 ^b	29,4 ± 0,9 ^c	34,8 ± 1,8 ^d	39,1 ± 1,7 ^e	41,7 ± 2,1 ^f	35,5 ± 1,3 ^d	**
	21	16,0 ± 2,0 ^a	31,3 ± 4,9 ^b	27,1 ± 0,6 ^c	44,0 ± 4,2 ^d	50,4 ± 2,8 ^e	46,5 ± 1,9 ^{de}	42,4 ± 3,3 ^d	**
	28	18,0 ± 2,7 ^a	38,5 ± 2,0 ^b	40,1 ± 2,1 ^b	44,5 ± 4,6 ^c	51,6 ± 5,4 ^d	45,8 ± 2,4 ^c	46,5 ± 2,8 ^c	**
BFE 500	7	8,0 ± 0,7 ^a	9,9 ± 0,3 ^b	12,3 ± 0,9 ^c	15,6 ± 0,8 ^d	18,8 ± 1,9 ^e	25,2 ± 1,1 ^f	20,8 ± 0,9 ^g	**
	14	13,2 ± 0,7 ^a	19,0 ± 1,1 ^b	23,6 ± 1,6 ^c	34,1 ± 1,8 ^d	42,1 ± 5,3 ^e	43,6 ± 1,3 ^e	36,2 ± 0,4 ^d	**
	21	17,9 ± 2,2 ^a	27,5 ± 2,5 ^b	34,3 ± 1,9 ^c	46,2 ± 4,9 ^d	57,6 ± 4,5 ^e	53,5 ± 2,8 ^e	45,4 ± 3,5 ^d	**
	28	22,1 ± 2,9 ^a	34,8 ± 3,1 ^b	38,4 ± 2,1 ^b	48,0 ± 4,0 ^c	56,5 ± 4,6 ^d	52,8 ± 2,3 ^d	46,7 ± 4,2 ^c	**
BFE 488	7	ig	7,7 ± 0,6 ^a	10,6 ± 0,7 ^b	14,1 ± 0,9 ^c	16,5 ± 0,9 ^d	19,0 ± 0,6 ^e	18,4 ± 1,0 ^e	**
	14	11,2 ± 0,7 ^a	14,5 ± 1,4 ^b	23,0 ± 3,9 ^c	25,1 ± 2,0 ^c	32,3 ± 2,6 ^d	36,1 ± 1,7 ^e	35,8 ± 1,3 ^e	**
	21	15,4 ± 0,9 ^a	22,8 ± 3,6 ^b	31,7 ± 1,9 ^c	35,0 ± 1,6 ^c	42,7 ± 4,5 ^d	45,1 ± 3,2 ^{de}	46,8 ± 2,4 ^d	**
	28	18,7 ± 1,0 ^a	31,1 ± 5,1 ^b	39,3 ± 1,8 ^c	39,5 ± 2,7 ^c	44,0 ± 5,7 ^{cd}	47,0 ± 2,4 ^d	47,7 ± 2,7 ^d	**
BFE 506	7	10,4 ± 0,3 ^a	14,1 ± 0,4 ^b	15,7 ± 1,1 ^c	18,4 ± 1,5 ^d	20,2 ± 1,1 ^e	23,9 ± 0,4 ^f	26,0 ± 0,4 ^g	**
	14	16,7 ± 1,0 ^a	22,5 ± 1,1 ^b	30,7 ± 4,6 ^c	33,5 ± 2,1 ^d	39,0 ± 2,1 ^e	38,1 ± 0,9 ^e	38,8 ± 0,6 ^e	**
	21	20,9 ± 1,0 ^a	29,9 ± 0,8 ^b	37,1 ± 1,5 ^c	47,1 ± 2,2 ^d	51,3 ± 2,5 ^e	42,4 ± 1,4 ^f	45,6 ± 2,5 ^d	**
	28	23,7 ± 0,4 ^a	39,9 ± 2,0 ^b	38,6 ± 0,5 ^b	44,3 ± 1,7 ^{cd}	51,0 ± 3,6 ^e	43,1 ± 1,7 ^c	46,7 ± 3,5 ^d	**
Media	7	8,3 ± 1,4 ^a	10,5 ± 2,3 ^b	13,7 ± 2,2 ^c	16,4 ± 1,6 ^d	19,2 ± 1,8 ^e	22,6 ± 3,1 ^f	21,0 ± 2,9 ^g	**
	14	13,7 ± 2,4 ^a	19,1 ± 2,9 ^b	26,8 ± 4,2 ^c	31,7 ± 3,9 ^d	38,4 ± 3,6 ^e	38,1 ± 4,8 ^e	35,5 ± 2,7 ^f	**
	21	18,6 ± 3,0 ^a	28,0 ± 4,4 ^b	34,5 ± 5,7 ^c	44,5 ± 5,8 ^d	51,7 ± 5,7 ^e	46,2 ± 4,6 ^d	45,2 ± 2,2 ^d	**
	28	21,7 ± 3,5 ^a	36,7 ± 4,7 ^b	40,5 ± 3,9 ^c	45,4 ± 4,7 ^d	51,5 ± 5,3 ^e	47,7 ± 3,7 ^d	47,6 ± 2,0 ^d	**

a,b,c,d,e,f,g los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

** diferencias significativas ($p < 0,01$).

ig, inicio de germinación (diámetro no valorable).

Tabla 41. Morfología macroscópica de las cepas de *P. verrucosum* a los 7 días de incubación en los medios con diferentes valores de a_w .

Cepa	Medio	Anverso		Reverso	Textura	Surcos	Pigmento difusible	Exudado	Grado de esporulación
		Micelio	Conidios						
BFE 487	0,88	B	(AG)	C	V	-	-	-	(+)
	0,90	B-m1	AG	GMc	V	DR	-	-	+
	0,92	B-m1	AG	GV	V	DR	-	-	+
	0,94	B-m1	AGc	GV	V	R	NMc	V	+
	0,96	B-c	AV	MV	VG	RC	NMc	I	+
	0,98	B-m2	AV	Mo-Mc	VG	RC	NMc	(I)	++
	0,99	B-c/m<2	AV	Mo-Mc	VG	RC	NMc	-	++
BFE 496	0,88	B	-	Amc	V	-	-	-	-
	0,90	B	-	Amc	V-G(c)	-	-	-	(+)
	0,92	B	AV-c	AmNc	V-F(c)	D(c)	Nc	-	(+)
	0,94	B	AG-c	AmNc	V-G(c)	D(c)	MNc	-	+
	0,96	B	AV-p	MNc	VFl	D-C(c)	MRj	-	+
	0,98	B	Vc-c	MNc	V	CD	MRj	-	+
	0,99	B	Vc-c	Mc-Mo(c)	V	C-D(c)	MNc	-	++
BFE 500	0,88	B	-	Amc	V	-	-	-	-
	0,90	B-c/m<1	VAG-	M	VG-Fl(c)	D	-	-	++
	0,92	B-c/m<1	VAG-	M	VG-Fl(c)	D	-	-	++
	0,94	B-m<1	AGc	Mo	VG	D	N	-	++
	0,96	B	AG-V	Mo	VG	D	NRj	-	++
	0,98	B	VA	Mo-Am(p)	VG	BRC	MRj	-	++
	0,99	B-m3	VA	Mo-Am(p)	V-G(c)	BRC	MRj	-	++
BFE 488	0,88	B	-	-	V	-	-	-	-
	0,90	B	AV	C	V	-	-	-	+
	0,92	B	VA	M	VG	-	-	-	+
	0,94	B	VA	MN	VG	-	NM	-	+
	0,96	B	Vc	MN	VG	-	NRj	-	+
	0,98	B-m3	VG	Mo-Mc(p)	V-G(c)	R-D(c)	NMc	I	++
	0,99	B-m2	VG	Mo-Mc(p)	VG	R-D(c)	NMc	I	++
BFE 506	0,88	B	Ac	C	V	D	-	-	+
	0,90	B	A	McV	V	D	-	-	+
	0,92	B	AG	GV	V	D	Am	-	+
	0,94	B	VG	McGV	V	D	NMc	-	++
	0,96	B	AVG	M-G(c)	V-G(c)	R	NMRj	-	++
	0,98	B-m<2	AVG	Mo-Mc(p)	V-G(c)	RC-D(c)	NMc	Am	++
	0,99	B	VA	Mc	VFl	BRC	NMc	-	++

Tabla 42. Detección mediante TLC de OA y CIT producidas en los medios con diferentes valores de a_w por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura (días)	0,88		0,90		0,92		0,94		0,96		0,98		0,99	
		OA ^a	CIT ^a	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT
BFE 487	7	- ^b	-	(+)	-	+	-	++	-	++	-	+	-	+	-
	14	(+)	-	+	-	+	-	++	-	++	-	(+)	-	(+)	-
	21	(+)	-	+	-	+	-	++	-	++	-	(+)	-	(+)	-
	28	(+)	-	+	-	++	-	++	-	++	-	(+)	-	(+)	-
BFE 496	7	-	(+)	-	(+)	+	(+)	+	++	++	++	++	++	(+)	++
	14	-	-	(+)	-	+	++	+	++	++	++	++	++	(+)	+
	21	-	-	(+)	-	+	++	+	++	++	++	++	++	(+)	+
	28	-	-	-	-	+	++	+	++	++	++	++	++	(+)	+
BFE 500	7	-	-	-	-	(+)	-	+	-	+	-	(+)	-	-	-
	14	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-
	21	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-	-
	28	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-	-
BFE 488	7	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	(+)	-	++	-	++	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	-	+	-	++	-	++	-	-	-	-
	28	-	-	-	-	-	(+)	-	++	-	+	-	-	-	-
BFE 506	7	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	(+) ^c	-	-	-	-
	21	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-
	28	-	-	-	(+) ^c	(+)	(+) ^c	(+)	(+) ^c	(+)	(+)	-	-	-	-

^a Detección semicuantitativa por comparación con los patrones utilizados: 25 ng de OA y 500 ng de CIT (a partir de soluciones de 5 µg/ml y de 100 µg/ml, respectivamente).

^b ++, producción de toxina superior a la del patrón; +, producción de toxina similar a la del patrón; (+), producción de toxina inferior a la del patrón; -, no detección de toxina.

^c CIT detectada únicamente en cromatoplaça impregnada previamente con ácido oxálico.

Tabla 43. Cuantificación (en µg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA producida en los medios con diferentes valores de a_w por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura(días)	0,88	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	0,99	p
BFE 487	7	+	2,3 ^a	47,9 ^a	322,2 ^b	245,3 ^c	13,3 ^a	16,3 ^a	**
	14	8,9 ^a	38,2 ^{ab}	64,9 ^b	281,0 ^c	222,8 ^d	10,4 ^a	11,9 ^a	**
	21	13,8 ^a	34,3 ^a	86,7 ^a	301,9 ^b	302,7 ^b	12,1 ^a	13,3 ^a	**
	28	16,9 ^a	33,8 ^a	114,2 ^a	616,2 ^b	544,6 ^b	24,3 ^a	8,7 ^a	**
BFE 496	7	nd	nd	14,3 ^a	11,2 ^a	73,4 ^b	39,4 ^c	6,1 ^a	**
	14	nd	0,4 ^a	22,2 ^{bc}	17,8 ^b	49,1 ^d	28,4 ^c	7,3 ^a	**
	21	0,1 ^a	1,7 ^a	44,1 ^b	23,2 ^c	84,4 ^d	54,5 ^b	11,5 ^{ac}	**
	28	nd	0,4 ^a	25,5 ^b	23,9 ^b	89,8 ^c	59,0 ^d	10,6 ^e	**
BFE 500	7	nd	nd	0,7 ^{ab}	2,7 ^c	4,8 ^d	1,4 ^b	0,1 ^a	**
	14	0,2 ^a	0,3 ^a	0,4 ^a	3,9 ^b	2,3 ^{ab}	1,6 ^{ab}	0,2 ^a	**
	21	0,1 ^a	0,8 ^{ab}	0,8 ^{ab}	4,8 ^c	6,5 ^d	1,8 ^b	0,05 ^a	**
	28	0,2 ^a	0,9 ^a	1,2 ^a	4,2 ^b	4,0 ^b	1,6 ^a	0,3 ^a	**
BFE 506	7	nd	nd	0,4 ^a	1,3 ^b	2,2 ^c	nd	nd	**
	14	nd	0,06 ^a	0,7 ^{ab}	1,1 ^b	1,4 ^b	0,2 ^a	0,1 ^a	**
	21	nd	nd	0,4 ^a	1,1 ^b	1,8 ^c	nd	nd	**
	28	nd	nd	0,3 ^a	2,2 ^b	1,4 ^{ab}	nd	nd	**
Media	7	nd	0,6 ^a	15,8 ^a	95,4 ^b	81,9 ^b	12,5 ^a	6,0 ^a	**
	14	2,6 ^a	11,1 ^a	22,1 ^a	84,2 ^b	78,6 ^b	10,8 ^a	5,1 ^a	**
	21	4,0 ^a	10,4 ^a	40,5 ^{ab}	82,7 ^{ab}	98,8 ^b	16,1 ^a	6,1 ^a	**
	28	4,3 ^a	11,5 ^a	35,3 ^a	161,6 ^b	160,0 ^b	22,5 ^a	4,7 ^a	**

+, trazas; nd, no detectada.

^{a,b,c,d,e} los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

** diferencias significativas ($p < 0,01$).

5.4.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH

5.4.3.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre las características morfológicas macroscópicas

La Tabla 44 detalla la media y la desviación estándar del diámetro de las colonias de cada una de las cepas ensayadas en cada uno de los medios de cultivo empleados a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación. Los diámetros de las colonias desarrolladas en los diferentes medios de cultivo fueron analizados estadísticamente para cada cepa y tiempo de lectura. El resultado del estudio estadístico mediante test de ANOVA se detalla en la misma tabla. Asimismo, se detalla la media y la desviación estándar de los diámetros de las 5 cepas ensayadas. Esta media fue analizada, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA.

La Gráfica 8 muestra la media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en cada uno de los medios de cultivo empleados para cada tiempo de lectura.

La valoración morfológica macroscópica de las colonias a los 7 días de incubación se describe en la Tabla 45, según las abreviaciones descritas en el apartado 5.4.1.1. A los 7 días de incubación, no se presentó crecimiento de ninguna de las cepas ensayadas en el medio de cultivo con pH ajustado a 2.

De las valoraciones morfológicas macroscópicas realizadas a los 14, 21 y 28 días de las colonias obtenidas, podemos destacar la presencia de pigmento difusible de color entre naranja y marrón a partir de los 14 días de incubación en todas las cepas excepto la cepa BFE 496. Esta cepa presentó, en los medios de pH inferior a 7, un pigmento amarillo durante los 28 días de incubación, mientras en los restantes medios este pigmento fue similar al de las restantes cepas. Las cepas BFE 488 y BFE 506 presentaron exudado amarillo en la lectura de 14 días, que desaparece entre los 21 y 28 días de incubación. Las cepas BFE 496 y BFE 500 no presentaron exudado en ninguno de los tiempos de lectura. Las coloraciones de las colonias fueron variando gradualmente a tonos más verdes y grises a lo largo de la duración del ensayo.

Cabe destacar que la cepa BFE 487 fue la única que presentó crecimiento a pH 2 a partir de los 14 días de incubación. Las colonias desarrolladas estaban ligeramente esporuladas, con color azul-verdoso oscuro y reverso marrón claro. Estas colonias presentaron exudado transparente a los 21 y 28 días de incubación.

5.4.3.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre la detección de OA y CIT mediante TLC

En la Tabla 46 se reflejan los resultados de la producción de OA y de CIT obtenidos mediante TLC de las 5 cepas de *P. verrucosum* desarrolladas en los medios de cultivo con diferente valor de pH a lo largo de los 28 días de incubación a 25°C. La detección de ambas micotoxinas se expresa por comparación con la concentración de los patrones utilizados: 5 µg/ml para la OA (equivalente a 25 ng en el inóculo) y 100 µg/ml para la CIT (equivalente a 500 ng en el inóculo). Cabe destacar que la cepa BFE 506, considerada como no productora de las dos micotoxinas ensayadas, ha elaborado CIT en pequeñas cantidades a pH 3 y 9.

5.4.3.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC

En la Tabla 47 se reflejan los valores obtenidos de la cuantificación (expresada en µg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA elaborada por las cepas ensayadas. El valor presentado en la tabla corresponde a la media de cuatro valores (2 cuantificaciones realizadas a cada una de las 2 réplicas). No se detectó presencia de OA mediante esta técnica para ninguno de los valores de pH ensayados para la cepa BFE 488. Se detectó OA por las 4 restantes cepas en los medios de cultivo con pH de 5 a 10 en al menos uno de los tiempos de lectura. Las concentraciones de OA obtenidas por las cepas productoras fueron analizadas estadísticamente para cada cepa y tiempo de lectura mediante test de ANOVA, tal como queda reflejado en dicha tabla.

La producción de OA ha resultado ser significativamente diferente ($p \leq 0,001$ para cada uno de los tiempos y cepas valorados) en los medios de cultivo ensayados. Se obtuvo una mayor producción de OA a partir de los valores de pH de entre 6 y 7 por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506, aunque a partir de los 21 días de incubación también

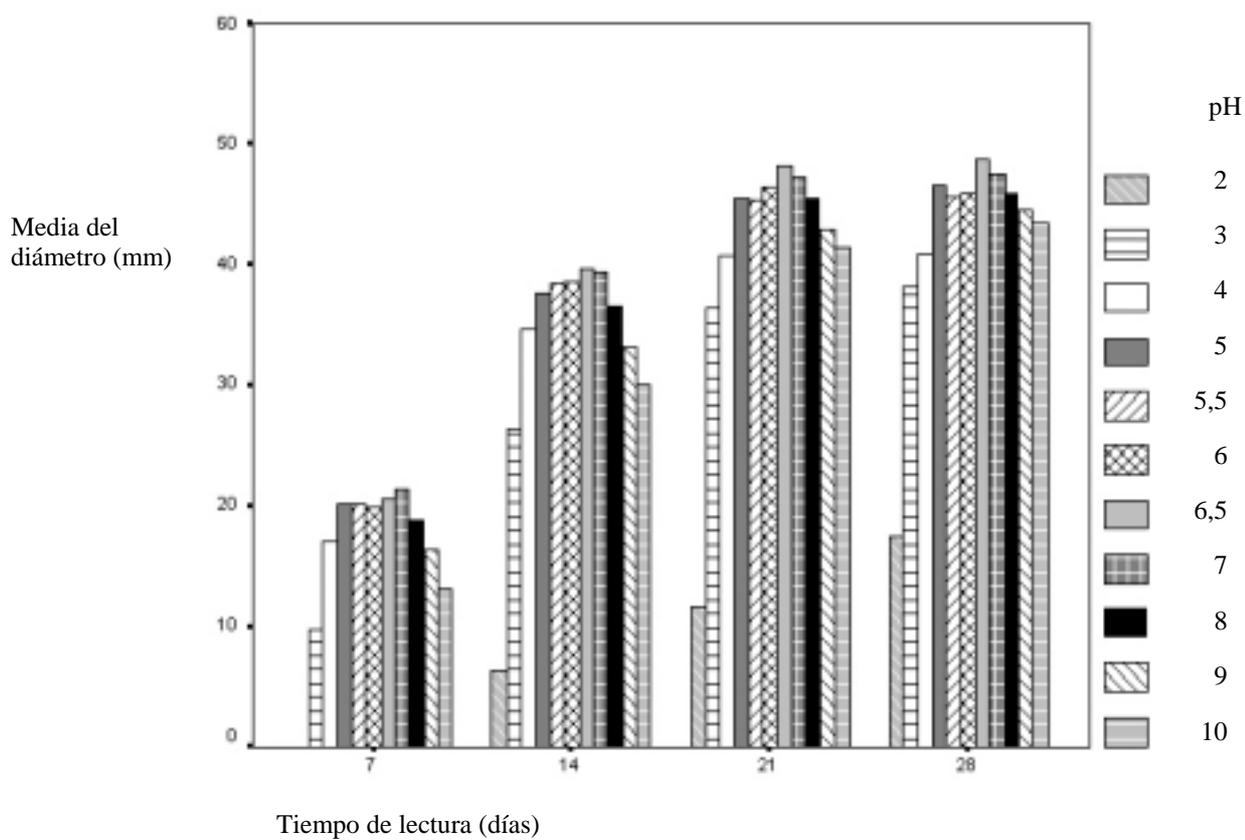
destaca la producción de OA obtenida a pH 9. La cepa BFE 487, en general, produjo más cantidad de OA cuánto más básico fue el pH del medio, llegando a su máximo en el medio con pH 10 (máximo valor ensayado).

La media de la concentración de OA producida por las cuatro cepas para cada tiempo de lectura y medio de cultivo empleado se detalla también en la Tabla 47. Este valor medio fue analizado, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA. Estos resultados no presentaron diferencias significativas entre los distintos valores de pH ensayados en ninguno de los tiempos de lectura.

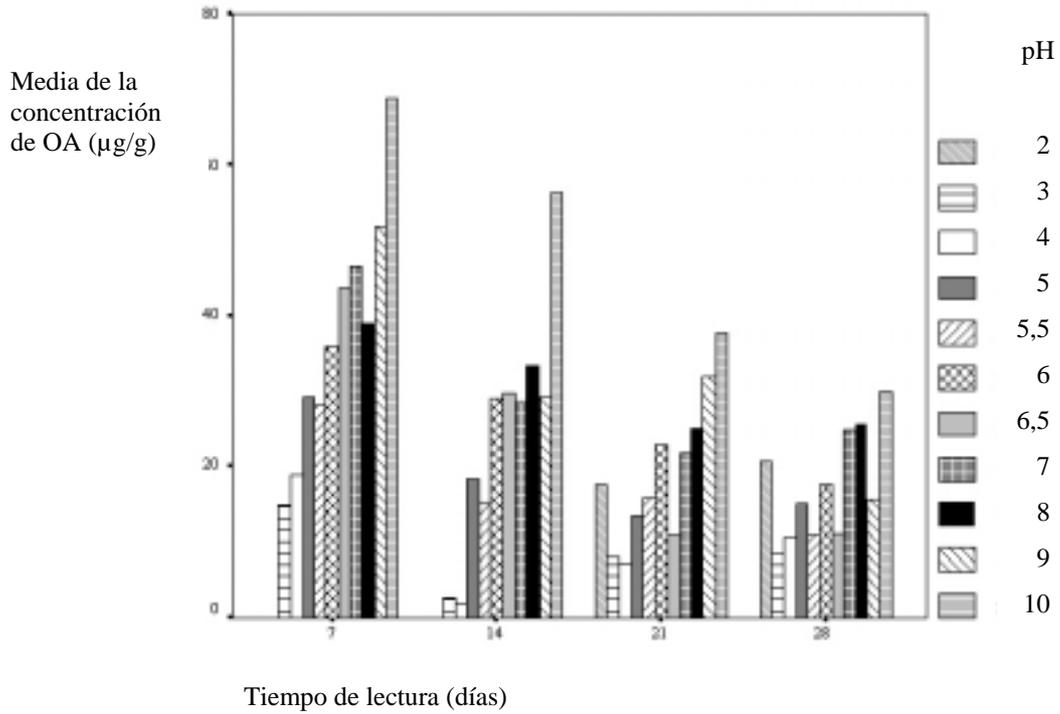
No se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,689$) entre los valores de la cuantificación de la OA obtenida en las 2 réplicas realizadas, según la prueba de t-Student realizada.

La Gráfica 9 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura. La cepa BFE 487 produjo una cantidad de OA superior a la obtenida por el resto de cepas tanto en éste (Tabla 47) como en los restantes modelos (apartados 5.4.1.3., 5.4.2.3. y 5.4.4.3.). La Gráfica 10 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506, tras eliminar los resultados de la cepa BFE 487, en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura.

Gráfica 8. Media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en los medios de cultivo con diferente pH a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.



Gráfica 9. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en los medios de cultivo con diferente pH a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.



Gráfica 10. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en los medios de cultivo con diferente pH a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.

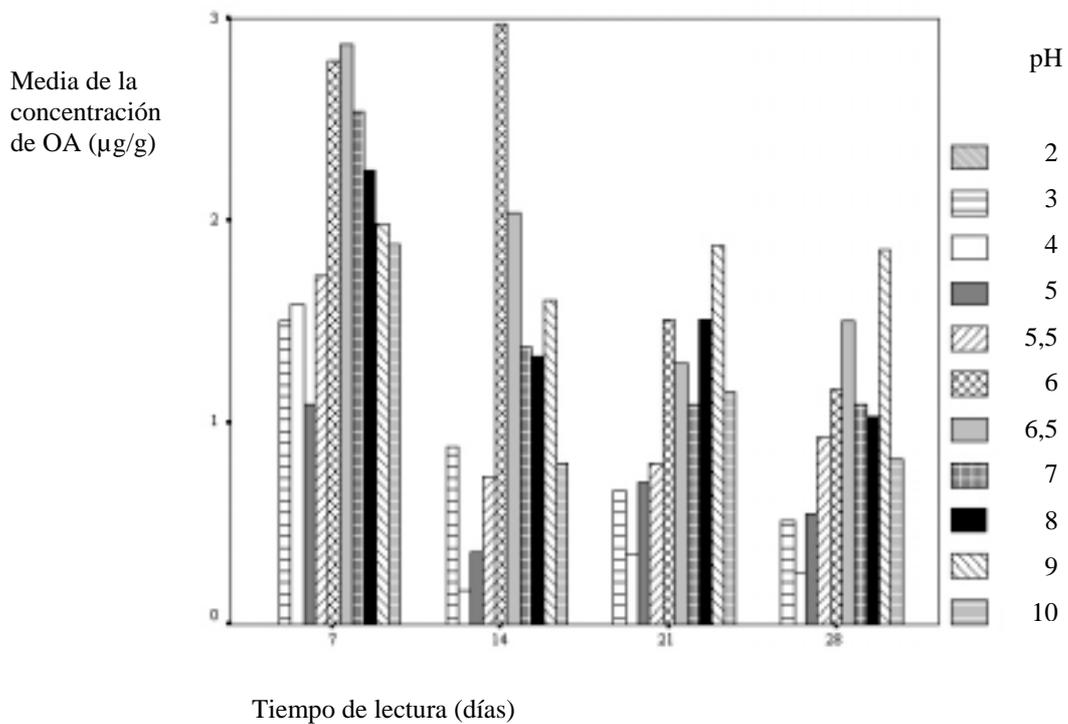


Tabla 44. Valores medios de los diámetros (en mm) y desviación típica de las colonias de *P. verrucosum* desarrolladas en los medios de cultivo con diferentes valores de pH a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación a 25°C.

Cepa	Tiempo (días)	2	3	4	5	5,5	6	6,5	7	8	9	10	p
BFE 487	7	nc	10,6 ± 0,9 ^a	18,2 ± 0,4 ^b	18,6 ± 0,5 ^b	19,5 ± 0,3 ^c	20,2 ± 0,5 ^{cd}	20,6 ± 0,6 ^{cd}	21,4 ± 1,0 ^d	21,4 ± 0,6 ^d	20,3 ± 1,3 ^{cd}	15,0 ± 1,3 ^e	**
	14	6,4 ± 1,0 ^a	25,5 ± 2,2 ^b	35,8 ± 0,6 ^c	36,6 ± 0,4 ^c	36,7 ± 0,3 ^c	38,9 ± 0,7 ^d	39,9 ± 0,5 ^d	39,8 ± 0,8 ^d	38,9 ± 1,7 ^d	34,4 ± 1,1 ^e	30,8 ± 1,4 ^f	**
	21	11,5 ± 1,2 ^a	40,1 ± 2,3 ^b	50,0 ± 1,1 ^{cd}	50,0 ± 1,2 ^{cd}	47,7 ± 2,4 ^{ce}	50,7 ± 2,6 ^{cd}	50,6 ± 3,7 ^{cd}	52,1 ± 3,1 ^d	51,9 ± 1,2 ^d	49,4 ± 1,9 ^{cd}	46,0 ± 1,9 ^e	**
	28	17,4 ± 1,8 ^a	42,7 ± 1,0 ^b	49,1 ± 1,1 ^{cd}	49,9 ± 1,1 ^{cd}	47,3 ± 1,7 ^c	50,7 ± 2,8 ^{cd}	51,0 ± 3,8 ^{cd}	51,3 ± 3,5 ^{cd}	51,6 ± 1,9 ^d	49,5 ± 2,1 ^{cd}	49,9 ± 2,5 ^{cd}	**
BFE 496	7	nc	11,7 ± 0,9 ^a	16,8 ± 0,7 ^b	20,6 ± 0,5 ^c	20,6 ± 0,3 ^c	19,6 ± 0,7 ^c	20,6 ± 0,4 ^c	19,7 ± 0,9 ^c	18,0 ± 1,3 ^d	16,4 ± 0,7 ^b	14,9 ± 0,5 ^e	**
	14	nc	25,6 ± 1,5 ^a	30,8 ± 0,9 ^b	35,9 ± 1,8 ^{cd}	37,1 ± 0,9 ^c	33,9 ± 1,6 ^{de}	35,8 ± 1,6 ^{cd}	35,9 ± 1,7 ^{cd}	34,3 ± 1,3 ^{de}	33,2 ± 0,8 ^e	29,6 ± 1,6 ^b	**
	21	nc	37,3 ± 1,8 ^a	38,0 ± 2,2 ^{ab}	41,0 ± 4,9 ^{abc}	44,6 ± 2,6 ^c	39,9 ± 3,4 ^{abc}	45,6 ± 4,2 ^c	43,8 ± 4,4 ^{bc}	42,8 ± 1,4 ^{abc}	40,8 ± 3,4 ^{abc}	41,0 ± 2,5 ^{abc}	**
	28	nc	38,9 ± 1,6 ^a	38,8 ± 1,3 ^a	42,4 ± 4,4 ^{ab}	47,0 ± 2,8 ^{bc}	41,0 ± 4,0 ^a	48,8 ± 4,8 ^c	47,4 ± 4,7 ^{bc}	44,6 ± 1,5 ^{abc}	43,8 ± 2,0 ^{abc}	40,5 ± 3,6 ^a	**
BFE 500	7	nc	12,8 ± 0,4 ^a	18,4 ± 0,2 ^b	21,0 ± 0,5 ^c	21,2 ± 1,2 ^c	22,6 ± 0,4 ^d	21,9 ± 0,6 ^{cd}	22,3 ± 0,8 ^d	21,0 ± 1,0 ^c	18,5 ± 0,9 ^b	16,3 ± 0,6 ^e	**
	14	nc	32,6 ± 3,2 ^a	39,8 ± 2,7 ^b	44,4 ± 2,4 ^c	43,9 ± 3,1 ^c	47,3 ± 1,1 ^c	47,1 ± 1,1 ^c	46,6 ± 1,6 ^c	44,8 ± 1,0 ^c	40,2 ± 2,6 ^b	38,4 ± 1,2 ^b	**
	21	nc	39,0 ± 6,3 ^a	40,3 ± 1,8 ^a	51,4 ± 5,1 ^{bc}	49,7 ± 4,4 ^{bc}	54,0 ± 1,6 ^b	53,9 ± 2,0 ^b	52,9 ± 1,3 ^{bc}	52,3 ± 1,3 ^{bc}	47,2 ± 3,2 ^c	48,3 ± 1,5 ^{bc}	**
	28	nc	37,3 ± 4,2 ^a	42,5 ± 2,8 ^b	52,0 ± 4,2 ^c	48,2 ± 3,8 ^c	51,4 ± 1,2 ^c	52,1 ± 1,2 ^c	50,3 ± 1,4 ^c	52,1 ± 2,7 ^c	48,1 ± 3,4 ^c	47,9 ± 3,9 ^c	**
BFE 488 ^j	7	nc	2,9 ± 0,2 ^a	10,2 ± 0,4 ^b	17,5 ± 0,7 ^c	17,4 ± 0,4 ^c	21,6 ± 0,2 ^d	22,3 ± 1,2 ^d	21,1 ± 0,7 ^d	7,1 ± 1,7 ^e	nc	2,7 ^a	**
	14	nc	14,1 ^a	29,4 ± 1,5 ^b	32,8 ± 1,5 ^c	34,8 ± 1,6 ^{cd}	37,9 ± 0,7 ^e	39,0 ± 2,3 ^e	36,7 ± 1,6 ^{de}	24,5 ± 2,1 ^f	22,8 ^f	19,2 ^g	**
	21	nc	25,8 ± 0,9 ^a	38,2 ± 3,7 ^{bc}	44,6 ± 3,3 ^d	41,9 ± 3,4 ^{cd}	44,0 ± 2,2 ^{cd}	44,4 ± 2,4 ^d	43,5 ± 2,6 ^{cd}	38,5 ± 2,1 ^{bc}	36,0 ^{bc}	32,0 ^e	**
	28	nc	32,8 ± 2,3 ^a	37,5 ± 2,3 ^{ab}	44,2 ± 2,1 ^b	41,9 ± 4,1 ^b	43,8 ± 1,2 ^b	43,1 ± 2,2 ^b	43,7 ± 2,8 ^b	39,4 ± 5,9 ^b	37,0 ^{ab}	37,4 ^{ab}	**
BFE 506	7	nc	4,7 ± 1,4 ^a	21,9 ± 0,7 ^b	21,8 ± 0,6 ^b	20,6 ± 0,6 ^b	14,9 ± 1,4 ^c	16,1 ± 2,9 ^c	22,3 ± 1,6 ^b	21,0 ± 1,0 ^b	8,9 ± 1,3 ^d	6,9 ± 0,8 ^e	**
	14	nc	22,8 ± 3,4 ^a	35,4 ± 1,4 ^{bc}	36,4 ± 1,1 ^{bc}	37,5 ± 1,5 ^b	33,3 ± 1,7 ^c	34,6 ± 1,5 ^{bc}	36,3 ± 0,5 ^{bc}	34,1 ± 3,4 ^{bc}	26,8 ± 0,7 ^d	23,1 ± 1,3 ^a	**
	21	nc	39,5 ± 4,0 ^a	36,2 ± 1,2 ^{ab}	40,0 ± 4,2 ^a	41,3 ± 4,2 ^a	37,7 ± 3,5 ^a	42,4 ± 1,2 ^a	41,6 ± 1,2 ^a	38,1 ± 4,7 ^a	36,0 ± 0,8 ^{ab}	31,7 ± 1,7 ^b	**
	28	nc	36,6 ± 2,7 ^a	36,0 ± 2,0 ^a	43,3 ± 4,5 ^a	41,4 ± 4,2 ^a	36,5 ± 1,6 ^a	44,0 ± 2,9 ^a	42,4 ± 1,6 ^a	38,8 ± 6,0 ^a	38,5 ± 1,2 ^a	36,6 ± 3,4 ^a	**
Media^k	7	nc	8,6 ± 4,1 ^a	17,1 ± 4,1 ^b	20,2 ± 1,6 ^{cd}	20,1 ± 1,3 ^{cd}	19,8 ± 2,7 ^{cd}	20,3 ± 2,5 ^{cd}	21,4 ± 1,2 ^c	17,8 ± 5,6 ^d	16,0 ± 4,7 ^b	12,1 ± 5,2 ^e	**
	14	6,4 ± 0,9 ^a	25,2 ± 5,8 ^b	34,6 ± 4,1 ^{ce}	37,7 ± 4,1 ^{de}	38,4 ± 3,3 ^{de}	38,2 ± 5,3 ^{de}	39,3 ± 4,9 ^d	39,3 ± 4,4 ^d	35,5 ± 7,0 ^{cde}	32,4 ± 6,0 ^c	29,2 ± 6,6 ^f	**
	21	11,5 ^a	36,3 ± 6,3 ^b	40,8 ± 5,5 ^{bc}	45,5 ± 5,7 ^{de}	45,4 ± 4,0 ^{cde}	46,1 ± 6,5 ^{cde}	47,7 ± 4,7 ^d	47,4 ± 5,2 ^{de}	44,8 ± 6,8 ^{cde}	42,6 ± 5,9 ^{cde}	40,7 ± 7,2 ^{bce}	**
	28	17,4 ± 1,4 ^a	37,7 ± 3,9 ^b	41,0 ± 5,3 ^{bc}	46,6 ± 5,1 ^{de}	45,5 ± 3,5 ^{de}	45,6 ± 5,7 ^{de}	48,3 ± 3,7 ^d	47,5 ± 4,0 ^{de}	45,6 ± 6,7 ^{de}	44,1 ± 5,1 ^{cde}	43,0 ± 6,2 ^{ce}	**

a,b,c,d,e,f,g,h,i los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

** diferencias significativas (p<0,01); n.s. diferencias no significativas; nc no crecimiento.

^j el diámetro de la cepa BFE 488 se obtuvo a partir de una sola colonia en los medios de cultivo con valor de pH 9 y 10.

^k la media del diámetro en el medio de cultivo de pH 2 corresponde al diámetro de la cepa BFE 487.

Tabla 45. Morfología macroscópica de las cepas de *P. verrucosum* a los 7 días de incubación en los medios con diferentes valores de pH.

Cepa	Medio	Anverso		Reverso	Textura	Surcos	Pigmento difusible	Exudado	Grado de esporulación
		Micelio	Conidios						
BFE 487	3	B-c/m2	Vo	BeAm	VG	B	-	I	++
	4	B-c/m2	Vo	MAM-Mc(c)	VG	R	-	Vo	++
	5	B-c/m2	Vo	MAM-Mc(c)	VG	RC	-	Vo	++
	5,5	B-c/m2	Vo	MAM-Mc(c)	VG	RC	-	Vo	++
	6	B-c/m2	Vo	MAM-Mc(c)	VG	RC	-	Vo	++
	6,5	B-c/m2	Vo	MAM-Mc(c)	VG	RC	-	Vo	++
	7	B-c/m2	VA-Vo(c)	MAM-Mc(c)	VG	BRC	NAm	V	++
	8	B-c/m2	VAo	MAM-M(c)	VG	RC	NMc	Am	++
	9	B-c/m2	VAo	MAM-M(c)	VG	RC	Mc	I	++
	10	B	(VAc-c)	MAM-Mo(c)	VG	R	-	I	+
BFE 496	3	B-c/m2	VAo	Mc	VFI	R	-	-	++
	4	B-m3	VAo	Am-NMc(c)	FI	BR	Am	-	++
	5	B-m4	VAG	Am-MRj(c)	FI	BR	Am	-	++
	5,5	B-m4	VAG	Am-MRj(c)	FI	BR	Am	-	++
	6	B-c/m5	VG	Am-Mo(c)	VFI	BR	Am	-	++
	6,5	B-c/m5	VG	Am-Mo(c)	VFI	BR	Am	-	++
	7	B-c/m5	VG	Amo-Mo(c)	VFI	BR	NMc	-	++
	8	B-c/m4	VAc	Am-Mc(c)	FI	BR-D(c)	NMc	-	++
	9	B-c/m4	VAc	Am-Mc(c)	FI	BR-D(c)	NMc	-	++
	10	B-m2	VAc	MAM-Mc(c)	FI	B-D(c)	NM	-	++
BFE 500	3	B-m1	VG	M-Am(m)	G	BR	-	-	++
	4	B-m2	VGo	MRj-Am(m)	VG	BRC	-	-	++
	5	B-m2	VGo	MRj-Am(m)	VG	BRC	-	-	++
	5,5	B-m2	VG	MRj-Am(m)	VG	BRC	-	-	++
	6	B-m2	VG	MRj-Am(m)	VG	BRC	NAm	-	++
	6,5	B-m2	VG	M-Mc(c)	VG	BRC	Amo	-	++
	7	B-c/m2	VG	M-Mc(c)	V	BRC	Amo	-	++
	8	B-c/m2	VGAo	M-NMc(c)	V	BRC	NM	-	++
	9	B-c/m2	VGAo	Mc-Am(c/m)	V	BRC	NM	-	++
	10	B-m2	V	MRj-Am(m)	V-G(c)	BRC	MRj	-	++

(sigue)

(Tabla 45, continúa)

Cepa	Medio	Anverso		Reverso	Textura	Surcos	Pigmento difusible	Exudado	Grado de esporulación
		Micelio	Conidios						
BFE 488	3	B-t/m1	VGo	Amo	VF	-	-	-	+
	4	B-m2	Vo	Am-Mc(c)	VG	R	-	-	++
	5	B-r/m1	VGo	Be-Mo(c)	VG-G(c)	R	-	I	++
	5,5	B-r/m1	VGo	Be-Mo(c)	VG-G(c)	R	-	I	++
	6	B-r/m3	VGo	Be-Mo(c)	V-G(c)	BR	-	-	++
	6,5	B-r/m3	VGo	Be-Mo(c)	V-G(c)	BR	-	-	++
	7	B-r/m3	VGo	Be-Mo(c)	V-G(c)	BR	-	-	++
	8	B-t/m3	VA	MNc	VFl	B	-	-	+
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	B	-	Amo	VFl	-	-	-	-
BFE 506	3	B-m<1	VGc	MNc	VFl	-	-	-	++
	4	B-m1	VG	Be	VG	BRC	-	-	++
	5	B-m2	VG	Be	VG	BR	-	-	++
	5,5	B-m2	VG	Be	VG-F(c)	RD	-	-	++
	6	B-m2	VGA	MGc	V	R	-	-	++
	6,5	B-m2	VGA	MGc	V	R	-	-	++
	7	B-m2	VG	MGc-Mo(c)	V-G(c)	BR	Mc	Am	++
	8	B-m2	VG	MGc	VG-F(c)	RCD	Mc	Mc	++
	9	B-m2	VG	MGc	VG	BR	-	-	++
	10	B-m2	VG	MN	VG	BR	-	-	++

Tabla 46. Detección mediante TLC de OA y CIT producidas en los medios con diferentes valores de pH por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	T (d) ^a	2		3		4		5		5,5		6		6,5		7		8		9		10	
		OA ^b	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT	OA	CIT
BFE 487	7	nc		++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
	14	- ^c	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
	21	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
	28	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-
BFE 496	7	nc		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	
	14	nc		(+)	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+
	21	nc		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	28	nc		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+	(+)	+
BFE 500	7	nc		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	14	nc		-	-	-	-	(+)	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	
	21	nc		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	28	nc		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
BFE 488	7	nc		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	14	nc		-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	21	nc		-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	
	28	nc		-	(+)	-	(+) ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)
BFE 506	7	nc		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	14	nc		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	21	nc		-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	
	28	nc		-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	

^a Tiempo de lectura (en días).

^b Detección semicuantitativa por comparación con los patrones utilizados: 25 ng de OA y 500 ng de CIT (a partir de soluciones de 5 µg/ml y de 100 µg/ml, respectivamente).

^c ++, producción de toxina superior a la del patrón; +, producción de toxina similar a la del patrón; (+), producción de toxina inferior a la del patrón; -, no detección de toxina.

^d CIT detectada únicamente en cromatoplaaca impregnada previamente con ácido oxálico.

Tabla 47. Cuantificación (en μg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA producida en los medios con diferentes valores de pH por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura(días)	2	3	4	5	5,5	6	6,5	7	8	9	10	p
BFE 487	7	nc	55,0 ^a	70,4 ^{ab}	92,5 ^b	106,7 ^{bc}	135,1 ^{cd}	166,0 ^{de}	178,4 ^e	149,0 ^{de}	189,0 ^e	269,9 ^f	**
	14	0,02 ^a	8,3 ^a	6,2 ^a	59,2 ^b	55,0 ^b	81,2 ^c	98,8 ^{cd}	82,8 ^c	113,4 ^d	98,2 ^{cd}	194,9 ^e	**
	21	17,8 ^a	30,3 ^a	24,1 ^a	45,6 ^b	53,1 ^{bc}	65,8 ^{cd}	58,8 ^{bcd}	68,4 ^d	83,9 ^e	80,0 ^e	110,7 ^f	**
	28	20,7 ^a	32,7 ^{ab}	27,8 ^{ab}	51,3 ^{cd}	40,8 ^{bc}	50,6 ^{cd}	39,7 ^{bc}	84,5 ^e	99,2 ^f	56,9 ^d	117,4 ^g	**
BFE 496	7	nc	4,5 ^a	4,7 ^a	4,5 ^a	5,0 ^a	8,4 ^b	8,5 ^b	7,6 ^{bc}	6,7 ^{cd}	7,2 ^{bc}	5,7 ^{ad}	**
	14	nc	2,3 ^{abc}	0,9 ^a	1,3 ^{ab}	2,0 ^{abc}	5,9 ^d	4,8 ^e	2,7 ^{bc}	3,3 ^{ef}	4,0 ^{ef}	2,0 ^{abc}	**
	21	nc	2,0 ^{ab}	1,7 ^a	1,7 ^a	2,0 ^{ab}	6,1 ^c	3,0 ^{bd}	2,4 ^{ab}	3,7 ^d	3,7 ^d	2,3 ^{ab}	**
	28	nc	1,5 ^{ab}	1,8 ^{ab}	1,3 ^a	2,7 ^{bc}	4,7 ^d	4,2 ^d	2,7 ^{bc}	3,1 ^c	5,6 ^e	2,4 ^{abc}	**
BFE 500	7	nc	nd	0,04 ^a	0,07 ^{ab}	0,01 ^a	nd	0,1 ^b	0,05 ^a	nd	0,03 ^a	nd	**
	14	nc	0,02 ^a	nd	0,2 ^b	0,06 ^a	0,06 ^a	0,3 ^c	0,03 ^a	0,02 ^a	nd	nd	**
	21	nc	nd	nd	nd	nd	nd	0,2 ^a	0,08 ^b	0,07 ^b	0,08 ^b	0,07 ^b	**
	28	nc	nd	nd	nd	nd	nd	0,3 ^a	0,06 ^b	nd	nd	nd	**
BFE 506	7	nc	nd	nd	0,1 ^a	0,2 ^a	0,02 ^b	0,02 ^b	0,02 ^b	0,02 ^b	0,02 ^b	+	**
	14	nc	nd	nd	+	0,08	0,06	+	0,1	0,06	0,06	+	*
	21	nc	nd	nd	0,01	0,01	nd	+	0,03	0,01	nd	+	n.s.
	28	nc	nd	nd	0,02	0,03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	n.s.
Media	7	nc	14,9	18,8	29,2	28,0	35,9	43,6	46,5	38,9	51,8	68,9	n.s.
	14	0,02	2,6	1,9	18,5	15,2	29,0	29,7	28,5	33,3	29,2	56,3	n.s.
	21	17,8	8,1	7,1	13,5	15,7	22,9	10,9	21,8	25,1	31,9	37,7	n.s.
	28	20,7	8,6	10,3	15,1	10,9	17,7	11,0	24,9	25,6	15,6	30,0	n.s.

nc, no crecimiento.

a,b,c,d,e,f,g los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas ($p < 0,05$).

** diferencias significativas ($p < 0,01$); * diferencias significativas ($p < 0,05$); n.s. diferencias no significativas.

+, trazas; nd, no detectada.

5.4.4. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación

5.4.4.1. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre las características morfológicas macroscópicas

En la Tabla 48 se detallan la media y la desviación estándar del diámetro de las colonias de cada una de las cepas ensayadas obtenidas en CYA a cada una de las temperaturas de incubación estudiadas tras 7, 14, 21 y 28 días. Ninguna cepa presentó crecimiento a la temperatura de 35°C. La cepa BFE 500 tampoco presentó crecimiento a 30°C. Los diámetros de las colonias desarrolladas a las diferentes temperaturas de incubación fueron analizados estadísticamente para cada cepa y tiempo de lectura. Los resultados del análisis estadístico mediante test de ANOVA se indican en la misma tabla.

Asimismo, se detalla la media y la desviación estándar de los diámetros de las 5 cepas ensayadas. Esta media fue analizada, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA.

La Gráfica 11 muestra la media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en CYA a las distintas temperaturas de incubación empleadas para cada tiempo de lectura.

La valoración morfológica macroscópica de las colonias a los 7 días de incubación se describe en la Tabla 49, según las abreviaciones descritas en el apartado 5.4.1.1.

De las valoraciones morfológicas macroscópicas realizadas a los 14, 21 y 28 días de incubación de las temperaturas de 10 a 25°C, podemos destacar que se encontró una mayor presencia de pigmento conforme aumentaba el tiempo de lectura. Éste se presentaba en mayor cantidad en las temperaturas de incubación de 15 a 25°C. Asimismo, las cepas de *P. verrucosum* presentaron exudado de color amarillo a marrón (excepto la cepa BFE 496, que no presentaba exudado) a los 14 días de incubación. La coloración del anverso de las colonias fue pasando a colores que revelan el envejecimiento de las colonias, grises o grises verdosos. Estos cambios fueron más rápidos en las colonias desarrolladas a las temperaturas de incubación de 15 a 25°C y

más paulatinos a las restantes temperaturas. Las colonias desarrolladas a 30°C continuaban presentando aspecto cerebriforme, surcos desorganizados y márgenes irregulares en todos los tiempos de lectura.

Cabe destacar que las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas presentaron crecimiento a 5°C. Mientras a los 7 días de incubación sólo se observaba el inicio de la germinación, tras 14 días de incubación se habían desarrollado colonias para las 5 cepas. La morfología de las colonias incubadas a esta temperatura fue similar a la obtenida en temperaturas óptimas de crecimiento, aunque la aparición de sus características fue más lenta. Estas colonias presentaron exudado y pigmento difusible a los 28 días de incubación. El grado de esporulación fue elevado a los 14 días de incubación y muy elevado a los 21 y 28 días.

5.4.4.2. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la detección de OA y CIT mediante TLC

En la Tabla 50 se reflejan los resultados de la detección de OA y de CIT mediante TLC de las 5 cepas de *P. verrucosum* incubadas a diferentes temperaturas en el medio de cultivo CYA a lo largo de los 28 días. La detección de ambas micotoxinas se expresa por comparación con la concentración de los patrones utilizados: 5 µg/ml para la OA (equivalente a 25 ng en el inóculo) y 100 µg/ml para la CIT (equivalente a 500 ng en el inóculo). Cabe destacar que la cepa BFE 506, considerada como no productora de las dos micotoxinas ensayadas, ha producido CIT en pequeñas cantidades a 10°C (y a 5°C a los 21 días de incubación).

5.4.4.3. Resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la detección y cuantificación de OA mediante HPLC

En la Tabla 51 se detallan los valores obtenidos de la cuantificación (expresada en µg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA elaborada por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506. El valor presentado corresponde a la media de cuatro valores (2 cuantificaciones realizadas a cada una de las 2 réplicas). La cepa BFE 488 no produjo OA a ninguna de las temperaturas de incubación ensayadas. La cepa BFE 506, considerada como no productora de las dos micotoxinas ensayadas, produjo OA en

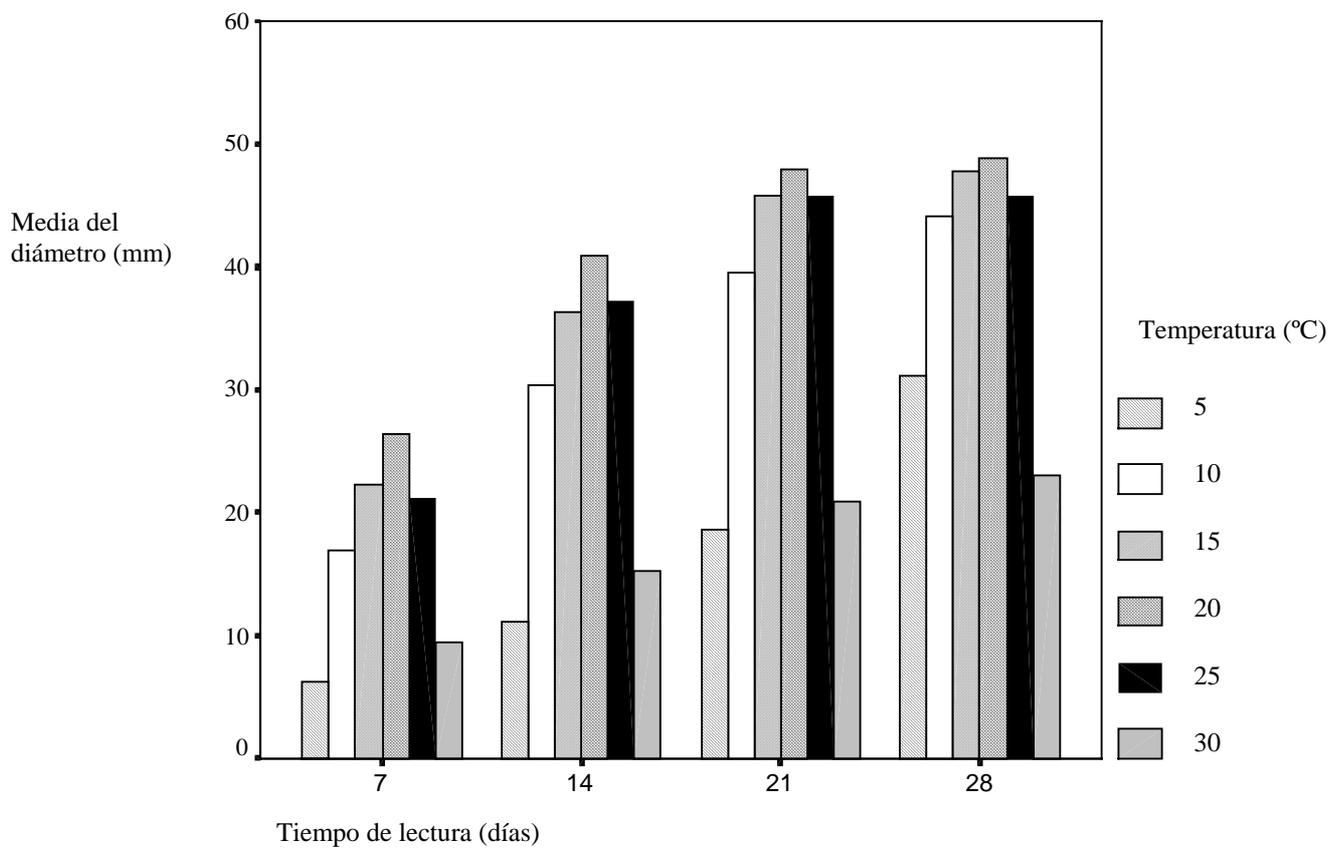
pequeñas cantidades a todas las temperaturas de incubación en al menos uno de los tiempos de lectura. Las concentraciones de OA obtenidas por las cepas productoras fueron analizadas estadísticamente para cada cepa y tiempo de lectura. La cepa BFE 487 presentó un óptimo de producción de OA a 25°C, mientras las restantes cepas lo presentaron entre los 15 y los 25°C, dependiendo de la cepa y el tiempo de lectura.

La media de la concentración de OA producida por las cuatro cepas para cada tiempo de lectura y temperatura de incubación se detalla también en la Tabla 51. Este valor medio fue analizado, para cada tiempo de lectura, mediante un test ANOVA.

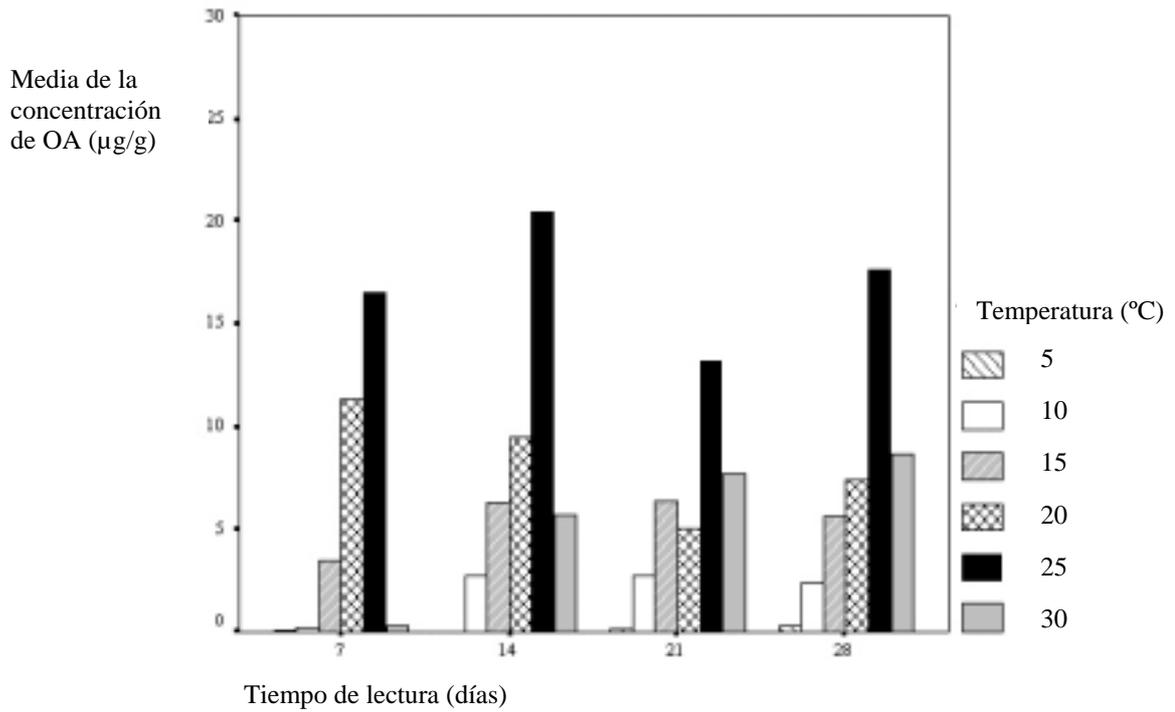
Se obtuvieron diferencias significativas ($p=0,001$) entre los valores de la cuantificación de la OA obtenida en las 2 réplicas realizadas, según la prueba de t-Student. Estas diferencias se debieron a la distinta concentración de OA que presentaban los 2 extractos de la cepa BFE 487 a 25°C (datos no presentes en la Tabla 51) en todos los tiempos de lectura. Ni los restantes extractos de la cepa BFE 487 ($p=0,364$), ni los de las cepas BFE 496 ($p=0,827$), BFE 500 ($p=0,099$) y BFE 506 ($p=0,083$) presentaron diferencias entre las 2 réplicas realizadas.

La Gráfica 12 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en CYA a las distintas temperaturas de incubación ensayadas para cada tiempo de lectura. La cepa BFE 487 produjo una cantidad de OA superior a la obtenida por el resto de cepas tanto en éste (Tabla 51) como en los restantes modelos (apartados 5.4.1.3., 5.4.2.3. y 5.4.3.3.). La Gráfica 13 muestra la media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506, tras eliminar los resultados de la cepa BFE 487, en los medios de cultivo ensayados para cada tiempo de lectura.

Gráfica 11. Media de los diámetros de las 5 cepas de *P. verrucosum* ensayadas en CYA a diferentes temperaturas de incubación a los 7, 14, 21 y 28 días.



Gráfica 12. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 487, BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en CYA a diferentes temperaturas de incubación a los 7, 14, 21 y 28 días.



Gráfica 13. Media de la concentración de OA producida por las cepas BFE 496, BFE 500 y BFE 506 en CYA a diferentes temperaturas de incubación a los 7, 14, 21 y 28 días.

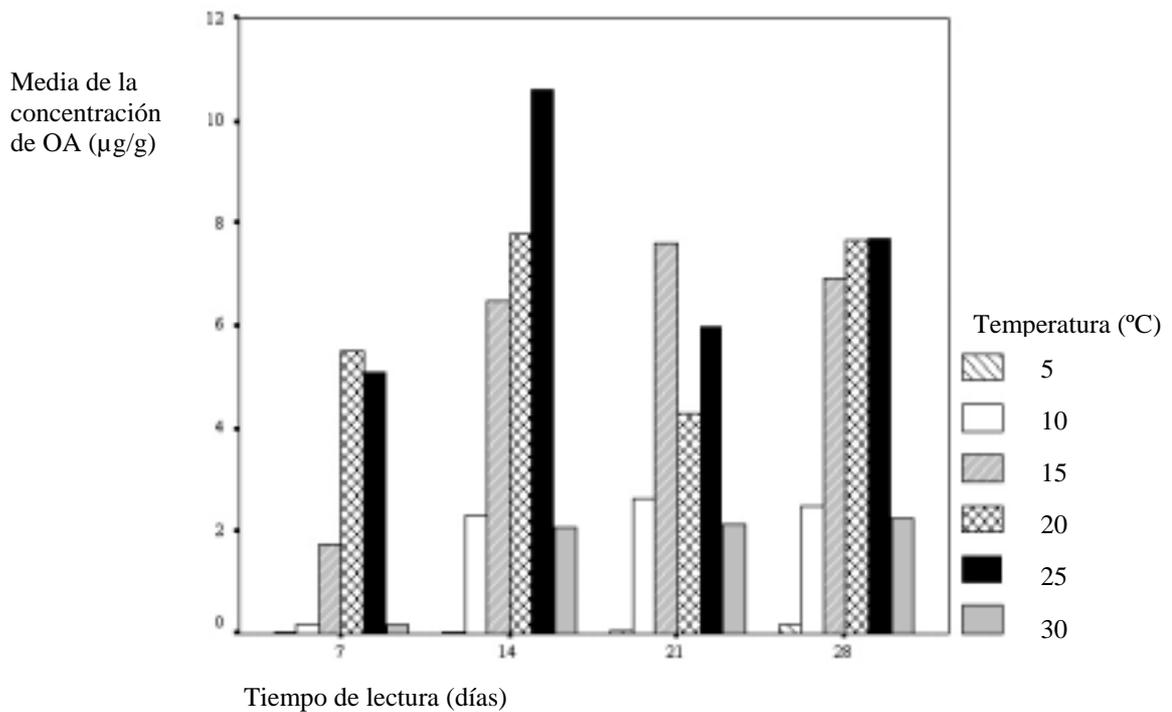


Tabla 48. Valores medios de los diámetros (en mm) y desviación típica de las colonias de *P. verrucosum* desarrolladas a las diferentes temperaturas de incubación (en °C) en el medio de cultivo CYA a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura(días)	5	10	15	20	25	30	35	p
BFE 487	7	7,0 ± 0,4 ^a	17,4 ± 0,6 ^b	25,4 ± 1,0 ^c	28,3 ± 0,5 ^d	21,4 ± 1,0 ^e	9,5 ± 1,0 ^f	nc	**
	14	11,5 ± 0,6 ^a	34,7 ± 0,8 ^b	43,1 ± 0,6 ^c	45,4 ± 1,1 ^d	38,6 ± 1,9 ^e	15,9 ± 1,0 ^f	nc	**
	21	20,3 ± 0,6 ^a	47,3 ± 1,7 ^b	56,6 ± 1,6 ^c	53,7 ± 2,8 ^d	50,4 ± 2,1 ^e	20,1 ± 1,5 ^a	nc	**
	28	34,6 ± 1,0 ^a	50,0 ± 3,1 ^b	58,0 ± 1,6 ^c	55,3 ± 2,4 ^d	50,0 ± 2,2 ^b	24,6 ± 1,6 ^e	nc	**
BFE 496	7	5,3 ± 0,9 ^a	16,1 ± 0,7 ^b	20,2 ± 1,0 ^c	24,7 ± 1,4 ^d	20,2 ± 0,5 ^c	9,8 ± 0,6 ^e	nc	**
	14	10,2 ± 0,5 ^a	27,6 ± 1,0 ^b	29,2 ± 1,7 ^b	38,1 ± 1,3 ^c	33,9 ± 1,7 ^d	16,1 ± 1,8 ^e	nc	**
	21	17,7 ± 0,6 ^a	33,6 ± 2,7 ^b	33,1 ± 5,5 ^b	44,3 ± 1,9 ^c	42,0 ± 1,8 ^c	22,3 ± 0,7 ^d	nc	**
	28	29,9 ± 0,9 ^a	38,7 ± 5,1 ^{bc}	36,0 ± 2,5 ^b	45,3 ± 2,6 ^d	42,0 ± 3,6 ^{cd}	23,1 ± 2,2 ^e	nc	**
BFE 500	7	6,4 ± 0,5 ^a	17,8 ± 0,8 ^b	23,7 ± 0,5 ^c	29,3 ± 0,6 ^d	23,6 ± 0,8 ^c	nc	nc	**
	14	11,3 ± 0,5 ^a	32,5 ± 1,2 ^b	40,1 ± 1,0 ^c	45,9 ± 2,0 ^d	40,1 ± 1,0 ^c	nc	nc	**
	21	18,8 ± 0,7 ^a	42,5 ± 2,1 ^b	55,5 ± 1,2 ^c	57,1 ± 2,8 ^c	51,9 ± 1,1 ^d	nc	nc	**
	28	32,6 ± 1,4 ^a	53,8 ± 3,7 ^b	59,5 ± 2,1 ^c	58,5 ± 2,5 ^c	51,5 ± 1,1 ^b	nc	nc	**
BFE 488	7	6,4 ± 0,2 ^a	16,5 ± 0,3 ^b	20,7 ± 0,6 ^c	23,9 ± 0,4 ^d	19,7 ± 0,6 ^e	9,2 ± 0,6 ^f	nc	**
	14	11,5 ± 0,6 ^a	28,3 ± 0,2 ^b	34,5 ± 0,9 ^c	37,7 ± 1,8 ^d	35,8 ± 1,2 ^e	14,1 ± 1,0 ^f	nc	**
	21	18,7 ± 0,7 ^a	38,2 ± 1,1 ^b	42,5 ± 1,0 ^c	43,8 ± 3,5 ^c	42,9 ± 2,8 ^c	21,3 ± 0,7 ^d	nc	**
	28	30,3 ± 1,0 ^a	42,7 ± 2,7 ^b	42,9 ± 1,1 ^b	43,6 ± 3,0 ^b	43,2 ± 3,2 ^b	24,2 ± 0,5 ^c	nc	**
BFE 506	7	6,2 ± 0,4 ^a	16,7 ± 0,7 ^b	21,3 ± 1,2 ^c	25,7 ± 1,6 ^d	21,2 ± 0,7 ^c	9,5 ± 0,7 ^e	nc	**
	14	11,1 ± 0,5 ^a	28,6 ± 1,2 ^b	35,0 ± 1,1 ^c	37,4 ± 1,7 ^d	37,6 ± 1,2 ^d	14,9 ± 0,8 ^e	nc	**
	21	17,5 ± 0,3 ^a	36,3 ± 1,6 ^b	41,6 ± 2,8 ^c	41,1 ± 2,8 ^c	42,0 ± 3,6 ^c	19,9 ± 1,1 ^a	nc	**
	28	28,3 ± 1,2 ^a	35,6 ± 1,7 ^b	42,3 ± 2,7 ^c	41,9 ± 2,6 ^c	42,4 ± 3,7 ^c	20,3 ± 1,2 ^d	nc	**
Media	7	6,3 ± 0,6 ^a	16,9 ± 0,7 ^b	22,3 ± 2,2 ^c	26,4 ± 2,2 ^d	21,2 ± 1,4 ^e	9,5 ± 0,6 ^f	nc	**
	14	11,1 ± 0,5 ^a	30,3 ± 2,9 ^b	36,4 ± 5,1 ^c	40,9 ± 4,2 ^d	37,2 ± 2,5 ^c	15,3 ± 1,2 ^e	nc	**
	21	18,6 ± 1,1 ^a	39,6 ± 5,1 ^b	45,8 ± 9,5 ^c	48,0 ± 6,8 ^c	45,8 ± 4,9 ^c	20,9 ± 1,1 ^a	nc	**
	28	31,1 ± 2,4 ^a	44,1 ± 7,3 ^b	47,7 ± 9,9 ^{bc}	48,9 ± 7,2 ^c	45,8 ± 4,8 ^{bc}	23,0 ± 2,2 ^d	nc	**

a,b,c,d,e,f los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

** diferencias significativas (p<0,01); nc, no crecimiento.

Tabla 49. Morfología macroscópica de las colonias de *P. verrucosum* obtenidas en CYA a los 7 días de incubación a diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura (°C)	Anverso		Reverso	Textura	Surcos	Pigmento difusible	Exudado	Grado de esporulación
		Micelio	Conidios						
BFE 487	5	ig							
	10	B-c/m3	VAG	BeMc	VG-F(c)	R	-	-	++
	15	B-c/m4	AGc	Be-Mc(c)	VG-F(c)	RC	-	I	++
	20	B-c/m2	AG	Be-Mc(c)	VG-F(c)	R	NMc	I-V	++
	25	B-c/m2	AVG	G-Mc(c)	G-V(c)	RC	-	I-V	++
	30	B	AG	Bec	V	D ^a	-	-	+
BFE 496	5	ig							
	10	B	Avc-c	Beo	VFI	BR	-	-	(+)
	15	B-m7	AV	Amo-NMc(c)	VFI	BR	-	-	+
	20	B-a/m5	Vc	BeN-Mc(c)	VFI	BR	MRj	-	++
	25	B-m5	Vc	Amo-Mo(c)	VFI	DR	MNc	-	++
	30	BC	-	Mo	VFIG	D ^a	-	-	(+)
BFE 500	5	ig							
	10	B-m2	AG	Mc	VG	B	-	-	++
	15	B-m4	VAo	M-N(c)	V-VG(c)	BRC	-	-	++
	20	B-m3	VG	M-Mc(c)	V-VG(c)	BRC	NMc	V	++
	25	B-a/m3	V-VG	M	FIF	BR	NMc	V	++
	30	-	-	-	-	-	-	-	-
BFE 488	5	ig							
	10	B-c/m3	AV	MNc	VFI	BR	-	-	+
	15	B-c/m5	AV	Amo-M(c)	V	BRC	MRj	I	++
	20	B-m3	VGc	BeN-Mo(c)	VG	BR	MRj	Am	++
	25	B-m2	AVGc	Am-Mo(c)	GV	BR	NMc	-	++
	30	BC	VAc	NAmo	G	D ^a	AmMc	-	+
BFE 506	5	ig							
	10	B-m2	AG	Be-Mc(c)	G-F(c)	DR	-	-	++
	15	B-m2	AGc	Be-M(c)	G-F(c)	DRC	MRjc	-	++
	20	B-m2	AGVc	Mc-Mo(c)	G	DR	MRj	Am	++
	25	B-m2	AVG	MGc-M(c)	V-G(c)	BRC	NM	V	++
	30	B	V	AmM	V-G(c)	D ^a	-	-	(+)

ig, inicio de germinación.

^aD, colonia elevada con surcos desorganizados, de aspecto cerebriforme.

Tabla 50. Detección mediante TLC de OA y CIT producidas en CYA a las diferentes temperaturas de incubación (en °C) probadas por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura (días)	5		10		15		20		25		30	
		OA ^a	CIT ^a	OA	CIT								
BFE 487	7	- ^b	-	-	-	(+)	-	++	-	++	-	(+)	-
	14	-	-	(+)	-	(+)	-	+	-	++	-	(+)	-
	21	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	++	-	+	-
	28	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	+	-	+	-
BFE 496	7	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	-	-
	14	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	+	(+)	+	(+)	-	-
	21	-	-	(+)	+	(+)	+	+	+	(+)	+	-	-
	28	-	(+)	(+)	+	(+)	+	++	+	+	+	-	-
BFE 500	7	-	-	-	-	(+)	-	(+)	-	(+)	-	nc	nc
	14	-	-	(+)	-	+	-	(+)	-	(+)	-	nc	nc
	21	-	-	(+)	-	+	-	(+)	-	+	-	nc	nc
	28	-	-	(+)	-	+	-	+	-	+	-	nc	nc
BFE 488	7	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	21	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	(+)	-	(+)	-	-	-	-	-	-
BFE 506	7	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	-	(+) ^c	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Detección semicuantitativa por comparación con los patrones: 25 ng de OA y 500 ng de CIT (a partir de soluciones de 5 µg/ml y de 100 µg/ml, respectivamente).

^b ++, producción de toxina superior a la del patrón; +, producción de toxina similar a la del patrón; (+), producción de toxina inferior a la del patrón;

-, no detección de toxina.

nc, no crecimiento.

^c CIT detectada únicamente en cromatoplaaca impregnada previamente con ácido oxálico.

Tabla 51. Cuantificación (en µg OA/g medio de cultivo) mediante HPLC de la OA producida en CYA a diferentes temperaturas de incubación (en °C) por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas a los 7, 14, 21 y 28 días de incubación.

Cepa	Tiempo de lectura(días)	5	10	15	20	25	30	p
BFE 487	7	0,1 ^a	0,4 ^a	8,6 ^a	28,8 ^b	50,7 ^c	0,6 ^a	**
	14	0,03 ^a	4,1 ^a	5,9 ^a	13,8 ^a	45,0 ^b	11,2 ^a	**
	21	0,5 ^a	3,0 ^a	2,6 ^a	7,0 ^a	35,2 ^b	18,9 ^a	**
	28	0,7 ^a	1,9 ^a	1,8 ^a	6,7 ^a	47,4 ^b	21,3 ^a	**
BFE 496	7	0,05 ^a	0,5 ^a	2,6 ^b	13,6 ^c	10,9 ^d	0,3 ^a	**
	14	nd	2,9 ^a	8,2 ^b	14,0 ^c	13,5 ^c	3,1 ^a	**
	21	0,1 ^a	3,9 ^a	11,7 ^b	8,4 ^b	9,5 ^b	4,5 ^a	**
	28	0,5 ^a	2,7 ^b	6,5 ^c	15,5 ^d	11,7 ^e	4,5 ^f	**
BFE 500	7	0,01 ^a	0,02 ^a	2,6 ^b	2,9 ^b	4,2 ^c	nc	**
	14	0,03 ^a	3,2 ^a	10,9 ^b	5,5 ^a	13,0 ^b	nc	**
	21	0,03 ^a	4,0 ^b	10,9 ^c	4,4 ^b	8,4 ^d	nc	**
	28	nd	4,7 ^a	14,2 ^b	7,4 ^a	11,4 ^b	nc	**
BFE 506	7	nd	nd	nd	0,06 ^a	0,1 ^b	nd	**
	14	0,1	0,4	0,3	0,08	0,09	0,07	n.s.
	21	0,05 ^{ab}	0,2 ^c	0,2 ^c	0,07 ^{ab}	0,09 ^a	0,03 ^b	**
	28	0,05	0,09	0,09	0,08	0,05	nd	*
Media	7	0,04 ^a	0,2 ^a	3,5 ^{ab}	11,3 ^{bc}	16,5 ^c	0,3 ^a	**
	14	0,03 ^a	2,8 ^{ab}	6,3 ^{ab}	9,5 ^b	20,4 ^c	5,7 ^{ab}	**
	21	0,2 ^a	2,7 ^a	6,4 ^{ab}	5,0 ^a	13,3 ^b	7,7 ^{ab}	**
	28	0,3 ^a	2,4 ^a	5,7 ^a	7,4 ^a	17,6 ^b	8,6 ^a	**

a,b,c,d,e,f los valores medios seguidos de letras distintas presentan diferencias significativas (p<0.05).

** diferencias significativas (p<0,01); * diferencias significativas (p<0,05).

nd, no detectada; nc, no crecimiento.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y EL RECUENTO DE *Penicillium* spp. EN MUESTRAS DE PIENSO Y MATERIAS PRIMAS

En el total de las muestras estudiadas, los recuentos fúngicos totales en MEA oscilaron entre <30 y $3,0 \times 10^6$ UFC/g, con un recuento total medio de $8,2 \times 10^4$ UFC/g. Los recuentos totales medios obtenidos para las muestras de cereales ($6,7 \times 10^4$ UFC/g) fueron similares a los obtenidos para las muestras de piensos ($9,8 \times 10^4$ UFC/g), coincidiendo estos resultados con los de otros trabajos (3, 5, 31, 50, 77, 78, 107, 108, 201, 407).

Los recuentos totales en las muestras de cereales oscilaron entre 200 y $7,7 \times 10^5$ UFC/g, coincidiendo con los resultados de otros autores (77, 78, 107, 108, 201). Entre los distintos cereales estudiados, el maíz es el que ha presentado unos recuentos totales significativamente superiores ($1,1 \times 10^5$ UFC/g), resultado similar al obtenido por otros autores (17, 77, 78, 291). Los recuentos totales en muestras de trigo han resultado ser inferiores a los del resto de sustratos analizados, con un valor medio de $3,5 \times 10^3$ UFC/g. Este resultado es similar al obtenido en otros estudios (77, 78, 242).

En las muestras de pienso, los recuentos totales oscilaron entre <30 y $3,0 \times 10^6$ UFC/g. Estos resultados coincidieron con los presentados por otros autores (31, 77, 78, 291, 407). Aunque no se han obtenido diferencias significativas entre los recuentos totales de los diferentes piensos estudiados, éstos han sido superiores en los piensos para caballo ($2,0 \times 10^5$ UFC/g). Este resultado es similar al obtenido en otros estudios (78, 466). Cabe destacar que este tipo de alimento fue, en ocasiones, una mezcla de cereales a la que no se le realiza ningún tratamiento térmico, por lo que su carga fúngica es superior.

El recuento fúngico total es un buen indicador de la calidad de piensos y materias primas. Según Chelkowski (103), no debería superar las 1×10^5 UFC/g.

Los recuentos de las especies del género *Penicillium* en MEA han oscilado entre <30 y $8,7 \times 10^4$ UFC/g, siendo el recuento medio $9,7 \times 10^2$ UFC/g. Estos valores suponen un 1,2% del recuento fúngico total en estas muestras (Tabla 15).

Se han aislado 34 especies del género *Penicillium*, de las cuáles tan sólo 8 presentan un recuento de más del 1% respecto al recuento total del género, destacando *P. crustosum* y *P. aurantiogriseum* (Tabla 19).

Analizando estos resultados según el tipo de muestra, en cereales se han obtenido recuentos parciales de *Penicillium* spp. de entre <30 y $8,7 \times 10^4$ UFC/g, con un recuento parcial medio de $1,5 \times 10^3$ UFC/g. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (5, 17, 77, 78, 373). El recuento obtenido corresponde a un 2,2% de la microbiota fúngica total. Aunque los mayores recuentos de *Penicillium* spp. se han obtenido en las muestras de maíz ($2,4 \times 10^3$ UFC/g), el mayor recuento del género respecto al total ha correspondido a las muestras de trigo, con un 4%, debido a su baja carga fúngica (Tabla 15), tal y como citan otros autores (17, 77, 241). En las muestras de cereales, las especies que han presentado un mayor recuento parcial fueron *P. aurantiogriseum* y *P. crustosum*, destacando también *P. citrinum*, *P. chrysogenum* y *P. verrucosum*. *Penicillium crustosum* ha presentado, en una muestra de maíz, unos recuentos extremadamente altos ($8,7 \times 10^4$ UFC/g) (Tabla 16), como describieron otros autores (361), probablemente debido a la elevada esporulación y facilidad de dispersión de los conidios que presenta esta especie.

En las muestras de pienso analizadas se han obtenido unos recuentos parciales de *Penicillium* spp. de entre <30 y $1,1 \times 10^4$ UFC/g. Estos resultados son similares (77, 78, 89, 407) o ligeramente inferiores (31, 284) a los de otras investigaciones. El recuento parcial medio fue de $4,4 \times 10^2$ UFC/g, lo que supone un 0,4% del recuento fúngico total. El recuento de *Penicillium* spp. respecto al total en los piensos para aves es superior al obtenido en piensos para cerdos y caballos. En las muestras de pienso las especies con mayor recuento parcial han sido *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum* y las especies *P. islandicum*, *P. minioluteum* y *P. purpurogenum*, del subgénero *Biverticillium*.

Las especies del género *Penicillium* se han aislado de un 53,4% de las muestras analizadas. Este porcentaje ha sido del 58,9% en las muestras de cereales, ligeramente

superior al obtenido en las muestras de piensos (47,7%), coincidiendo con otros trabajos (9, 77, 78). En la bibliografía consultada, existe variabilidad respecto a estos valores, siendo de entre un 20 a 60% (81, 89, 108, 128, 228, 275, 311, 373), o incluso llegando a valores del 80 a 90% (3, 5, 17, 50, 107, 284, 405) en distintos sustratos. Esta diferencia se puede deber a que el crecimiento de *Penicillium* spp. depende de la presencia en la muestra de hongos con desarrollo más rápido.

La especie con mayor frecuencia de aislamiento ha sido *Penicillium aurantiogriseum*, aislada en 47 de las 95 muestras que contenían *Penicillium* spp. (Tabla 18). Esta especie ha sido aislada de todos los tipos de sustratos analizados (Tabla 20). Aunque con menor frecuencia de aislamiento, destacan también *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum*, *P. crustosum* y *P. oxalicum*.

En las muestras de cereales las especies de mayor frecuencia de aislamiento fueron *P. aurantiogriseum* (52,8%), *P. verrucosum* (13,2%), *P. viridicatum* (13,2%), *P. crustosum* (11,3%) y *P. oxalicum* (11,3%). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros trabajos (17, 201, 217, 301), pero difieren de los obtenidos por otros autores para maíz (81, 128, 181, 213, 217, 310, 361), trigo (310) y cebada (5), ya que en éstos las especies más frecuentemente aisladas pertenecen a los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Biverticillium*, a excepción de *P. chrysogenum*. Este tipo de microbiota es más característica de los cereales en estado de pre-cosecha (181), mientras que la obtenida en nuestro estudio, así como en otros trabajos (17, 201, 217, 301), es más típica de cereales en almacenamiento. Las especies *P. crustosum* y *P. oxalicum* se presentaron sobretodo en muestras de maíz (Tabla 20). Por su parte, *P. verrucosum* y *P. viridicatum* se aislaron con mayor frecuencia de muestras de cebada. Así, la especie ocratoxígena *P. verrucosum* se aisló del 20% de las muestras de cebada, siendo su presencia significativamente superior que en el resto de sustratos objeto del estudio. También se aisló esta especie de una muestra de alimento para caballos, que era una mezcla de avena y cebada, y de una muestra de trigo. Algunos autores consideran que existe una relación específica entre esta especie y la cebada (356). Sin embargo, y sobretodo en países de clima frío, se aísla frecuentemente *P. verrucosum* tanto de cebada como de trigo (9, 83, 244, 301).

En las muestras de pienso, las especies que han presentado mayor frecuencia de aislamiento han sido *P. aurantiogriseum* (45,2%) y *P. chrysogenum* (16,7%), coincidiendo con otros trabajos (3, 50, 269). Sin embargo, otros autores aíslan como especies más frecuentes a *P. brevicompactum*, *P. restrictum*, *P. purpurogenum* y *P. oxalicum* de piensos para aves de corral (108, 284).

La mayoría de especies aisladas en nuestro estudio han sido relacionadas con los mismos sustratos (350, 360). Sin embargo, para las especies *P. bilaii*, *P. capsulatum*, *P. italicum* y *P. purpurogenum*, ampliamente relacionadas con muestras de tierra, no se han encontrado referencias en la bibliografía consultada acerca de su aislamiento en el tipo de alimentos tratados en nuestro estudio. Cabe tener en cuenta que en la elaboración y/o almacenamiento de este tipo de alimentos, es posible una contaminación por especies que habitan en el suelo. No obstante, algunas de estas especies son de crecimiento lento y pueden no llegar a aislarse (como los monovercicilados *P. bilaii* y *P. capsulatum*).

6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO FISIOLÓGICO, BIOQUÍMICO Y MICOTOXÍGENO DE *Penicillium* spp.

6.2.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp.

6.2.1.1. Discusión de los resultados correspondientes a la identificación hasta nivel de especie de las cepas de *Penicillium* spp.

Como cualquier sistema de identificación basado en la morfología, la identificación de las cepas de *Penicillium* spp. es compleja. Esta dificultad es mayor para las especies que pertenecen al subgénero *Penicillium*, que presentan mayores similitudes morfológicas. Las cepas pertenecientes a *Penicillium* spp. son, de entre los tres géneros más frecuentemente aislados en los sustratos estudiados, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, las que más comúnmente se encuentran identificadas únicamente hasta nivel de género en la bibliografía (31, 89, 107, 373). Los constantes cambios en la nomenclatura que ha sufrido el género (366) han complicado también esta situación.

La identificación de las cepas en nuestro trabajo se ha realizado mediante la sistemática de Pitt (350). El tratado de Pitt y Hocking (360) ha sido empleado para casos en los que se han acogido cambios taxonómicos desde la publicación del primero. Este último trabajo incluye, además, criterios no morfológicos (como la capacidad de producción de diferentes micotoxinas, datos ecológicos, fisiológicos y de biología molecular), aunque abarca únicamente las especies de mayor frecuencia de aparición en alimentos. Para las especies terverticiladas, contempla la reacción en el medio CSN, la respuesta a la prueba del indol y algunas otras características fisiológicas. Las descripciones morfológicas de cada especie son similares a las del tratado de Pitt (350).

La inclusión de las cepas en uno de los cuatro subgéneros de *Penicillium* a partir de la observación de una preparación microscópica se realizó según la morfología del conidióforo. En los casos en los que las cepas presentaron estructuras típicas de más de un subgénero al mismo tiempo, se consideró la mayoritaria (350). Ésto sucedía con más frecuencia entre los subgéneros *Penicillium* y *Furcatum*, aunque también se dió entre

éste último y *Aspergilloides*. En pocos casos existió confusión entre los dos subgéneros de *Penicillium* biverticilados, puesto que las estructuras del conidióforo presentan suficientes y marcadas diferencias.

Las especies terverticiladas *P. commune* y *P. solitum* fueron identificadas mediante el tratado de Pitt y Hocking (360), ya que Pitt, en 1979, consideró a las cepas de estas especies como pertenecientes a *P. puberulum* y *P. aurantiogriseum*, respectivamente (350). Estudios basados en la producción de metabolitos secundarios y otras características fisiológicas (142, 145, 151, 152, 270, 271, 272, 355), fueron claves para la posterior aceptación de estas dos especies. La identificación final entre estas dos especies se basó en la respuesta a la prueba del indol y en la coloración del reverso de la colonia en el medio MEA (270, 360).

La distinción entre las especies *P. aurantiogriseum* y *P. viridicatum*, muy próximas entre sí (151, 152, 346), ha resultado complicada, ya que sólo se diferencian muy ligeramente en el color y el diámetro de la colonia y la rugosidad de las estructuras microscópicas.

El crecimiento a 37°C es una característica que presentan únicamente *P. chrysogenum* (350, 360) y la recientemente descrita *P. aethiopicum* (152, 360) en el subgénero *Penicillium*. En nuestro estudio, sin embargo, la mayoría de las cepas de *P. griseofulvum* germinaron a esta temperatura. Esto podría deberse a que *P. griseofulvum* puede presentar crecimiento a una temperatura máxima de 35°C, próxima a la empleada, mientras la temperatura máxima de crecimiento de la mayoría de especies del subgénero *Penicillium* está alrededor de los 30°C (360).

Las cepas identificadas como *P. verrucosum* presentaron, a los 7 días de incubación, unos diámetros inferiores a los de la mayoría de especies del subgénero *Penicillium*, y también una menor esporulación en los medios CYA y MEA. Los reversos de las colonias presentaron coloraciones de amarillo claro a marrón en CYA y amarillas, o algo rosados en ocasiones, en los medios MEA y G25N.

Una característica importante para diferenciar las especies del subgénero *Aspergilloides* es la presencia de vesícula al final de la estipe. Cabe destacar que esta característica fue

más fácilmente observable en las preparaciones microscópicas realizadas a partir del medio CYA que a partir de MEA.

La diferenciación entre *P. glabrum* y *P. spinulosum*, pertenecientes al subgénero *Aspergilloides*, se basó en la rugosidad de los conidios. Estas 2 especies, junto con *P. purpurescens*, son difíciles de distinguir (350). Un estudio realizado por la ‘Subcomisión on *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics’ (SPAS) de la Comisión Internacional de Taxonomía Fúngica de la Unión Internacional de Sociedades Microbiológicas (IUMS) trató éstas y otras especies relacionadas mediante estudios morfológicos, de patrones de metabolitos secundarios, enzimáticos y de RFLP y concluyeron que, aunque muy relacionadas, se trata de especies distintas (362). Sin embargo, las características que recomendaron para diferenciarlas eran nuevamente morfológicas. Un estudio reciente basado en el crecimiento en diferentes sustratos (432) obtuvo al menos cuatro grupos distintos de comportamiento entre las cepas de *P. spinulosum* y *P. glabrum* analizadas.

Dos cepas procedentes de muestras de tierra fueron identificadas como *P. paxilli*, especie perteneciente al subgénero *Furcatum*. Esta especie presenta similitudes con *P. scabrosum*, especie descrita en el año 1990 (160) y que proviene de suelos, la cual parece ser muy frecuente en el norte de Europa y Canadá. La posibilidad de que estas cepas pertenecieran a la especie *P. scabrosum* se descartó por diferencias en la morfología microscópica.

La identificación de algunas cepas pertenecientes al subgénero *Biverticillium* se complicó en ocasiones al presentar tardíamente algunas de las características típicas de la especie, como sucedió con la conidiogénesis sinematosa típica de *P. duclauxii*, que sólo se pudo observar tras varias semanas en refrigeración, o incluso al no presentarlas, como sucedió con algunas cepas de *P. purpurogenum* que no elaboraron el pigmento rojo característico.

6.2.1.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp.

El medio de cultivo sólido YES promueve unas buenas características morfológicas, por lo que se ha propuesto en ocasiones para diferenciar las especies de *Penicillium* (142, 143). Una de las aplicaciones con más interés es la identificación rápida y selectiva de *P. verrucosum* al presentar esta especie, según Frisvad (142, 143), una coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia. En nuestro estudio un 48% de las cepas de *P. verrucosum* estudiadas han presentado esta coloración en al menos alguna zona de su reverso. Cabe remarcar que un elevado porcentaje de cepas aisladas en nuestro estudio presentan dicha coloración, sin embargo las cepas procedentes de colecciones de cultivo la mostraron en menor proporción. Esto puede ser debido a que dichas cepas hayan perdido esta capacidad en los sucesivos subcultivos. Además de esta especie, esta coloración la han mostrado también algunas especies del subgénero *Penicillium*: *P. italicum* y algunas cepas de *P. chrysogenum* (el 12%), y de los restantes subgéneros: *P. glabrum* (28%), *P. sclerotiorum*, *P. oxalicum* (29%), *P. funiculosum*, *P. islandicum*, *P. minioluteum* (100%), *P. purpurogenum* (90%) y *P. rugulosum*. Aunque existan tantas especies que presenten esta coloración en el reverso, si se consideran otras características morfológicas es difícil la confusión de las citadas especies con *P. verrucosum*. Así, esta característica puede ayudar en su identificación, aunque cabe considerar que no todas las cepas de *P. verrucosum* la presentan.

Según los trabajos de Larsen y colaboradores (244) y Castellá y colaboradores (79), 11 de las cepas de *P. verrucosum* de colecciones de cultivo ensayadas en el presente estudio, corresponderían con *P. nordicum*. Larsen y colaboradores describieron, para la especie *P. nordicum*, un reverso en YES de color amarillo o crema, mucho más pálido que el marrón rojizo típico de *P. verrucosum* (244). Sin embargo, en nuestro estudio dos (las cepas BFE 487 y BFE 549) de estas 11 cepas han mostrado la coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia en YES. Así, esta coloración no es una característica exclusiva de *P. verrucosum* si consideramos ambas especies: si bien es más frecuente en cepas de *P. verrucosum*, la especie de reciente descripción *P. nordicum* también puede presentarla.

Los medios CREA (145) y CSN (355) fueron diseñados para facilitar la taxonomía de las especies del subgénero *Penicillium*. En estos medios, tanto la cantidad de crecimiento que presentan las cepas como su respuesta metabólica (formación de metabolitos ácidos y/o básicos, valorado por un indicador de pH en el medio) permiten diferenciar estas especies (145, 355, 360). En un trabajo reciente, sin embargo, Ahmad y Malloch (19) no encontraron de utilidad taxonómica el uso de un medio con creatina para las más de 100 especies ensayadas al presentar muchas de las cepas un crecimiento moderado en éste.

En nuestro estudio se obtuvieron dos tipos de crecimiento distintos entre las *Penicillium* spp. en estos medios. Algunas especies presentaron una cierta inhibición, desarrollándose colonias no opacas, con poca formación de micelio y escasa esporulación ('w' en las Tablas 21 a 24 y 26). Otras presentaron colonias con elevada esporulación, similares a las desarrolladas en el medio CYA. Frisvad describió cuatro categorías de crecimiento en CREA (145, 149), tres de los cuáles correspondían a colonias translúcidas. Frisvad, en el trabajo previo a la descripción del CREA (142) y Pitt (355, 360), dividieron en tres (fuerte, moderado y escaso, según Pitt) los posibles tipos de crecimiento en los medios CREA y CSN.

Las dos formas de desarrollo de las colonias obtenidas en nuestro trabajo no variaron entre los 7 y los 14 días de incubación para las distintas especies. Tampoco existieron diferencias entre el crecimiento observado en CREA y en CSN por una misma cepa, aunque en algunos aislamientos se producía un crecimiento ligeramente superior en CSN. Esta diferencia puede ser debida a que el pH inicial ligeramente ácido del medio CSN favorezca este crecimiento o a las diferencias en composición existentes entre ambos medios (apartado 4.5.1.) (145, 355).

Seis de las 18 especies del subgénero *Penicillium* ensayadas, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. echinulatum*, *P. glandicola*, *P. roqueforti* y *P. solitum*, presentaron un abundante crecimiento en CREA y CSN, coincidiendo con otros trabajos (145, 149, 355, 360). Para las especies *P. expansum* (145, 149, 355, 360) y *P. hirsutum* (355, 360) también se describe este tipo de crecimiento, aunque en nuestro estudio sólo se produjo en una de las tres y en tres de las cuatro cepas ensayadas, respectivamente. Se describe (145, 149, 355, 360) el crecimiento de *P. aurantiogriseum* y *P. chrysogenum* como

moderado en estos medios. En nuestros resultados, unos porcentajes de entre el 30% y el 50% de sus cepas han presentado un crecimiento abundante en estos medios, y escaso para el resto de las cepas. También las restantes especies del subgénero presentaron un crecimiento escaso. Este resultado coincide, a excepción de *P. viridicatum*, con lo descrito por estos autores (145, 149, 355, 360).

Sin embargo, para todas las especies de los restantes subgéneros (exceptuando a *P. humuli* y *P. paxilli* y algunas cepas de *P. purpurogenum*) este crecimiento fue escaso (Tablas 22 a 24). Este resultado es similar al obtenido por Frisvad (149).

La posible producción de metabolitos ácidos o básicos en los medios CREA y CSN también ha permitido diferenciar las *Penicillium* spp. Generalmente, las especies del subgénero *Penicillium* que presentan un crecimiento abundante en estos medios son las que provocan un viraje básico del medio (*P. commune*, *P. crustosum*, *P. echinulatum*, *P. glandicola*, *P. roqueforti* y *P. solitum*), coincidiendo con otros autores (145, 149, 355, 360), a excepción de las descripciones para *P. glandicola* según Pitt (355, 360). La especie *P. expansum* ha producido también viraje básico en ambos medios, como describía Frisvad en CREA (145, 149). Sin embargo, Pitt no cita que esta especie alcalinice el CSN (355) o sólo de forma esporádica (360). Tres de las cuatro cepas de *P. hirsutum* ensayadas, 85% de las de *P. aurantiogriseum* y 76% de las de *P. chrysogenum* han producido viraje básico del medio CSN (siendo estos porcentajes inferiores en CREA), reacción no contemplada por otros autores para estas especies (145, 149, 355, 360). La observación del viraje básico ha sido más fácilmente valorable en CSN.

Las especies *P. verrucosum*, *P. digitatum*, *P. italicum* y *P. griseofulvum* (un 62% de cepas de ésta última en CREA y un 54% en CSN) presentaron una reacción neutra en los medios CREA y CSN a los 7 días de incubación, coincidiendo con otros trabajos (145, 149, 355, 360). Sin embargo, una proporción de cepas de *P. griseofulvum* y de *P. verrucosum*, cerca de un 40% en CREA y un 46 y un 63% en CSN, respectivamente, han producido viraje ácido en estos medios tras 14 días de incubación, como describió Frisvad en CREA (145, 149). El resto de especies del subgénero *Penicillium* produjeron ácido en el medio, ya fuera como única reacción (como *P. brevicompactum*, *P. nalgiovense* y *P. viridicatum*), coincidiendo con otros autores (145, 149, 355, 360) o previo al viraje básico. La producción de metabolitos ácidos es una característica con

menos interés para aquellas especies que provocan, posteriormente, la alcalinización del medio.

Para las especies de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Biverticillium* la situación es distinta. Las únicas cepas capaces de virar el medio CSN a básico fueron las dos de *P. spinulosum* (del subgénero *Aspergilloides*), las tres de *P. humuli* y las dos de *P. paxilli* ensayadas. Las restantes especies presentaron una respuesta ácida (en la mayoría de los casos) o neutra en los medios CREA y CSN (Tablas 22 a 24). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Frisvad (149).

Así, y tal como citó Frisvad (149), el valor de los medios con creatina como criterio taxonómico es más limitado para las especies de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* y *Biverticillium* que para las del subgénero *Penicillium*.

Pitt describió la formación de un pigmento marrón en el medio CSN por algunas especies del subgénero *Penicillium* como *P. aurantiogriseum*, *P. expansum*, *P. glandicola*, *P. hirsutum*, *P. viridicatum* (355, 360), *P. aethiopicum* y *P. hordei* (360), ya sea en el reverso de la colonia o difundido en el medio. Sin embargo, en nuestro estudio este pigmento se ha observado sólo en un 4 a un 33% de cepas de *P. aurantiogriseum*, *P. viridicatum* y *P. expansum* tanto en CREA como en CSN, aunque también se ha observado en un 8 a un 20% de cepas de *P. brevicompactum* y *P. griseofulvum* en ambos medios (datos no mostrados en el apartado 5.2.1.).

El medio CSN, además de facilitar la formación de metabolitos básicos, permite la de los compuestos ácidos y un crecimiento de las *Penicillium* spp. similar a los que se producen en el medio CREA. De esta forma, este medio supone una mejor herramienta taxonómica que su homólogo alcalino.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo a partir del medio de cultivo NSA (142) no han presentado muchas diferencias entre las especies de *Penicillium*. El crecimiento de las cepas fue inferior al que se produjo en los medios CYA y MEA, ya que el nitrito sódico presenta actividad inhibitoria (53). Sin embargo, todas las cepas de las especies ensayadas, excepto dos cepas de *P. verrucosum* y una de *P. glabrum*, *P. capsulatum* y *P. purpurogenum* han presentado crecimiento, en mayor o menor grado, en NSA.

Bridge citó dificultades similares para pruebas de asimilación de fuentes de nitrógeno y carbono realizadas en medio sólido, incluyendo el nitrito sódico (53). Aunque diversos estudios citan unas buenas características de este medio para distinguir las especies de *Penicillium* (53, 57, 142), Frisvad no destacó la utilidad del NSA como criterio taxonómico para *Penicillium* spp. (145).

El medio RT fue propuesto por Frisvad en el ‘Third International Workshop on *Penicillium* and *Aspergillus*’ (150) para diferenciar las especies del complejo *P. aurantiogriseum* según Lund y Frisvad (274). Así, *P. aurantiogriseum*, *P. neoehinulatum*, *P. polonicum*, *P. viridicatum*, *P. aurantiovirens*, *P. cyclopium* y *P. freii* se caracterizarían por formar un halo de pigmento difusible marrón oscuro en el medio, mientras *P. melanoconidium* y *P. tricolor* y las restantes especies del subgénero *Penicillium* no lo presentarían. En nuestro estudio, todas las cepas del complejo han sido identificadas como *P. aurantiogriseum* o *P. viridicatum*. Un 46% de las cepas de la primera y un 50% de la segunda han producido este halo. Sin embargo, algunas cepas de *P. solitum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. verrucosum* y *P. chrysogenum* (un 12%, 50%, 33%, 2% y 8%, respectivamente) produjeron también el halo marrón oscuro. Cabe considerar, sin embargo, que las dos cepas de *P. aurantiogriseum* que se corresponderían, según el estudio micotoxígeno (apartado 6.2.2.1.), con *P. melanoconidium* no han producido el halo de pigmento marrón. Las especies que presentan este halo lo hacen en un bajo porcentaje de sus cepas (Tabla 25) y, a excepción de *P. roqueforti*, se trata de especies muy similares entre sí (como *P. aurantiogriseum* y *P. viridicatum*), con lo que esta prueba presenta, según nuestros resultados, poca utilidad taxonómica.

El medio líquido con urea (53) ha dado un resultado similar para muchas de las especies de *Penicillium*. Únicamente seis especies del género han dado lugar a un resultado negativo por un 90% o más de sus cepas (viraje ácido del medio), aunque debemos remarcar que de cinco de estas especies sólo se han ensayado una o dos cepas (Tablas 21, 22 y 24). El resto de las especies han presentado un resultado variable o positivo a esta prueba. Bridge y colaboradores (57), ensayando un gran número de especies, obtuvieron formación de base por una baja proporción de cepas de las distintas especies a partir del medio líquido con urea, excepto para *P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. atramentosum*, *P. roqueforti* y *P. claviforme*, con producción de base por más de un

90% de sus cepas. En nuestro estudio, el resultado obtenido para las especies *P. verrucosum*, *P. griseofulvum* y *P. citrinum*, de las que se ha ensayado un alto número de cepas, ha sido positivo para más de un 90% de éstas. Ahmad y Malloch (19), utilizando un medio sólido con urea como única fuente de nitrógeno, obtuvieron resultados muy distintos: un gran número de especies de las evaluadas, entre ellas *P. verrucosum*, *P. roqueforti* o *P. griseofulvum*, presentó formación de ácido en el medio. Así, según los resultados obtenidos, la variabilidad intraespecífica de resultados a esta prueba no justifica su utilización para diferenciar las *Penicillium* spp.

La prueba del indol postulada por Lund en 1995 (270) ha presentado resultados algo más concluyentes que las tres anteriores. Esta prueba detecta de forma rápida metabolitos, producidos por algunas *Penicillium* spp., estructuralmente relacionados con el indol. El autor citaba que la reacción positiva se debía a la producción de ácido ciclopiazónico en el caso de *P. camemberti* y *P. commune*, rugulovasina A y B también en el caso de *P. commune*, quetoglobosina C en el de *P. discolor* y *P. expansum* e isofumigaclavina A cuando se trataba de *P. roqueforti* var. *roqueforti*. Las cepas de *P. commune*, *P. expansum* y *P. roqueforti* ensayadas en nuestro trabajo han presentado una respuesta positiva a la prueba a partir de las colonias desarrolladas en CYA tras 14 días de incubación (a excepción de una cepa de *P. expansum*). Otras especies del subgénero *Penicillium* han obtenido también un resultado positivo a esta prueba por un alto porcentaje de sus cepas, destacando *P. aurantiogriseum*, *P. griseofulvum*, *P. puberulum* y *P. viridicatum* (Tablas 21 y 25). Según la bibliografía consultada, no existen citas acerca de la respuesta de estas especies a esta prueba. Sin embargo, *P. griseofulvum* se conoce como especie productora de ácido ciclopiazónico (162, 360), con lo que la respuesta positiva puede deberse a la detección de este metabolito.

Una de las aplicaciones más útiles de esta prueba es la de diferenciar, según algunos autores (271, 360), las especies *P. commune* y *P. solitum*, muy similares morfológicamente entre sí. En nuestros resultados la realización de esta prueba ha permitido diferenciar a *P. commune* de *P. solitum* a partir de las colonias incubadas en CYA (y CSN) durante 14 días. Lund (271) describió la distinción de las especies *P. commune*, *P. solitum* y *P. palitans*. Esta última especie se consideraba sinónima de *P. commune*. Así se comprobó la consistencia del patrón metabólico de *P. palitans*, lo que sirvió para distinguirla de las otras dos (366).

Muy pocas especies de los subgéneros *Aspergilloides*, *Furcatum* o *Biverticillium* han dado un resultado positivo a la prueba del indol, únicamente *P. oxalicum* y *P. purpurogenum* (100% y 50% de las cepas, respectivamente, en CYA a los 14 días de incubación) (Tablas 23 y 24). En el caso de *P. purpurogenum*, sin embargo, cabe la posibilidad de que se produzca un falso positivo debido al pigmento difusible rojo que presenta esta especie. No existen datos bibliográficos respecto a la prueba del indol en especies de estos tres subgéneros.

Aunque la repetibilidad entre las cepas de algunas especies no haya resultado muy alta para la prueba del indol, la sencillez de la misma y los datos que aporta en algunos casos justifican su uso como criterio taxonómico complementario para la identificación de las especies terverticiladas. Pitt y Hocking (360) la incluyen para la distinción de las especies *P. commune* y *P. solitum*. En este tratado los autores citan que un resultado positivo a esta prueba tiene mayor valor que uno negativo.

La realización de esta prueba a partir de colonias de 7 o 14 días no ha presentado grandes diferencias en nuestros resultados, aunque sería interesante realizarla a partir de colonias de más de 7 días de incubación, y sobretodo en los casos en los que se dificulte o retrase la producción de metabolitos secundarios, como puede suceder al emplear cepas de colección o que se hayan mantenido mucho tiempo en condiciones de laboratorio (2, 272). Con la especie *P. verrucosum* puede haber ocurrido algo similar en nuestro estudio. Un 91% de las cepas aisladas de muestras naturales han presentado un resultado positivo a esta prueba a partir de las colonias en CYA en al menos uno de los tiempos de lectura, mientras sólo una cuarta parte de las procedentes de colecciones de cultivo han dado este mismo resultado.

La descripción original de la prueba del indol se realizó para diferenciar especies que presentaban buen crecimiento en el medio CREA (270). En ese trabajo, Lund se planteó la realización de la prueba a partir de las colonias desarrolladas tanto en ese medio como en CYA. En el presente estudio, al evaluar conjuntamente los medios CYA, CREA y CSN se ha observado que la respuesta es más sensible a partir del medio CYA, tal como describía Lund (270). Si consideramos, tal como comentan Pitt y Hocking (360), que la respuesta positiva a esta prueba tiene mayor valor que la negativa,

destacaríamos el uso del medio CYA frente al CREA y CSN para la realización de esta prueba.

6.2.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio micotoxígeno de *Penicillium* spp.

6.2.2.1. Discusión de los resultados correspondientes a la detección de las micotoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AP, CIT, STE, OA, PEN A y ZEA mediante TLC

En el estudio micotoxígeno de *Penicillium* spp. mediante TLC se detectó AP en los extractos de cinco especies: *P. aurantiogriseum*, *P. canescens*, *P. expansum*, *P. raistrickii* y *P. viridicatum*, CIT en los de cuatro especies: *P. canescens*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum* y *P. verrucosum*, OA únicamente en los de *P. verrucosum* y PEN A en los de siete especies: *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. crustosum*, *P. echinulatum*, *P. glandicola*, *P. janczewski* y *P. viridicatum*.

No se detectaron aflatoxinas ni STE en ninguno de los extractos analizados. Tanto las aflatoxinas como la STE, metabolito precursor de las primeras, están relacionadas con *Aspergillus* spp. Las aflatoxinas son elaboradas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, y, como se describió recientemente, también por *A. nomius* (360, 403). La STE, micotoxina de baja toxicidad, la producen *Emericella nidulans* y, sobretodo, *A. versicolor* (360, 403). Tampoco se detectó producción de ZEA por ninguna *Penicillium* spp., micotoxina estrogénica relacionada con numerosas *Fusarium* spp. (360, 403).

Todas las micotoxinas detectadas en este estudio fueron comprobadas mediante la realización de un patrón interno (apartado 4.2.3.3.). Esta comprobación permitió descartar metabolitos de comportamiento similar en TLC al de las micotoxinas ensayadas. En el caso de la OA, además, esta detección se comprobó paralelamente mediante HPLC. Respecto a la OA, se descartaron como especies productoras mediante estas comprobaciones a *P. griseofulvum*, *P. viridicatum* y a varias especies del subgénero *Biverticillium*, destacando *P. purpurogenum*, que presentaban metabolitos similares a esta toxina en TLC.

El AP ha sido detectado en los extractos de un 56,4% de cepas de *P. aurantiogriseum*. La producción de AP por *P. aurantiogriseum*, y por especies del complejo *P. aurantiogriseum* como *P. aurantiovirens*, *P. polonicum* o *P. cyclopium*, actualmente consideradas sinónimas de la especie *P. aurantiogriseum* (366), se ha descrito en numerosos trabajos, por lo que *P. aurantiogriseum* está comúnmente aceptada como productora de la toxina (159, 162, 274, 363). Se han descrito porcentajes de cepas de esta especie productoras de AP de entre el 50% y el 75% (57, 152, 245, 303).

Dos de las diez cepas de *P. viridicatum* ensayadas han producido AP. La situación respecto a la producción de AP por esta especie es más compleja. Algunos trabajos clásicos no citan dicha producción (259, 350), mientras en el estudio de Ciegler (83) sólo una cepa de las 22 clasificadas en su grupo I (correspondiente a *P. viridicatum*) elaboraba AP. En revisiones más recientes tampoco se cita esta producción y sí la de xantomegnina y viomelleína por esta especie (123, 360, 363). Sin embargo, en trabajos anteriores de Frisvad y colaboradores se acepta la producción de AP por esta especie (144, 146, 147, 152, 159, 161), relacionando su producción con la de las micotoxinas xantomegnina y viomelleína (144, 146, 152). Frisvad y Filtenborg (152) citaron la producción de AP por una proporción de más del 90% de cepas de *P. viridicatum*.

En nuestro estudio, *P. raistrickii* también ha producido AP. Esta producción ya ha sido citada con anterioridad (57, 147), aunque el bajo número de citas halladas en la bibliografía consultada no parece corresponder con la alta proporción de cepas productoras de la toxina (tres de las cuatro ensayadas) obtenida en el presente trabajo.

Una de las dos cepas analizadas de *P. canescens* también ha producido AP. Esta producción ha sido citada con anterioridad por otros autores (220), aunque *P. canescens* no se considera una especie típicamente productora de AP (360).

Una cepa de *P. expansum* también ha elaborado esta micotoxina. Esta especie, sin embargo, no se considera productora de AP, sino de patulina y CIT (159, 161, 360). No se han encontrado, en la bibliografía consultada, citas de la producción de AP por parte de esta especie.

Se han citado otras especies como productoras de AP, como *Penicillium fennelliae*, del subgénero *Penicillium* (147, 154, 259, 363), aunque se trata de una especie poco frecuente en alimentos (350, 363). Mayor importancia se concedió a la especie *Penicillium roqueforti* como productora de AP debido a su utilización como iniciador en la obtención de algunos quesos. A finales de la década de los 70 se comenzó a citar producción de AP por algunas cepas de *P. roqueforti* (57, 252, 309, 321). En estudios posteriores de metabolismo secundario se subdividió la especie *P. roqueforti* en dos grupos (144, 147), llamados más tarde *P. roqueforti* var. *roqueforti* y *P. roqueforti* var. *carneum* (152). Boysen y colaboradores (48), en 1996, propusieron tres especies distintas (*P. roqueforti*, *P. carneum* y *P. paneum*) mediante estudios de patrones de RAPD y de metabolitos secundarios, cuya definición como especies o variedades está todavía en debate (360). De estos tres grupos, las cepas productoras de AP pertenecían siempre a *P. roqueforti* var. *carneum* (48, 154, 159, 360). En nuestro estudio no se ha detectado AP de los extractos de las cepas de *P. roqueforti* estudiadas. La especie *P. simplicissimum*, del subgénero *Furcatum*, también produce AP de forma consistente (123, 144, 252, 350, 360, 363), por lo que la producción de AP se consideró marcador taxonómico para esta especie en un estudio de Frisvad (144).

La producción de CIT se ha obtenido de los extractos de las diez cepas de *P. citrinum* ensayadas. Este resultado coincide con la bibliografía consultada, en la que se cita a la CIT como un buen marcador taxonómico para *P. citrinum*, especie del género *Penicillium* que presenta la mayor producción de CIT, tanto en frecuencia de cepas toxígenas como en cantidad de micotoxina elaborada (144, 303, 360).

Un 51,9% de las cepas de *P. verrucosum* ensayadas han producido CIT. De entre las 11 cepas aisladas en nuestro laboratorio, diez produjeron CIT, por lo que tal vez esta capacidad se pierde tras mantenerse las cepas durante mucho tiempo en condiciones de laboratorio, como suele suceder con las cepas de colecciones de cultivo. Si no consideramos las 11 cepas que corresponderían a *P. nordicum* (Tabla 34) según algunos autores (79, 244), el porcentaje de cepas de *P. verrucosum* productoras de CIT asciende a un 65,9% en nuestro estudio. Este porcentaje ha sido similar al obtenido en algunos trabajos (79), aunque ha resultado inferior al de otros, que oscila entre un 75% y un 90% (83, 152, 244).

La producción de CIT por *P. canescens* se ha detectado en una de las dos cepas ensayadas. Dicha producción ha sido citada anteriormente (171), aunque no se la considere como una especie típicamente productora de CIT (360).

Una cepa de *P. chrysogenum* aislada de una muestra de tierra produjo una gran cantidad de CIT en el medio CYA. Al repetir la siembra y extracción, la producción de CIT no se reprodujo. Esta producción ha sido citada con anterioridad (300). Frisvad detectó la producción de esta toxina por una cepa 'transición entre *P. citrinum* y *P. chrysogenum*' (142). *Penicillium chrysogenum* comparte pocas características morfológicas con las especies terverticiladas productoras de CIT. Sin embargo, esta especie es, de las terverticiladas, la que más similitudes morfológicas presenta con especies del subgénero *Furcatum* (como el crecimiento a 37°C) y, más concretamente, con *P. citrinum* (350), la mayor productora de CIT del género, según algunos autores (350, 360).

Aunque la especie *P. expansum* se considera productora de CIT (159, 162, 360, 363), ninguna de las cepas de *P. expansum* ensayadas en este trabajo la ha elaborado. Sin embargo, la proporción de cepas de *P. expansum* productoras de CIT no es muy elevada, del 64%, según Frisvad y Filtenborg (152).

Otras especies del género producen también CIT, como un subgrupo de *P. hirsutum* (144, 146), que se denominó posteriormente *P. hirsutum* var. *albocoremium* (152, 154). Algunos autores citan la producción de CIT por otras especies del subgénero *Furcatum*, así como de especies pertenecientes al subgénero *Aspergilloides* (146, 147).

En este estudio se detectó OA, en al menos uno de los medios probados, en 40 de las 52 cepas de *P. verrucosum* (un 76,9%) analizadas mediante TLC, resultados similares a los de otros estudios en los que el porcentaje oscila entre el 70 y el 100% (83, 152, 244). Sin embargo, Pitt describe valores de alrededor de un 55% (352). Respecto a las cepas aisladas de muestras de cereales y piensos, 10 de las 11 produjeron OA.

La capacidad de elaborar conjuntamente OA y CIT es un carácter típico de *P. verrucosum*. La OA se ha utilizado, en los últimos 15 años, como un marcador taxonómico de esta especie, al haber sido considerada la única ocratoxígena del género. La producción de CIT ha sido un punto de partida en el estudio quimiotaxonómico de

las cepas ocratoxígenas, llevando a la propuesta de dividir *P. verrucosum* en dos especies (244). Por ello algunos autores (79, 244) consideran a la CIT, junto con otros metabolitos, características ecológicas, genéticas o morfológicas, como un criterio distintivo de *P. verrucosum* frente a la recientemente propuesta *P. nordicum*.

La capacidad de producir OA y CIT de *P. verrucosum* parece disminuir en cepas mantenidas mucho tiempo en condiciones de laboratorio. Mientras una alta proporción de las cepas aisladas en nuestro trabajo produjeron OA y/o CIT, la proporción de cepas procedentes de colecciones de cultivo que las sintetizaron fue bastante inferior. La producción de estas toxinas por la cepa tipo de la especie *P. verrucosum*, IMI 200.310, considerada como ocratoxígena en las diferentes colecciones, ha evolucionado a lo largo de los años, como se puede comprobar en la bibliografía. Así, en trabajos realizados en los años 80 se detectaba OA (152, 352), mientras en nuestro estudio ha elaborado cantidades muy bajas de toxina (0,6 µg/g en CYA), no detectables mediante TLC. Larsen y colaboradores (244) no detectaron OA. Según diversos autores (152, 244, 352), esta cepa no produce CIT, por lo que se la incluyó en el quimiotipo no productor de CIT del trabajo de Frisvad y Filtenborg (152).

Las 11 cepas de *P. crustosum* ensayadas han producido PEN A. Otros autores han citado también que casi la totalidad de las cepas de esta especie son productoras de esta micotoxina (123, 159, 350, 360, 363, 402). *Penicillium crustosum* es la principal fuente de PEN A en alimentos: se aísla frecuentemente de cereales, frutos secos, derivados cárnicos, queso y fruta (117, 152, 360).

La única cepa ensayada de *P. glandicola*, procedente de una colección de cultivo, también produjo PEN A. Esta especie también se considera productora de esta micotoxina (147, 159, 360, 363), aunque es poco común en alimentos, aislándose esporádicamente de diferentes cereales y derivados cárnicos (360).

También produjo PEN A la única cepa de *P. janczewskii* aislada, de una muestra de tierra, en nuestro estudio. Esta capacidad de producción ya ha sido citada (117, 147, 159, 360, 363), aunque se trata de una especie que no suele aparecer en alimentos, mientras sí es aislada frecuentemente de muestras de tierra (360).

Una de las dos cepas de *P. echinulatum* aislada en el presente trabajo produjo PEN A. Aunque esta especie no se considera productora de ninguna micotoxina de manera consistente (360), Bridge y colaboradores citaron la producción de PEN A y de patulina (57). *Penicillium echinulatum* presenta una gran similitud morfológica con *P. crustosum*, la especie de mayor producción de PEN A del género *Penicillium*, por lo que podrían compartir esta característica, como ocurre con *P. janczewskii* y *P. canescens* (360).

Cinco de las seis cepas de *P. chrysogenum* aisladas de uvas han producido PEN A. Las 19 cepas de esta especie con otros orígenes no han presentado esta producción. *Penicillium chrysogenum* no se considera una especie productora de PEN A (360), ni se ha encontrado ninguna cita bibliográfica previa de esta producción. Además del distinto origen y la producción de PEN A, dos de estas cepas presentaban un pigmento difusible anaranjado, en vez del amarillo típico de la especie, como única característica morfológica especial.

Dos cepas de *P. aurantiogriseum*, de las 55 ensayadas, produjeron PEN A. Estas dos cepas elaboraron también AP (Tablas 27 y 30). La capacidad de producir estas dos micotoxinas conjuntamente es característica (152, 159, 162, 274) de la variedad *melanoconidium* de *P. aurantiogriseum*, según Frisvad y Filtenborg (152), variedad a la que luego propusieron como especie: *P. melanoconidium* (274). Esta especie se considera actualmente sinónima de *P. aurantiogriseum* (366). Sin embargo, *P. melanoconidium* es de las pocas especies propuestas dentro del complejo *P. aurantiogriseum* (Tabla 3) que presenta diferencias morfológicas respecto a las restantes. Así, en nuestro estudio, estas dos cepas presentaban el anverso de la colonia verde-azul oscuro, a lo que se debe el nombre, y el reverso de amarillo a naranja en los medios CYA y MEA, coincidiendo con la descripción de Frisvad y Filtenborg (152). Estas características son algo distintas a las de *P. aurantiogriseum* (350, 360).

Algo similar ha sucedido con la cepa NRRL 958 de *P. viridicatum*. Esta cepa ha presentado producción de PEN A en nuestro estudio. La producción de esta toxina por *P. viridicatum* fue citada con anterioridad (57). Sin embargo, la cepa NRRL 958 fue recibida como *P. viridicatum* de la colección de cultivos americana, pero consta actualmente como *P. melanoconidium* en la base de datos de la colección CBS, según la

reidentificación de Frisvad y su posterior depósito como CBS 109603 en Julio del 2001 (82). En ésta se señala la capacidad de producir PEN A y AP por esta cepa, aunque esta última toxina no fue detectada en nuestro trabajo.

Otra especie considerada en distintos trabajos como productora de PEN A es *P. canescens* (116, 117, 360, 363). Esta especie no suele aparecer en alimentos, sino que se aísla frecuentemente de muestras de tierra (360). Las dos cepas de esta especie aisladas en nuestro estudio, sin embargo, no presentaron la producción de esta micotoxina, sino que una produjo AP y la otra CIT (Tablas 27 y 28), micotoxinas no relacionadas con esta especie de forma consistente (360). La variedad *carneum* de *P. roqueforti* (152), propuesta como especie, *P. carneum*, también elabora PEN A (48). En nuestro estudio no se ha detectado PEN A (ni AP) de los extractos de las cepas de *P. roqueforti* estudiadas, por lo que podríamos pensar que no corresponden a la variedad *carneum*.

Según Di Menna y colaboradores (117), también *P. janthinellum* es capaz de producir PEN A, aunque en pequeñas cantidades. En nuestro estudio las tres cepas de esta especie ensayadas no han producido ninguna de las micotoxinas estudiadas. Otras especies, aunque poco comunes, productoras de PEN A son *P. clavigerum* (144, 147, 154) y *P. nova-zelandiae* (117).

En el medio CYA la detección de PEN A mediante TLC ha sido mejor a la obtenida en YES (Tabla 30). Para las restantes toxinas ensayadas, en cambio, esta detección ha sido igual en ambos medios, como sucedía con la OA (Tabla 29) o ligeramente mejor en YES que en CYA, como sucedía con la CIT y el AP (Tablas 27 y 28). Frisvad y Filtenborg ya citaron que la producción de los alcaloides intracelulares roquefortina C, meleagrina, oxalina y penitrem A (151, 154) y de las naftoquinonas xantomegnina, viomelleína y vioxantina se veían favorecidas en el medio CYA mientras el resto de micotoxinas se detectaban mejor en YES (151, 152).

6.2.2.2. Discusión de los resultados correspondientes a la detección y cuantificación de OA mediante HPLC

Penicillium verrucosum ha sido la única especie de la que se ha detectado producción de OA mediante esta técnica. Se detectó OA, en al menos uno de los medios probados, en 46 de las 52 cepas analizadas mediante HPLC (Tabla 31), con lo que el porcentaje de cepas productoras ascendió del 76,9% obtenido mediante TLC a un 84,6%.

La cantidad de OA media producida en YES fue ligeramente superior a la obtenida en CYA, aunque no se encontraron diferencias significativas ($p=0,167$). Si bien para algunas cepas se detectó más OA en CYA y para otras en YES, para la mayoría esta producción fue similar en ambos medios (Tabla 31).

Las 11 cepas ensayadas en este estudio que corresponderían con *P. nordicum* según Larsen y colaboradores (244) o con el grupo I de Castellá y colaboradores (79) (Tabla 34) presentaron una mayor producción de OA que las 25 que corresponderían con *P. verrucosum*. Estas diferencias se observaron tanto para el medio CYA ($p=0,000$) como para el YES ($p=0,021$), coincidiendo con lo descrito por estos autores (79, 244). La producción media de OA en cada grupo fue superior en YES que en CYA, aunque no se presentaron diferencias significativas entre los dos medios ni para las 11 cepas asignadas a *P. nordicum* ($p=0,368$) ni para las 35 asignadas a *P. verrucosum* ($p=0,205$). Estos resultados difieren de los obtenidos por Castellá y colaboradores (79) en los cuáles, realizando una caracterización a nivel metabólico de algunas de las cepas ensayadas, obtuvieron una producción de OA por *P. verrucosum* superior en CYA que en YES, a diferencia de lo que sucedía con *P. nordicum*.

Además de la mayor producción de OA, ninguna de las cepas consideradas *P. nordicum* han producido CIT, mientras 14 de las 25 cepas de *P. verrucosum* sí la han elaborado (Tabla 34), coincidiendo con lo postulado por estos autores (79, 244).

Así, dado el origen (una muestra de trigo, seis de cebada y una mezcla de avena y cebada destinada a la alimentación de équidos) y la producción de OA y CIT (Tablas 28 y 31) de las cepas de *P. verrucosum* aisladas en nuestro muestreo de piensos y materias

primas, estas cepas pertenecerían a la especie ocratoxígena *P. verrucosum* y no a *P. nordicum*.

Cabe considerar también, como curiosidad, que la primera cepa de *Penicillium* spp. descrita como productora de OA (495) se identificó en su día como *P. viridicatum*. Años más tarde, se consideró perteneciente a *P. verrucosum*, dado que esta especie fue considerada como la única capaz de producir OA de su género (352). Las características de esta cepa coinciden con las descritas actualmente para la especie ocratoxígena *P. nordicum* (244), al originarse de un producto cárnico cocido, presentar una importante producción de OA (695 mg OA/l de medio YES líquido tras 7 a 14 días de incubación, incluyendo el micelio) y no presentar capacidad de producir CIT.

6.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MOLECULAR DE *P. verrucosum*

6.3.1. Discusión de los resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2

Las secuencias del fragmento de DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2 de las cepas de *P. viridicatum* y *P. solitum* ensayadas han resultado muy similares a las de *P. verrucosum*, como describieron otros autores para un gran número de especies del subgénero *Penicillium* (346, 444, 445). Estas cepas presentaron unas ligeras diferencias respecto a *P. verrucosum* que coincidían con las descritas en los citados trabajos, incluso para la cepa de *P. viridicatum* reidentificada como *P. melanoconidium* (apartado 6.2.2.1.) por Frisvad (82). La especie *P. glandicola* presenta más diferencias respecto a *P. verrucosum* que las otras dos especies terverticiladas anteriormente citadas. Cabe destacar que esta especie se considera, mediante criterios morfológicos, muy diferente a las anteriores, situándose en una sección distinta de la sección *Penicillium* de Pitt (350). La secuencia de la especie del subgénero *Aspergilloides*, *P. glabrum*, utilizada como control externo, presentó diferencias respecto a las anteriores incluso en la región de DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal (Figuras 8 y 9), demostrando ser una especie filogenéticamente más alejada, como concluyen otros trabajos (346, 521).

La secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2 ha mostrado una gran uniformidad entre las cepas de *P. verrucosum* ensayadas. La principal diferencia encontrada fue una transición guanina por adenina en la posición 103 del ITS 1. Nueve de las 15 cepas secuenciadas (P293, P297, P346, P364, P410, P437, P440, BFE 487, e IBT 12803) presentaron adenina en esta posición mientras las seis cepas restantes (BFE488, BFE 496, BFE 500, BFE 506, P438 e IMI 200.310) presentaron una base de guanina. Esta transición intraespecífica ya fue descrita por otros autores para *P. verrucosum* (79, 444, 445).

Castellá y colaboradores (79) detectaron dos cambios nucleotídicos en la región ITS1 en 13 cepas de *P. verrucosum*. El primero fue una transversión citosina por adenina que describieron como exclusiva del grupo I, y que según sus resultados de AFLP, RAPD y

análisis quimiotaxonómico correspondería a la especie *P. nordicum*. Esta transversión se presentó en tres de las seis cepas del tipo I secuenciadas en el estudio. La segunda mutación fue una transición guanina por adenina que describieron como exclusiva del grupo II, y que según sus resultados de AFLP, RAPD y análisis quimiotaxonómico correspondería a la especie *P. verrucosum*. Esta transición se presentó en tres de las siete cepas del tipo II secuenciadas.

En nuestro estudio, las secuencias obtenidas no presentaron la primera mutación mientras que la transición guanina por adenina apareció en 6 (P438, BFE488, BFE 496, BFE 500, BFE 506 e IMI 200.310) de las 15 cepas de *P. verrucosum* analizadas.

Esta transición nos separa las cepas de *P. verrucosum* en dos grupos al realizar el test 'Bootstrap' de filogenia (Figura 9). El grupo de cepas con guanina en la posición 103 del ITS1 engloba dos cepas moderadamente productoras de OA, dos poco productoras y dos no productoras. El grupo de cepas con adenina en esta posición engloba una cepa muy productora de OA, siete moderadamente productoras y una cepa muy poco productora. Respecto a la producción de CIT encontramos la misma proporción de cepas productoras de la toxina en ambos grupos. La coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia en YES también se presentó en la misma proporción de cepas en ambos grupos.

6.3.2. Discusión de los resultados correspondientes al análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)

Mediante el RAPD del DNA genómico se han dividido las cepas de *P. verrucosum* en dos grupos. En el grupo A están incluidas las cepas correspondientes al grupo I de Castellá y colaboradores (79) y dos cepas de *P. nordicum* según Larsen y colaboradores (244) (Figura 10, Tabla 34). En el grupo B se incluyen cepas correspondientes al grupo II de Castellá y colaboradores (79), la cepa neotipo de *P. verrucosum* y las 11 cepas aisladas en nuestro laboratorio.

Entre las cepas del grupo B se ha observado una mayor heterogeneidad que entre las del grupo A (Figura 10), aunque cabe considerar que se han analizado más cepas del grupo B que del grupo A.

Las cepas englobadas en el grupo A proceden mayoritariamente de productos cárnicos, a excepción de la cepa BFE 487. Todas las cepas fueron moderada o altamente productoras de OA y ninguna produjo CIT. Ninguna produjo coloración marrón rojiza en YES a excepción de la BFE 487 y la BFE 549 (Figura 10, Tabla 34).

Las cepas englobadas en el grupo B proceden mayoritariamente de productos vegetales, a excepción de la cepa BFE 521. Todas las cepas produjeron OA, a excepción de la BFE 488 y la BFE 506, aunque en general en cantidades inferiores a las del grupo A. Se detectó CIT en 15 de las 20 cepas ensayadas. Un 60% de las cepas presentaron coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia en el medio YES (Figura 10, Tabla 34).

En el grupo B se incluyeron las 11 cepas aisladas en nuestro laboratorio, mayoritariamente de muestras de cebada. En general, estas cepas produjeron OA de forma moderada y todas ellas producen CIT a excepción de la P410. Más del 80% (9 de las 11) presentaron coloración marrón rojiza en el reverso de la colonia desarrollada en el medio YES.

Castellá y colaboradores (79) describieron que mediante técnicas de RAPD y AFLP se distinguían dos grupos en *P. verrucosum*. Las cepas de los dos grupos se diferenciaban por su capacidad de producir OA, mientras que en el grupo I se agrupaban cepas altamente productoras de OA, las cepas del grupo II fueron moderada o no productoras de OA. De igual modo, las cepas del grupo I se aislaron de queso y productos cárnicos mientras las del grupo II se originaron de sustratos vegetales. Además, se observaron diferencias entre los dos grupos respecto a la producción de otros metabolitos secundarios. Las cepas del grupo I presentaron el quimiotipo de *P. nordicum* y las del grupo II el de *P. verrucosum*.

A pesar de que la técnica de RAPD es muy sensible a los cambios en las concentraciones de los reactivos de la reacción de PCR, haciendo que esta técnica sea, a veces, poco reproducible (62), en nuestro estudio los resultados han coincidido con los obtenidos por los autores que describieron esta técnica (79). De este modo, los grupos A

y B de nuestro estudio corresponden con los grupos I y II de Castellá y colaboradores (79), respectivamente.

Por lo tanto, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en el estudio molecular de *P. verrucosum*, la técnica de RAPD, en combinación con el origen de la cepa y datos de producción de OA y CIT, permite diferenciar dos grupos, A y B, que corresponderían con *P. nordicum* y *P. verrucosum*, respectivamente, especies propuestas por Larsen y colaboradores (244) basándose en criterios de metabolismo secundario o quimiotaxonomía. La homología entre las secuencias ITS1-5.8S-ITS2 indica una estrecha relación filogenética entre ambos grupos. Éstos presentan distintas características fenotípicas y genotípicas posiblemente a causa de su adaptación a diferentes hábitats.

6.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL EFECTO DE DIVERSOS FACTORES ABIÓTICOS SOBRE LA MORFOLOGÍA Y LA PRODUCCIÓN DE OA Y CIT EN CEPAS DE *P. verrucosum*

6.4.1. Discusión de los métodos empleados

6.4.1.1. Discusión de los métodos empleados: medios de cultivo

El medio base utilizado para realizar los 4 modelos fue el medio Czapeck Yeast extract Agar (CYA). Este medio es de uso general en identificación (350, 360) y ha sido recomendado para detectar la producción de las micotoxinas estudiadas (7, 49).

Cabe tener en cuenta diversas situaciones que se han producido al preparar y emplear los medios de cultivo para los distintos modelos. Así, en el modelo con diferentes fuentes de carbono, los medios de cultivo con almidón presentaron una mayor opacidad que los elaborados con el resto de azúcares. En estos medios, tras 7 días de incubación de las cepas de *P. verrucosum*, se observaba un halo alrededor de las colonias de mayor opacidad que la del medio original. Este halo opaco se transformaba en un halo transparente a los 14 o más días de incubación. Probablemente, los cambios descritos se deban a la degradación del almidón en azúcares de cadena más corta y mayor solubilidad.

Existen diversas maneras de modificar la a_w de un sustrato. Los cereales y sustratos naturales se suelen desecar a altas temperaturas para disminuir su a_w (8, 10, 25). En los medios sintéticos o semisintéticos se suele disminuir mediante la adición de compuestos (sales, azúcares o alcoholes) de bajo peso molecular. Los más comúnmente utilizados son la sacarosa, el glicerol y el cloruro sódico (90, 322, 339, 385, 408). Northolt y colaboradores (322) ensayaron tanto la sacarosa como el glicerol para disminuir la a_w del medio, sin obtener diferencias destacables en el crecimiento ni en la producción de OA por las cepas ensayadas (de *A. ochraceus*, *P. viridicatum* y *P. cyclopium*). Sin embargo, la mayoría de estudios utilizan glicerol al considerar que altera menos la composición en nutrientes del medio de cultivo (339, 385, 408).

Por otra parte, cabe señalar también que la incubación del medio de cultivo sin inocular a una temperatura de 25°C durante 28 días no supuso un descenso importante del agua disponible en el medio, según los resultados obtenidos (apartado 5.3.2.1.). De esta manera, pudimos considerar el valor de la a_w del medio constante a lo largo del estudio.

Respecto al estudio del efecto del pH, los medios de cultivo de pH inferior a 5 fueron elaborados de forma distinta (apartado 4.4.2.3.) para evitar la hidrólisis del agar (184, 188). El resultado de esta técnica fue satisfactorio. Sin embargo, en el caso de los medios con pH básico no fue posible evitar la caramelización o la reacción de Maillard que se produjo durante el autoclavado (374). Se observó un oscurecimiento del medio apreciable visiblemente en el medio de cultivo con pH 10 (el medio de cultivo presentaba un color marrón). El medio de cultivo con pH 9 también presentaba un ligero oscurecimiento, aunque más ligero que en el caso anterior. Cabe tener en cuenta que estas reacciones químicas pueden modificar la composición en nutrientes (de azúcares y aminoácidos, sobretodo) del medio de cultivo respecto al resto de medios empleados (374).

6.4.1.2. Discusión de los métodos empleados: TLC

La TLC ha demostrado ser una sencilla y buena técnica de cribado en la detección de micotoxinas (49, 135, 137, 138, 151, 152, 161, 193, 301, 333, 438). También se utiliza ampliamente para la cuantificación de las micotoxinas, ya sea mediante valoración visual (13, 68, 109, 112, 238, 334, 339) o mediante distintas técnicas espectrofotométricas (25, 67, 186, 322). El diseño de nuestros modelos de producción de micotoxinas nos ha permitido obtener unos resultados semicuantitativos respecto a la concentración del patrón utilizado.

6.4.1.3. Discusión de los métodos empleados: técnica de extracción (valoración según los resultados obtenidos mediante HPLC)

La técnica de HPLC es la más ampliamente utilizada actualmente para la detección y cuantificación de OA (49, 391, 427, 429, 441, 455, 525, 526). En nuestro estudio, el contar con un dato cuantitativo nos ha permitido valorar, comparando las dos réplicas efectuadas en cada modelo, la técnica de extracción empleada. Los resultados obtenidos

en los 4 modelos (a excepción de un único caso en el modelo de temperaturas (apartado 5.4.4.3.)) no han presentado diferencias significativas entre las dos réplicas realizadas (apartados 5.4.1.3., 5.4.2.3., 5.4.3.3. y 5.4.4.3.). Así, la similitud de la cuantificación de la OA en las dos réplicas efectuadas en cada experimento demuestra que la técnica de extracción empleada (4, 49) presenta una buena repetibilidad.

6.4.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de diversos factores abióticos sobre la morfología en cepas de *Penicillium verrucosum*

La morfología en *Penicillium* spp. es extremadamente variable según el sustrato en el que crezca (350, 360). En nuestros modelos el medio de cultivo base utilizado ha sido siempre el CYA, ajustando en cada caso el factor estudiado, para minimizar la posible variabilidad en la morfología.

Cada una de las cepas ensayadas ha mantenido sus características morfológicas generales (textura, coloración de la esporulación, presencia de exudado y de pigmento) en cada modelo y entre los diferentes modelos. Las principales características morfológicas que han variado son las que nos reflejan un mejor o peor crecimiento, es decir, el diámetro y el grado de esporulación. Este último se valora por la cantidad de coloración debida a la formación de conidios, la oscuridad de esta coloración y, en menor grado, la textura. Otras características (por ejemplo, la presencia de exudado) nos indican el tiempo que tarda la colonia en presentar su desarrollo máximo.

En el modelo de las fuentes de carbono, se ha obtenido un mejor crecimiento de las cepas de *P. verrucosum* en los medios con almidón respecto a los medios con los mono y disacáridos. Esta valoración se realizó en base a las coloraciones que presentaban las colonias a los pocos días de incubación, el alto grado de esporulación, las texturas más complejas y el mayor diámetro de las colonias en estos medios. Las diferencias en crecimiento obtenidas entre los distintos almidones no fueron muy destacables. En la bibliografía consultada, no se han encontrado descripciones de las diferencias morfológicas y de crecimiento que se dan entre las colonias desarrolladas en medios con esta fuente de carbono.

Las condiciones que más han afectado el crecimiento de las colonias de *P. verrucosum* utilizadas han sido la baja actividad de agua y las temperaturas extremas. Las características que se observaron en estas condiciones fueron una disminución del diámetro y un retraso en la esporulación. Esto nos indica que el crecimiento con una baja de a_w o con condiciones extremas de temperatura se produce de manera más lenta. Condiciones aún más extremas de estos dos factores llegan a inhibir el crecimiento de *P. verrucosum*, como sucedió para la temperatura de 35°C en nuestro estudio y como demuestran los resultados de otros autores para la temperatura (322) y para la a_w (322, 339). Las altas temperaturas son, de las condiciones probadas, las que más afectan visiblemente a la morfología de *P. verrucosum*. Las colonias desarrolladas a la temperatura de incubación de 30°C son algo elevadas, de aspecto ‘cerebriforme’, presentan numerosos surcos sin organización aparente y la capacidad de esporulación está disminuida.

A pesar de haber ensayado un rango de valores de pH muy amplio, el crecimiento obtenido por las cepas de *P. verrucosum* a diferentes condiciones de pH ha presentado poca variabilidad, como citaron otros autores (184, 319). Sin embargo, las condiciones de pH extremas han llegado a inhibir el crecimiento de algunas de las cepas. A pH 2 únicamente presentó crecimiento la cepa BFE 487. Los medios con pH básico no llegaron a inhibir el crecimiento de las cepas ensayadas, aunque para la cepa BFE 488 se desarrolló una única colonia (de las seis inoculaciones) en los medios con pH 9 y 10. Aunque únicamente modificando el pH sea difícil inhibir totalmente el crecimiento de *P. verrucosum*, algunos autores han citado que a condiciones extremas de pH disminuye el rango de temperatura y de a_w en el que se obtiene crecimiento de especies de diversos géneros fúngicos (entre ellas cinco especies pertenecientes al género *Penicillium*) (283).

El diámetro de la colonia en las cepas ensayadas ha presentado un comportamiento, a lo largo de los distintos tiempos de lectura, muy similar entre los distintos modelos (Tablas 35, 40, 44 y 48 y Gráficas 2, 5, 8 y 11). Así, exceptuando los extremos de temperatura y los extremos inferiores de a_w y pH, tras 7 días de incubación presentaban un diámetro de alrededor de 20 mm, tal como se describe para la especie (350, 360), mientras éste se doblaba (de alrededor de 40 mm en los distintos modelos) a los 14 días de incubación. El incremento del diámetro de la colonia posterior a los 14 días no era tan acusado, debido, probablemente, a la disminución de la concentración de nutrientes en el medio.

6.4.3. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de diversos factores abióticos sobre la producción de OA y CIT

6.4.3.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de la fuente de carbono sobre la producción de OA y CIT

En general, la producción de OA y de CIT, por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas, ha sido superior en los medios con mono y disacáridos respecto a la obtenida en los medios con almidones como fuente de carbono (apartados 5.4.1.2. y 5.4.1.3.). Esta diferencia puede ser debida a la mayor disponibilidad de la fuente de carbono con glúcidos sencillos y dobles que con almidones.

Respecto a los diferentes mono y disacáridos empleados, la producción de OA fue significativamente superior, a partir de los 14 días de incubación, en el medio con sacarosa y en el medio control CYA que en los que incorporaban glucosa o fructosa (Tabla 38). Así, la producción de OA por *P. verrucosum* se ve favorecida si la fuente de carbono en el medio es la sacarosa (ya que el CYA también contiene sacarosa en su composición). La producción de OA por las distintas cepas en el medio con fructosa fue ligeramente superior a la obtenida en el medio con glucosa. Lai y colaboradores (238), ensayando cepas de *Aspergillus* spp. (*A. ochraceus*, *A. sulphureus* y *A. melleus*), obtuvieron una cantidad similar de OA en medio líquido con glucosa y con sacarosa e inferior con otros azúcares (maltosa, manosa, galactosa, xilosa, arabinosa). Las diferencias obtenidas en nuestro estudio entre el medio control CYA y el medio con sacarosa (Tabla 38) se deben al diferente origen de sus componentes, ya que es la única diferencia que presentan. Así, el medio control se elaboró a partir de un preparado comercial (apartado 4.5.1.) mientras al medio con sacarosa se añadieron los distintos componentes por separado.

La producción de OA y CIT fue similar en los medios que incorporaban diferentes almidones (Tablas 37 y 38). El almidón de patata es el único que ha provocado una mayor producción de OA a la obtenida con el resto de almidones, aunque sólo por la cepa BFE 487 a los 28 días de incubación. No existen modelos, en la bibliografía consultada, sobre la producción de estas toxinas con almidones como fuente de carbono. En arroz esterilizado, Saxena y colaboradores (409) obtuvieron una producción de OA

por *P. verrucosum* similar a la obtenida en nuestro medio con almidón de arroz. Algunos estudios han obtenido también cantidades de OA similares entre un producto natural y un medio semisintético a imitación del primero, como en cebada (322), queso (188, 322) o pan (339).

La producción de OA y CIT, sin embargo, está mucho más estudiada en granos de cereal. Axberg y colaboradores (23) demostraron que, a diferencia de lo que ocurría en el trigo, en la cebada se relaciona una mayor producción de OA por *P. verrucosum* con una mayor cantidad de almidón en el grano. La producción en estos sustratos parece ser bastante lenta, como se demuestra en estudios realizados inoculando cepas de *P. verrucosum* en trigo (282, 300) y en maíz (282), en los que la cantidad de OA seguía incrementando tras 28 días de incubación. Lo mismo sucedía con la CIT en maíz (282). Los máximos de acumulación en cebada de OA (23, 109) y de CIT (109) estuvieron entre las 7 y las 23 semanas de incubación tras la inoculación de *P. verrucosum*, mientras estos máximos para la producción de OA y CIT se situaron entre las 14 y 20 semanas al inocular trigo (44). Este máximo se presentó entre las 14 y 48 semanas cuando la OA la producía la flora natural de distintos cereales (8, 10, 11).

En cuanto a la cantidad de OA elaborada por las distintas cepas en nuestro trabajo ha presentado grandes diferencias (Tabla 38), fundamentalmente debidas a la cepa BFE 487, que ha producido una cantidad de OA muy superior respecto a las restantes cepas ensayadas.

La cantidad de OA elaborada por las distintas cepas no ha presentado grandes variaciones entre los distintos tiempos de lectura realizados. Sin embargo, las diferencias en la concentración de OA obtenidas entre las distintas cepas y medios empleados no presentan la misma tendencia en el tiempo, con lo que no es posible asignar un tiempo de lectura al que se obtenga la máxima producción de OA.

6.4.3.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de la a_w sobre la producción de OA y CIT

La a_w del medio ha resultado tener un claro efecto sobre la producción de OA por las cepas de *P. verrucosum* ensayadas. Todas las cepas han elaborado OA en los medios de cultivo con a_w de 0,92 a 0,96 en todos los tiempos de lectura. La cepa BFE 487 produjo más OA a 0,94 y 0,96 en los cuatro tiempos de lectura. La cepa BFE 496 ha presentado una concentración de OA significativamente superior a 0,96. Respecto a las cepas BFE 500 y BFE 506, aunque han elaborado una menor cantidad de OA que las restantes, se han obtenido en general concentraciones de OA algo más elevadas a 0,96. Northolt y colaboradores (322) obtuvieron un máximo de producción de OA similar por las tres cepas ensayadas, de entre 0,95 y 0,99. Otros autores obtuvieron la máxima cantidad de OA a una a_w inferior, de 0,92, en un medio análogo de pan (339).

La producción de CIT también ha resultado favorecida a unos valores de a_w similares a los de la OA. La cepa BFE 496 produjo más CIT en los medios con una a_w de entre 0,94 y 0,98, mientras para la cepa BFE 488 esta producción fue mayor en los medios con a_w de 0,94 y 0,96. Para la cepa BFE 506, únicamente se destacó la a_w de 0,96. Al contrario de lo sucedido con la cepa BFE 496, las cepas BFE 488 y BFE 506 no produjeron CIT a valores de a_w de 0,98 y 0,99. Otros autores obtuvieron un máximo para la producción de CIT de 0,92 en un análogo de pan (339). Diversos trabajos, al igual que en nuestros resultados, obtuvieron la máxima producción de OA y de CIT a los mismos valores de a_w , o de humedad en el caso de cereales (8, 10, 300, 339).

Tres de las cuatro cepas de *P. verrucosum* (BFE 487, BFE 496 y BFE 500) han elaborado OA a la mínima a_w ensayada, de 0,88, en al menos uno de los tiempos de lectura (Tabla 43). Diversos autores citan que la a_w mínima para la producción de OA por cepas ocratóxigenas de *Penicillium* se sitúa entre 0,83 a 0,90 en medio sintético (322), alrededor de 0,80 en un análogo de pan (339) y a valores de 0,85 en granos de trigo (189).

La mínima a_w requerida para la producción de CIT en nuestro estudio fue de 0,88 (mínimo valor ensayado) para la cepa BFE 496, de 0,90 para la BFE 506 y de 0,92 para

la BFE 488. Patterson y Damoglou situaron en 0,80 la a_w mínima para la producción de CIT en un análogo de pan (339).

Al igual que en el estudio sobre las diferentes fuentes de carbono, la cantidad de OA elaborada por las distintas cepas ha presentado grandes diferencias (Tabla 43). La cepa BFE 487 ha elaborado una cantidad de OA muy superior a la del resto de cepas. Esta diferencia es más evidente a la a_w a la que esta cepa ha presentado la máxima producción de OA (0,94 y 0,96).

Las máximas concentraciones de OA producidas por las distintas cepas (a excepción de la BFE 500) han sido superiores a las máximas obtenidas en los restantes modelos, coincidiendo con autores que consideran a la humedad el factor más influyente en la producción de OA, seguido de la temperatura (104).

Cabe destacar que la cepa BFE 506, considerada como negativa para la producción de OA y CIT, produjo pequeñas cantidades de ambas micotoxinas a las a_w comprendidas entre 0,90 y 0,96 en al menos uno de los tiempos de lectura. La OA también se detectó, aunque en concentraciones muy bajas, a los valores de a_w de 0,98 y 0,99 a los 14 días de incubación (Tabla 43). Esto nos sugiere que algunas cepas de la especie podrían considerarse atoxígenas en una valoración rutinaria en CYA (con una a_w de 0,99 y tras 7 a 10 días de incubación).

Así, la detección de OA y CIT producidas por *P. verrucosum* podría verse mejorada disminuyendo la a_w del medio de cultivo empleado. Esto nos permitiría valorar mejor la cantidad de ambas micotoxinas que es capaz de elaborar la cepa, ya que a una a_w de entre 0,94 y 0,96 se presentan los máximos de producción de todas las cepas ensayadas.

Las cepas que han producido una alta concentración de OA han presentado un comportamiento similar en el tiempo. Así, la cepa BFE 487 presentó, en general, la máxima concentración de OA a los 28 días de incubación, casi doblando la producción de los 21 días a los valores de 0,92 a 0,98. La cepa BFE 496 presentó un importante incremento en la concentración de OA a los 21 días de incubación, que se mantuvo a los 28 días. Esta tendencia es más evidente a la a_w a la que las cepas presentan la máxima producción de OA (Tabla 43). Otros autores citan la máxima producción de OA

alrededor de 40 días de incubación en YES líquido por una cepa de *Penicillium* sp. (67) y a los 28 días, el último tiempo de lectura ensayado, en cebada por *P. viridicatum* (185).

6.4.3.3. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto del pH sobre la producción de OA y CIT

El pH del medio también ha influido en la producción de OA y de CIT. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten fijar un único pH óptimo para la producción de estas toxinas. Valores ácidos (iguales o inferiores a 5) no promueven una mayor formación de OA. En cambio, con valores de pH de entre 6 y 10 existe una mayor producción de OA, sobretodo por parte de las cepas BFE 487 y BFE 496 (Tabla 47). La cepa BFE 487 presentó un máximo de producción de OA a pH 10, aunque la producción obtenida en los medios con pH de 6 a 10 fue similar. La cepa BFE 496 obtuvo una máxima producción de OA en el medio con pH 6, aunque para esta cepa la producción de OA a valores de pH de entre 6 a 9 no presentó muchas diferencias. La cepa BFE 500, aunque ha elaborado una baja cantidad de OA, parece presentar una mayor producción a pH 6,5 sin observar ningún otro efecto relevante de los valores de pH ensayados. La cepa BFE 506, que al igual que la BFE 500 ha elaborado poca OA, parece presentar su máximo de producción de OA a valores de pH de entre 5 y 5,5, sin haberse presentado producción a pH 3 y 4. Estas dos últimas cepas, aunque elaboraron cantidades muy bajas de OA, también presentaron una mayor producción de OA a los valores de pH básicos que a los extremos ácidos ensayados. Otros trabajos han obtenido un máximo de producción de OA a valores de pH ligeramente ácidos, de 6,5 (68) y de 5,6 (339). No hemos encontrado resultados, en la bibliografía consultada, acerca del efecto de los valores de pH básicos sobre la producción de OA. Sin embargo, cabe considerar que, para los medios de pH básico, pueden encontrarse diferencias de composición respecto al resto, al haberse producido un pardeamiento enzimático (visible en los medios de pH 9 y 10).

La cepa BFE 496 fue capaz de elaborar CIT en todos los valores de pH en los que se desarrolló y a todos los tiempos de lectura (Tabla 46). La producción de CIT fue superior en los medios con pH de 5,5 a 10 por la cepa BFE 496. Patterson y Damoglou (339) obtuvieron un máximo de producción de CIT a pH 5,6 en un análogo de pan. Sin

embargo, las otras dos cepas que han producido esta micotoxina (BFE 500 y BFE 488) lo han hecho sólo a los valores de pH 3 y 9 a partir de los 21 días de incubación (la cepa BFE 488 también produjo pequeñas cantidades a pH 4 y 10 tras 28 días de incubación). Este efecto de los valores de pH extremos sobre la producción de CIT no ha sido citado previamente en la bibliografía consultada.

En resumen, podemos destacar que la producción de OA se ha detectado, a excepción de la cepa BFE 506 a pH 3 y 4, en todos los valores de pH ensayados en los que se ha obtenido crecimiento por las distintas cepas (2 a 10 para la cepa BFE 487 y de 3 a 10 para las restantes) en al menos uno de los tiempos de lectura. La producción de CIT se ha detectado en todo el rango en el que se ha producido crecimiento de la cepa BFE 496. Las cepas BFE 488 y BFE 506, sin embargo, sólo la han producido a los valores de pH extremos. En la bibliografía consultada no se han encontrado datos acerca de la producción de estas toxinas en todo el rango de pH tratado en este estudio.

Nuevamente, la cepa BFE 487 ha producido una cantidad de OA muy superior a la obtenida del resto de cepas. Esta cepa presentó, además, otra característica que la diferenció de las restantes, al presentar crecimiento y producción de OA en el medio de cultivo con pH 2.

Cabe también destacar que la cepa BFE 506, considerada no productora de OA y CIT, ha producido OA, en muy baja cantidad, en los medios con pH de 5 a 10 y CIT en los medios con pH 3 y 9.

A diferencia de lo obtenido en los modelos de a_w y temperatura (Tablas 43 y 51), la producción de OA en los medios con distinto pH ensayados ha ido decreciendo a lo largo de los distintos tiempos de lectura (Tabla 47).

6.4.3.4. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de OA y CIT

La producción de OA y CIT ha resultado muy influenciada por la temperatura de incubación utilizada. Así, la OA se ha producido en mayor cantidad a las temperaturas de 15 a 25°C (Tabla 51). Para la cepa BFE 487 este máximo de producción de OA fue de 25°C, mientras para las restantes cepas este máximo se situó entre los 15 y los 25°C, variando entre las distintas cepas y tiempos de lectura. En un estudio de Bullerman (68) se obtuvo una mayor producción de OA a 12°C que a 25°C. Otros autores, sin embargo, coinciden en señalar que a 25°C se produce la mayor cantidad de OA por cepas ocratoxígenas de *Penicillium* (185, 322).

Se ha producido OA en todo el rango de temperaturas ensayado en el que se obtuvo crecimiento (Tabla 51). A 30°C, las cepas BFE 487 y BFE 496 produjeron más OA que a 5°C, mientras la cepa BFE 506 produjo una cantidad similar a estas dos temperaturas (y similar también a la obtenida por la cepa BFE 500 a 5°C). Otros autores han citado también la producción de OA a 5°C, en bajas concentraciones, por cepas de *P. verrucosum* (68, 185, 319, 322).

La producción de CIT se presentó entre los 10 y 25°C mayoritariamente (Tabla 50). Dentro de este rango, la cepa BFE 496 produjo CIT a todas las temperaturas y en todos los tiempos de lectura ensayados. Sin embargo, la cepa BFE 488 sólo produjo CIT a 10 y a 15°C y la BFE 506 a 10°C (y a 5°C, en baja cantidad, a los 21 días de incubación). En otros estudios se detectó más CIT a 20°C que a 10°C en granos de cebada (109) y a 25°C que a 12°C en trigo (189). En medio líquido, otros autores obtuvieron la máxima producción de CIT por *P. viridicatum* a 30°C (517).

Así, como sucedía con la a_w (Tabla 42) y el pH (Tabla 46), la temperatura de incubación a la que se obtiene una mayor producción de OA por *P. verrucosum* es similar a la temperatura en la que se obtiene la mayor producción de CIT (Tabla 50). Esto sucede en términos generales para la especie y más estrictamente para cada cepa que posea la capacidad de elaborar ambas micotoxinas.

La producción de OA por la cepa BFE 487 fue superior también en este ensayo a la obtenida por las restantes cepas (Tabla 51), aunque las diferencias no fueron tan marcadas como en el modelo de a_w o de pH (Tablas 43 y 47).

Cabe destacar que la cepa BFE 506, considerada no productora de OA ni de CIT, ha elaborado de nuevo ambas micotoxinas. La OA fue detectada por HPLC en bajas concentraciones en los extractos obtenidos de todas las temperaturas ensayadas y la CIT se detectó a 10 y 5°C (a esta última temperatura únicamente en un tiempo de lectura y en muy baja cantidad).

Respecto a la tendencia en el tiempo de la producción de OA y CIT, y en general, se ha observado un aumento de la concentración de la OA a los 14 días de incubación, para mantenerse después más o menos constante o aumentar ligeramente a los 28 días de incubación. La cepa BFE 487 no ha seguido esta tendencia, sino que a las temperaturas de 15 a 25°C ha presentado la máxima producción de OA a los 7 días de incubación, mientras a las restantes temperaturas este máximo ha sido siempre más tardío (Tabla 51).

6.4.4. Discusión de la relación existente entre los resultados correspondientes al estudio de diversos factores abióticos sobre la morfología de *P. verrucosum* y sobre la producción de OA y CIT

Al tratarse de metabolismo secundario, la producción de micotoxinas suele relacionarse con fases tardías del crecimiento, situaciones de estrés o con sustratos que no favorezcan el crecimiento vegetativo (37). Esta relación, sin embargo, no siempre se cumple, al depender la producción de metabolitos secundarios notablemente del sustrato en que se desarrollan las cepas (282, 312, 390).

Diversos estudios citan que el sustrato ejerce un mayor efecto sobre la producción de micotoxinas que sobre la cantidad de micelio formado (11, 12, 23, 186, 238, 281). Aunque en nuestro estudio de fuentes de carbono han variado notablemente tanto el crecimiento como la producción de OA y CIT, en este caso parece existir la clásica relación inversa entre el grado de desarrollo de las colonias y el metabolismo secundario.

Sin embargo, en los modelos de a_w , pH y temperatura, los puntos en los que se obtenía el máximo crecimiento de las cepas han coincidido aproximadamente con los que presentaron la máxima producción de OA (excepto la cepa BFE 506, que produjo más OA a 10 y 15°C sin ser su temperatura óptima de crecimiento, aunque, como hemos señalado, esta cepa elabora muy poca cantidad de estas toxinas). Este efecto no se ha presentado en los valores de pH básicos extremos (9 y 10), a los que las diferentes cepas produjeron más OA mientras el crecimiento iba disminuyendo progresivamente conforme aumentaba el pH (Tabla 44). No obstante, en estos medios cabe considerar las posibles alteraciones en su composición (apartado 4.6.1.1.).

El rango de crecimiento obtenido en los estudios de temperatura, a_w y pH para las distintas cepas de *P. verrucosum* ensayadas también ha coincidido con el rango de producción de OA (en las cepas que producen bastante cantidad de esta toxina). Estos resultados contrastan con los de otros autores (319, 322), que citan que la producción de OA se produce a rangos de a_w y temperatura más estrechos a los que permiten el crecimiento de las cepas de la especie. Sin embargo, los rangos a los que se ha producido CIT en nuestro estudio sí han resultado algo inferiores, en general, a los que han permitido el crecimiento, con lo que tal vez estas diferencias se puedan deber a la sensibilidad de la técnica cromatográfica empleada para la detección de cada toxina.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la producción de OA y CIT es posible a condiciones extremas de crecimiento, aunque a niveles muy bajos. Sin embargo, el metabolismo secundario también es muy dependiente de la capacidad toxígena de la cepa empleada.

Numerosos estudios han intentado relacionar ergosterol, glucosamina o peso de micelio seco (como indicadores de crecimiento fúngico de *P. verrucosum*) con la producción de OA, sin obtener una relación directamente proporcional (68, 112, 185, 186, 456). Por lo tanto, tomar estos parámetros indicadores del crecimiento como indicadores de la cantidad de OA presente en las muestras no parece ser fiable. En una muestra natural, además, no sería una práctica útil ya que el ergosterol presente puede provenir de cualquier cepa fúngica presente en el sustrato.

Entre los cuatro modelos realizados se han presentado algunas diferencias respecto a la producción y la cantidad detectadas de OA y CIT elaboradas por una misma cepa en condiciones similares. Cabe destacar que los cuatro ensayos se realizaron en diferentes espacios de tiempo y a partir de inóculos distintos, mientras éstos fueron idénticos en un mismo ensayo, lo que podría explicar esta variabilidad entre ellos. En este sentido, Bridge y colaboradores demostraron que variaban diversas características fisiológicas, morfológicas y de metabolismo secundario entre siembras realizadas a partir de un único conidio de una misma cepa para distintas *Penicillium* spp. (59).

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Se han aislado cepas pertenecientes a *Penicillium* spp. en más de la mitad de las muestras analizadas, identificándose un total de 34 especies que representaron un recuento parcial del 3,4% con respecto al recuento total fúngico.
2. *Penicillium aurantiogriseum* fue la única especie que se aisló de todos los tipos de muestras analizadas, presentando la mayor presencia y los mayores recuentos de todas las especies aisladas.
3. La especie ocratoxígena *P. verrucosum* muestra una baja presencia en el total de sustratos analizados, aislándose sólo de cereales y fundamentalmente de cebada.
4. Los medios CREA y CSN tienen una gran utilidad taxonómica para las especies terverticiladas de *Penicillium*, pudiéndose observar una mayor gama de respuestas metabólicas en este último.
5. El crecimiento en NSA, la producción de metabolitos básicos en el medio líquido con urea y la producción de pigmento marrón en RT no han sido útiles para diferenciar las especies del género *Penicillium*.
6. En el medio YES, la formación de pigmento marrón rojizo en el reverso de las colonias, en el caso de primocultivos y subcultivos recientes de cepas de *P. verrucosum* puede ser de utilidad taxonómica para diferenciarlas de otras especies del complejo *P. aurantiogriseum*. La especie de reciente descripción, *P. nordicum*, también puede presentar dicha coloración.
7. *Penicillium aurantiogriseum* y *P. raistrickii* son las especies que presentan una mayor porcentaje de cepas productoras de AP. Todas las cepas de *P. citrinum* y *P. crustosum* han elaborado CIT y PEN A, respectivamente.
8. *Penicillium verrucosum* ha sido la única especie del género capaz de producir OA y, al igual que otras especies, puede sintetizar CIT. Las cepas ensayadas de la especie de reciente descripción, *P. nordicum*, sólo elaboran OA.

9. La técnica de extracción de toxinas empleada a partir de los cultivos en CYA y YES, seguida de su detección por métodos cromatográficos, ha resultado sencilla, rápida y de bajo coste, presentando una buena repetibilidad.
10. La detección de micotoxinas mediante TLC ha resultado un buen método de cribado para detectar cepas de *Penicillium* spp. toxígenas. La técnica de HPLC ha presentado una mayor sensibilidad en la detección de la OA.
11. La secuencia del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS 1 y 2 ha mostrado una gran uniformidad en las cepas de *P. verrucosum* ensayadas, así como en las cepas de especies relacionadas. Esta técnica no ha permitido una diferenciación entre *P. verrucosum* y la especie de reciente descripción *P. nordicum*.
12. El estudio mediante RAPD del DNA genómico con el cebador ari1 permite diferenciar dos grupos, A y B, entre las cepas de *P. verrucosum*. Las cepas del grupo A, aisladas de productos cárnicos, produjeron OA y no presentaron la capacidad de elaborar CIT, coincidiendo con la especie de reciente descripción *P. nordicum*. Las cepas del grupo B, entre las que se encuentran las identificadas morfológicamente en nuestro estudio como *P. verrucosum*, produjeron OA, en menor concentración, y/o CIT y fueron aisladas de sustratos vegetales.
13. *Penicillium verrucosum* presenta la capacidad de elaborar OA y CIT en un amplio margen de temperatura, a_w y pH. La concentración de OA producida disminuye cuando estos valores no son óptimos para su crecimiento. Los valores máximos de OA se han obtenido en las actividades de agua de 0,94 y 0,96, entre 15 y 25°C temperatura y a un pH superior a 6.
14. Si bien el desarrollo de *P. verrucosum* se ha visto favorecido con la utilización de almidones como fuente de carbono, la producción de OA y CIT ha sido superior en los medios adicionados de mono y disacáridos, siendo la sacarosa la que ha favorecido una mayor elaboración de ambas micotoxinas.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañes JC. 1997. New ochratoxigenic species in the genus *Aspergillus*. J. Food Protect., 60: 1580-1582.
2. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañes JC. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev. Iberoam. Micol., 17: S63-S68.
3. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. 1994. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. J. Food Protect., 57: 256-258.
4. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. Appl. Environ. Microb. 60: 2650-2652.
5. Abdel-Kader MIA, Moubasher AH, Abdel-Hafez SH. 1979. Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. Mycopathologia, 68: 143-147.
6. Abouzied MM, Horvath AD, Podlesny PM, Regina NP, Metodiev VD, Kamenova-Tozeva RM, Niagolova ND, Stein AD, Petropoulos EA, Ganev VS. 2002. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. Food Addit. Contam., 19: 755-764.
7. Abramson D, Clear RM. 1996. A convenient method for assessing mycotoxin production in cultures of *Aspergilli* and *Penicillia*. J. Food Protect., 59: 642-644.
8. Abramson D, Hulasare R, White NDG, Jayas DS, Marquardt RR. 1999. Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. J. Stored Prod. Res., 35: 297-305.
9. Abramson D, Mills JT, Boycott BR. 1983. Mycotoxins and mycoflora in animal feedstuffs in western Canada. Can. J. Comp. Med., 47: 23-26.
10. Abramson D, Mills JT, Sinha RN. 1990. Mycotoxin production in amber durum wheat stored at 15 and 19% moisture content. Food Addit. Contam., 7:617-627.
11. Abramson D, Richter W, Rintelen J, Sinha RN, Schuster M. 1992. Ochratoxin A production in bavarian cereal grains stored at 15 and 19% moisture content. Arch. Environ. Con. Tox., 23: 259-265.
12. Abramson D, Sinha RN, Mills JT. 1980. Mycotoxin and odor formation in moist cereal grain during granary storage. Cereal Chem., 57: 346-351.
13. Abramson D, Sinha RN, Mills JT. 1985. Mycotoxin formation and quality changes in granary-stored corn at 16 and 21% moisture content. Sci. Aliment., 5: 653-663.
14. Abrunhosa L, Paterson RRM, Kozakiewicz Z, Lima N, Venâncio A. 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Lett. Appl. Microbiol., 32: 240-242.
15. Accensi F, Abarca ML, Cano J, Figuera L, Cabañes FJ. 2001. Distribution of ochratoxin A producing strains in the *A. niger* aggregate. Anton. Leeuw. Int. J. G., 79: 365-370.
16. Accensi F, Cano J, Figuera L, Abarca ML, Cabañes FJ. 1999. New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. FEMS Microbiol. Lett., 180: 191-196.
17. Adebajo LO, Idowu AA, Adesanya OO. 1994. Mycoflora, and mycotoxins production in Nigerian corn and corn-based snacks. Mycopathologia, 126: 183-192.
18. Adour L, Couriol C, Amrane A, Prigent Y. 2002. Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camembertii* in liquid media in relation with the consumption of carbon and nitrogen sources and the release of ammonia and carbon dioxide. Enzyme Microb. Tech., 2002, 31: 533-542.
19. Ahmad I, Malloch D. 1999. An evaluation of carbon and nitrogen assimilatory patterns for taxonomic differentiation of *Penicillium* species. Mycologia, 91: 1031-1044.

20. Ahmad I, Malloch D. 2000. The use of primary metabolism for identification on *Penicillium* species. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 101-112.
21. Andersen SJ, Frisvad JC. 1994. Penicillin production by *Penicillium nalgiovense*. Lett. Appl. Microbiol., 19: 486-488.
22. Anónimo. 2002. Commission regulation (EC) N° 472/2002 of 12 March 2002 amending regulation (EC) N° 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities 16.03.2002 L75/18.
23. Axberg K, Jansson G, Svensson G, Hult K. 1997. Varietal differences in accumulation of ochratoxin A in barley and wheat cultivars after inoculation of *Penicillium verrucosum*. Acta Agr. Scand. B S. P., 47: 229-237.
24. Aziz NH, Youssef YA, El-Fouly M, Moussa LA. 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxins. Bot. Bull. Acad. Sinica, 39: 279-285.
25. Bacon CW, Sweeney JG, Robbins JD, Burdick D. 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and moisture requirements. Appl. Microbiol., 26: 155-160.
26. Bacha H, Maaroufi K, Ghedira-Chekir L, Abid S, Cherif A, Achour A, Creppy EE. 1999. Mycotoxins and mycotoxicosis in Tunisia: what do we know and what do we need to know?. J. Toxicol.-Toxin Rev., 18: 245-262.
27. Barna-Vetró I, Solti L, Téren J, Gyöngyösi Á, Szabó E, Wölfling A. 1996. Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A. J. Agr. Food Chem., 44: 4071-4074.
28. Bateman AC, Jones GR, O'Connell S, Clark FJ, Plummeridge M. 2002. Massive hepatosplenomegaly caused by *Penicillium marneffe* associated with human immunodeficiency virus infection in a Thai patient. J. Clin. Pathol., 55: 143-144.
29. Battilani P, Pietri A. 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. Eur. J. Plant Pathol., 108: 639-643.
30. Baudrimont I, Sostaric B, Yenot C, Betbeder A-M, Dano-Djedje S, Sanni A, Steyn PS, Creppy EE. 2001. Aspartame prevents the karyomegaly induced by ochratoxin A in rat kidney. Arch. Toxicol., 75: 176-183.
31. Bauduret P. 1990. A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feeds in Reunion island. Mycopathologia, 109: 157-164.
32. Bauer J, Gareis M. 1987. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. J. Vet. Med. B, 34: 613-627.
33. Baxter ED. 1996. The fate of ochratoxin A during malting and brewing. Food Addit. Contam., 13, Supl.: 23-24.
34. Baxter ED, Slaiding IR, Kelly B. 2001. Behavior of ochratoxin A in brewing. J. Am. Soc. Brew. Chem., 59: 98-100.
35. Bengoa A, Briones V, López MB, Payá MJ. 1994. Beak infection by *Penicillium cyclopium* in a Macaw (*Ara ararauna*). Avian Dis., 38: 922-927.
36. Benkhemmar O, Fremy JM, Lahlou H, Bompeix G, El Mniai H, Boubekri C. 1993. Production of patulin by *Penicillium expansum* dans le jus de raisin de table. Sci. Aliment., 13: 149-154.
37. Bennett JW. 1995. From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. Can. J. Bot., 73: S917-S924.

38. Berbee ML, Yoshimura A, Sugiyama J, Taylor JW. 1995. Is *Penicillium* monophyletic? An evaluation of phylogeny in the family *Trichocomaceae* from 18S, 5.8S and ITS ribosomal DNA sequence data. *Mycologia*, 87: 210-222.
39. Betina V. 1993. Thin layer chromatography of mycotoxins. En: *Chromatography of mycotoxins. Techniques and applications*. Ed: Betina V. Elsevier, Amsterdam. pp: 141-251.
40. Beuchat LR. 1987. *Food and beverage mycology*. 2ª Ed. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
41. Blanc M, Pittet A, Muñoz-Box R, Viani R. 1998. Behavior of ochratoxin A during green coffee roasting and soluble coffee manufacture. *J. Agr. Food Chem.*, 46: 673-675.
42. Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.*, 27: 201-213.
43. Blaylock RB, Overstreet RM, Klich MA. 2001. Mycoses in red snapper (*Lutjanus campechanus*) caused by two deuteromycete fungi (*Penicillium corylophilum* and *Cladosporium sphaerospermum*). *Hydrobiologia*, 460: 221-228.
44. Boley A, Müller H-M. 1986. Production of ochratoxin A, citrinin, and ergosterol by *Penicillium viridicatum* in autoclaved and non-autoclaved wheat at low temperature. *Mycotoxin Res.*, 2: 99-103.
45. Bondy GS, Pestka JJ. 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Env. Heal. B*, 3: 109-143.
46. Boutrif E, Canet C. 1998. Mycotoxin prevention and control: FAO programmes. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*, 149: 681-694.
47. Boysen M, Jacobsson K-G, Schnürer J. 2000. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl. Environ. Microb.*, 66: 1523-1526.
48. Boysen M, Skouboe P, Frisvad J, Rossen L. 1996. Reclassification of the *Penicillium roqueforti* group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles. *Microbiology*, 142: 541-549.
49. Bragulat MR, Abarca ML, Cabañes JC. 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 139-144.
50. Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Cabañes FJ. 1995. A mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. *J. Sci. Food Agr.*, 67: 215-220.
51. Bresch H, Urbanek M, Hell K. 2000. Ochratoxin A in coffee, tea and beer. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 89-94.
52. Bresch H, Urbanek M, Nusser M. 2000. Ochratoxin A in food containing liquorice. *Nahrung*, 44: 276-278.
53. Bridge PD. 1985. An evaluation of some physiological and biochemical methods as an aid to the characterization of species of *Penicillium* subsection *Fasciculata*. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1887-1895.
54. Bridge PD. 1990. Identification of terverticillate *Penicillia* from a matrix of percent test results. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 283-287.
55. Bridge PD, Hawksworth DL. 1984. The API ZYM enzyme testing system as an aid to the rapid identification of *Penicillium* isolates. *Microbiol. Sci.*, 1: 232-234.

56. Bridge PD, Hawksworth DL, Kozakiewicz Z, Onions AHS, Paterson RRM, Sackin MJ. 1989. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. II. Identification. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2967-2978.
57. Bridge PD, Hawksworth DL, Kozakiewicz Z, Onions AHS, Paterson RRM, Sackin MJ, Sneath PHA. 1989. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. I. Numerical taxonomy. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2941-2966.
58. Bridge PD, Hawksworth DL, Kozakiewicz Z, Onions AHS, Paterson RRM, Sackin MJ, Sneath PHA. 1990. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 139-147.
59. Bridge PD, Hudson L, Kozakiewicz Z, Onions AHS, Paterson RRM. 1987. Investigation of variation in phenotype and DNA content between single-conidium isolates of single *Penicillium* isolates. *J. Gen. Microbiol.*, 133: 995-1004.
60. Bringmann G, Mader T. 1995. *In vivo* formation of diazepam-like 1,4-benzodiazepines by *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* after administration of 2-aminobenzophenones and glycine. *J. Neural Transm.*, 101: 169-181.
61. Bruna JM, Fernández M, Ordóñez JA, de la Hoz L. 2002. Enhancement of the flavour development of dry fermented sausages by using a protease (Pronase E) and a cell-free extract of *Penicillium camemberti*. *J. Sci. Food Agr.*, 82: 526-533.
62. Bruns TD, White TJ, Taylor JW. 1991. Fungal molecular systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 22: 525-564.
63. Bucheli P, Kanchanomai C, Meyer I, Pittet A. 2000. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *J. Agr. Food Chem.*, 48: 1358-1362.
64. Bucheli P, Meyer I, Pittet A, Vuataz G, Viani R. 1998. Industrial storage of green Robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content. *J. Agr. Food Chem.*, 46: 4507-4511.
65. Bucheli P, Taniwaki MH. 2002. Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Addit. Contam.*, 19: 655-665.
66. Bullerman LB. 1974. A screening medium and method to detect several mycotoxins in mold cultures. *J. Milk Food Technol.*, 37: 1-3.
67. Bullerman LB. 1985. Effects of potassium sorbate on growth and ochratoxin production by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium* species. *J. Food Protect.*, 48: 162-165.
68. Bullerman LB. 1985. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 18: 197-200.
69. Burda K. 1992. Incidence of patulin in apple, pear, and mixed fruit products marketed in New South Wales. *J. Food Protect.*, 55: 796-798.
70. Burdaspal PA, Legarda TM. 1998. Ocratoxina A en muestras de café comercializado en España. *Alimentaria*, 35: 31-35.
71. Burdaspal PA, Legarda TM. 1998. Datos sobre la presencia de ocratoxina A en plasma humano en España. *Alimentaria*, 35: 103-109.
72. Burdaspal PA, Legarda TM. 1999. Ocratoxina A en vinos, mostos y zumos de uva elaborados en España y en otros países europeos. *Alimentaria*, 36: 107-113.

73. Cabañes FJ, Accensi F, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Minguez S, Pons A. 2002. What is the source of ochratoxin A in wine?. *Int. J. Food Microbiol.*, 79: 213-215.
74. Campbell H, Choo TM, Vigier B, Underhill L. 2000. Mycotoxin in barley and oat samples from eastern Canada. *Can. J. Plant Sci.*, 80: 977-980.
75. Canela R, Viladrich R, Velazquez CA, Sanchis V. 1994. A survey of porcine kidneys and chicken liver for ochratoxin A in Spain. *Mycopathologia*, 125: 29-32.
76. Castegnaro M, McGregor D. 1998. Carcinogenic risk assessment of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*, 149: 671-678.
77. Castellá G, Bragulat MR, Cabañes FJ. 1996. Mycoflora and fumonisin-producing strains of *Fusarium moniliforme* in mixed poultry feeds and component raw material. *Mycopathologia*, 133: 181-184.
78. Castellá G, Bragulat MR, Cabañes FJ. 1999. Surveillance of fumonisins in maize-based feeds and cereals from Spain. *J. Agr. Food Chem.*, 47: 4707-4710.
79. Castellá G, Larsen TO, Cabañes J, Schmidt H, Alboresi A, Niessen L, Färber P, Geisen R. 2002. Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *System. Appl. Microbiol.*, 25: 74-83.
80. Castellari M, Versari A, Fabiani A, Parpinello GP, Galassi S. 2001. Removal of ochratoxin A in red wines by means of adsorption treatments with commercial fining agents. *J. Agr. Food Chem.*, 49: 3917-3921.
81. Castro MFPM, Soares LMV, Furlani RPZ. 1995. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays* L.): a preliminary study. *Rev. Microbiol. Sao Paulo*, 26: 289-295.
82. CBS. 2003. CBS Filamentous fungi database. En: http://www.cbs.knaw.nl/search_fdb.html
83. Ciegler A, Fennell DI, Sansing GA, Detroy RW, Bennett GA. 1973. Mycotoxin-producing strains of *Penicillium viridicatum*: classification into subgroups. *Appl. Microbiol.*, 26: 271-278.
84. Ciegler A, Lee LS, Dunn JJ. 1981. Production of naphthoquinone mycotoxins and taxonomy of *Penicillium viridicatum*. *Appl. Environ. Microb.*, 42: 446-449.
85. Clarke JR, Marquardt RR, Frohlich AA, Pitura RJ. 1994. Quantification of ochratoxin A in swine kidneys by enzyme-linked immunosorbent assay using a simplified sample preparation procedure. *J. Food Protect.*, 57: 991-995.
86. Colombo F, Vallone L, Giaretti M, Dragoni I. 2003. Identification of *Penicillium aurantiogriseum* species with a method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Food Control*, 14: 137-140.
87. Comerio MR. 2000. Nefrotoxinas y especies nefrotóxicas del género *Penicillium* Link. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17: 82-89.
88. Cook WO, Osweiler GD, Anderson TD, Richard JL. 1986. Ochratoxicosis in Iowa swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188: 1399-1402.
89. Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M. 1997. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw material. *Rev. Microbiol.*, 28: 279-283.
90. Corry JEL. 1987. Relationships of water activity to fungal growth. En: *Food and beverage mycology*. 2ª Ed. Ed: Beuchat LR. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. pp: 51-99.
91. Creppy EE. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.*, 127: 19-28.

92. Creppy EE, Baudrimont I, Belmadani A, Betbeder AM. 1996. Aspartame as a preventive agent of chronic toxic effects of ochratoxin A in experimental animals. *Food Addit. Contam.*, 13, Supl.: 51-52.
93. Creppy EE, Baudrimont I, Betbeder AM. 1995. Ochratoxines et conséquences en toxicologie. *Cryptogamie Mycol.*, 16: 195-221.
94. Creppy EE, Lugnier AAJ, Beck G, Röschenthaier R, Dirheimer G. 1979. Action of ochratoxin A on cultured hepatoma cells-reversion of inhibition by phenylalanine. *FEBS Lett.*, 104: 287-290.
95. Cruickshank RH, Pitt JI. 1987. Identification of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium* by enzyme electrophoresis. *Mycologia*, 79: 614-620.
96. Curtui V, Gareis M, Usleber E, Märthlbauer E. 2001. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Addit. Contam.*, 18: 730-738.
97. Curtui V, Usleber E, Dietrich R, Lepschy J, Märthlbauer E. 1998. A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia*, 143: 97-103.
98. Cvetnic Z, Pepeljnjak S. 1990. Ochratoxinogenicity of *Aspergillus ochraceus* strains from nephropathic and non-nephropathic areas in Yugoslavia. *Mycopathologia*, 110: 93-99.
99. Cvoriscéc D, Ceovic S, Borso G, Rukavina AS. 1998. Endemic nephropathy in Croatia. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36: 271-277.
100. Czerwiecki L, Czajkowska D, Witkowska-Gwiazdowska A. 2002. On ochratoxin A and fungal flora in Polish cereals from conventional and ecological farms. Part 1: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1997. *Food Addit. Contam.*, 19: 470-477.
101. Chand-Goyal T, Spotts RA. 1997. Biological control of postharvest diseases of apple and pear under semi-commercial and commercial conditions using three saprophytic yeasts. *Biol. Control*, 10: 199-206.
102. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Saengwonloey O, Nelson KE. 2001. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994-1998: regional variation and temporal trends. *Clin. Infect. Dis.*, 32: 955-962.
103. Chelkowski J. 1991. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. En: Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Ed: Chelkowski J. Elsevier, Amsterdam. pp: 217-227.
104. Chelkowski J, Dopierala G, Godlewska B, Radomska W, Szebioto K. 1981. Mycotoxins in cereal grain. Part III. Production of ochratoxin A in different varieties of wheat, rye and barley. *Nahrung*, 25: 625-629.
105. Cholmakov-Bodechtel C, Wolff J, Gareis M, Bresch H, Engel G, Majerus P, Rosner H, Schneider R. 2000. Ochratoxin A: representative food consumption survey and epidemiological analysis. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 111-115.
106. da Rocha Rosa CA, Palacios V, Combina M, Fraga ME, de Oliveira Rekson A, Magnoli CE, Dalcero AM. 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brasil. *Food Addit. Contam.*, 19: 408-414.
107. Dalcero A, Magnoli C, Chiacchiera S, Palacios G, Reynoso M. 1997. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 137: 179-184.
108. Dalcero A, Magnoli C, Luna M, Ancasi G, Reynoso MM, Chiacchiera S, Miazzo R. 1998. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 141: 37-43.

ANEXOS

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1. Abreviaturas

AFB₁: Aflatoxina B₁.

AFB₂: Aflatoxina B₂.

AFG₁: Aflatoxina G₁.

AFG₂: Aflatoxina G₂.

AP: Ácido penicílico.

BEN: Balkan Endemic Nephropathy (nefropatía endémica de los Balcanes).

BFE: Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, Alemania.

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holanda.

CECT: Colección española de cultivos tipo.

CIT: Citrinina.

CREA: Creatine sucrose agar (agar creatina sacarosa).

CSN: Creatine Sucrose Neutral agar (agar creatina sacarosa neutro).

CYA: Czapek Yeast extract Agar (agar Czapek extracto de levadura).

DRBC: Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (agar dicloran rosa de Bengala cloranfenicol).

FAO: Food and Agricultural Organization.

FDA: Food and Drug Administration.

G25N: 25% Glycerol Nitrate agar (agar nitrato 25% glicerol).

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia).

IAC: Immunoaffinity Columns (columnas de inmunoafinidad).

IBT: colección IBT del departamento de Biotecnología, BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark, Lyngby, Dinamarca.

IMI: International Mycological Institute, Egham, Reino Unido.

ITS: Internal Transcribed Spacer (espaciadores internos de transcripción).

LSU: Large Subunit (subunidad 28S del DNA ribosomal)

MEA: Malt Extract Agar (agar extracto de malta).

NRRL: Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, EEUU.

NSA: Nitrite Sucrose Agar (agar nitrito sacarosa).

OA: Ocratoxina A.

PCR: Polimerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PEN A: Penitrem A.

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA (polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente).

rDNA: DNA ribosomal.

Rf: Frente de resolución.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción).

RT: Raulin-Thom medium (medio de Raulin-Thom).

SF: Suero fisiológico.

SFW: Suero fisiológico con Tween 80 al 0,05%.

STE: Esterigmatocistina.

TLC: Thin Layer Chromatography (cromatografía en capa fina).

UFC: Unidades formadoras de colonia.

UV: Ultravioleta.

YES: Yeast Extract Sucrose agar (agar extracto de levadura sacarosa).

ZEA: zearalenona.

9.2. ANEXO 2. Colores

En el presente anexo se relacionan los colores de aparición más frecuente en *Penicillium* spp., incluyendo los mencionados en el presente estudio, con los colores y números de referencia de la carta de colores del 'Royal Botanic Garden Edinburgh' (392).

B: blanco	1
C: crema	3
A: amarillo	50
Be: beige	52
AmN: amarillo-naranja	9
N: naranja	48
NM: naranja-marrón	11
R: rosado	45
MR: marrón rosado	10
Mc: marrón claro	12
Mo: marrón oscuro	16
MRj: marrón rojizo	19
MN: marrón negruzco	37
GV: gris verdoso	61
VG: verde grisáceo	65
Vo: verde oscuro	60
VAo: verde azulado oscuro	70
AVc: azul verdoso claro	69



B



C



A



Be



AmN



N



NM



R



MR



Mc



Mo



MRj



MN



GV



VG



Vo



VAo



AVc

9.3. ANEXO 3. Láminas

LÁMINA 1

Apartado 5.1. Estudio de la presencia y el recuento de *Penicillium* spp. en muestras de pienso y materias primas.

Figura I.

Aspecto macroscópico de *P. aurantiogriseum* P477 en el medio CYA (a) y MEA (b) y aspecto microscópico (c).

Figura II.

Aspecto macroscópico de *P. verrucosum* P437 en el medio CYA (a) y MEA (b) y aspecto microscópico (c).

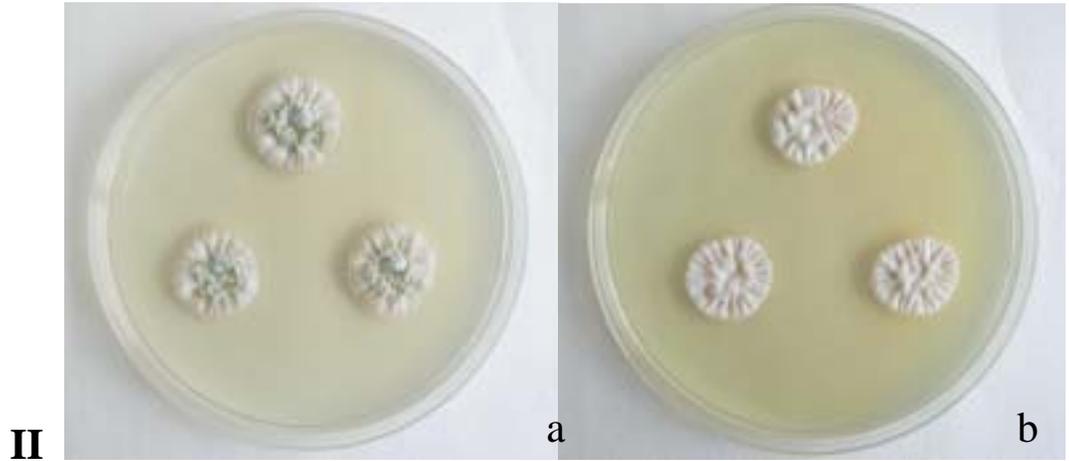
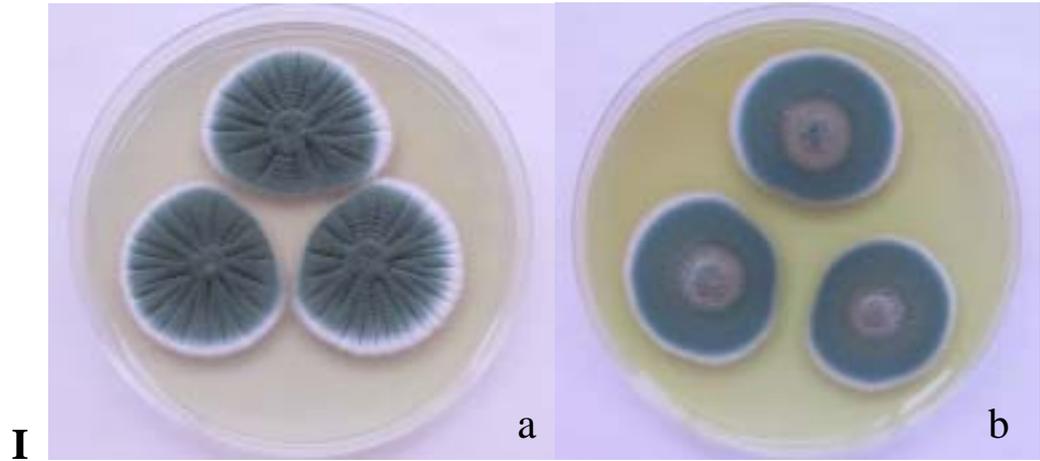


LÁMINA 2

Apartado 5.2.1. Estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp. Aspecto del reverso de la colonia de *P. verrucosum* desarrollada en el medio YES.

Figura I. Ausencia de coloración marrón rojiza (*P. verrucosum* P440).

Figura II. Presencia de coloración marrón rojiza en zonas (*P. verrucosum* P105).

Figura III. Presencia de coloración marrón rojiza en todo el reverso (*P. verrucosum* P194).



I



II



III

LÁMINA 3

Apartado 5.2.1. Estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp.

Figura I. Desarrollo en el medio NSA de *P. viridicatum* NRRL 961 (a) y de *P. verrucosum* BFE 489 (b).

Figura II. Presencia de pigmento difusible marrón en el medio RT en *P. aurantiogriseum* P429 (a). Ausencia de pigmento difusible marrón en el medio RT en *P. verrucosum* BFE 492 (b).

Figura III. Utilización de la urea como fuente de nitrógeno en medio líquido.

- a. Respuesta negativa: viraje ácido del medio por *P. echinulatum* P461.
- b. Aspecto del medio original sin inocular.
- c. Respuesta positiva: viraje alcalino del medio por *P. verrucosum* P198.

Figura IV. Prueba del indol.

- a. Respuesta positiva de *P. aurantiogriseum* P429 a partir de una colonia desarrollada en CYA.
- b. Respuesta negativa de *P. aurantiogriseum* P429 a partir de una colonia desarrollada en CREA.

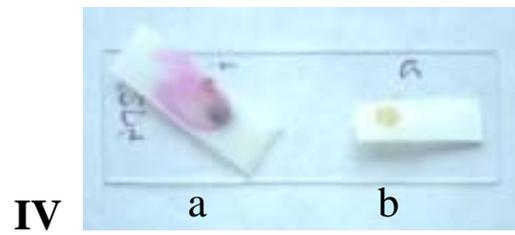
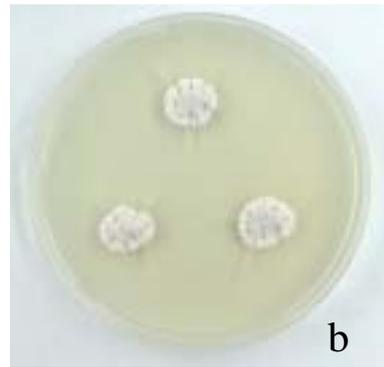
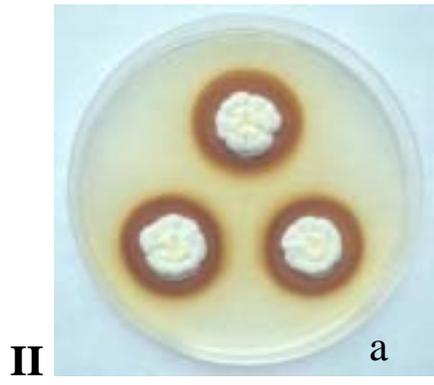
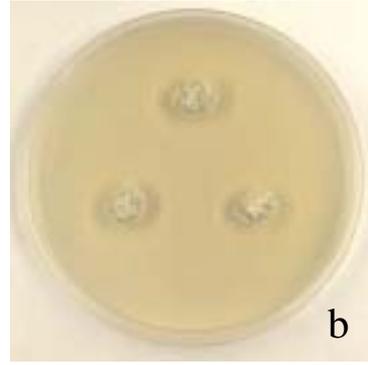
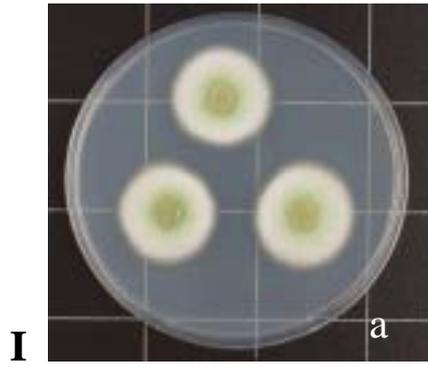


LÁMINA 4

Apartado 5.2.1. Estudio fisiológico y bioquímico de *Penicillium* spp. Tipos de crecimiento y de respuesta en los medios con creatina.

Figura I. Valoración en el medio CREA.

- a. Crecimiento escaso y respuesta neutra (no formación de ácido ni de álcali) por *P. verrucosum* IBT 12803.
- b. Crecimiento escaso y formación de ácido (viraje del medio a amarillo) por *P. viridicatum* NRRL 961.
- c. c1. Crecimiento abundante y formación de ácido (viraje del medio a amarillo) por *P. crustosum* P329, a los siete días de incubación.
c2. Crecimiento abundante y formación de ácido (viraje del medio a amarillo) y álcali (viraje del medio a violeta) por *P. crustosum* P329, a los diez días de incubación.

Figura II. Valoración en el medio CSN.

- a. Crecimiento escaso y respuesta neutra (no formación de ácido ni de base) por *P. verrucosum* IBT 12803.
- b. Crecimiento escaso y formación de ácido (viraje del medio a amarillo) por *P. viridicatum* NRRL 961.
- c. c1. Crecimiento abundante y formación de ácido (viraje del medio a amarillo) y álcali (viraje del medio a violeta) por *P. crustosum* P329, a los siete días de incubación.
c2. Crecimiento abundante y formación de álcali (viraje del medio a violeta) por *P. crustosum* P329, a los diez días de incubación.

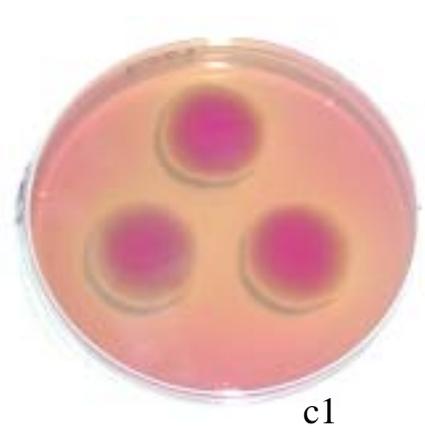
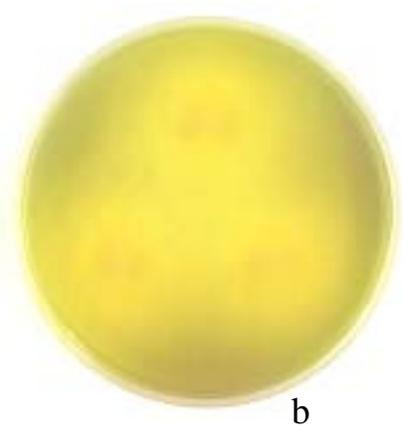
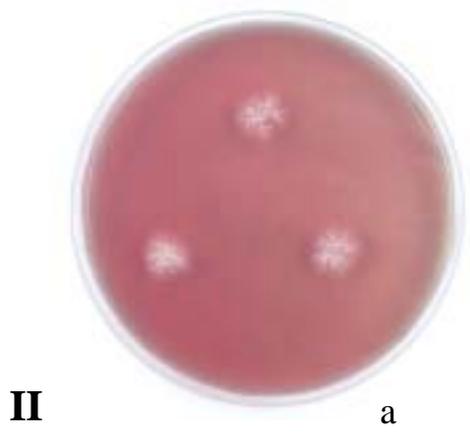
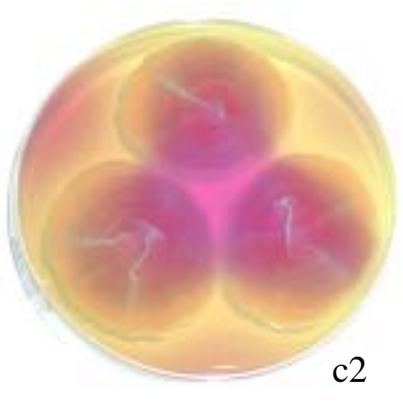
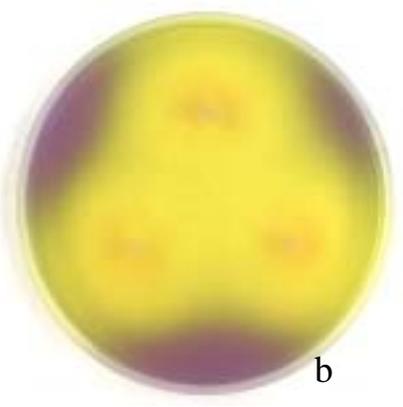
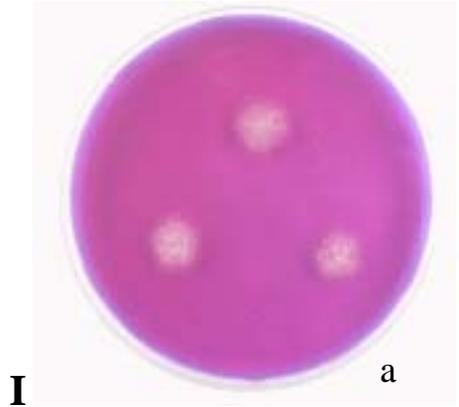


LÁMINA 5

Apartado 5.3.2. Estudio molecular de *P. verrucosum*. Análisis del polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD).

Patrones de bandas obtenidos al amplificar el DNA genómico de *P. verrucosum* con el cebador ari1. Las carreras 1 a 3 corresponden al patrón obtenido para las cepas englobadas en el grupo A y las carreras 4 a 18 al obtenido para las englobadas en el grupo B. Carreras L, marcador '100bp molecular ruler' (Bio-Rad); carrera 1, IBT 12803; carrera 2, CECT 2320; carrera 3, BFE 487; carrera 4, BFE 488; carrera 5, BFE 496; carrera 6, BFE 500; carrera 7, BFE 506; carrera 8, IMI 200.310; carrera 9, P105; carrera 10, P194; carrera 11, P198; carrera 12, P293; carrera 13, P297; carrera 14, P346; carrera 15, P364; carrera 16, P437; carrera 17, P438; carrera 18, P440.

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 L

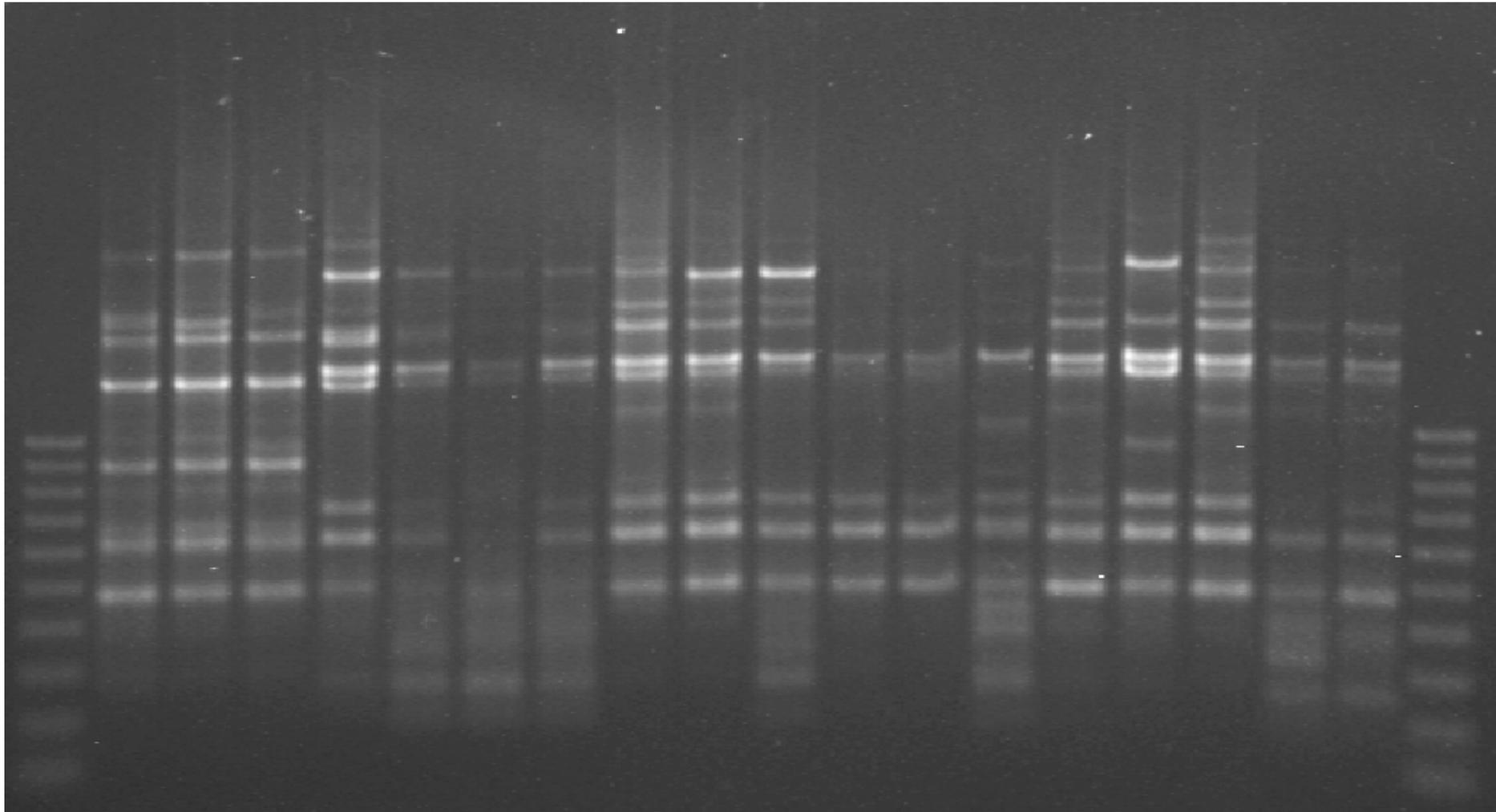


LÁMINA 6

Apartado 5.4.1.1. Estudio del efecto de la fuente de carbono sobre las características morfológicas macroscópicas.

Aspecto de las colonias de *P. verrucosum* BFE 500 en el medio control CYA (a) y en los medios con fructosa (b), sacarosa (c), almidón de trigo (d) y almidón de patata (e).

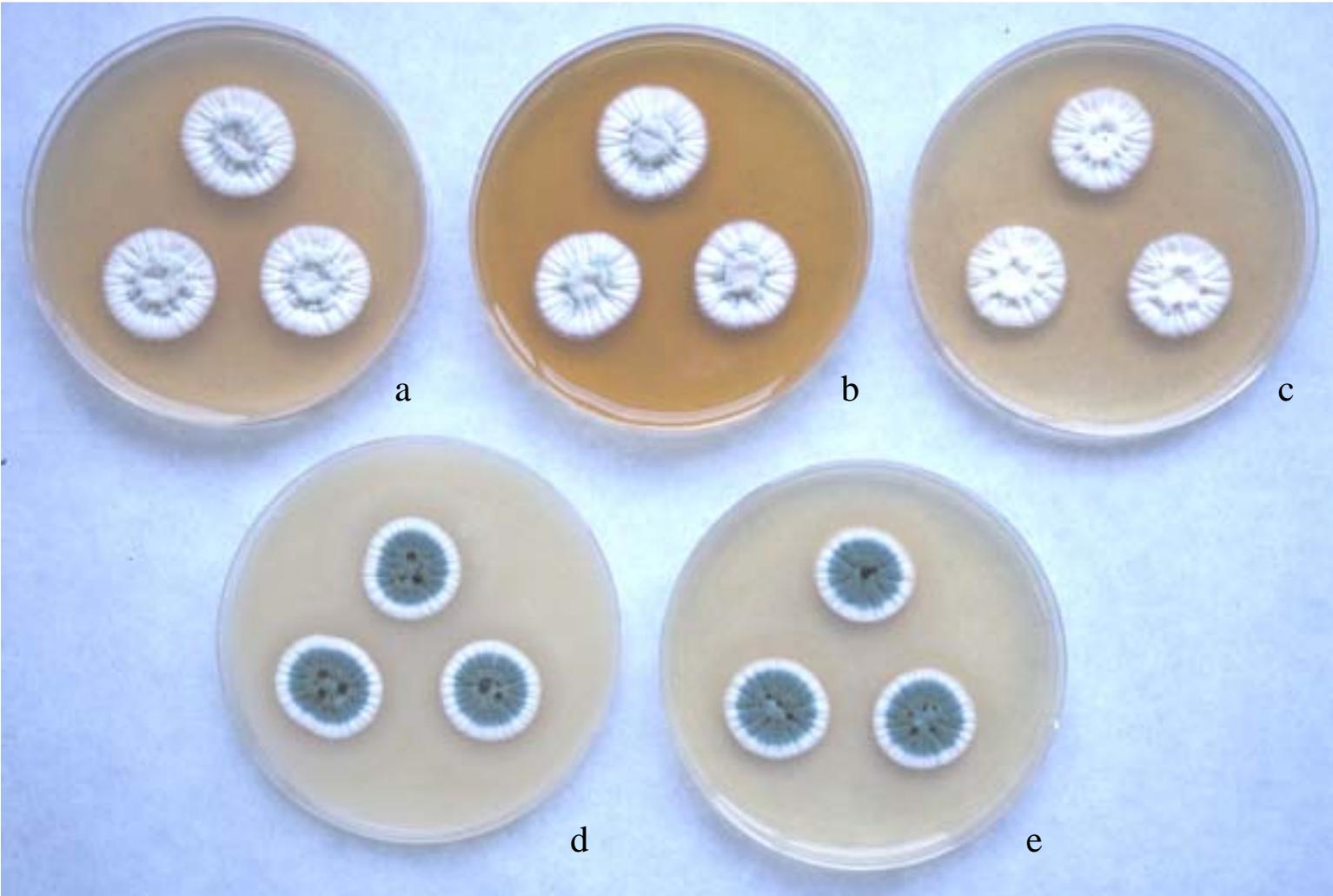
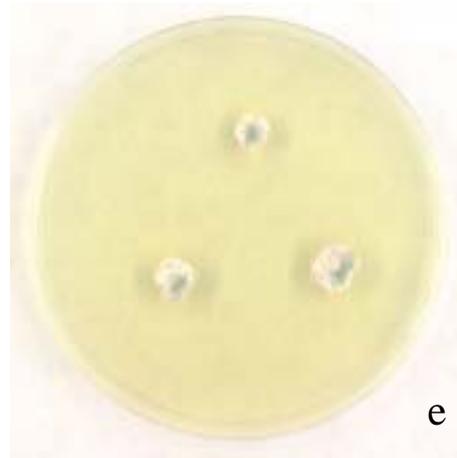
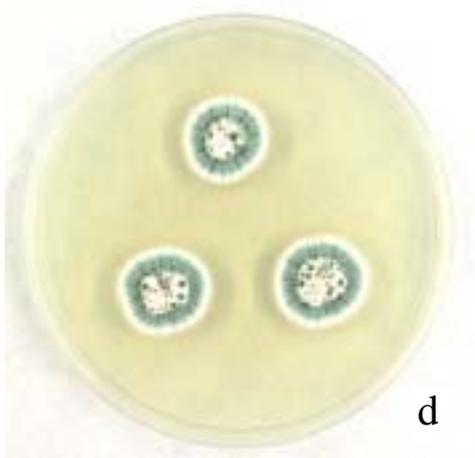
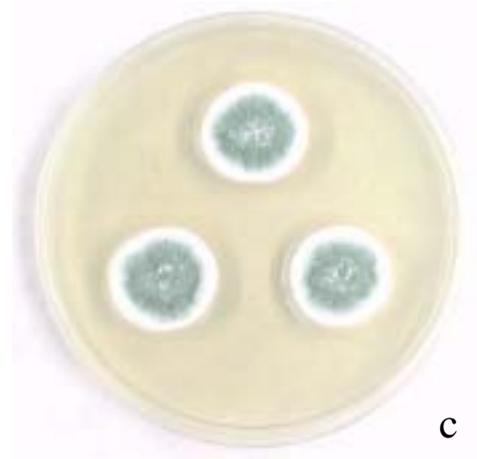
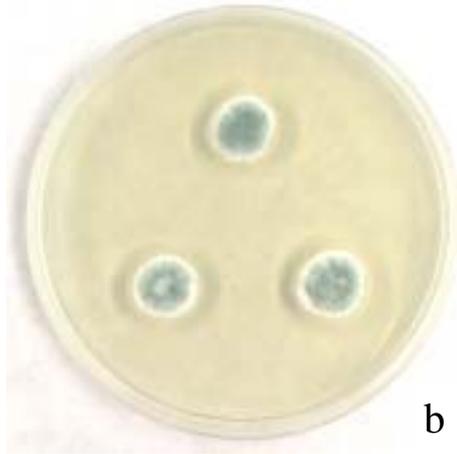
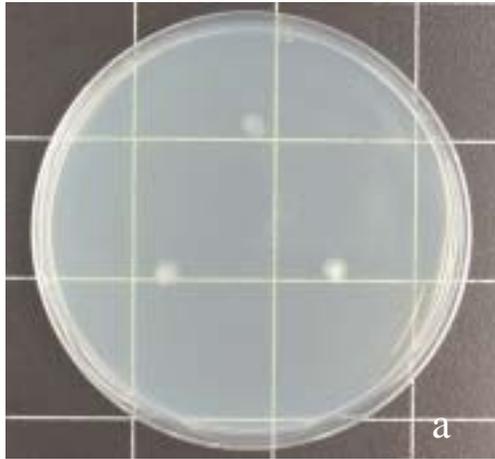


LÁMINA 7

Apartado 5.4.4.1. Estudio del efecto de la temperatura de incubación sobre las características morfológicas macroscópicas.

Aspecto de las colonias de *P. verrucosum* BFE 487 en el medio CYA a 5°C (a), 10°C (b), 15°C (c), 25°C (d) y 30°C (e), a los 7 días de incubación.



109. Damoglou AP, Downey GA, Shannon W. 1984. The production of ochratoxin A and citrinin in barley. *J. Sci. Food Agr.*, 35: 395-400.
110. Davis ND, Diener UL. 1987. Mycotoxins. En: Food and beverage mycology. 2ª Ed. Ed: Beuchat LR. Van Nostrand Reinhold, Nueva York. pp: 517-570.
111. Davis ND, Diener UL, Eldridge DW. 1966. Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 14: 378-380.
112. Davis ND, Searcy JW, Diener UL. 1969. Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, 17: 742-744.
113. de Groene EM, Hassing IGAM, Blom MJ, Seinen W, Fink-Gremmels J, Horbach GJ. 1996. Development of human cytochrome p450-expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Res.*, 56: 299-304.
114. de Hoog GS, Guarro J. 1995. Atlas of clinical fungi. CBS, Baarn, Holanda-URV, Reus.
115. Degelmann P, Becker M, Herderich M, Humpf H-U. 1999. Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 49: 543-546.
116. Deschaux O, Bizot J-C. 1997. Effects of penitrem A on rat's performances in passive avoidance and Morris water maze tests. *Mycopathologia*, 138: 99-104.
117. di Menna ME, Lauren DR, Wyatt PA. 1986. Effect of culture conditions on tremorgen production by some *Penicillium* species. *Appl. Environ. Microb.*, 51: 821-824.
118. Dirheimer G. 1998. Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*, 149: 605-616.
119. D'Mello JPF, Macdonald AMC. 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 69: 155-166.
120. Dörge T, Carstensen JM, Frisvad JC. 2000. Direct identification of pure *Penicillium* species using image analysis. *J. Microbiol. Meth.*, 41: 121-133.
121. Droby S, Vinokur V, Weiss B, Cohen L, Daus A, Goldschmidt EE, Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92: 393-399.
122. Dupont J, Magnin S, Marti A, Brousse M. 1999. Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. *Int. J. Food Microbiol.*, 49: 109-118.
123. El-Banna AA, Pitt JI, Leistner L. 1987. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *System. Appl. Microbiol.*, 10: 42-46.
124. El-Halouat A, Debevere JM. 1997. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *Int. J. Food Microbiol.*, 35: 41-48.
125. Engel G. 2000. Ochratoxin A in sweets, oil seeds and dairy products. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 98-101.
126. Environmental Protection Agency. 1997. Final risk assessment. *Penicillium roqueforti*. En: <http://www.epa.gov/opptintr/biotech/pdf/fra008.pdf>
127. Estruch JJ, Antuña C, Ferrer S, Ramón D. 1989. Aislamiento de DNA genómico de *Trichophyton mentagrophytes*. *Rev. Iberoam. Micol.*, 6: 62-66.
128. Etcheverry M, Nesci A, Barros G, Torres A, Chulze S. 1999. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B1 in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia*, 147: 37-41.

129. Fan Q, Tian S. 2001. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) skinner. *Postharvest Biol. Tec.*, 21: 341-350.
130. FAO. 1997. Worldwide regulations for mycotoxins 1995. A compendium. FAO Food and Nutrition Paper 64, Rome.
131. Fazekas B, Tar AK, Zomborszky-Kovács M. 2002. Ochratoxin A contamination of cereal grains and coffee in Hungary in the year 2001. *Acta Vet. Hung.*, 50: 177-188.
132. Festas I, Herbert P, Santos L, Cabral M, Barros P, Alves A. 2000. Ochratoxin A in some portuguese wines: method validation and screening in port wine and vinho verde. *Am. J. Enol. Viticult.*, 51: 150-154.
133. Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayada A, Soulaymani R, Creppy EE. 2002. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21: 241-245.
134. Filali A, Ouammi L, Betbeder AM, Baudrimont I, Soulaymani R, Benayada A, Creppy EE. 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit. Contam.*, 18: 565-568.
135. Filtenborg O, Frisvad JC. 1980. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure cultures. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 13: 128-130.
136. Filtenborg O, Frisvad JC. 1990. Identification of *Penicillium* and *Aspergillus* species in mixed cultures in Petri dishes using secondary metabolite profile. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 27-37.
137. Filtenborg O, Frisvad JC, Svendsen A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Appl. Environ. Microb.*, 45: 581-585.
138. Filtenborg O, Frisvad JC, Thrane U. 1990. The significance of yeast extract composition on metabolite production in *Penicillium*. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 433-441.
139. Filtenborg O, Frisvad JC, Thrane U. 1996. Moulds in food spoilage. *Int. J. Food Microbiol.*, 33: 85-102.
140. Florianowicz T. 2001. Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *Eur. Food Res. Technol.*, 212: 282-286.
141. Frank JM. 2001. Development of critical control points for preventing ochratoxin A accumulation in coffee. En: *Mycotoxins and phycotoxins in perspective of the turn of the millenium*. Ed: de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M. Wageningen, Holanda. pp: 289-298.
142. Frisvad JC. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric Penicillia. *Appl. Environ. Microb.*, 41: 568-579.
143. Frisvad JC. 1983. A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. *J. Appl. Bacteriol.*, 54: 409-416.
144. Frisvad JC. 1984. Expressions of secondary metabolism as fundamental characters in *Penicillium* taxonomy. En: *Toxigenic fungi. Their toxins and health hazard*. Ed: Kurata H, Ueno Y. Elsevier, Amsterdam. pp: 98-106.
145. Frisvad JC. 1985. Creatine sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1: 109-113.
146. Frisvad JC. 1986. Profiles of primary and secondary metabolites of value in classification of *Penicillium viridicatum* and related species. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 311-325.

147. Frisvad JC. 1987. High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *J. Chromatography*, 392: 333-347.
148. Frisvad JC. 1992. Chemometrics and chemotaxonomy: a comparison of multivariate statistical methods for the evaluation of binary fungal secondary metabolite data. *Chemometr. Intell. Lab.*, 14: 253-269.
149. Frisvad JC. 1993. Modifications on media based on creatine for use in *Penicillium* and *Aspergillus* taxonomy. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16: 154-157.
150. Frisvad JC. 1997. Species in the *Penicillium aurantiogriseum* complex: an overview. Comunicación en: Third International Workshop on *Penicillium* and *Aspergillus*. Baarn, Holanda. p: 15.
151. Frisvad JC, Filtenborg O. 1983. Classification of terverticillate penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *Appl. Environ. Microb.*, 46: 1301-1310.
152. Frisvad JC, Filtenborg O. 1989. Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia*, 81: 837-861.
153. Frisvad JC, Filtenborg O. 1990. Revision of *Penicillium* subgenus *Furcatum* based on secondary metabolites and conventional characters. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 159-172.
154. Frisvad JC, Filtenborg O. 1990. Secondary metabolites as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 373-384.
155. Frisvad JC, Filtenborg O, Lund F, Samson RA. 2000. The homogeneous species and series in subgenus *Penicillium* are related to mammal nutrition and excretion. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 265-283.
156. Frisvad JC, Filtenborg O, Lund F, Thrane U. 1992. New selective media for the detection of toxigenic fungi in cereal products, meat and cheese. En: Modern concepts in food mycology. Ed: Samson RA, Hocking AD, Pitt JI, King AD. Elsevier, Amsterdam. pp: 275-284.
157. Frisvad JC, Filtenborg O, Samson RA, Stolk AC. 1990. Chemotaxonomy of the genus *Talaromyces*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 57: 179-189.
158. Frisvad JC, Lund F. 1993. Toxin and secondary metabolite production by *Penicillium* species growing in stored cereals. En: Occurrence and significance of mycotoxins. Ed: Scudamore KA. Central Science Laboratory, Londres. pp: 146-171.
159. Frisvad JC, Samson RA. 1991. Mycotoxins produced by species of *Penicillium* and *Aspergillus* occurring in cereals. En: Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Ed: Chelkowski J. Elsevier, Amsterdam. pp: 441-476.
160. Frisvad JC, Samson RA, Stolk AC. 1990. A new species of *Penicillium*, *P. scabrosum*. *Persoonia*, 14: 177-182.
161. Frisvad JC, Thrane U. 1987. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *J. Chromatography*, 404: 195-214.
162. Frisvad JC, Thrane U. 1996. Mycotoxin production by food-borne fungi. En: Introduction to food-borne fungi. 5^a Ed. Ed: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. CBS, Baarn, Holanda. pp: 251-260.
163. Frohlich AA, Marquardt RR, Clarke JR. 1997. Enzymatic and immunological approaches for the quantitation and confirmation of ochratoxin A in swine kidneys. *J. Food Protect.*, 60: 172-176.

164. Fuhrmann B, Roquebert MF, van Hoegaerden M, Strosberg AD. 1989. Immunological differentiation of *Penicillium* species. *Can. J. Microbiol.*, 35: 1043-1047.
165. Fukal L. 1990. A survey of cereals, cereal products, feedstuffs and porcine kidneys for ochratoxin A by radioimmunoassay. *Food Addit. Contam.*, 7: 253-258.
166. Galtier P. 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*, 149: 549-554.
167. Gareis M, Rosner H, Ehrhardt S. 2000. Blood serum levels of ochratoxin A and nutrition habits. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 108-110.
168. Gareis M, Rotheneder R, Rödel W. 1999. Mould-ripened meat products: new selection scheme for non-toxicogenic *Penicillium* spp. *Mycotoxin Res.*, 15: 61-66.
169. Gareis M, Scheuer R. 2000. Ochratoxin A in meat and meat products. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 102-104.
170. Gareis M, Wolff J. 2000. Relevance of mycotoxin contaminated feed for farming animals and carry over of mycotoxins in food of animal origin. *Mycoses*, 43, Supl. 1: 79-83.
171. Gedek B. 1977. Kind and frequency of toxin production by cereals contaminating *Aspergilli* and *Penicillia*. *Ann. Nutr. Alim.*, 31: 467-475.
172. Geisen R. 1993. Fungal starter cultures for fermented foods: molecular aspects. *Trends Food Sci. Tech.*, 4: 251-256.
173. Geisen R. 1995. Characterization of the species *Penicillium nalgiovense* by RAPD- and protein patterns and its comparison with *Penicillium chrysogenum*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18: 595-601.
174. Gené J, Guillamón JM, Guarro J, Pujol I, Ulfig K. 1996. Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 70: 49-57.
175. Gimeno A, Martins ML. 1982. Multimycotoxin method for analysis of 17 mycotoxins in raw materials, mixed feeds, food products and animal tissues by thin layer chromatography. *Comunicación en: V International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Viena, Septiembre 1982.* pp: 24-27.
176. Giridhar P, Reddy SM. 1997. Incidence of mycotoxin producers on spices from Andhra Pradesh. *J. Indian Bot. Soc.*, 76: 161-164.
177. Giridhar P, Reddy SM. 1998. Incidence of fungi in relation to mycotoxins on garlic and onion bulbs in Andhra Pradesh. *J. Mycol. Pl. Pathol.*, 28: 347-350.
178. Giridhar P, Reddy SM. 2001. Mycobiota and potential mycotoxins of date fruit. *J. Food Sci. Tech.*, 2001, 38: 418-420.
179. Gökmen V, Acar J. 2000. Long-term survey of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey. *Food Addit. Contam.*, 17: 933-936.
180. Golinski P, Hult K, Grabarkiewicz-Szczesna J, Chelkowski J, Szebiotko K. 1985. Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidney and serum samples in Poland. *Appl. Environ. Microb.*, 49: 1014-1015.
181. González HHL, Resnik SL, Boca RT, Marasas WFO. 1995. Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 130: 29-36.

182. Guglielminetti M, Valoti E, Cassini P, Taino G, Caretta G. 2000. Respiratory syndrome very similar to extrinsic allergic alveolitis due to *Penicillium verrucosum* in workers in a cheese factory. *Mycopathologia*, 149: 123-129.
183. Haasum I, Nielsen PV. 1998. Ecophysiological characterization of common food-borne fungi in relation to pH and water activity under various atmospheric compositions. *J. Appl. Microbiol.*, 84: 451-460.
184. Haasum I, Nielsen PV. 1998. Physiological characterization of common fungi associated with cheese. *J. Food Sci.*, 63: 157-161.
185. Häggblom PE. 1982. Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. *Appl. Environ. Microb.*, 43: 1205-1207.
186. Häggblom PE, Ghosh J. 1985. Postharvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum* in barley with different protein levels. *Appl. Environ. Microb.*, 49: 787-790.
187. Hamilton PB, Huff WE, Harris JR, Wyatt RD. 1982. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. *Poultry Sci.*, 61: 1832-1841.
188. Hansen BV, Nielsen PV. 1997. Development of a semisynthetic cheese medium for fungi using chemometric methods. *J. Dairy Sci.*, 80: 1237-1245.
189. Harwig J, Chen Y-K. 1974. Some conditions favoring production of ochratoxin A and citrinin by *Penicillium viridicatum* in wheat and barley. *Can. J. Plant Sci.*, 54: 17-22.
190. Haubeck H-D, Lorkowski G, Kölsch E, Rösenthaller R. 1981. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Environ. Microb.*, 41: 1040-1042.
191. Hawksworth DL. 1985. The typification and citation of the generic name *Penicillium*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 3-7.
192. Hay RJ. 1995. Sick library syndrome. *Lancet*, 346: 1573-1574.
193. Heenan CN, Shaw KJ, Pitt JI. 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. *J. Food Mycol.* 1: 67-72.
194. Heilmann W, Rehfeldt AG, Rotzoll F. 1999. Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *Eur. Food Res. Technol.*, 209: 297-300.
195. Helbig F, Steighardt J, Roos W. 2002. Uric acid is a genuine metabolite of *Penicillium cyclopium* and stimulates the expression of alkaloid biosynthesis in this fungus. *Appl. Environ. Microb.*, 68: 1524-1533.
196. Hennigen MR, Dick T. 1995. Incidence and abundance of mycotoxins in maize in Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Addit. Contam.*, 12: 677-681.
197. Hesseltine CW, Vandegrift EE, Fennell DI, Smith ML, Shotwell OL. 1972. *Aspergilli* as ochratoxin producers. *Mycologia*, 64: 539-550.
198. Hetmanski MT, Scudamore KA. 1993. Toxic metabolites of some *Penicillium* moulds in cereals. En: *Occurrence and significance of mycotoxins*. Ed: Scudamore KA. Central Science Laboratory, Londres. pp: 279-283.
199. Hirota M, Menta AB, Yoneyama K, Kitabatake N. 2002. A major decomposition product, citrinin H₂, from citrinin on heating with moisture. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 66: 206-210.
200. Höhler D. 1998. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z. Ernährungswiss.*, 37: 2-12.

201. Holmberg T, Breitholtz-Emanuelsson A, Häggblom P, Schwan O, Hult K. 1991. *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathologia*, 116: 169-176.
202. Horie Y. 1995. Productivity of ochratoxin A of *Aspergillus carbonarius* in *Aspergillus* section *Nigri*. *Nippon Kingakukai Kaiho* 36: 73-76.
203. Horr  R, Gilges S, Breig P, Kupfer B, de Hoog GS, Hoekstra E, Poonwan N, Schaal KP. 2001. Case report. Fungaemia due to *Penicillium piceum*, a member of the *Penicillium marneffe* complex. *Mycoses*, 44: 502-504.
204. Hosobuchi M, Ogawa K, Yoshikawa H. 1993. Morphology study in production of ML-236B, a precursor of pravastatin sodium, by *Penicillium citrinum*. *J. Ferment. Bioeng.*, 76: 470-475.
205. Hsueh P-R, Teng L-J, Hung C-C, Hsu J-H, Yang P-C, Ho S-W, Luh W-T. 2000. Molecular evidence for strain dissemination of *Penicillium marneffe*: an emerging pathogen in Taiwan. *J. Infect. Dis.*, 181: 1706-1712.
206. Huff WE, Wyatt RD, Hamilton PB. 1975. Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. *Appl. Microbiol.*, 30: 48-51.
207. Hunt DC, McConnie BR, Crosby NT. 1980. Confirmation of ochratoxin A by chemical derivatisation and high-performance liquid chromatography. *Analyst*, 105: 89-90.
208. Igarashi Y, Sekine A, Fukazawa H, Uehara Y, Yamaguchi K, Endo Y, Okuda T, Furumai T, Oki T. 2002. Anicequol, a novel inhibitor for anchorage-independent growth of tumor cells from *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx TP-F0213. *J. Antibiot.*, 55: 371-376.
209. Janisiewicz WJ. 1987. Postharvest biological control of blue mold on apples. *Phytopathology*, 77: 481-485.
210. Jiao Y, Blaas W, R hl Ch, Weber R. 1994. Ochratoxin A in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft. *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 90: 318-321.
211. Jiménez AM, López de Cerain A, Gonzalez-Peñas E, Bello J. 2001. Determination of ochratoxin A in pig liver-derived p t s by high-performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.*, 18: 559-563.
212. Jiménez M, Mateo R, Querol A, Huerta T, Hernández E. 1991. Mycotoxins and mycotoxigenic moulds in nuts and sunflower seeds for human consumption. *Mycopathologia*, 115: 121-127.
213. Jiménez M, Sanchis V, Mateo R, Hernández E. 1986. *Penicillium* in pre-harvest corn in Valencia (Spain) II. Study of the enzymatic and toxigenic capacities of the species. *Mycopathologia*, 96: 13-18.
214. Joosten HMLJ, Goetz J, Pittet A, Schellenberg M, Bucheli P. 2001. Production of ochratoxin A by *Aspergillus carbonarius* on coffee cherries. *Int. J. Food Microbiol.*, 65: 39-44.
215. Jorgensen K. 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 15: 550-554.
216. Jorgensen K, Rasmussen G, Thorup I. 1996. Ochratoxin A in danish cereals 1986-1992 and daily intake by the danish population. *Food Addit. Contam.*, 13: 95-104.
217. Julian AM, Wareing PW, Phillips SI, Medlock VFP, MacDonald MV, del Río LE. 1995. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. *Mycopathologia*, 129: 5-16.
218. Kanisawa M. 1984. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of ochratoxin A in mice. En: *Developments in Food Science 7. Toxigenic fungi. Their toxins and health hazard*. Ed: Kurata H, Ueno Y. Elsevier, Amsterdam. pp: 245-254.

219. Karabulut OA, Cohen L, Wiess B, Daus A, Lurie S, Droby S. 2002. Control of brown rot and blue mold of peach and nectarine by short hot water brushing and yeast antagonists. *Postharvest Biol. Tec.*, 24: 103-111.
220. Keromnes J, Thouvenot D. 1985. Role of penicillic acid in the phytotoxicity of *Penicillium cyclopium* and *Penicillium canescens* to the germination of corn seeds. *Appl. Environ. Microb.*, 49: 660-663.
221. Kiessling K-H, Pettersson H, Sandholm K, Olsen M. 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 47: 1070-1073.
222. Kiil H, Sasa M. 2000. Characterization of *Penicillium* by the use of biolog. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 251-257.
223. Kirk PM, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. 9^a Ed. CAB International, Oxon.
224. Kitchen DN, Carlton WW, Tuite J. 1977. Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in beagle dogs. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 14: 261-272.
225. Klich MA. 1990. Computer applications in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 269-278.
226. Kozakiewicz Z, Paterson RRM, Bridge PD. 1993. Novel approaches to the identification of mycotoxin producing *Penicillium* species. En: Occurrence and significance of mycotoxins. Ed: Scudamore KA. Central Science Laboratory, Londres. pp: 64-75.
227. Kpodo K, Sorensen AK, Jakobsen M. 1996. The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. *Food Chem.*, 56: 147-153.
228. Krivobok S, Seigle-Murandi F, Steiman R, Creppy EE. 1995. Fungal flora and ochratoxin A production in various food and feed in France. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18: 455-459.
229. Krivobok S, Seigle-Murandi F, Steiman R, Marzin D. 1987. Screening methods to detect toxigenic fungi in liquid medium. *J. Microbiol. Meth.*, 7: 29-36.
230. Krogh P. 1991. Porcine nephropathy associated with ochratoxin A. En: Mycotoxins and animal foods. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 627-645.
231. Krogh P, Hald B, Pedersen EJ. 1973. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Path. Microbiol. Scand. B*, 81: 689-695.
232. Krogh P, Hald B, Plestina R, Ceovic S. 1977. Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Path. Microbiol. Scand. B*, 85: 238-240.
233. Kuiper-Goodman T. 1996. Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Addit. Contam.*, 13, Supl.: 53-57.
234. Kuiper-Goodman T, Scott PM. 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.*, 2: 179-248.
235. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 17: 1244-1245.
236. Kure CF, Skkar I. 2000. Mould growth on the Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and Jarlsberg. *Int. J. Food Microbiol.*, 62: 133-137.

237. Kwon Chung KJ, Bennett JE. 1992. Medical mycology. Lea and Febiger, Filadelfia.
238. Lai M, Semeniuk G, Hesseltine W. 1970. Conditions for production of ochratoxin A by *Aspergillus* species in a synthetic medium. Appl. Microbiol., 19: 542-544.
239. Laich F, Fierro F, Martín JF. 2002. Production of penicillin by fungi growing on food products: identification of a complete penicillin gene cluster in *Penicillium griseofulvum* and a truncated cluster in *Penicillium verrucosum*. Appl. Environ. Microb., 68: 1211-1219.
240. Land CJ, Hult K. 1987. Mycotoxin production by some wood-associated *Penicillium* spp. Lett. Appl. Microbiol., 4: 41-44.
241. Langseth W, Nymoen U, Bergsjø B. 1993. Ochratoxin A in plasma of norwegian swine determined by an HPLC column-switching method. Natural Toxins, 1: 216-221.
242. Langseth W, Stenwig H, Sogn L, Mo E. 1993. Growth of moulds and production of mycotoxins in wheat during drying and storage. Acta Agr. Scand. B S. P., 43: 32-37.
243. Larcher R, Nicolini G. 2001. Survey of ochratoxin A in musts, concentrated musts and wines produced or marketed in Trentino (Italy). J. Commodity Sci., 40: 69-78.
244. Larsen TO, Svendsen A, Smedsgaard J. 2001. Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus *Penicillium*. Appl. Environ. Microb., 67: 3630-3635.
245. Le Bars J. 1982. Contamination fongique et mycotoxique d'aliments composés fabriqués à la Guadeloupe. Sci. Aliment., 2: 61-66.
246. Le Bars J, Le Bars P. 1998. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. Rev. Méd. Vét.-Toulouse, 149: 493-500.
247. Leal JA, Gómez-Miranda B, Prieto A, Domenech J, Ahrazem O, Bernabé M. 1997. Possible chemotypes from cell wall polysaccharides, as an aid in the systematics of *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Mycol. Res., 101: 1259-1264.
248. Lee HB, Magan N. 1999. Environment factors influence *in vitro* interspecific interactions between *A. ochraceus* and other maize spoilage fungi, growth and ochratoxin production. Mycopathologia, 146: 43-47.
249. Legarda TM, Burdaspal PA. 1998. Ocratoxina A en cervezas elaboradas en España y en otros países europeos. Alimentaria, 35: 115-122.
250. Legarda TM, Burdaspal PA. 2001. Presencia de ocratoxina A en muestras de pan comercializado en España y en muestras procedentes de doce países extranjeros. Alimentaria, 321: 89-96.
251. Leistner L. 1984. Toxigenic penicillia occurring in feeds and foods: a review. Food Technology in Australia, 36: 404-413.
252. Leistner L, Eckardt C. 1979. Occurrence of toxinogenic *Penicillia* in meat products. Fleischwirtschaft, 59: 1892-1896.
253. Leistner L, Pitt JI. 1977. Miscellaneous *Penicillium* toxins. En: Mycotoxins in Human and Animal Health. Ed: Rodricks JV, Hesseltine CW, Mehlman MA. Pathotox Publishers, Illinois. pp: 639-653.
254. Lenette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JP. 1980. Manual of clinical microbiology. 3^a Ed. American Society for Microbiology, Washington.
255. Leoni LAB, Valente Soares LM, Oliveira PLC. 2000. Ochratoxin A in brazilian roasted and instant coffees. Food Addit. Contam., 17: 867-870.

256. Leverentz B, Janisiewicz WJ, Conway WS, Saftner RA, Fuchs Y, Sams CE, Camp MJ. 2000. Combining yeasts or a bacterial biocontrol agent and heat treatment to reduce postharvest decay of 'Gala' apples. *Postharvest Biol. Tec.*, 21: 87-94.
257. Lillehoj EB, Elling F. 1983. Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agr. Scand.*, 33: 113-128.
258. Lillehoj EB, Goransson B. 1980. Occurrence of ochratoxin- and citrinin-producing fungi on developing danish barley grain. *Acta Path. Microbiol. Scand. B*, 88: 133-137.
259. Lindenfelser LA, Ciegler A. 1977. Penicillic acid production in submerged culture. *Appl. Environ. Microb.*, 34: 553-556.
260. Little CJL, McNeil PE, Robb J. 1991. Hepatopathy and dermatitis in a dog associated with the ingestion of mycotoxins. *J. Small Anim. Pract.*, 32: 23-26.
261. Lo Y, Tintelnot K, Lippert U, Hoppe T. 2000. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an african AIDS patient. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94: 187.
262. LoBuglio KF, Pitt JI, Taylor JW. 1993. Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia*, 85: 592-604.
263. LoBuglio KF, Pitt JI, Taylor JW. 1994. Independent origins of the synnematosus *Penicillium* species, *P. duclauxii*, *P. clavigerum* and *P. vulpinum*, as assessed by two ribosomal DNA regions. *Mycol. Res.*, 98: 250-256.
264. LoBuglio KF, Taylor JW. 1995. Phylogeny and PCR identification of the human pathogenic fungus *Penicillium marneffei*. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 85-89.
265. Logrieco A, Peterson SW, Wicklow DT. 1990. Ribosomal RNA comparisons among taxa of the terverticillate *Penicillia*. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 343-355.
266. Lopes da Silva T, de Sousa E, Pereira PT, Ferrao AM, Roseiro JC. 1998. Cellular fatty acid profiles for the differentiation of *Penicillium* species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164: 303-310.
267. Lopez de Cerain A, González-Peñas E, Jiménez AM, Bello J. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines. *Food Addit. Contam.*, 19: 1058-1064.
268. López-Díaz T-M, Santos J-A, García-López M-L, Otero A. 2001. Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Int. J. Food Microbiol.*, 68: 69-74.
269. Lovett J. 1972. Toxigenic fungi from poultry feed and litter. *Poultry Sci.*, 51: 309-313.
270. Lund F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Lett. Appl. Microbiol.*, 20: 228-231.
271. Lund F. 1995. Diagnostic characterization of *Penicillium palitans*, *P. commune* and *P. solitum*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21: 60-64.
272. Lund F. 1996. Direct identification of the common cheese contaminant *Penicillium commune* in factory air samples as an aid to factory hygiene. *Lett. Appl. Microbiol.*, 22: 339-341.
273. Lund F, Filtenborg O, Frisvad JC. 1995. Associated mycoflora of cheese. *Food Microbiol.*, 12: 173-180.
274. Lund F, Frisvad JC. 1994. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. *Mycol. Res.*, 98: 481-492.

275. Lurá MCE, González AM, Beccaria AJ, Latorre MG, Nepote AF, Rico M. 1994. Aislamiento, identificación y determinación de la capacidad toxicogénica de hongos contaminantes de cereales y productos alimenticios. *Boletín Micológico*, 9: 103-108.
276. Lusky K, Tesch D, Göbel R, Doberschütz K-D. 1994. Ochratoxin A. Residue behaviour in the pig and in food prepared from it. *Fleischwirtschaft*, 74: 558-560.
277. Maaroufi K, Abid S, Cherif A, Achour A, Zakhama A, Creppy EE, Bacha H. 1999. Molecular aspects of human ochratoxicosis in Tunisia. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 18: 263-276.
278. Maaroufi K, Achour A, Zakhama A, Ellouz F, El May M, Creppy EE, Bacha H. 1996. Human nephropathy related to ochratoxin A in Tunisia. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 15: 223-237.
279. MacDonald S, Wilson P, Barnes K, Damant A, Massey R, Mortby E, Shepherd MJ. 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Addit. Contam.*, 16: 253-260.
280. Macgeorge KM, Mantle PG. 1990. Nephrotoxicity of *Penicillium aurantiogriseum* and *P. commune* from an endemic nephropathy area of Yugoslavia. *Mycopathologia*, 112: 139-145.
281. Madhyastha SM, Marquardt RR, Abramson D. 1993. Effect of ochratoxin producing fungi on the chemical composition of wheat and barley. *J. Food Quality*, 16: 287-299.
282. Madhyastha SM, Marquardt RR, Frohlich AA, Platford G, Abramson D. 1990. Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. *J. Agr. Food Chem.*, 38: 1506-1510.
283. Magan N, Lacey J. 1984. Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 82: 71-81.
284. Magnoli C, Dalcero AM, Chiacchiera SM, Miazzo R, Saenz MA. 1998. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*, 142: 27-32.
285. Majerus P, Bresch H, Otteneder H. 2000. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 95-97.
286. Majerus P, Otteneder H. 1996. Nachweis und Vorkommen von Ochratoxin A in Wein und Traubensaft. *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 92: 388-390.
287. Mantle PG, McHugh KM. 1993. Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. *Mycol. Res.*, 97: 205-212.
288. Mantle PG, McHugh KM, Adatia R, Heaton JM, Gray T, Turner DR. 1991. *Penicillium aurantiogriseum*-induced, persistent renal histopathological changes in rats; an experimental model for balkan endemic nephropathy competitive with ochratoxin A. En: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Ed: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. IARC, Lyon. pp: 119-127.
289. Mantle PG, Perera KPWC, Maishman NJ, Mundy GR. 1983. Biosynthesis of penitrems and roquefortine by *Penicillium crustosum*. *Appl. Environ. Microb.*, 45: 1486-1490.
290. Manzoni M, Rollini M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Appl. Microbiol. Biot.*, 58: 555-564.
291. Marasas WFO, Wehner FC, van Rensburg SJ, van Schalkwyk DJ. 1981. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. *Phytopathology*, 71: 792-796.
292. Markaki P, Delpont-Binet C, Grosso F, Dragacci S. 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *J. Food Protect.*, 64: 533-537.

293. Marquardt RR. 1996. Effects of molds and their toxins on livestock performance: a western Canadian perspective. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 58: 77-89.
294. Marquardt RR, Frohlich AA. 1992. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim. Sci.*, 70: 3968-3988.
295. Martín A, Asensio MA, Bermúdez ME, Córdoba MG, Aranda E, Córdoba JJ. 2002. Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins. *Meat Sci.*, 62: 129-137.
296. Marty F, Mylonakis E. 2002. Antifungal use in HIV infection. *Expert Opin. Pharmacother.*, 3: 91-102.
297. Meyer RA, Neugebauer S. 2000. Bestimmung von Ochratoxin A in Bier mit automatischer Probenreinigung an Immunaффinitätssäulen. *Nahrung*, 44: 58-59.
298. Micco C, Grossi M, Miraglia M, Brera C. 1989. A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans. *Food Addit. Contam.*, 6: 333-339.
299. Mills JT, Abramson D. 1982. Ochratoxigenic potential of *Penicillium* spp. isolated from stored rapeseed and cereals in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.*, 4: 37-41.
300. Mills JT, Abramson D, Frohlich AA, Marquardt RR. 1989. Citrinin and ochratoxin A production by *Penicillium* spp. from stored durum wheat. *Can. J. Plant Pathol.*, 11: 357-360.
301. Mills JT, Seifert KA, Frisvad JC, Abramson D. 1995. Nephrotoxicogenic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada. *Mycopathologia*, 130: 23-28.
302. Minter DW, Hawksworth DL, Onions AHS, Kozakiewicz Z. 1985. Descriptive terminology of the conidiogenous structures in *Aspergillus* and *Penicillium*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 71-87.
303. Mislivec PB, Dieter CT, Bruce VR. 1975. Mycotoxin-producing potential of mold flora of dried beans. *Appl. Microbiol.*, 29: 522-526.
304. Möller T, Akerstrand K, Massoud T. 1997. Toxin-producing species of *Penicillium* and the development of mycotoxins in must and homemade wine. *Natural Toxins*, 5: 86-89.
305. Moodley RS, Govinden R, Odhav B. 2002. The effect of modified atmospheres and packaging on patulin production in apples. *J. Food Protect.*, 65: 867-871.
306. Mori T, Ebe T, Takahashi M, Kohara T, Isonuma H, Matsumura M. 1993. Clinical aspects of penicilliosis, a rare infection. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 34: 145-153.
307. Mori T, Matsumura M, Kohara T, Watanabe Y, Ishiyama T, Wakabayashi Y, Ikemoto H, Watanabe A, Tanno M, Shirai T, Ichinoe M. 1987. A fatal case of pulmonary penicilliosis. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 28: 341-348.
308. Moss MO. 1996. Mycotoxins. Centenary review. *Mycol. Res.*, 5: 513-523.
309. Moubasher AH, Abdel-Kader MIA, El-Kady IA. 1978. Toxigenic fungi isolated from roquefort cheese. *Mycopathologia*, 66: 187-190.
310. Moubasher AH, Elnaghy MA, Abdel-Hafez SI. 1972. Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. *Mycopathologia et Mycologia applicata*, 47: 261-274.
311. Müller H-M, Schwadorf. 1993. A survey of the natural occurrence of *Fusarium* toxins in wheat grown in a southwestern area of Germany. *Mycopathologia*, 121: 115-121.

312. Nagy Z, Keresztessy Z, Szentirma A, Biró S. 2001. Carbon source regulation of β -galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. J. Basic Microb., 41: 351-362.
313. Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M. 1999. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. J. AOAC Int., 82: 897-902.
314. Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M, Ueno Y. 1997. Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. Food Agr. Immunol., 9: 77-83.
315. Neal GE. 1998. Participation of animal biotransformation in mycotoxin toxicity. Rev. Méd. Vét.-Toulouse, 149: 555-560.
316. Nielsen KF, Gravesen S, Nielsen PA, Andersen B, Thrane U, Frisvad JC. 1999. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. Mycopathologia, 145: 43-56.
317. Nilsson T, Larsen TO, Montanarella L, Madsen JO. 1996. Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. J. Microbiol. Meth., 25: 245-255.
318. Nishijima M. 1984. Survey for mycotoxins in commercial foods. En: Developments in Food Science 7. Toxicogenic fungi. Their toxins and health hazard. Ed: Kurata H, Ueno Y. Elsevier, Amsterdam. pp: 172-181.
319. Northolt MD, Bullerman LB. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. J. Food Protect., 45: 519-526.
320. Northolt MD, Frisvad JC, Samson RA. 1996. Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. En: Introduction to food-borne fungi. 5^a Ed. Ed: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. CBS, Baarn, Holanda. pp: 243-250.
321. Northolt MD, van Egmond HP, Paulsch WE. 1979. Penicillic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. J. Food Protect., 42: 476-484.
322. Northolt MD, van Egmond HP, Paulsch WE. 1979. Ochratoxin A production by some fungal species in relation to water activity and temperature. J. Food Protect., 42: 485-490.
323. Northolt MD, van Egmond HP, Soentoro P, DeJill E. 1980. Fungal growth and the presence of sterigmatocystin in hard cheese. J. AOAC Int., 63: 115-119.
324. Nunes C, Usall J, Teixidó N, Miró M, Viñas I. 2001. Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears. Eur. J. Plant Pathol., 107: 543-551.
325. Nunes C, Usall J, Teixidó N, Ochoa de Eribe X, Viñas I. 2001. Control of post-harvest decay of apples by pre-harvest and post-harvest application of ammonium molybdate. Pest Manag. Sci., 57: 1093-1099.
326. Odhav B, Naicker V. 2002. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Addit. Contam., 19: 55-61.
327. Ogawa H, Sugiyama J. 2000. Evolutionary relationships of the cleistothecial genera with *Penicillium*, *Geosmithia*, *Merimbla* and *Sarophorum* anamorphs as inferred from 18S rDNA sequence divergence. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 149-161.
328. Oswald IP, Coméra C. 1998. Immunotoxicity of mycotoxins. Rev. Méd. Vét.-Toulouse, 149: 585-590.

329. Otteneder H, Majerus P. 2000. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Addit. Contam.*, 17: 793-798.
330. Otteneder H, Majerus P. 2001. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. *Food Addit. Contam.*, 18: 431-435.
331. Özçelik N, Kosar A, Soysal D. 2001. Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicol. Lett.*, 121: 9-13.
332. Page RDM, Holmes EC. 1998. *Molecular evolution: a phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford.
333. Park DL, Whitaker TB, Giesbrecht FG, Njapau H. 2000. Performance of three pneumatic probe samplers and four analytical methods used to estimate aflatoxins in bulk cottonseed. *J. AOAC Int.*, 83: 1247-1251.
334. Paster N, Lisker N, Chet I. 1983. Ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm grown under controlled atmospheres. *Appl. Environ. Microb.*, 45: 1136-1139.
335. Patel S, Hazel CM, Winterton AGM, Gleadle AE. 1997. Survey of ochratoxin A in UK retail coffees. *Food Addit. Contam.*, 14: 217-222.
336. Patel S, Hazel CM, Winterton AGM, Mortby E. 1996. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, 13: 833-841.
337. Paterson RRM, Bridge PD, Crosswaite MJ, Hawksworth DL. 1989. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological and morphological features. III. An evaluation of pectinase and amylase isoenzymes for species characterization. *J. Gen. Microbiol.*, 135: 2979-2991.
338. Paterson RRM, Buddie A. 1991. Rapid determination of ubiquinone profiles in *Penicillium* by reversed phase high performance thin-layer chromatography. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13: 133-136.
339. Patterson M, Damoglou AP. 1986. The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on a bread analogue. *Lett. Appl. Microbiol.*, 3: 123-125.
340. Paul GC, Thomas CR. 1996. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 51: 558-572.
341. Pavlovic M, Plestina R, Krogh P. 1979. Ochratoxin A contamination of foodstuffs in an area with balkan (endemic) nephropathy. *Acta Path. Microbiol. Scand. B*, 87: 243-246.
342. Pavoncello D, Lurie S, Droby S, Porat R. 2001. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. *Physiol. Plantarum*, 111: 17-22.
343. Peckham JC, Doupnik Jr B, Jones Jr OH. 1971. Acute toxicity of ochratoxins A and B in chicks. *Appl. Microbiol.*, 21:492-494.
344. Pedersen LH, Skouboe P, Boysen M, Soule J, Rossen L. 1997. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.*, 35: 169-177.
345. Peintner U, Geiger J, Pöder R. 2000. The mycobiota of speck, a traditional tyrolean smoked and cured ham. *J. Food Protect.*, 63: 1399-1403.
346. Peterson SW. 2000. Phylogenetic analysis of *Penicillium* species based on ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 163-178.

347. Petzinger E, Weidenbach A. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livest. Prod. Sci.*, 76: 245-250.
348. Petzinger E, Ziegler K. 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 23: 91-98.
349. Pietri A, Bertuzzi T, Pallaroni L, Piva G. 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Addit. Contam.*, 18: 647-654.
350. Pitt JI. 1979. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, Nueva York.
351. Pitt JI. 1985. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. North Ryde, Australia.
352. Pitt JI. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microb.*, 53: 266-269.
353. Pitt JI. 1989. Recent developments in the study of *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. *J. Appl. Bacteriol.*: 37S-45S.
354. Pitt JI. 1990. Penname, a new computer key to common *Penicillium* species. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 279-281.
355. Pitt JI. 1993. A modified creatine sucrose medium for differentiation of species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *J. Appl. Bacteriol.*, 75: 559-563.
356. Pitt JI. 1994. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J. Med. Vet. Mycol.*, 32, Supl. 1: 17-32.
357. Pitt JI. 1995. Phylogeny in the genus *Penicillium*: a morphologist's perspective. *Can. J. Bot.*, 73: S768-S777.
358. Pitt JI. 1997. Especies micotoxigénicas de *Penicillium*. En: Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Ed: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ. Acribia, Zaragoza. pp: 427-439.
359. Pitt JI, Basílico JC, Abarca ML, López C. 2000. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med. Mycol.*, 38, Supl. 1: 41-46.
360. Pitt JI, Hocking AD. 1997. Fungi and food spoilage, 2^a Ed. Chapman and Hall, Londres.
361. Pitt JI, Hocking AD, Miscamble BF, Dharmaputra OS, Kuswanto KR, Rahayu ES, Sardjono. 1998. The mycoflora of food commodities from Indonesia. *J. Food Mycol.*, 1: 41-60.
362. Pitt JI, Klich MA, Shaffer GP, Cruickshank RH, Frisvad JC, Mullaney EJ, Onions AHS, Samson RA, Williams AP. 1990. Differentiation of *Penicillium glabrum* from *Penicillium spinulosum* and other closely related species: an integrated taxonomic approach. *Syst. Appl. Microbiol.*, 13: 304-309.
363. Pitt JI, Leistner L. 1991. Toxigenic *Penicillium* species. En: Mycotoxins and animal foods. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 82-99.
364. Pitt JI, Samson RA. 1990. Systematics of *Penicillium* and *Aspergillus*-past, present and future. En: Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 3-13.
365. Pitt JI, Samson RA. 1993. Species names in current use in the *Trichocomaceae* (Fungi, *Eurotiales*). *Regnum Vegetabile* 128: 13-57.

366. Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. En: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 9-49.
367. Pittet A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds-an updated review. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*, 149: 479-492.
368. Pittet A, Royer D. 2002. Rapid, low cost thin-layer chromatographic screening method for the detection of ochratoxin A in green coffee at a control level of 10 µg/kg. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 243-247.
369. Pittet A, Tornare D, Huggett A, Viani R. 1996. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. *J. Agr. Food Chem.*, 44: 3564-3569.
370. Pohland AE. 1993. Mycotoxins in review. *Food Addit. Contam.*, 10: 17-28.
371. Pohland AE, Nesheim S, Friedman L. 1992. Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.*, 64: 1029-1046.
372. Porat R, Vinokur V, Holland D, McCollum TG, Droby S. 2001. Isolation of a citrus chitinase cDNA and characterization of its expression in response to elicitation of fruit pathogen resistance. *J. Plant Physiol.*, 158: 1585-1590.
373. Pozzi CR, Corrêa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Meirelles MCA. 1995. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food Addit. Contam.*, 12: 313-319.
374. Priestley RJ. 1979. Effects of heating on foodstuffs. Applied Science Publishers, Londres.
375. Prior MG, Sisodia CS, O'Neil JB. 1976. Acute oral ochratoxicosis in day-old white leghorns, turkeys and japanese quail. *Poultry Sci.*, 55: 786-790.
376. Radic B, Fuchs R, Peraica M, Lucic A. 1997. Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol. Lett.*, 91: 105-109.
377. Raisbeck MF, Rottinghaus GE, Kendall JD. 1991. Effects of naturally occurring mycotoxins on ruminants. En: Mycotoxins and animal foods. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 647-677.
378. Ramakrishna N, Lacey J, Smith JE. 1996. Colonization of barley grain by *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A formation in the presence of competing fungi. *J. Food Protect.*, 59: 1311-1317.
379. Ramírez C. 1982. Manual and atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
380. Ramírez C. 1985. Revision of recently described *Penicillium* taxa. En: Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 135-142.
381. Ramírez C. 1990. A new species of *Penicillium* isolated from soil at the Kruger National Park in South Africa. *Mycopathologia*, 110: 23-29.
382. Ramírez C, Martínez AT. 1981. Seven new species of *Penicillium* and a new variety of *Penicillium novae-caledoniae* Smith. *Mycopathologia*, 74: 35-49.
383. Ramírez C, Martínez AT, Berenguer J. 1980. Four new species of *Penicillium* isolated from the air. *Mycopathologia*, 72: 27-34.
384. Ramírez C, Martínez AT, Ferrer S. 1978. Three new species of *Penicillium*. *Mycopathologia*, 66: 77-82.

385. Ramos AJ, Labernia N, Marín S, Sanchis V, Magan N. 1998. Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *Int. J. Food Microbiol.*, 44: 133-140.
386. Raper KB, Thom C. 1949. A manual of the Penicillia. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, EUA.
387. Reinhard H, Zimmerli B. 1999. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. *J. Chromatogr. A*, 862: 147-159.
388. Richard JL, Plattner RD, May J, Liska SL. 1999. The occurrence of ochratoxin A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*, 146: 99-103.
389. Rimek D, Zimmermann T, Hartmann M, Prariyachatigul C, Kappe R. 1999. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany. *Mycoses*, 42, Supl. 2: 25-28.
390. Rosfarizan M, Madihah S, Ariff AB. 1998. Isolation of a kojic acid-producing fungus capable of using starch as a carbon source. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 27-30.
391. Rosner H, Rohrmann B, Peiker G. 2000. Ochratoxin A in human serum. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 104-107.
392. Royal Botanic Garden Edinburgh. 1969. Flora of British fungi. Colour identification chart. Her Majesty's Stationery Office, Edinburgh.
393. Rutqvist L, Björklund N-E, Hult K, Hökby E, Carlsson B. 1978. Ochratoxin A as the cause of spontaneous nephropathy in fattening pigs. *Appl. Environ. Microb.*, 36: 920-925.
394. Sage L, Krivobok S, Delbos É, Seigle-Murandi F, Creppy EE. 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *J. Agr. Food Chem.*, 50: 1306-1311.
395. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
396. Samarajeewa U. 1991. *In situ* degradation of mycotoxins by physical methods. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 785-796.
397. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.
398. Samson RA, Frisvad JC. 1991. Current taxonomic concepts in *Penicillium* and *Aspergillus*. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Ed: Chelkowski J. Elsevier, Amsterdam. pp: 405-439.
399. Samson RA, Frisvad JC, Pitt JI, Hoekstra E, Klich M, Lawrence Z, Seifert K, Okuda T. 1997. Collaborative study of the *Penicillium aurantiogriseum*-complex. Comunicación en: *Third International Workshop on Penicillium and Aspergillus*. Baarn, Holanda. pp: 15-16.
400. Samson RA, Gams W. 1984. The taxonomic situation in the hyphomycete genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium*. *Anton. Leeuw. Int. J. G.*, 50: 815-824.
401. Samson RA, Hoekstra ES. 1997. *Penicillium marneffei* and other medically important Penicillia. Comunicación en: *Third International Workshop on Penicillium and Aspergillus*. Baarn, Holanda. pp: 23.
402. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. 1996. *Introduction to food-borne fungi*. 5a. Ed. CBS, Baarn, Holanda.
403. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. 2000. *Introduction to food- and airborne fungi*. 6a. Ed. CBS, Baarn, Holanda.

404. Samson RA, Stolk AC, Hadlok R. 1976. Revision of the subsection *Fasciculata* of *Penicillium* and some allied species. *Stud. Mycol.*, 11: 1-47.
405. Sanchis V, Sala N, Palomes A, Santamarina P, Burdaspal PA. 1986. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic molds in foods and feed in Spain. *J. Food Protect.*, 49: 445-448.
406. Sanchis V, Viñas I, Jiménez M, Calvo MA, Hernández E. 1982. Mycotoxin-producing fungi isolated from bin-stored corn. *Mycopathologia*, 80: 89-93.
407. Saubois A, Nepote MC. 1994. Aflatoxins in mixed feeds for rabbits. *Boletín Micológico*, 9: 115-120.
408. Sautour M, Rouget A, Dantigny P, Divies C, Bensoussan M. 2001. Application of Doehlert design to determine the combined effects of temperature, water activity and pH on conidial germination of *Penicillium chrysogenum*. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 900-906.
409. Saxena J, Munimbazi C, Bullerman LB. 2001. Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 29-34.
410. Scott PM. 1984. Effects of food processing on mycotoxins. *J. Food Protect.*, 47: 489-499.
411. Scott PM. 1991. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins present in cereal grain. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Ed: Chelkowski J. Elsevier, Amsterdam. pp: 529-572.
412. Scott PM. 1993. Gas chromatography of mycotoxins. En: *Chromatography of mycotoxins. Techniques and applications*. Ed: Betina V. Elsevier, Amsterdam. pp: 373-425.
413. Scott PM. 1996. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.*, 79: 875-882.
414. Scott PM. 1998. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Rev. Méd. Vét.-Toulouse*, 149: 543-548.
415. Scott PM, Kanhere SR. 1995. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit. Contam.*, 12: 591-598.
416. Scott PM, Kanhere SR, Canela R, Lombaert GA, Bacler S. 1991. Determination of ochratoxin A in meat by liquid chromatography. *Prehrambeno-tehnol. Biotehnol. Rev.*, 29: 61-64.
417. Scott PM, Kanhere SR, Lau BP-Y, Lewis DA, Hayward S, Ryan JJ, Kuiper-Goodman T. 1998. Survey of canadian human blood plasma for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 15: 555-562.
418. Scott PM, Lawrence JW, van Walbeek W. 1970. Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: application to screening of fungal extracts. *Appl. Microbiol.*, 20: 839-842.
419. Scott PM, van Walbeek W, Harwig J, Fennell DI. 1970. Occurrence of a mycotoxin, ochratoxin A, in wheat and isolation of ochratoxin A and citrinin producing strains of *Penicillium viridicatum*. *Can. J. Plant Sci.*, 50: 583-585.
420. Scott PM, van Walbeek W, Kennedy B, Anyeti D. 1972. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and strigmatocystin) and toxigenic fungi in grains and other agricultural products. *J. Agr. Food Chem.*, 20: 1103-1109.
421. Scudamore KA. 1996. Ochratoxin A in animal feed-effects of processing. *Food Addit. Contam.*, 13, Supl.: 39-42.
422. Scudamore KA, Clarke JH, Hetmanski MT. 1993. Isolation of *Penicillium* strains producing ochratoxin A, citrinin, xanthomegnin, viomellein and vioxanthin from stored cereal grains. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17: 82-87.

423. Scudamore KA, Hetmanski MT. 1995. Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. *Food Addit. Contam.*, 12: 377-382.
424. Scudamore KA, Hetmanski MT, Chan HK, Collins S. 1997. Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Addit. Contam.*, 14: 157-173.
425. Scudamore KA, Hetmanski MT, Nawaz S, Naylor J, Rainbird S. 1997. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 14: 175-186.
426. Scudamore KA, Livesey CT. 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *J. Sci. Food Agr.*, 77: 1-17.
427. Scudamore KA, MacDonald SJ. 1998. A collaborative study of an HPLC method for determination of ochratoxin A in wheat using immunoaffinity column clean-up. *Food Addit. Contam.*, 15: 401-410.
428. Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT. 1998. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit. Contam.*, 15: 30-55.
429. Scudamore KA, Patel S. 2000. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food Addit. Contam.*, 17: 407-416.
430. Scudamore KA, Patel S, Breeze V. 1999. Surveillance of stored grain from the 1997 harvest in the United Kingdom for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 16: 281-290.
431. Schubert M, Kreisel H. 1991. Ubiquinones in selected species of *Penicillium* and related teleomorph genera. *Persoonia*, 14: 341-346.
432. Seifert KA, Bissett J, Giuseppin S, Louis-Seize G. 2000. Substrate utilization patterns as identification aids in *Penicillium*. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 239-250.
433. Seifert KA, Giuseppin S. 2000. Cycloheximide tolerance as a taxonomic character in *Penicillium*. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 259-263.
434. Seifert KA, Louis-Seize G. 2000. Phylogeny and species concepts in the *Penicillium aurantiogriseum* complex as inferred from partial B-tubulin gene DNA sequences. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 189-198.
435. Seifert KA, Speers L. 2000. Taxonomic initiatives, taxonomic tools and the information age. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 129-138.
436. Seifert KA, Wingfield BD, Wingfield MJ. 1995. A critique of DNA sequence analysis in the taxonomy of filamentous Ascomycetes and ascomycetous anamorphs. *Can. J. Bot.* 73: S760-S767.
437. Sharman M, MacDonald S, Gilbert J. 1992. Automated liquid chromatographic determination of ochratoxin A in cereals and animal products using immunoaffinity column clean-up. *J. Chromatography*, 603: 285-289.
438. Sherma J. 2000. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. *J. Chromatogr. A*, 880: 129-147.
439. Shlosberg A, Elkin N, Malkinson M, Orgad U, Hanji V, Bogin E, Weisman Y, Meroz M, Bock R. 1997. Severe hepatopathy in geese and broilers associated with ochratoxin in their feed. *Mycopathologia*, 138: 71-76.

440. Shreeve BJ, Patterson DSP, Pepin GA, Roberts BA, Wrathall AE. 1977. Effects of feeding ochratoxin to pigs during early pregnancy. *Br. Vet. J.*, 133: 412-417.
441. Sibanda L, De Saeger S, Bauters TGM, Nelis HJ, Van Peteghem C. 2001. Development of a flow-through enzyme immunoassay and application in screening green coffee samples for ochratoxin A with confirmation by high-performance liquid chromatography. *J. Food Protect.*, 64: 1597-1602.
442. Simon P. 1996. Ochratoxin and kidney disease in the human. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 15: 239-249.
443. Skaug MA. 1999. Analysis of norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, 16: 75-78.
444. Skouboe P, Frisvad JC, Taylor JW, Lauritsen D, Boysen M, Rossen L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycol. Res.*, 103: 873-881.
445. Skouboe P, Taylor JW, Frisvad JC, Lauritsen D, Larsen L, Albaek C, Boysen M, Rossen L. 2000. Molecular methods for differentiation of closely related *Penicillium* species. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Harwood Publishers, Amsterdam. pp: 179-188.
446. Skrinjar M, Danev M, Dimic G. 1995. Interactive effects of propionic acid and temperature on growth and ochratoxin A production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Folia Microbiol.*, 40: 253-256.
447. Skrinjar M, Stubblefield RD, Vujicic IF. 1992. Ochratoxigenic moulds and ochratoxin A in forages and grain feeds. *Acta Vet. Hung.*, 40: 185-190.
448. Slayne MA. 2001. Ochratoxin A in food in the UK. En: *Mycotoxins and phycotoxins in perspective of the turn of the millenium*. Ed: de Koe WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M. Wageningen, Holanda. pp: 143-149.
449. Smilanick JL, Margosan DA, Mlikota F, Usall J, Michael IF. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. *Plant Dis.*, 83: 139-145.
450. Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. 2001. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J. Agr. Food Chem.*, 49: 2733-2740.
451. Solti L, Pécsi T, Barna-Vetró I, Szász Jr F, Biró K, Szabó E. 1999. Analysis of serum and seminal plasma after feeding ochratoxin A with breeding boars. *Anim. Reprod. Sci.*, 56: 123-132.
452. Spotti E, Cacchioli C, Colla F, Beatrisotti M, Zanardi S. 1999. Growth of *Penicillium verrucosum* in model systems based on raw ripened meat products: ochratoxin A determination and control. *Industria Conserve*, 74: 113-123.
453. Spotts RA, Cervantes LA, Facticeau TJ. 2002. Integrated control of brown rot of sweet cherry fruit with a preharvest fungicide, a postharvest yeast, modified atmosphere packaging, and cold storage temperature. *Postharvest Biol. Tec.*, 24: 251-257.
454. Sreemannarayana O, Frohlich AA, Vitti TG, Marquardt RR, Abramson D. 1988. Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin A in young calves. *J. Anim. Sci.*, 66: 1703-1711.
455. Stander MA, Steyn PS, Lübben A, Miljkovic A, Mantle PG, Marais GJ. 2000. Influence of halogen salts on the production of the ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *J. Agr. Food Chem.*, 48: 1865-1971.
456. Steele JA, Davis ND, Diener UL. 1973. Effect of zinc, copper, and iron on ochratoxin A production. *Appl. Microbiol.*, 25: 847-849.

457. Steyn PS, Thiel PG, Trinder DW. 1991. Detection and quantification of mycotoxins by chemical analysis. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 165-221.
458. Stoev SD. 1998. The role of ochratoxin A as a possible cause of balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. *Vet. Hum. Toxicol.*, 40: 352-360.
459. Stoev SD, Daskalov H, Radic B, Domijan A-M, Peraica M. 2002. Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxin aetiology. *Vet. Res.*, 33: 83-93.
460. Stoev SD, Stoeva JK, Anguelov G, Hald B, Creppy EE, Radic B. 1998. Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneous cases with different frequency of porcine nephropathy in Bulgaria. *J. Vet. Med. A*, 45: 229-236.
461. Stolk AC, Samson RA, Frisvad JC, Filtenborg O. 1990. The systematics of the terverticillate *Penicillia*. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 121-137.
462. Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter J, Schlatter C. 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem. Toxicol.*, 33: 341-355.
463. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. 1994. Disseminated *Penicillium marneffe* infection in Southeast Asia. *Lancet*, 344: 110-113.
464. Svendsen A, Frisvad JC. 1994. A chemotaxonomic study of the terverticillate penicillia based on high performance liquid chromatography of secondary metabolites. *Mycol. Res.*, 98: 1317-1328.
465. Sweeney MJ, Dobson ADW. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 43: 141-158.
466. Sydenham EW, Marasas WFO, Shephard GS, Thiel PG, Hirooka EY. 1992. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agr. Food Chem.*, 40: 994-997.
467. Szczech GM, Carlton WW, Tuite J. 1973. Ochratoxicosis in beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Vet. Pathol.*, 10: 135-154.
468. Szczech GM, Carlton WW, Tuite J. 1973. Ochratoxicosis in beagle dogs. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, 10: 219-231.
469. Tateo F, Bononi M, Fuso-Nerini A, Lubian E, Martello S, Commisati I. 1999. Ochratoxin A detection in wines. *Industrie delle Bevande*, 28: 592-596.
470. Tateo F, Bononi M, Lubian E. 2000. Survey on ochratoxin A in wines. Data concerning the market of table wines in brik. *Bulletin O.I.V.*, 73: 773-783.
471. Taylor JW, Pitt JI, Hocking AD. 1990. Ribosomal DNA restriction studies of *Talaromyces* species with *Paecilomyces* and *Penicillium* anamorphs. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 357-370.
472. Terao K, Ohtsubo K. 1991. Biological activities of mycotoxins: field and experimental mycotoxicoses. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 455-488.
473. Téren J, Palágyi A, Varga J. 1997. Isolation of ochratoxin producing *Aspergilli* from green coffee beans of different origin. *Cereal Res. Commun.*, 25: 303-304.
474. Téren J, Varga J, Hamari Z, Rinyu E, Kevei F. 1996. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia* 134: 171-176.

475. Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Emmanuel KE, Larondelle Y, Reddy DVR. 2001. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Addit. Contam.*, 18: 830-835.
476. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25: 4876-4882.
477. Tonon SA, Marucci RS, Jerke G, García A. 1997. Mycoflora of paddy and milled rice produced in the region of Northeastern Argentina and Southern Paraguay. *Int. J. Food Microbiol.*, 37: 231-235.
478. Tornadijo ME, Fresno JM, Martín Sarmiento R, Carballo J. 1998. *Penicillium* species during the manufacturing and ripening of Armada raw goat's milk cheese: identification, characteristics and *in vitro* potential toxins production. *Lait*, 78: 661-672.
479. Trout D, Bernstein J, Martínez K, Biagini R, Wallingford K. 2001. Bioaerosol lung damage in a worker with repeated exposure to fungi in a water-damaged building. *Environ. Health Persp.*, 109: 641-644.
480. Trucksess MW, Giler J, Young K, White KD, Page SW. 1999. Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley, and coffee-1997. *J. AOAC Int.*, 82: 85-89.
481. Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka E-L, Lindroos O, Kalso S, Koukila-Kähkölä P, Mussalo-Rauhamaa H, Haahtela T. 2000. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl. Environ. Microb.*, 66: 1899-1904.
482. Ueno Y. 1991. Biochemical mode of action of mycotoxins. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 437-453.
483. Ueno Y. 1998. Residue and risk of ochratoxin A in human plasma and beverages in Japan. *Mycotoxins*, 47: 25-32.
484. Ueno Y, Kawamura O, Sugiura Y, Horiguchi K, Nakajima M, Yamamoto K, Sato S. 1991. Use of monoclonal antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and immunoaffinity column chromatography to determine ochratoxin A in porcine sera, coffee products and toxin-producing fungi. En: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Ed: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky IN, Bartsch H. IARC, Lyon. pp: 71-75.
485. Ueno Y, Maki S, Lin J, Furuya M, Sugiura Y, Kawamura O. 1998. A 4-year study of plasma ochratoxin A in a selected population in Tokyo by immunoassay and immunoaffinity column-linked HPLC. *Food Chem. Toxicol.*, 36: 445-449.
486. Urbano GR, Taniwaki MH, Leitao MF de F, Vicentini MC. 2001. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw brazilian coffee. *J. Food Protect.*, 64: 1226-1230.
487. Usall J, Teixidó N, Fons E, Viñas I. 2000. Biological control of blue mould on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 58: 83-92.
488. Valenta H. 1998. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *J. Chromatogr. A*, 815: 75-92.
489. Valenta H, Goll M. 1996. Determination of ochratoxin A in regional samples of cow's milk from Germany. *Food Addit. Contam.*, 13: 669-676.
490. Valenta H, Kühn I, Rohr K. 1993. Determination of ochratoxin A in urine and faeces of swine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography*, 613: 295-302.
491. van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, Theron JJ. 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205: 1112-1113.

492. van der Stegen GHD, Essens PJM, van der Lijn J. 2001. Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin A in coffee. *J. Agr. Food Chem.*, 49: 4713-4715.
493. van der Stegen G, Jörissen U, Pittet A, Saccon M, Steiner W, Vincenzi M, Winkler M, Zapp J, Schlatter Chr. 1997. Screening of european coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Addit. Contam.*, 14: 211-216.
494. van Gulik WM, Antoniewicz MR, deLaat WTAM, Vinke JL, Heijnen JJ. 2000. Energetics of growth and penicillin production in a high-producing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, 72: 185-193.
495. van Walbeek W, Scott PM, Harwig J, Lawrence JW. 1969. *Penicillium viridicatum* Westling: a new source of ochratoxin A. *Can. J. Microbiol.*, 15: 1281-1285.
496. Vanittanakom N, Vanittanakom P, Hay RJ. 2002. Rapid identification of *Penicillium marneffei* by PCR-based detection of specific sequences on the rDNA gene. *J. Clin. Microbiol.*, 40: 1739-1742.
497. Varga J, Kevei F, Rinyu É, Téren J, Kozakiewicz Z. 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microb.*, 62: 4461-4464.
498. Vazquez-Belda B, Fente-Sampayo CA, Quinto-Fernandez E, Franco-Abuin C, Rodríguez-Otero JL, Cepeda-Saez A. 1995. Incidencia de hongos toxigénicos en queserías de la zona de Arzua (La Coruña España). *Food Sci. Technol. Int.*, 1: 91-95.
499. Veldman A, Borggreve GJ, Mulders EJ, van de Lagemaat D. 1992. Occurrence of the mycotoxins ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in feed components. *Food Addit. Contam.*, 9: 647-655.
500. Venturini ME, Blanco D, Oria R. 2002. *In vitro* antifungal activity of several antimicrobial compounds against *Penicillium expansum*. *J. Food Protect.*, 65: 834-839.
501. Viani R. 1996. Fate of ochratoxin A (OTA) during processing of coffee. *Food Addit. Contam.*, 13, Supl.: 29-33.
502. Virgili A, Zampino MR, Mantovani L. 2002. Fungal skin infections in organ transplant recipients. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3: 19-35.
503. Visconti A, Bottalico A. 1983. High levels of ochratoxins A and B in moldy bread responsible for mycotoxicosis in farm animals. *J. Agr. Food Chem.*, 31: 1122-1123.
504. Visconti A, Pascale M, Centonze G. 1999. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 864: 89-101.
505. Visconti A, Pascale M, Centonze G. 2001. Determination of ochratoxin A in wine and beer by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic analysis with fluorometric detection: collaborative study. *J. AOAC Int.*, 84: 1818-1827.
506. Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Märtlbauer E. 2000. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from bulgarian villages with a history of balkan endemic nephropathy. *J. Agr. Food Chem.*, 48: 2483-2488.
507. Wafa EW, Yahya RS, Sobh MA, Eraky I, El-Baz M, El-Gayar HAM, Betbeder AM, Creppy EE. 1998. Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Hum. Exp. Toxicol.*, 17: 124-129.
508. Wannemacher RW, Bunner DL, Neufeld HA. 1991. Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 499-552.

509. Warnock DW, Dupont B, Kauffman CA, Sirisanthana T. 1998. Imported mycoses in Europe. *Med. Mycol.*, 36, Supl. 1: 87-94.
510. Webley DJ, Jackson KL, Mullins JD. 1997. Mycotoxins in food: a review of recent analyses. *Food Aust.*, 49: 375-379.
511. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Ed: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Nueva York. pp: 315-322.
512. Wilkins K, Larsen K. 1995. Variation of volatile organic compounds patterns of mold species from damp buildings. *Chemosphere*, 31: 3225-3236.
513. Wilson DM, Sydenham EW, Lombaert GA, Trucksses MW, Abramson D, Benett GA. 1998. Mycotoxin analytical techniques. En: *Mycotoxins in agriculture and food safety*. Ed: Sinha KK, Bhatnagar D. Marcel Dekker, Nueva York. pp: 135-182.
514. Williams AP. 1990. Identification of *Penicillium* and *Aspergillus* computer-assisted keying. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. Ed: Samson RA, Pitt JI. Plenum Press, Londres. pp: 289-294.
515. Wolff J. 2000. Ochratoxin A in cereals and cereal products. *Arch. Lebensmittelhyg.*, 51: 85-88.
516. Wolter R, Jean C. 1997. Intoxications alimentaires: principales mycotoxicoses chez les carnivores domestiques. *Prat. Méd. Chir. Anim.*, 32: 157-162.
517. Wu MT, Ayres JC, Koehler PE. 1974. Production of citrinin by *Penicillium viridicatum* on country-cured ham. *Appl. Microbiol.*, 27: 427-428.
518. Wyatt RD. 1991. Poultry. En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 553-605.
519. Yeulet SE, Mantle PG, Rudge MS, Greig JB. 1988. Nephrotoxicity of *Penicillium aurantiogriseum*, a possible factor in the aetiology of Balkan Endemic Nephropathy. *Mycopathologia*, 102: 21-30.
520. Yigit F, Özcan M, Akgül A. 2000. Inhibitory effect of some spice essential oils on *Penicillium digitatum* causing postharvest rot in citrus. *Grasas Aceites*, 51: 237-240.
521. Yoon C-S, Bae KS. 1995. Genetic relationships among *Penicillium* species by characterizing RAPD markers. *J. Microbiol.*, 33: 171-177.
522. Yoshizawa T. 1991. Natural occurrence of mycotoxins in small grain cereals (wheat, barley, rye, oats, sorghum, millet, rice). En: *Mycotoxins and animal foods*. Ed: Smith JE, Henderson RS. CRC Press, Londres. pp: 301-324.
523. Zahavi T, Cohen L, Weiss B, Schena L, Daus A, Kaplunov T, Zutkhi J, Ben-Arie R, Droby S. 2000. Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. *Postharvest Biol. Tec.*, 20: 115-124.
524. Zanic-Grubisic T, Zrinski R, Cepelak I, Petrik J, Radic B, Pepeljnjak S. 2000. Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 167: 132-139.
525. Zimmerli B, Dick R. 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *J. Chromatogr. B*, 666: 85-99.
526. Zimmerli B, Dick R. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.*, 13: 655-668.