



*CONTAMINACIÓ FÚNGICA
DE MOSTRES DE SORGO
DEL NORD D'ÀFRICA*

PERILL POTENCIAL PER A LA SALUT HUMANA



2n Batxillerat Científic

2012/2013

Treball emmarcat dins de les línies d'investigació del grup de Micologia Aplicada de la Facultat d'Enginyers Agrònoms de Lleida per a la detecció de micotoxines produïdes per soques toxigèniques contaminants del sorgo.

Dirigit pel Dr. Vicent Sanchis i realitzat per la investigadora Amani Lahouar.

AGRAÏMENTS

Dono les gràcies al Dr. Vicent Sanchis per oferir-me la participació en el grup de Micologia Aplicada del Departament de Tecnologia d'Aliments de la Universitat de Lleida dins de les línies d'investigació que es segueixen per tal de prevenir la ingestió de micotoxines pels consumidors.

També dono les gràcies a la Dra. Teresa Hernández per oferir-me la possibilitat de tenir el primer contacte amb la Universitat de Lleida.

Agraeixo l'ajuda i la paciència per part de les investigadores Amani Lahouar i Montse Prim per explicar-me en tot moment el funcionament de les diferents tècniques de laboratori i els procediments a seguir per al meu estudi.

D'altra banda agraeixo també el suport de la meva tutora i dels meus pares i germà.

ÍNDEX

1. RESUM DEL TREBALL	7
2. INTRODUCCIÓ	10
2.1. ELS CEREALS I EL SORGO	10
2.2. FONGS I FLORIDURES	16
2.2.1. DEFINICIÓ I CARACTERÍSTIQUES DE LES FLORIDURES	16
2.2.2. IMPORTÀNCIA DE LES FLORIDURES COM A AGENTS ALTERANTS DELS ALIMENTS I FACTORS QUE INFLUEIXEN EN EL SEU CREIXEMENT	21
2.3. MICOTOXINES I CONTAMINACIÓ D'ALIMENTS	28
2.3.1. DESCOBRIMENT, DEFINICIÓ I ESTRUCTURA DE LES MICOTOXINES	28
2.3.2. TIPUS DE MICOTOXINES	30
2.3.3. VIES DE BIOSÍNTESI DE MICOTOXINES	36
2.3.4. ASPECTES I FACTORS QUE INFLUEIXEN EN LA PRODUCCIÓ DE MICOTOXINES	37
2.3.5. EFECTES TÒXICS DE LES MICOTOXINES EN ELS ÉSSERS VIUS	45
3. OBJECTIUS	48
4. MATERIALS I MÈTODES	49
4.1. MATERIALS	49

4.1.1. MOSTRES DE SORGO	49
4.1.2. RECOMPTE I IDENTIFICACIÓ DE FLORIDURES A LES MOSTRES DE SORGO	51
4.1.3. AÏLLAMENT DE LES FLORIDURES ESCOLLIDES	53
4.1.4. DETECCIÓ DE LA CAPACITAT MICOTOXIGÈNICA DE LES FLORIDURES AÏLLADES	53
4.2. MÈTODES	57
4.2.1. RECOMPTE I IDENTIFICACIÓ DE FLORIDURES A LES MOSTRES DE SORGO	58
4.2.2. AÏLLAMENT DE LES FLORIDURES ESCOLLIDES	64
4.2.3. DETECCIÓ DE LA CAPACITAT MICOTOXIGÈNICA DE LES FLORIDURES AÏLLADES	69
5. RESULTATS I DISCUSSIONS	93
5.1. RESULTATS	93
5.1.1. MICOBIOTA DE LES MOSTRES DE SORGO	93
5.1.2. CAPACITAT PRODUCTORA DE MICOTOXINES	97
5.2. DISCUSSIONS DELS RESULTATS	103
5.1.1. DISCUSSIÓ DE LA MICOBIOTA DE LES MOSTRES DE SORGO	103
5.1.2. DISCUSSIÓ DE LA CAPACITAT PRODUCTORA DE MICOTOXINES	108
6. CONCLUSIONS	114
7. PROPOSTES DE MILLORA	116

8. BIBLIOGRAFIA	118
9. ANNEXOS	121
9.1. COMPOSICIÓ I CARACTERÍSTIQUES DELS MEDIS DE CULTIU UTILITZATS	121
9.2. NIVELLS MÀXIMS ESTABLERTS D' AFLATOXINES I D'OCRATOXINA A EN ALIMENTS (LEGISLACIÓ EUROPEA)	124
9.3. NORMES DE TREBALL AMB MICOTOXINES	126
9.4. GUIA DE MATERIAL I MÈTODES UTILITZATS EN AQUESTS TIPUS D'INVESTIGACIONS	128

1. RESUM DEL TREBALL

Aquest treball tracta sobre la presència de micotoxines originades per floridures desenvolupades en els aliments, un tema que tot i que no és massa conegut a nivell general si que és molt important i té gran ressò en el món de la seguretat alimentària. En realitat, el meu coneixement sobre aquesta possible contaminació d'aliments per micotoxines era nul abans de realitzar el treball, tot i que era conscient de que aquests podien presentar floridures.

La idea de realitzar aquest projecte va venir primerament per la meva inquietud per conèixer el món dels microorganismes contaminants d'aliments, com són les floridures. D'altra banda aquesta curiositat va fer-me investigar i buscar informació sobre aquests. D'aquesta manera vaig descobrir que les floridures tenen la capacitat de sintetitzar uns metabòlits secundaris tòxics en tota mena d'aliments, perjudicials per a la salut tant humana com animal.

Com que el tema de la salut humana és molt important per a mi i de fet tinc pensat dedicar-m'hi posteriorment vaig decidir triar aquest tema per al meu treball. El fet de que la detecció de micotoxines sigui un treball d'investigació majoritàriament pràctic amb la realització d'un conjunt de processos de laboratori complexos amb diferents materials va cridar-me encara més l'atenció ja que sempre havia tingut l'esperança de poder utilitzar-ne i de saber com funcionaven.

La realització d'aquest treball ha estat possible gràcies a l'oferiment per part de la Dra. Teresa Hernández i del Dr. Vicent Sanchis de dur a terme aquest projecte dins del grup de Micologia Aplicada de la Universitat de Lleida, dins de les vies d'investigació que porta el grup encaminades a prevenir la ingesta de micotoxines pels consumidors.

Aquest seguit d'investigacions sobre les micotoxines i les seves conseqüents publicacions fan adonar-nos que aquestes són perjudicials tant a nivell de salut

Resum del treball

com econòmic pel que fa a la venda d'aquests aliments contaminats, i per tant es podrien evitar problemes si se'n detecta la seva presència en aliments.

Penso que s'hauria de donar més informació sobre el tema a la població per a que els consumidors coneguin aquest perill alimentari.

Per això crec que el meu treball si més no, encara que sigui una petita part d'una via d'investigació d'aquest grup, podria aportar informació rellevant sobre aquest tema, mitjançant les dades obtingudes després de la realització del procés.

L'estudi s'ha centrat en un cereal anomenat sorgo (melca). Aquest cereal és molt comú en la gastronomia dels països nord-africans i té un gran valor nutricional encara que en d'altres continents com l'Amèrica s'usa bàsicament per a l'alimentació de bestiar. S'ha comptat amb mostres d'aquest cereal originàries de dos països diferents del nord d'Àfrica, Tunísia i Egipte, ja que en aquests països hi ha un gran consum d'aquest cereal i vol saber-se si la seva ingesta pot estar relacionada amb moltes malalties presents en la població d'aquests països. També es vol comparar l'origen de les mostres per saber en quin país aquest cereal és més perjudicial.

L'objectiu principal és el d'estudiar la microbiota de 47 mostres de sorgo tunisenc i egipci i conèixer la capacitat potencial de produir-hi micotoxines. També s'ha determinat el grau de contaminació d'aquestes mostres i s'ha fet una anàlisi comparativa en funció de l'origen d'aquest cereal.

El treball consta de dues parts: una part teòrica (introducció teòrica) realitzada per a conèixer una mica el tema del que s'investiga, i una part pràctica on s'esmenten tots els materials utilitzats i s'expliquen tots els mètodes emprats en el procés. Seguidament s'expressen els resultats i les corresponents discussions, les conclusions d'acord amb els objectius marcats (en un altre apartat) i es proposen diferents possibilitats de millora del treball un cop ja valorat i acabat. Finalment s'exposen la bibliografia i els annexos.

La part teòrica s'ha elaborat mitjançant la consulta de treballs en diferents publicacions web, de tesis doctorals i de publicacions en revistes científiques. Molta de la informació ha estat facilitada per les investigadores Amani Lahouar i Montse Prim, i pel Dr. Vicent Sanchis, catedràtic del Departament de Tecnologia d'Aliments de la UdL.

La part pràctica s'ha realitzat seguint unes pautes marcades i un protocol determinat, amb uns materials i mètodes específics d'aquesta investigació. També s'han realitzat fotografies del material emprat i dels processos, així com també de les diferents floridures desenvolupades, per tal de fer conèixer el seu aspecte.

Aquesta part es va desenvolupar durant el mes de juliol al laboratori de microbiologia del Departament de Tecnologia d'Aliments de l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària (ETSEA) de la UdL. Durant tot el temps d'elaboració del projecte les persones del grup de treball abans nomenades han prestat la seva ajuda per resoldre dubtes i oferir informació.

Als annexos s'inclouen les instruccions de funcionament i maneig d'alguns dels aparells i tècniques de laboratori. Cal seguir-les amb una cura especial per a obtenir processos de qualitat.

2. INTRODUCCIÓ

2.1. ELS CEREALS I EL SORGO

Els cereals constitueixen un grup de plantes herbàcies pertanyent a un altre de més general i ampli, les gramínies. Aquests es caracteritzen perquè s'empren tant en l'alimentació humana com en la del bestiar.

Dels cereals no tan sols se n'utilitza el gra sinó que també s'empren plantes senceres, collides abans de la seva maduresa, en forma d'ensitjat, com el blat de moro i el sorgo.

Cada cultura, cada civilització, cada zona geogràfica del planeta, consumeix diversos tipus de cereals específics creant tota una cultura gastronòmica al seu voltant. Entre els europeus i els americans domina el consum del blat, l'arròs és el menjar essencial dels pobles asiàtics i el sorgo i el mill són propis de les comunitats africanes. L'ordi, el sègol i la civada també són importants en l'alimentació humana.

Gràcies a les seves característiques nutritives, el seu cost moderat, la seva capacitat per provocar sacietat immediata, la seva abundant reproducció, el seu fàcil emmagatzematge, la seva propietat de conservació durant molt de temps sense la pèrdua del poder nutritiu, la seva preparació agroindustrial i tractament culinari senzills i de gran versatilitat, els cereals són un dels productes bàsics en l'alimentació dels diferents països; i de consum adequat per a qualsevol edat i condició.

Es considera que el sorgo és originari de l'Àfrica Central i que posteriorment va ser introduït a l'Índia, encara que es creu possible un origen independent als dos continents.

El sorgo (*Sorghum bicolor*, L. Moench), utilitzat pel consum en l'actualitat, es coneix sota diversos noms: “mill gran i blat de moro de Guinea” a l'Àfrica occidental, “kafir” a l'Àfrica austral, “duró” al Sudan, “mtama” a l'Àfrica oriental, “iowar” a l'Índia i “kaoliang” a la Xina (Purseglove , 1972). Als Estats Units se sol denominar “mill o blat de moro”.

El sorgo es tracta com a planta anual, encara que és herba perenne i en els tròpics es pot fer més d'una collita a l'any.

A l'Àfrica, la melca es cultiva en una àmplia franja que s'estén des de l'Atlàntic fins a Etiòpia i Somàlia, a la frontera del Sàhara al nord i al sud dels boscos equatorials. A l'Àfrica subsahariana, el sorgo és el cereal més important (quantitativament) després del blat de moro (FAOSTAT, 2005).

Aquesta superfície s'estén al llarg de les parts més àrides de l'Àfrica oriental i austral, on les precipitacions són massa baixes per al bon cultiu del blat. Domesticat, el sorgo té una gran diversitat morfològica que contribueix a la seva capacitat d'adaptació a les variables climàtiques, edàfiques i ecològiques.

Aquest pot ser conreat en sòls més pobres i en climes més secs que el blat de moro, com ja s'ha destacat, i prospera en sòls pesats, incloent argiles que es fraccionen.

També tolera inundacions temporals. Fins i tot en l'etapa de plàntula la melca és resistent a la sequera i és adequada per a àrees de pluges erràtiques. El rang favorable de pluges està entre 400 i 755 mm.

No obstant això, però, és susceptible al dany dels ocells i és necessari un bon control dels mateixos en les zones de sabanes.

És un cultiu apropiat per condicions càlides a molt càlides i mor amb les gelades.

Introducció

En condicions equatorials pot créixer fins als 2200 m d'altitud, encara que generalment l'hi conrea per sota els 1000 m; varietats tradicionals resistents al fred són usades en majors altituds a Etiòpia.

El seu rang de latitud és de 40° a banda i banda de la línia equatorial i el seu rang d'adaptació al pH del sòl és ampli, entre 5,0 i 8,5, suportant la salinitat millor que el blat de moro. El sorgo és una planta de dia curt, amb una marcada resposta al fotoperíode, de manera que els cultivars han de ser seleccionats d'acord a aquest.

Dins del grup dels cereals, el sorgo (*Sorghum* spp.) és un dels que és més poc conegut, encara que aquest és el cinquè cereal que es consumeix al món amb una producció global de 59 milions de tones el 2005. És un cultiu que s'estén per 45 milions d'hectàrees (FAOSTAT, 2005), majoritàriament en zones àrides.

Per adonar-nos del contrast i diferències de la utilització de cereals arreu del món, segons la seva economia, podem dir que el consum de cereals en els països en desenvolupament va ser al trienni de 1988-1990 de 930 milions de tones (dels quals 90 milions van ser importacions dels països desenvolupats). D'aquest volum, el 72%, equivalent a 670 milions de tones es consumiren directament, el 17%, és a dir, 160 milions de tones van alimentar bestiar i la resta es va destinar a llavors i altres usos industrials.

Els cinc productors més grans de sorgo del món l'any 1990 (segons la FAO) van representar junts el 73% de la producció mundial total d'aquell any (TAULA 1).

En canvi dades de la FAO al 2007 indiquen que els principals països productors de sorgo van variar respecte el 1990 segons la quantitat de la seva producció (TAULA 1).

TAULA 1: Comparació de la producció de sorgo dels diferents països en els anys 1990 i 2007

PAÍS	PRODUCCIÓ 2007 (1000 t)	PRODUCCIÓ ANY 1990 (1000 t)
Estats Units	12636	14516
Nigèria	9058	4000
Índia	7151	12500
Mèxic	6203	6230
Sudan	4999	1502
Argentina	2795	2016
Xina	2435	5310
Etiòpia	2174	1000
Burkina Faso	1508	917
Austràlia	1283	933

Dades del 1990 : FAO, 1991 (Document: El sorgo y el mijo en la nutricion humana, 1995)

Dades del 2007: FAO, 2007 (Document : Cultiu del sorgo (infoagro.com))

Actualment, la producció de la meitat del sòl cultivable dels Estats Units es destina a consum animal, la majoria en la fabricació de pinsos, com en altres països desenvolupats.

Aquest cereal és més utilitzat, tot i que depèn de la zona que vulguem destacar, per a l'alimentació del bestiar i en concret s'empren els grans d'aquest en forma de pinsos, encara que també s'utilitza la planta per a l'elaboració de farratge i palla que posteriorment es dirigida a l'ús ramader.

L'Àfrica de mitjana anual, en produeix al voltant de 20 milions de tones. El sorgo és un cereal important per al consum humà de les regions tropicals i subtropicals d'Àfrica i Àsia (Doggett, 1988).

Es pot observar que la producció de Sorgo té lloc a tot el continent, amb els països del nord d'Àfrica de Nigèria, Sudan, Etiòpia i Burkina Faso que representen gairebé el 70% de la producció Africana (**TAULA 2**).

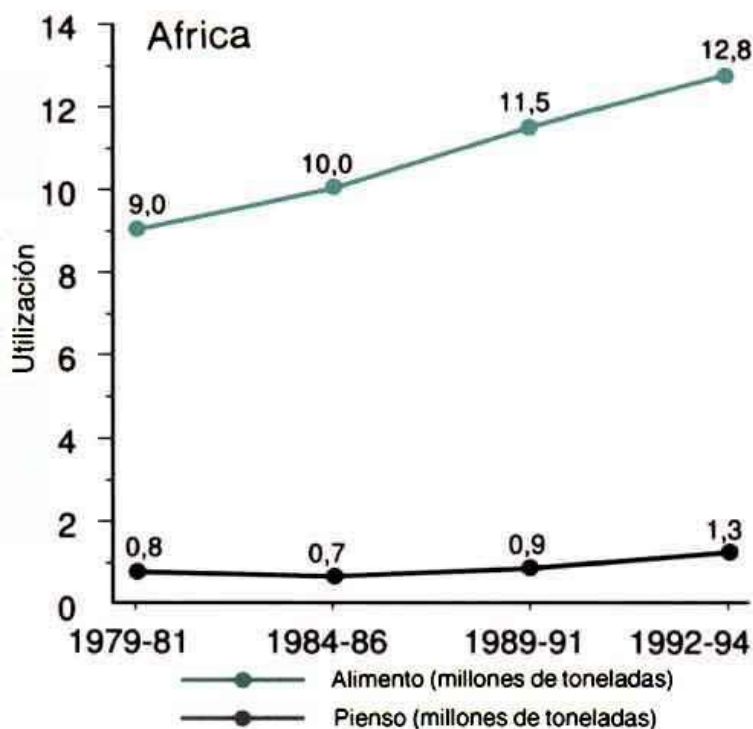
TAULA 2: Països de l'Àfrica, amb una producció anual d'almenys cent mil tones de Sorgo (dades de 2001)

País	Producció (en tones x 10 ³)
Nigèria	7081 (33.8) ^a
Sudan	4470 (21.4)
Etiòpia	1538 (7.3)
Burkina Faso	1372 (6.6)
Egipte	862 (4.1)
Tanzània	736 (3.5)
Níger	656 (3.1)
Mali	517 (2.5)
Txad	497 (2.4)
Camerun	450 (2.1)
Uganda	423 (2.0)
Moçambic	314 (1.5)
Ghana	280 (1.3)
Sudàfrica	211 (1.0)
Ruanda	175 (0.8)
Benin	165 (0.8)
Togo	141 (0.7)
Senegal	140 (0.7)
Kenia	133 (0.6)
Zimbaue	103 (0.5)
Somàlia	100 (0.5)

(a) percentatge de la producció de Sorgo d'Àfrica

Department of Food Science, University of Pretoria, Pretoria 0002, South Africa.

El 56% del total de la producció de cereals al nord d'Àfrica és consumida directament per la població, al igual que al Pròxim Orient. En més baix percentatge, per tant, com ja s'ha indicat, els cereals s'utilitzen en forma de pinsos, palla i farratge per al consum animal o del bestiar.



La Economía del Sorgo y del Mijo en el Mundo: Hechos, Tendencias y Perspectivas, (FAO, 1997).

GRÀFIC 1: Desenvolupament de la utilització del Sorgo a l'Àfrica

La seva poca utilització per al consum humà és deguda al fet que el seu aroma i gust són bastant diferents a el que el món occidental està acostumat.

Aquest cereal podria tenir un gran avantatge econòmic, ja que és barat, per tant, s'està intentant incorporar a l'alimentació humana i a processos industrials, els quals permetrien reduir el seu gust i aroma forts. Ja s'ha incorporat mitjançant aquests processos, en baixes proporcions, en galetes i snacks.

El Sorgo (tipus waxy) s'utilitza en la indústria per a l'extracció de midó mitjançant un procés de moltura humida. El Sorgo també és utilitzat per a l'elaboració de cerveses i begudes alcohòliques, en països Africans i Asiàtics, encara que el gust i aroma es molt fort per la seva alta concentració d'antocianogens, aquests li donen també un color fosc al producte final. Es podrien utilitzar algunes varietats d'aquests per a produir cervesa en el món occidental, de tonalitat més clara i de gust i aroma menys fort.

Introducció

Una nova iniciativa és utilitzar aquest cereal per a la producció de pa i confitures, juntament amb la farina de blat. També s'utilitza a Etiòpia, Somàlia, Índia i Xina per a l'elaboració de coques i cuscús.

Encara que no és un cereal molt conegut, com ja es sabut, representa una bona font de beneficis per a l'organisme. És un cereal similar al blat de moro, tant en aparença com en aportació nutricional, tot i que comparant-lo amb totes les espècies de gra (contenen 60-70% de glúcids digeribles), aquest té un menor contingut calòric i, per tant, energètic a causa del seu més baix nivell en hidrats de carboni. Segons Favier (1989), el sorgo conté 11% de proteïnes, 3,2% de greixos, 59,3% hidrats de carboni digeribles i 14,5% de fibra dietètica.

El Sorgo no conté gluten, i és apte, per tant, per a celíacs. És ben assimilat per l'organisme i li proporciona hidrats de carboni d'absorció lenta que permeten mantenir els nivells d'energia al llarg del dia i regular la concentració de glucosa en sang. Per aquesta raó és molt recomanable a persones diabètiques.

2.2. FONGS I FLORIDURES

2.2.1. DEFINICIÓ I CARACTERÍSTIQUES DE LES FLORIDURES

El regne dels fongs és molt ampli i conté molta variabilitat, per això la identificació d'aquests depèn en gran mesura de caràcters morfològics com ara el tipus de reproducció i disposició de les espores.

Tot i que el terme floridura no està definit amb precisió, la majoria dels biòlegs consideren com floridures els fongs petits, filamentosos, multinucleats i, en certs casos, pluricel·lulars.

Les floridures, per tant, pot dir-se que són un grup heterogeni de fongs, eucariotes, uni o pluricel·lulars, filamentosos, (Pitt, 2000), que poden contaminar els ambients més diversos (sòl, aire, roba, menjar i plantes), i que contribueixen amb altres microorganismes per a la biodegradació i el reciclatge de la matèria orgànica, per exemple d'escombraries o fusta.

Els fongs, i per tant, també les floridures, són tal·lòfites, ja que estan formades pel seu tal·lus filamentós i ramificat i conegut ordinàriament amb el nom de miceli, sense diferenciació estructural en arrels, tiges i fulles.

Més concretament les floridures pertanyen amb més abundància a l'ordre de les mucorals, dins de la classe dels zigomicets, que és el més gran i més ben estudiat en l'actualitat, en el regne dels fongs. Aquestes s'acostumen a propagar per espores asexuals, formades per escissió.

Per a definir la seva estructura i conformació pot dir-se que un conjunt o agregat de filaments filiformes o hifes conformen el miceli vegetatiu de les floridures, que compon el seu organisme i que permet molts cops reconèixer-les, gràcies a la seva aparença cotonosa. En concret, les hifes són túbuls cilíndrics ramificats, de diàmetre variable, septats o no (en les floridures no són septats), constituïts per una paret cel·lular rígida, prima i transparent que conté una massa citoplasmàtica multinucleada i mòbil.

Les hifes viuen i es desenvolupen amagades entre la matèria orgànica, generalment en descomposició, formant un conjunt semblant a una teranyina anomenat miceli. La forma de filament estret no és casual (normalment, de 5 a 15 micròmetres) ja que representa la millor forma per a poder penetrar en el substrat, cercar-hi aliments i absorbir-los (també n'hi ha que són unicel·lulars i s'han adaptat a viure dins de cèl·lules).

Aquests filaments o túbuls poden tenir una sèrie d'elements que compleixen diferents funcions, com els rizoides que penetren en el substrat primitiu a la recerca d'aliments, per tant, serveixen per a la fixació.

Introducció

Segons la seva funció podem trobar dos tipus de hifes:

- Hifes vegetatives que penetren en el substrat per absorbir les substàncies nutritives
- Hifes fèrtils (aeròbiques), que produeixen les cèl·lules reproductores

Als extrems de les hifes apareixen unes estructures en forma de bola que s'ennegreixen poc a poc. Són els esporangis, que al seu interior formen les espores. Aquestes són alliberades quan es trenca la paret de l'esporangi i si cauen en un medi favorable donaran lloc a un nou miceli.

Les estructures reproductores presenten gran varietat de formes, a partir de les quals es classifiquen els fongs. En aquestes es formen les espores que permetran, amb la seva dispersió, la reproducció de l'espècie.

Les floridures estan desproveïdes de clorofil·la, per la qual cosa són organismes heteròtrofs, és a dir, obtenen l'aliment de les matèries mortes, com sapròfits, o es nodreixen com paràsits sobre hostes vius.

Aquests microorganismes són heteròtrofs, per tant, es veuen obligats a obtenir els nutrients del medi de cultiu, però a causa de la rigidesa de la paret cel·lular, no són capaços de fagocitar molècules complexes. Per aconseguir aquesta matèria orgànica per a nodrir-se segreguen uns enzims que transformen l'aliment en petites molècules, que seguidament són absorbides per les cèl·lules del fong, mitjançant la paret, i que a més, extrauen del terreny on es troben l'aigua i sals minerals que necessiten per a dur a terme diverses funcions metabòliques.

Fisiològicament, les floridures s'adapten a condicions més severes que els altres microorganismes. Per exemple les floridures es desenvolupen en substrats amb concentracions de sucres que els bacteris no poden tolerar, ja que les floridures no són tan sensibles a la pressió osmòtica elevada.

Les floridures toleren i es desenvolupen en concentracions d'acidesa relativament elevades. Suporten escales de pH entre 2 i 9, però el pH òptim per a gairebé totes les espècies és de 5-6.

TAULA 3: Requeriments fisiològics i nutricionals de floridures i bacteris comparats

Paràmetre	Floridures	Bacteris
pH òptim	5-6	6.5-7.5
Temperatura òptima	22-30 °C	20-30 °C
Gasos	Aerobis estrictes	Anaeròbics o aeròbics
Llum	Cap	Alguns bacteris fotosintètics
Concentració de glúcids al medi	4%	0,5-1%
Carboni	Heteròtrofs	Autòtrofs o heteròtrofs

CASTILLO, Yorling, ANDINO, Flavia. Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Curso: Microbiología de los alimentos, UNI-Norte, Febrer 2010

Gairebé tots els fongs són estrictament aeròbics, el seu creixement l'incrementa la presència d'abundant O₂, es desenvolupen en condicions de temperatures molt variades, però entre 22 a 30 °C és l'òptima per a la major part de les espècies. Alguns fongs poden créixer a 0 °C i danyar la carn i els vegetals en refrigeració. Per contra, algunes floridures termòfils es desenvolupen a 62 °C.

La glucosa és una font de carboni molt aprofitada per moltes floridures, encara que altres sucres com la sacarosa i la maltosa, així com molts compostos de carboni orgànic més complexos com el midó i la cel·lulosa són utilitzats per moltes espècies. També necessiten per al seu desenvolupament petites quantitats de ferro, fòsfor, potassi, zinc, coure, manganès i molibdè. Algunes espècies necessiten vitamines.

Introducció

La floridura es troba comunament als cereals i probablement els grans són l'aliment més contaminat per aquests microorganismes. També poden créixer en altres plantes per a aliment humà o animal (verdures, fruites). Les pastanagues, les cebes i la col estan freqüentment contaminades amb espècies de *Penicillium* i *A.niger* (Lugauskas, 2005).

Mescles d'aliments poden estar contaminades amb espores que inicialment eren presents als grans o en d'altres ingredients (fruits secs) que contenen.

També poden ser contaminats durant el procés de fabricació o durant l'emmagatzematge. Les espècies de fongs més freqüents en compostos dels aliments pertanyen als mateixos tipus que els contaminants dels cereals: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*.

Tot i això, no totes les espècies de fongs creixen en les mateixes condicions climàtiques, per això es pot dir que les espècies d'*Aspergillus* sovint es troben en els grans de les regions càlides. Les espècies de *Penicillium* solen proliferar en presència d'una activitat d'aigua relativament baixa i baixa temperatura.

Aquestes espècies (d'*Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*) són comunament aïllades dels cereals produïts en països de clima temperat. També es troben en el gra emmagatzemat en els països amb climes més càlids (Amèrica del Sud, Àsia). Les espècies de *Fusarium* creixen preferentment en climes freds i humits.

Alguns tipus de floridures representen grans beneficis econòmics per als éssers humans, ja que s'utilitzen en la indústria per a donar a determinats productes industrials propietats organolèptiques, com ara el *Penicillium* i *Penicillium camemberti* utilitzats en la maduració del formatge, *Penicillium jensenii* o *Penicillium nalgiovense* utilitzat en el curat de la carn.

Altres són emprats per a la producció d'enzims (per exemple, la proteasa i pectinasa produïda per *A.niger*), àcids orgànics (àcid cítric i glucònic produït per espècies d'*Aspergillus* i *Penicillium*) i antibiòtics (penicil·lina produïda per *P. chrysogenum*) (Carlile i Watkinson, 1997;. Kiffer i Morelet, 1997, Perry , 2004).

Per altra banda existeixen fongs nocius que, a partir del miceli, mitjançant la infiltració per les hifes poden créixer en diferents substrats i també excretar enzims hidrolítics que degraden parcialment el substrat i causen grans danys, especialment en el camp de l'agricultura a través de la secreció de micotoxines.

La presència de fongs nocius és indesitjable en els productes alimentaris a causa dels resultats en humans i animals en l'alteració quantitativa i qualitativa dels productes de nutrició i dietètica, ja que provoca un deteriorament en la qualitat organolèptica (la secreció dels pigments com la melanina, olor a humitat) i els seus rendiments. Els metabòlits secundaris sintetitzats en el creixement de fongs són també elements importants en la descomposició dels aliments.

2.2.2. IMPORTÀNCIA DE LES FLORIDURES COM A AGENTS ALTERANTS DELS ALIMENTS I FACTORS QUE INFLUEIXEN EN EL SEU CREIXEMENT

Per donar un exemple de com aquests metabòlits secundaris sintetitzats en el creixement de fongs poden afectar alguns aliments i per consegüent als éssers vius que els ingereixen, s'observa que si la font d'alimentació per al bestiar lleter conté nivells relativament alts d'aquests metabòlits secundaris (micotoxines), la llet pot estar contaminada. L'Aflatoxina B₁ en els aliments ingerits per les vaques lleteres es metabolitza parcialment en el fetge i es converteix en el seu derivat 4-hidroxi, conegut com a aflatoxina M₁, contaminant a la llet.

Les condicions de pasteurització i/o esterilització, envasament i emmagatzematge eviten una major contaminació per fongs. Per contra, aquests mètodes no proporcionen la desintoxicació de l'aflatoxina M₁ en la llet.

Introducció

Aquesta molècula estable que persisteix al llarg de la cadena alimentària es troba en els productes làctics. Els productes làctics com el iogurt i el formatge són, per ells mateixos, molt més susceptibles a la contaminació per fongs.

Espècies que contaminen el iogurt i la llet en pols pertanyen als gèneres *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus* i *Rhizopus*. La mantega pot tornar-se rancia, a causa de la contaminació per *Aspergillus repens* (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Totes les cultures de climes càlids i humits es troben exposades al creixement de floridures toxigèniques i els productes vegetals obtinguts poden ser contaminats per micotoxines. Aquest és el cas dels cereals, les llavors oleaginoses, els fruits secs, espècies, fruites seques, panses de raïm, llet i derivats i descomposició de la matèria orgànica, etc ... (D'Mello i Macdonald , 1997).

Els aliments contenen tots els nutrients necessaris per al creixement microbià, però en quantitats desiguals. La composició d'un aliment determina la naturalesa de les fonts de carboni i nitrogen així com també la seva abundància, el pH i l'activitat de l'aigua que són específics per a cada producte. Per tant, ho faran en gran diversitat de floridures, dominades per un grup o un altre i característiques tant dels aliments com del medi ambient (Bourgeois, 1996).

Les floridures toxigèniques responsables de l'alteració dels aliments es divideixen en dos grups ecològics (Christensen, 1974):

- Les floridures de camp que contaminen els productes agrícoles abans o durant la collita, principalment *Alternaria* i *Fusarium* i *Aspergillus* també, en el cas del raïm
- Les floridures d'emmagatzematge: *Aspergillus* i *Penicillium* que tendeixen a contaminar els aliments durant l'emmagatzematge

Tant les espècies *A.fumigatus* i *A.clavatus* només ataquen les llavors danyades i requereixen una alta retenció d'humitat de la llavor.

La contaminació dels aliments per micotoxines es produeix quan es forma un conjunt de condicions ambientals al camp, així com en els processos mal controlats de la collita, l'emmagatzematge i el processament. La producció de micotoxines per fongs és una conseqüència de la propietat combinada de les característiques genètiques d'aquests i el seu entorn (Blumenthal, 2004).

Com en tots els organismes, la naturalesa taxonòmica de la flora fúngica i la proliferació d'un determinat ecosistema està fortament influenciada per la naturalesa física i química del medi ambient. Una comprensió de la influència ambiental ajuda a controlar el seu creixement i a estudiar la distribució de floridures d'entorns naturals.

2.2.2.1. FACTORS FÍSICS

La disponibilitat d'aigua

L'activitat d'aigua (aw) d'un aliment és la quantitat d'aigua lliure, és a dir, la disponibilitat de l'aigua. Això depèn de la composició química de l'aliment (aigua retinguda per les sals, sucres i proteïnes) i de les seves característiques físiques (porositat, polaritat). Aquest paràmetre pot variar de 0 (per a tots els substrats en els que l'aigua és retinguda) a 1 (per l'aigua pura).

L'activitat d'aigua és igual a 1/100 de la humitat relativa del producte (quan s'expressa com un percentatge). L'aw és fonamental per al creixement de floridura, especialment en la germinació d'espores i el creixement micelià. D'altra banda, per a una temperatura donada, cada espècie de floridura requereix una activitat d'aigua òptima per a la germinació de les espores, el creixement, la esporulació i la formació de metabòlits. El requisit d'aigua i tolerància de floridures varia d'una soca a una altra.

Introducció

Les floridures es classifiquen en tres grups:

- Les espècies hidròfiles: les espores germinen amb més del 90% d'humitat relativa (HR) i el creixement òptim es realitza amb un 100% HR (*Mucor* sp.)
- Les espècies mesòfiles: les espores germinen entre el 80% i 90% HR i el creixement òptim és entre el 95% i 100% HR (*Alternaria* sp., *Penicillium* sp.)
- Les espècies xerofítiques: el creixement també és òptim entre el 95% i el 100% HR, però els espores poden germinar amb menys del 80% HR (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.)

Les floridures són més xerotolerants (adaptació a ambients secs) que altres microorganismes. La majoria de les floridures creixen a partir d'una activitat d'aigua de 0,85. Per tant, molts productes en els que l'activitat de l'aigua no permet el creixement de bacteris poden ser colonitzats per floridures.

Els fongs pertanyents als gèneres *Aspergillus* i *Penicillium* són generalment xeròfils i capaços de créixer amb valors d' a_w al voltant de 0,7 a 25 °C, pel que poden créixer en els aliments pobres en aigua, com ara en l'emmagatzematge de cereals, fruits secs, productes amb activitat d'aigua reduïda (productes curats en sec, melmelades ...) (Castegnaro i Pfohl Leszkowicz-, 2002). En comparació, *Fusarium* poden desenvolupar-se amb valors d'activitat d'aigua superiors a 0,9. Ens trobem per tant davant d'espècies en les plantes vives que creixen en el camp (Castegnaro i Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Composició gasosa

Els fongs són majoritàriament aerobis estrictes. Necessiten oxigen per al seu creixement normal. No obstant això, el seu desenvolupament no es veu afectat pels nivells 10 vegades menors d'O₂ (2,1%) que els de l'atmosfera. Com a resultat, algunes espècies de fongs poden créixer en aliments en un ambient baix en O₂.

Aquest és el cas de l'*Aspergillus flavus* que tolera molt baixes pressions d'O₂. Per contra, per a les floridures, com ara *Fusarium proliferatum*, dependent d'oxigen, la biomassa fúngica es redueix significativament en l'absència d'O₂ (Keller, 1997). Algunes espècies poden créixer en condicions anaeròbies: el cas de *Byssochlamys* que contaminen suc de fruites conservats per la pasteurització (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

La concentració de CO₂ també influeix en el creixement de fongs i es veu reflectida en la intensitat respiratòria. L'augment de la pressió de CO₂ en el medi inhibeix el creixement de fongs. El desenvolupament d'*Aspergillus ochraceus* és completament inhibida per una concentració de 80% de CO₂ (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Temperatura

La temperatura determina el desenvolupament de la flora fúngica i, especialment, la seva taxa de creixement. També actua sobre el metabolisme de fongs mitjançant l'activació o inhibició de les reaccions enzimàtiques responsables de la descomposició dels aliments. La inhibició s'atribueix tant a la desnaturalització de l'estructura de l'enzim (alta temperatura) o una disminució en la taxa de reaccions químiques per energia baixa (baixa temperatura).

Introducció

Les floridures solen ser mesòfiles: el creixement de les hifes és òptim entre 20 i 25°C. Les espores mesòfiles de les floridures no poden germinar a una temperatura per sota de 5°C (Pfohl Leszkowicz-2001). També hi ha espècies psicròfils, com ara, per exemple, *Penicillium expansum*. Aquestes poden créixer lentament a temperatures baixes per sota de 4°C (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Les espècies termòfiles són estranyes. Aquest és el cas d'*Aspergillus flavus*, la seva temperatura òptima de creixement és d'entre 25 i 35°C, però la floridura pot créixer bé en una gamma més àmplia (15 a 45°C) i de vegades fins 50°C (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). Aquestes característiques fisiològiques requereixen un baix contingut d'aigua i el possible desenvolupament d'una àmplia gamma de temperatures, fet que fa que aquestes espècies estiguin freqüentment involucrades en el deteriorament de matèries primeres i aliments (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

Cal assenyalar que les floridures són majoritàriament sensibles a l'augment de la temperatura i a la cocció o pasteurització de processament les quals sovint destrueixen els micelis dels fongs (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

No obstant això, les micotoxines són més resistents a la calor. Les espores de les floridures són molt resistents a la calor. La majoria de les espores poden resistir temperatures d'esterilització normal (120 ° C durant 20 minuts).

Temps d'emmagatzematge

L'estudi de l'evolució de diferents paràmetres en el desenvolupament de la microflora en funció del temps determina que el període d'emmagatzematge no ha d'excedir més enllà del qual el producte es deteriori.

2.2.2.2. FACTORS QUÍMICS

El pH

El pH és una mesura de l'activitat d'ions hidrogen en solució. En general, els grups microbians diferents tenen preferiblement unes característiques de pH. Cada espècie creix en un interval definit de pH i té un pH òptim per al creixement. L'acció del pH sobre el creixement microbià és principalment en la cinètica de les reaccions enzimàtiques. La majoria dels microfongs prefereixen un ambient lleugerament àcid, el seu creixement és normalment millor entre 5 i 6. Sovint es reproduïxen en un ampli interval de pH 3 a 8, però varia segons l'espècie. No obstant això, hi ha límits a la seva tolerància i dràstics canvis en el pH poden causar danys.

Composició del substrat

La naturalesa del substrat té un paper important en el creixement de fongs. En el cas dels cereals, per exemple, és gairebé sempre en el germen del gra (ric en nutrients, no conté midó, però una gran quantitat de sucres simples, més fàcilment digeribles), on es produeix una contaminació per floridures.

És interessant observar que els canvis taxonòmics de la flora fúngica estan associats al substrat, reflectint sovint el seu potencial enzimàtic.

2.2.2.3. FACTORS BIOLÒGICS

Interacció microbiana

La competència pels nutrients i l'espai és un problema freqüent en el món dels éssers vius. La presència simultània de diverses espècies de microorganismes en el mateix entorn determina les interaccions entre espècies diferents. Les condicions ambientals poden afavorir determinades espècies i desfavorir-ne d'altres.

Introducció

La síntesi de micotoxines i l'acumulació d'aquestes en el medi ambient també poden tenir un efecte inhibidor sobre el creixement d'altres espècies (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Presència d'insectes

Els insectes són els principals vectors d'espores de floridura. Contribueixen a la infestació dels aliments per floridures tant en el camp com en sales d'emmagatzematge (Pfohl-Leszkowicz, 2001). A la paret dels grans i les llavors degradats, els insectes promouen la contaminació per floridura. La contaminació dels cacauets amb *Aspergillus flavus* abans de la collita és sovint associada amb l'atac d'insectes (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Els àcars també són importants vectors d'espores, viuen al gra florit i poden transportar les espores per mitjà de la superfície del seu cos i del seu tracte digestiu (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). De la mateixa manera, les erugues i escarabats estan sovint associats amb la contaminació del blat de moro per aflatoxines (Hubert, 2007).

Durant l'emmagatzematge de cereals, aus i rosegadors poden tenir el mateix paper com a vectors d'espores de fongs (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

2.3. MICOTOXINES I CONTAMINACIÓ D'ALIMENTS

2.3.1. DESCOBRIMENT, DEFINICIÓ I ESTRUCTURA DE LES MICOTOXINES

Durant segles, diverses epidèmies reportades en la història humana s'han atribuït al consum d'aliments amb floridura, però han passat àmpliament desapercebudes. Les floridures van ser vistes sovint com les taques desagradables del menjar.

Als anys seixanta del segle passat, granges de galls d'Indi a Anglaterra van veure's afectades per una greu malaltia anomenada intoxicació per X dels galls d'Indi causada per la ingestió de farina de cacauet del Brasil. Els símptomes de la malaltia van ser la pèrdua de gana, debilitat de les ales, letargia, i després la mort sobtada.

Posteriorment, es va trobar que aquests pinsos estaven contaminats amb un fong anomenat *Aspergillus flavus*. El 1961, investigadors britànics de l'Institut de Productes Tropicals van demostrar que els fongs *Aspergillus flavus* produïen una substància tòxica anomenada aflatoxina. Posteriorment, en la investigació es va demostrar que en realitat hi havia quatre aflatoxines B₁, B₂, G₁ i G₂, que actualment són considerades l'agent cancerigen més potent que es coneix al món.

Des de llavors, les micotoxines han provocat una onada d'investigacions i publicacions. La llista de les floridures reconegudes amb la capacitat de produir toxines responsables de les micotoxicosis és impressionant i es troba en constant creixement. No obstant això, només algunes d'aquestes toxines són contaminants naturals. Altres apareixen només en condicions artificials.

Aquests metabòlits secundaris nocius formats a partir d'un fong toxigènic desenvolupat en algun aliment s'anomenen micotoxines. Aquest terme, etimològicament prové del grec "mycos" que significa fong i del llatí "tòxic" que significa verí.

Les micotoxines es troben entre els metabòlits secundaris, que no exerceixen cap paper evident en l'economia de l'organisme. Probablement, és una defensa contra els fongs paràsits o contra altres microorganismes que competeixen en el mateix entorn (Adams, 2002).

Les micotoxines són produïdes per diverses floridures amb diferents efectes tòxics. Sembla que les produeixin en la fase de creixement logarítmic de la floridura (Bottalico, 1981).

Introducció

Pel que fa a l'estructura química les micotoxines són majoritàriament compostos heterocíclics insaturats. La presència d'un doble enllaç de carboni en els grups extrems de furà permet l'addició d'O₂ i la formació d'un cicle d'epoxi altament tòxic (Bennett i Klich, 2003).

Algunes d'aquestes molècules són fluorescents sota llum UV (aflatoxina B₁, B₂, G₁ i G₂, ocratoxina A, zearalenona ...). Aquesta característica és important en el desenvolupament de mètodes de detecció i determinació.

La distribució de les micotoxines no és uniforme, ja que depèn de cada aliment. Segons alguns estudis fets als laboratoris sembla que queden retingudes en el miceli, en els esclerocis o en les espores, i d'altres s'excreten al medi (Palmgren i Lee, 1986; Moss, 1992).

2.3.2. TIPUS DE MICOTOXINES

Les principals micotoxines que es troben en els aliments poden ser produïdes per cinc tipus de fongs: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* i *Claviceps*. A causa de les seves propietats tòxiques en humans i animals i la seva freqüència de contaminació de les matèries primeres i aliments, les micotoxines més importants són les aflatoxines, ocratoxina A, fumonisines, tricotecens i la zearalenona.

Entre els centenars de micotoxines identificades en l'actualitat, trenta d'aquestes són molt importants per a la salut humana i animal per la seva freqüència o toxicitat (Bennett i Klich, 2003).

Les principals toxines (**TAULA 4**) són produïdes per soques de fongs dels gèneres *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium* (Afssa, 2006).

TAULA 4: Principals micotoxines i espècies de fongs que les produeixen

Micotoxines	Principals floridures productores
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. Nonius</i>
Ocratoxina A	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. Carbonarius</i>
Patulina	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i>
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. Proliferatum</i>
Tricotecens (DON)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F.culmorum</i> , <i>F.crookwellense</i> , <i>F.sporotrichioides</i> , <i>F.poeae</i> , <i>F.tricinatum</i> , <i>F.Acuminatum</i>
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F.culmorum</i> , <i>F.crookwellense</i> .
Alcaloides d'ergot (del sègol banyut)	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C.paspali</i> , <i>C.africana</i>
Altres micotoxines	
Citrinina	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A.carneus</i> , <i>A.Niveus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P.citrinum</i> , <i>P.Expansum</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol mètil èter...) Àcid ciclopiazònic	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i>
Esterigmatocistina	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A.versicolor</i> , <i>A.Flavus</i>
Sporidesmines	<i>Pithomyces chartarum</i>
Stachybotryotoxines	<i>Strachybotrys chartarum</i>
Toxines d'endòfit	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N.Lolii</i>

TAULA 4: Continuació

Phomopsins	<i>Phomopsis leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. Puberrelum</i> <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. Fumigatus</i>

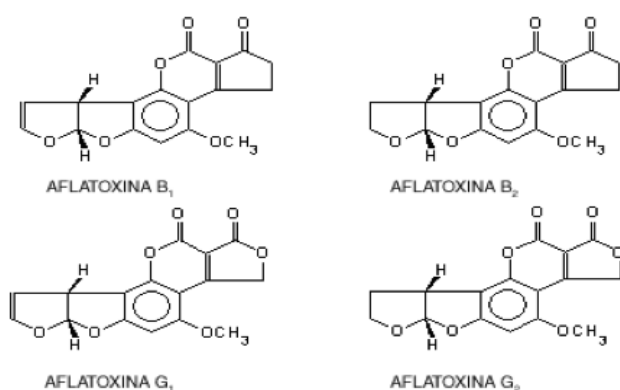
LAHOUAR, Amani. Comunicació personal.

2.3.2.1. AFLATOXINES

Es denominen amb el nom d'Aflatoxines un seguit de compostos químics que presenten estructura anàloga i que són produïts per soques del grup *Aspergillus flavus*. Pertanyen al grup de metabòlits secundaris furanocumàrics tòxics cristal·lins molt fluorescents.

Els quatre metabòlits principals que pertanyen a aquesta categoria es designen amb una lletra B₁, B₂, G₁, G₂ que es refereixen a alguna característica física o d'algun altre tipus. Així les aflatoxines B presenten fluorescència blava (blue) i les G fluorescència verda (green) al ser il·luminades sota llum UV.

L'aflatoxina M₁ és menys important i es troba en la llet dels animals lactants que han ingerit la B₁.



TOXICOLOGIA Y QUÍMICA LEGAL, Guía de Seminarios, Contenido Segunda Parte, Intoxicaciones alimentarias: micotoxinas

IMATGE 1: Estructura de les Aflatoxines principals

En general l'aflatoxina B₁ és la que apareix en major nombre de casos i concentració, seguida per la G₁, B₂ i G₂. En algunes mostres la concentració d'aflatoxina B₁ ha arribat a ser de varis mg/kg.

Les concentracions d'aquestes toxines varien molt depenent d'una sèrie de factors tals com: capacitat productora de la soca, substrat i condicions de desenvolupament.

De les plantes cultivades amb destí alimentari, el cacauet i el blat de moro són les que tenen més alt risc potencial de contaminació per aflatoxines. També poden trobar-se en fruits secs i algunes fruites com les figues. Els pinsos contaminats amb aflatoxines també són un problema de seguretat alimentària ja que poden acumular-se als animals destinats a produir aliments. Això té una importància particular en les vaques lleteres, que poden excretar aflatoxines per la llet.

Altres estudis realitzats mostren que el límit inferior per al desenvolupament d'*Aspergillus flavus* i producció de toxina és una humitat que correspon entre el 18 i 18,5% d'humitat al blat de moro i al sorgo. Aquest desenvolupament es produeix en un interval de temperatures entre 12-42°C amb el màxim d'acumulació d'aflatoxina a 25-32°C.

Per contra, els límits d'humitat que ofereixen riscos varien amb la temperatura en que s'emmagatzema el producte i la duració del període d'emmagatzemament. La humitat en cereals que han de quedar emmagatzemats en climes càlids durant llargs períodes no ha de superar el 11 o 12% per a evitar la contaminació fúngica.

La presència d'*Aspergillus flavus* en un aliment no es indicadora de contaminació per aflatoxina donat que no totes les seves soques són aflatoxigèniques. Per les mateixes raons tampoc es cert que l'absència de floridures vives garanteixi que no existeixi contaminació.

Introducció

D'altra banda en la producció de toxina per *Aspergillus flavus* pot influir la presència d'altres fongs que afavoreixen o dificulten la seva producció.

Les aflatoxines poden contaminar els productes al propi camp, durant el cultiu, la collita, l'emmagatzematge, el transport o l'elaboració, fins i tot en un moment posterior previ al consum.

Les condicions ambientals que porten a la infecció són una atmosfera humida i càlida. Un factor important són els danys ocasionats per insectes que creen obertures a les llavors per on pot penetrar el fong. Les condicions desfavorables faciliten l'atac d'aquests insectes i redueixen la capacitat de la planta per resistir la invasió per floridures i, per tant, la formació d'aflatoxines.

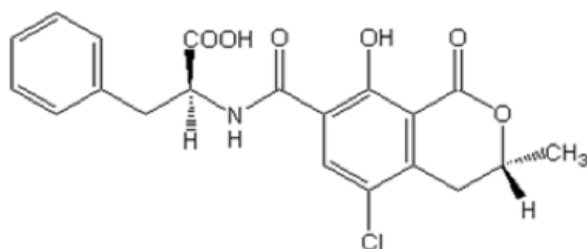
L'Aflatoxina B₁ provoca aberracions cromosòmiques, trencament d'ADN i s'ha demostrat també que provoca mutacions genètiques en sistemes d'assaig bacterià.

Dades epistemològiques obtingudes d'Àfrica i Àsia sud-oriental confirmen la relació existent entre la ingestió d'aflatoxines i el càncer de fetge. La ingestió crònica guarda més relació amb aquesta malaltia que la ingestió esporàdica a altes concentracions. A més la toxicitat aguda, subaguda i crònica varien amb l'espècie, l'edat, el sexe, l'estat nutricional, la dosis d'aflatoxines i la duració i el temps d'exposició.

Encara que el fetge sigui l'origen principal on es localitza l'aflatoxina també s'ha trobat al cor, al ronyó, als teixits cerebrals, a l'orina i als excrements. Sembla ser que aquesta toxina també posseeix efectes immunosupressors, teratogènics, provoquen síndromes idiopàtics (síndrome de Reyes) i cirrosis infantils.

2.3.2.2. OCRATOXINA A

L'Ocratoxina A (OTA) és una micotoxina produïda de manera natural per algunes espècies de fongs com *Penicillium verrucosum* i *Aspergillus ochraceus* durant la fase de cultiu i, amb més freqüència, durant la fase d'emmagatzemament.



TOXICOLOGIA Y QUÍMICA LEGAL, Guia de Seminarios, Contenido Segunda Parte, Intoxicaciones alimentarias: micotoxinas

IMATGE 2: Estructura Ocratoxina A

Estructuralment, té la particularitat de contenir un àtom de clor.

La toxina és estable a la calor i no es destrueix per operacions de cocció i d'elaboració.

Té propietats carcinogèniques, nefrotòxiques, teratògenes, immunotòxiques i possiblement neurotòxiques. El principal òrgan afectat per Ocratoxina A és el ronyó, però també el fetge pot veure's afectat. L'Ocratoxina A pot tenir una llarga semivida en els éssers humans.

Es troba en tota una sèrie de productes vegetals com els cereals, els grans de cafè, el cacau i els fruits secs. S'ha detectat la seva presència en aliments a base de cereals, cafè, vi, cervesa i al suc de raïm. També en productes d'origen animal com els ronyons de porc.

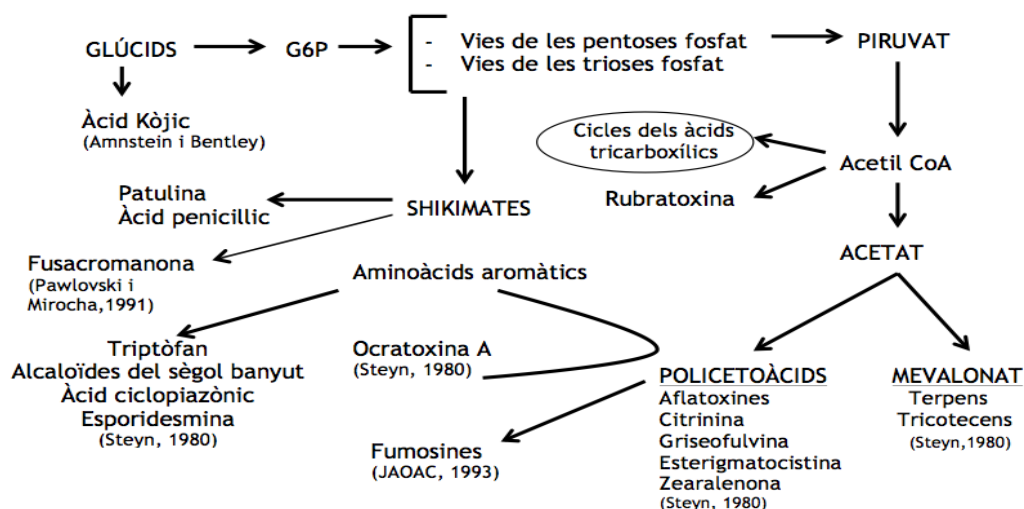
2.3.3. VIES DE BIOSÍNTESI DE MICOTOXINES

Aquestes substàncies altament tòxiques són considerades els contaminants naturals més perillosos pel seu impacte en la salut humana i animal, la seguretat alimentària i les economies de molts països (Steyn, 1995;. Pitt, 2000).

La floridura, per la seva notable adaptabilitat, contamina els aliments crus (cereals, fruites, nous, fesols, raïm i llavors oleaginoses) o processats, en la qual es produeixen micotoxines que persisteixen al llarg de la cadena alimentària a causa de la seva resistència als tractaments químics i físics.

A diferència del metabolisme primari, que és bàsicament el mateix per a tots els éssers vius, el metabolisme secundari depèn de l'espècie, i sovint de la soca. La naturalesa dels metabòlits secundaris, molt heterogenis, depèn dels caràcters individuals de la soca i les condicions ambientals.

Els metabòlits secundaris més importants en els fongs, els quals es troben entre una àmplia varietat de molècules, són les micotoxines. Aquests productes es classifiquen sovint per la família de productes químicament relacionats (aflatoxines, tricotecens, etc.). Aquests tenen tres orígens biosintètics principals: la via dels poliactats, els terpens i la d'aminoàcids (**ESQUEMA 1**)



LAHOUAR, Amani (Comunicació personal)

ESQUEMA 1: Vies de la biosíntesi de les micotoxines

2.3.4. ASPECTES I FACTORS QUE INFLUEIXEN EN LA PRODUCCIÓ DE MICOTOXINES

La contaminació final per part de micotoxines és el resultat d'una complexa interacció entre espècies productores, els seus competidors, el substrat, les condicions ambientals i el període d'emmagatzematge i transport, el de collita, el d'assecat i el de processar les llavors (en els grans) o durant la transformació de primeres matèries i aliments (SCOTT, 1990; Lacey i Cols, 1993) (ESQUEMA 2).

De fet, es pot dir que la formació de metabòlits tòxics en un substrat com a conseqüència del seu atac per fongs pot ser el resultat de tres mecanismes diferents.

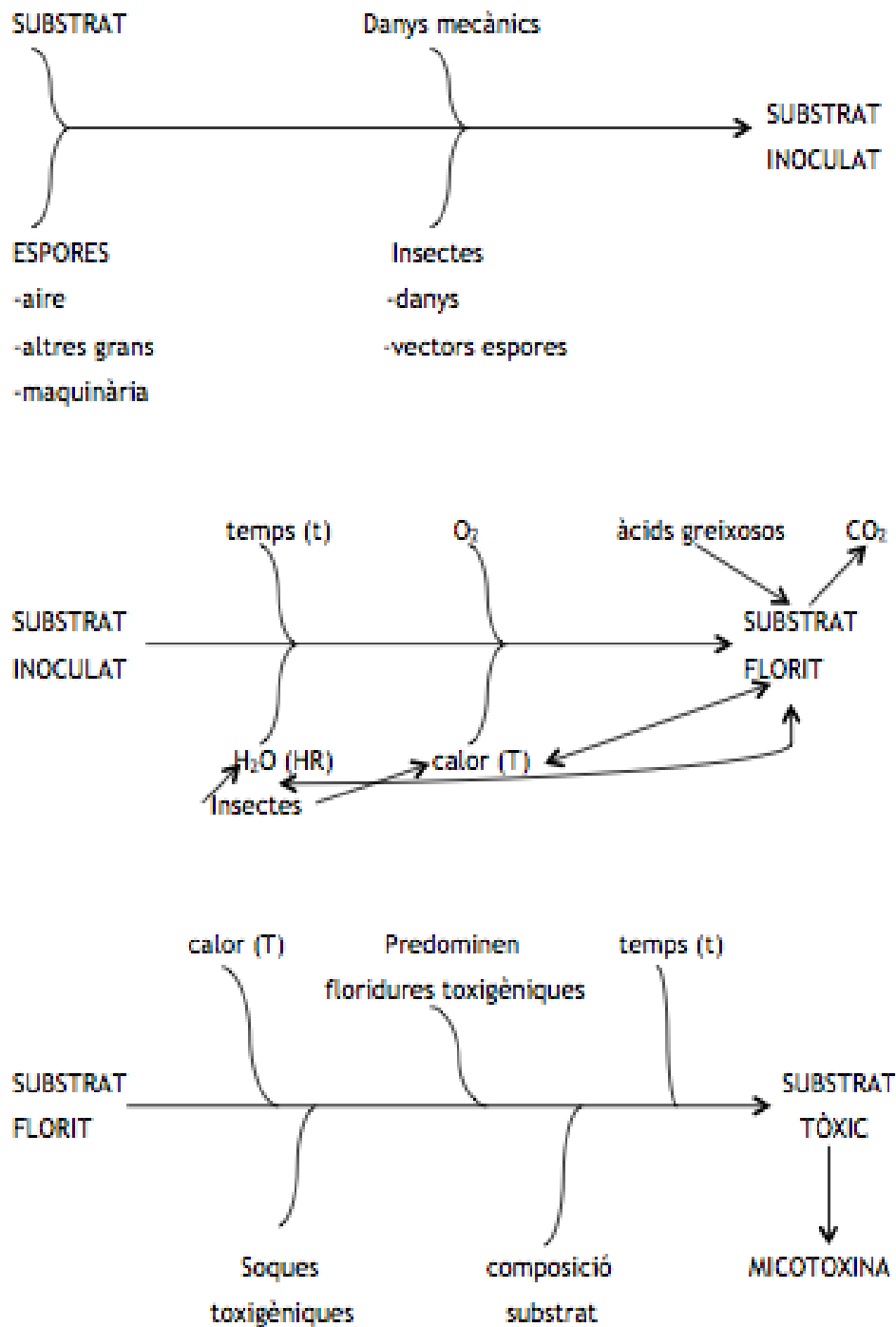
Dos d'ells podrien ser:

- El fong, paràsit d'una planta viva, també excreta enzims hidrolítics que degraden parcialment el substrat, o pot causar exacerbació de certes reaccions metabòliques de la planta, donant lloc a concentracions anormalment altes d'un constituent habitual
- La toxina, directament, pot ser un metabòlit propi del fong, Ex: aflatoxina, zearalenona (Le Bars, 1988)

S'estima que són més de 100.000 el nombre d'espècies de fongs, amb més de 1000 d'ells que poden contaminar els aliments (Castegnaro i Pfohl Leszkowicz, 2002). Se sap que diversos fongs (incloent la *Acremonium*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys* i *Trichoderma*) són contaminants dels productes agrícoles per la seva gran capacitat de produir metabòlits tòxics (Cahagnier, 1998).

Introducció

ESQUEMA 2: Aspectes de la producció de micotoxines durant l'emmagatzematge



(ABRAMSON I HILLS, 1985)

SALA, Núria.1993. Contaminació fúngica i de micotoxines de grans destinats a l'alimentació animal a Catalunya. Capacitat toxigènica de les soques. Universitat de Lleida. E.T.S. d'Enginyeria Agrària.

El sorgo és un substrat ideal per al desenvolupament dels *Aspergillus* i la secreció de les aflatoxines. Winn i Lane (1978) van demostrar experimentalment que la AFB1 i AFB2 poden ser produïdes per *A. flavus* en sorgo a diferents nivells (de 1-65 ng / g) en menys de 48 hores a 25 °C i 90% humitat relativa d'equilibri (HRE). La presència natural d'aflatoxines en sorgo difereix d'un país a un altre en funció de les condicions meteorològiques.

A Tunísia, els cereals són juntament amb els fruits secs una font important de micotoxines. La melca comercialitzada a Tunísia com a forma granular o en pols sovint està contaminada amb AFB1 (Said, 1998). El contingut d'AFB1 en la melca és sovint alt (Said i Feki, 1999).

Altres estudis sobre el mateix tema van demostrar que la melca contenia sovint grans quantitats d'aflatoxines molt per sobre del límit establert per la Comissió Europea o pels estàndards tunisians (> 4 ng / g) (Ghali, 2009). L'AFB1 és la més detectada, seguida de l'AFB2. Això pot ser degut al fet que *A. flavus* és més dominant que *A. parasiticus* (Ghali, 2009).

La micotoxigenèsi es defineix com el conjunt de factors de síntesi i d'excreció de micotoxines.

La producció de micotoxines està directament relacionada amb el creixement de fongs. Per tant, els factors que poden influir en el creixement de fongs també són importants en la producció de toxina. En general, les condicions ambientals necessàries per a la producció de micotoxines són més estrictes que les de creixement fúngic i es troben més sovint prop d'un desenvolupament òptim de l'espècie. Per tant, els aliments amb floridura no necessàriament estan contaminats per micotoxines.

El tipus de micotoxines que contaminen els aliments i la quantitat produïda no només depèn de tots aquests factors, sinó també de l'estabilitat d'aquestes toxines en l'entorn alimentari. La producció de micotoxines pot ser transportada des del camp a la placa.

A més dels factors ambientals o extrínsecs, la secreció de metabòlits secundaris per fongs toxigènics en els aliments també depèn d'altres factors relacionats amb la naturalesa de la soca, factors intrínsecs. Per tant, la producció de micotoxines és una conseqüència de la propietat combinada de línia genètica i els factors ambientals (Olsen, 2003).

2.3.4.1. FACTORS INTRÍNSECS

Les micotoxines són produïdes principalment per espècies dels gèneres *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*.

La difusió de les micotoxines depèn del potencial infecció de les floridures (intensitat esporulació, la longevitat de les espores).

Un aliment florit no és necessàriament contaminat per micotoxines perquè les floridures no són totes toxigèniques. No obstant això, no hi ha una relació directa entre espècies de fongs i micotoxines. De fet, una sola molècula pot ser produïda per diverses espècies de fongs pertanyents a diferents gèneres. Per exemple, l'Ocratoxina A (OTA) és produïda per *Penicillium verrucosum* (Olsen, 2003) i *Aspergillus ochraceus* (Van der Merwe, 1965).

Entre les espècies toxigèniques conegudes, totes les soques no tenen necessàriament la capacitat de produir micotoxines, és a dir, que algunes soques són fortament productores de toxines, mentre que d'altres tenen menys grau de producció o simplement d'altres no són toxigèniques (Castegnaro i Pfohl-Leszkowicz, 2002). De la mateixa manera, una espècie pot desenvolupar diverses micotoxines com ara l'*Aspergillus flavus* que pot elaborar les diferents aflatoxines, l'àcid ciclopiazònic, i l'aspertoxina. No obstant això, algunes micotoxines estan estretament relacionades amb certs fongs: aflatoxines (*A. flavus* i *A. parasiticus*), esporidesmines (*Pithomyces chartarum*) (Fitzgerald, 1998).

Per a cada soca, hi ha la determinació d'un potencial que s'expressa com el logaritme de la concentració màxima de toxina. La toxinogènesis d'una floridura i la quantitat produïda depèn de la soca (polimorfisme genètic) i de l'etapa de desenvolupament de la floridura.

2.3.4.2. FACTORS EXTRÍNSECS

Els factors extrínsecs o ambientals que afecten a la producció de micotoxines són químics, físics, fisicoquímics (activitat de l'aigua, pH, presència d'oxigen, temperatura i composició del substrat) o biològics (Interaccions microbianes) (Mitchell, 2004). No obstant això, aquests factors rarament actuen de manera independent (Lacey, 1986), de fet les seves interaccions són en general més importants que l'efecte d'un sol factor. A la Taula 5 es presenten alguns dels factors ambientals que poden influir en la producció de micotoxines en diverses etapes de producció (Hesseltine, 1976).

TAULA 5: Principals factors que poden influir en la producció de micotoxines en les diferents etapes de la cadena alimentària

Factor	Al camp	A la collita	Durant l'emmagatzematge
Físics			
- Humitat	+	+	+
- Rapidesa d'assecat	-	+	+
- Rehumidificació	-	+	+
- Humitat relativa	+	+	+
- Temperatura	+	+	+
- Dany mecànic	+	+	+
- Barreja de grans	-	+	+
- Temps	+	+	+
Químics			
- CO ₂	-	-	+
- O ₂	-	-	+

TAULA 5: Continuació

Factor	Al camp	A la collita	Durant l'emmagatzematge
- Naturalesa del substrat	+	-	+
- Nutrició mineral	+	-	+
- Tractament químic	-	-	+
Biològics			
- Estrès de la planta	+	-	+
- Vectors invertebrats	+	-	+
- Infecció per fongs	+	-	+
- Diferències entre les varietats de plantes	+	-	+
- Diferències entre les soques fúngiques	+	-	+
- Espores de càrrega	+	+	+
- Sistema -microbiològic	+	-	+

+: Efecte en producció de micotoxina
 -: Sense efecte en producció de micotoxina

LAHOUAR, Amani (Comunicació Personal)

Activitat d'aigua (aw)

L'activitat d'aigua necessària per a la producció de toxina és major que per al creixement fúngic (Pfohl Leszkowicz-2001). Per exemple, *Penicillium verrucosum* pot desenvolupar-se a partir d'una aw de 0,80, per contra, la producció d'OTA només és possible quan l'aw és més gran que o igual a 0,85 (Cairns-Fuller, 2005). La formació d'aflatoxina per *Aspergillus flavus* requereix un valor d'aw entre 0,83 i 0,87, però el creixement del microorganisme pot passar a valors inferiors d'aw (Troller, 1980).

El pH

El rang de pH per toxinogènesis és més estret que per al creixement de fongs. Keller (1997) va demostrar que la producció de fumonisina B₁ és màxima a un pH entre 3,7 i 4,2.

Presència d'oxigen

En general, la producció de micotoxines és més sensible a canvis en la composició de l'aire que en el creixement fúngic.

La reducció de la pressió parcial d'oxigen a menys de l'1%, i l'augment de les concentracions de CO₂ impedeix el desenvolupament de micotoxines (Cairns-Fuller, 2005, Keller, 1997). Per contra, *Fusarium roseum* en una àrea confinada, encara pot desenvolupar zearalenona.

Després de l'emmagatzematge en un ambient tancat, en el qual la floridura pot créixer més o menys, sotmetre aquesta posteriorment a l'aire lliure o ventilació provoca ràpidament la producció de toxines.

Temperatura

La temperatura òptima per al desenvolupament de micotoxines és generalment prop de la temperatura òptima de creixement del fong, però més sovint lleugerament inferior. Aquest és particularment el cas per al desenvolupament de les aflatoxines per *Aspergillus flavus* (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Algunes vegades l'aparició de les micotoxines en condicions naturals es veu afavorida per temperatures relativament baixes en comparació amb la promoció d'un creixement òptim de floridura.

La temperatura òptima per al creixement de *Fusarium graminearum* és 25°C, però la síntesi de la zearalenona pot tenir lloc a 15°C.

Introducció

La temperatura també pot influir en la proporció de les toxines produïdes per una soca capaç de sintetitzar diverses molècules. Per exemple, *Fusarium graminearum* pot produir zearalenona preferiblement a 25°C, mentre que el deoxinivalenol es produeix principalment a 28°C (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Composició del substrat

La composició qualitativa i quantitativa dels nutrients (especialment els hidrats de carboni, la principal font de carboni en la floridura) pot influir en la producció de micotoxines. La presència d'algunes substàncies en els aliments, com ara sacarosa i aminoàcids estimulen el creixement de fongs i el desenvolupament de micotoxines.

La contaminació dels aliments per una floridura depèn de la naturalesa del substrat, en particular, la naturalesa dels hidrats de carboni disponibles.

La presència de certes molècules en el substrat també poden influir en la producció de micotoxines. Així, l'àcid fític disminueix la síntesi d'aflatoxina per *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* mentre que estimula la producció de prolina (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

En un aliment, sovint hi ha una espècie dominant, per cada toxina. Per exemple, *P. verrucosum* és el principal productor d'OTA en cereals, mentre que *P. nordicum* sovint contamina els productes de proteïna, productes fermentats de carn o formatge (Lund i Frisvard, 2003).

Interaccions microbianes

La presència simultània de diverses espècies de microorganismes en el mateix mitjà condueix a una disminució de la producció de micotoxines per cada un dels microorganismes productors.

Així, la quantitat d'aflatoxina B₁ produïda es redueix quan una soca d'*Aspergillus flavus* s'introdueix en un cultiu, junt amb una soca d'*Aspergillus parasiticus*, encara que la soca sigui un cep d'*Aspergillus parasiticus* no toxigènic (Pfohl-Leszkwicz, 2001). De la mateixa manera, la producció d'aflatoxina per *Aspergillus flavus* és inhibida per la presència d'*Aspergillus Níger* (Horn i Wicklow, 1983).

El 1988, Mislivec va demostrar experimentalment que el cultiu simultani d'*Aspergillus parasiticus* i *Aspergillus flavus* no afecta la producció d'aflatoxina per aquesta última, mentre que la presència d'espècies de *Penicillium* disminueix la producció d'aquesta micotoxina (Mislivec, 1988). La presència de *Fusarium verticillioides* en les panotxes de blat de moro protegeix de la contaminació posterior amb *Aspergillus flavus* i redueix la quantitat d'aflatoxina produïda (Zummo i Scott, 1992).

La millor manera d'evitar la contaminació de floridures i la consegüent formació de toxines es controlar el grau d'humitat de la llavor emmagatzemada seca i protegir-la contra la pluja, aigua del terra i contaminació ambiental.

2.3.5. EFECTES TÒXICS DE LES MICOTOXINES EN ELS ÉSSERS VIUS

L'exposició a micotoxines pot ser pel consum directe d'aliments d'origen vegetal contaminats, sobretot aliments bàsics: cereals, fruits secs i les llavors oleaginoses, o indirectament a través d'aliments d'origen animal a partir d'animals exposats, anomenada ruta secundària o toxicitat relé. És el resultat de les malalties i trastorns metabòlics anomenats micotoxicosis (**TAULA 6**)

Aquestes malalties no són ni infeccioses ni contagioses, el seu ritme és pseudo-epidèmia causada per la ingestió d'aquestes toxines a través d'un aliment comú.

La ingestió d'aliments contaminats amb micotoxines causa la intoxicació sempre que la seva concentració sigui prou alta com per produir un efecte biològic.

Introducció

Hi ha micotoxines amb activitat mutagènica, carcinogènica, teratogènica, immunosupressora, nefrotòxica, hepatotòxica i en els estrògens (Miller, 2001 ; Johanning, 2002).

Les manifestacions clíniques poden ser d'hemorràgia aguda, diarrea, convulsions, tremolors, vòmits, letargia, edema, o la mort, o després de la ingestió crònica de dosis moderades de la toxina a més d'un llarg període en els resultats d'una disminució del rendiment de l'animal o de la vitalitat de l'ésser humà i en paral·lel a una alteració de molts òrgans vitals, incloent l'aparició de cirrosi o hepatitis atròfica, la infiltració grassa del fetge, hiperplàsia nodular, càncer, etc...

Els canvis histopatològics no són específics d'una micotoxina determinada. Els símptomes de la intoxicació aguda o crònica varien amb l'espècie, l'edat, el sexe. Per exemple, algunes micotoxines, com ara aflatoxines són anàlegs estructurals d'hormones femenines, la resposta dels animals a aquestes micotoxines és modificada per la naturalesa de la cèl·lula diana en si. L'evolució de la intoxicació depèn de la durada de la ingestió dels factors de la toxina, de freqüència i altres.

TAULA 6: Efectes tòxics en éssers vius (tant en animals com en persones)

MICOTOXINA	EFFECTES
Ocratoxina A	Nefratòxiques Nefrocancerígenes
Zearalenona (F-2 o ZEN)	Estrògenes Genotòxiques
Patulina	Poca evidència experimental o clínica dels seus efectes en humans
Tricotecens Deoxinivalenol (DON)	Citotòxiques Immunosupressores
Fumonisines: FB1, FB2 i FB3	Leucoencefalomalàcia en equins Edema pulmonar en porcíns Càncer en humans
Aflatoxines: AFB1, AFB2, AFG1 i AFG2	Cancerígenes Mutàgenes Teratògenes

MÉNDEZ-ALBORES, Abraham i MORENO-MARTÍNEZ, Ernesto. Las micotoxinas: Contaminantes naturales de los alimentos (2009).

3. OBJECTIUS

Els objectius principals del treball són:

- Estudiar la microbiota de 47 mostres de sorgo Tunisenc i Egipci:
 - Identificació de floridures a ull nu i amb microscopi
 - Comparació de la microbiota segons la procedència del sorgo
- Conèixer la capacitat potencial de les floridures aïllades per a produir micotoxines:
 - Identificació de tres tipus de micotoxines (Ocratoxina A, Aflatoxines B₁ i B₂) mitjançant tècniques d'HPLC (cromatografia líquida d'alta pressió)
 - Comparació de la capacitat potencial micotoxigènica dels aïllats d'*Aspergillus* segons la procedència del sorgo
 - Diferenciació de les mostres amb més capacitat toxigènica si es donessin les condicions adequades per al seu creixement
- Valoració de les condicions òptimes pel creixement de floridures i micotoxines
- Vinculació dels resultats obtinguts amb dades de la legislació europea pel que fa al límit permès en aliments dirigits al consum humà
- Conèixer les conseqüències provocades per la presència de les micotoxines (malalties, valor econòmic)
- Aprendre tècniques d'un laboratori de recerca i el funcionament d'aquest

4. MATERIALS I MÈTODES

4.1. MATERIALS

4.1.1. MOSTRES DE SORGO

En la investigació s'han utilitzat 47 mostres de Sorgo procedent de diverses localitats de Tunísia obtingudes en diferents mesos de l'any 2012. Tot i això les mostres tenen dos orígens diferents. Les mostres compreses entre S21 i S47 són d'origen Tunisenc (TAULA 7) i la resta, per tant, prové d'Egipte (TAULA 8).

Es disposa de 200 g de cereal per mostra. Abans de ser utilitzades les mostres es troben emmagatzemades en bosses de plàstic, numerades amb el codi S(núm. mostra),(ex., S62) i conservades en la nevera a 5 °C per no perdre les seves propietats i fer possible dur a terme la investigació.

TAULA 7: Mostres de sorgo tunisenc (2012) (200 g/ mostra)

Número	Poble de compra	Data de compra	Codi
1	Monastir	Mes de febrer	S21
2	Sousse	Mes de febrer	S22
3	Sousse	Mes de febrer	S23
4	Sousse	Mes de febrer	S24
5	Sousse	Mes de febrer	S25
6	Sousse	Mes de febrer	S26
7	Sousse	Mes de febrer	S27
8	Sousse	Mes de febrer	S28
9	Sousse	Mes de febrer	S29
10	Sousse	Mes de febrer	S30
11	Sousse	Mes de febrer	S31
12	Sousse	Mes de febrer	S32

TAULA 7: Continuació

Número	Poble de compra	Data de Compra	Codi
13	Hammam Sousse	Mes de febrer	S33
14	Sidi Bouali	3 de març	S34
15	Sidi Bouali	3 de març	S35
16	Sidi Bouali	3 de març	S36
17	Nefidha	4 de març	S37
18	Nefidha	4 de març	S38
19	Sousse Souk Ahad	18 de març	S39
20	Sousse Souk Ahad	18 de març	S40
21	Sousse Souk Ahad	18 de març	S41
22	Sousse Souk Ahad	18 de març	S42
23	Sousse Souk Ahad	18 de març	S43
24	Sousse Souk Ahad	18 de març	S44
25	Sousse Souk Sebt	17 de març	S45
26	Sousse Souk Sebt	17 de març	S46
27	Sousse Akouda	23 de març	S47

TAULA 8: Mostres de sorgo egipci (2012) (200 g/ mostra)

Número	Poble de compra	Data de compra	Codi
1	Monastir	Mes de febrer	S51
2	Monastir	Mes de febrer	S52
3	Monastir	Mes de febrer	S53
4	Monastir	Mes de febrer	S54
5	Monastir	Mes de febrer	S55
6	Monastir	Mes de febrer	S56
7	Monastir	Mes de febrer	S57
8	Monastir	Mes de febrer	S58
9	Monastir	Mes de febrer	S59
10	Sidi bouali	3 de març	S60

TAULA 8: Continuació

Número	Poble de compra	Data de compra	Codi
11	Kalaa kebira	9 de març	S61
12	Kalaa kebira	9 de març	S62
13	Sousse Souk Ahad	18 de març	S63
14	Sousse Souk Ahad	18 de març	S64
15	Sousse Souk Ahad	18 de març	S65
16	Sousse Souk Sebt	17 de març	S66
17	Sousse Souk Sebt	17 de març	S67
18	Sousse Souk Sebt	17 de març	S68
19	Sousse Souk Sebt	17 de març	S69
20	Sousse Akouda	23 de març	S70

Són mostres del mercat (emmagatzematge) de pobles del centre de Tunísia, propers a la costa, on hi ha molta humitat. Totes les mostres tenen un emmagatzematge idèntic.

4.1.2. RECOMPTE I IDENTIFICACIÓ DE FLORIDURES A LES MOSTRES DE SORGO

Per a realitzar tot aquest procés s'utilitzen un seguit d'estrís de laboratori:

4.1.2.1. Per a formar les dilucions, és a dir, en el 1r pas del procediment:

- Grans de sorgo de les diferents mostres
- Nevera
- Envasos de 250 ml de volum
- Tubs d'assaig
- Dissolvent: Peptona Salina
- Pipetes de 1000 µl ___ 1 ml (segona dilució)

Materials i mètodes

- Cullera
- Balança
- Fogonet bunsen
- Cabina de flux laminar

4.1.2.2. Per a sembrar les dilucions de cada mostra en el 2n pas:

- Pipetes de 100 µl___0,1 ml (dilució mare i segona dilució)
- Agitador de mostres
- Vòrtex (agitador tubs d'assaig)
- Plaques de petri amb medi de cultiu DRBC
- Plaques de petri amb medi de cultiu PDA
- Imants
- Nansa de Drigalsky
- Cabina de flux laminar

4.1.2.3. Per a la incubació, 3r pas:

- Cambra d'incubació
- Nevera (guardar les mostres ja utilitzades, per a conservar-les i poder ser utilitzades en cas d'error)

4.1.2.4. En la lectura, 4t pas:

- Diferents plaques de petri ja incubades
- Codi d'identificació de les floridures a ull nu (forma, mida, color)
- Bolígraf i llibreta per apuntar el nombre de colònies de cada placa i anotar els tipus de floridures que s'hi distingeixen
- En alguns casos el microscopi (identificació floridura)

4.1.3. AÏLLAMENT DE LES FLORIDURES ESCOLLIDES

S'empren diversos materials per dur a terme aquest procediment:

4.1.3.1. En el 1r pas, per a l'aïllament i inoculació dels tres tipus de floridures en els dos tipus diferents de medis:

- Plaques de petri amb medi de cultiu CAM
- Plaques de petri amb medi de cultiu CYA
- Plaques de petri amb les floridures a aïllar (*Aspergillus flavi*, *Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati*) tant procedents de medi DRBC com de medi PDA
- Ansa
- Fogonet bunsen
- Cabina de flux laminar

4.1.3.2. En el 2n pas, per a la incubació de les plaques CYA i CAM:

- Bosses estèrils
- Cambra d'incubació

4.1.4. DETECCIÓ DE LA CAPACITAT MICOTOXIGÈNICA (PRODUCTORA DE MICOTOXINES) DELS AÏLLATS

Durant l'última setmana s'utilitzen gran diversitat de productes i estris específics per aquest procés:

4.1.4.1. En el 1r pas, per seleccionar les floridures desenvolupades correctament:

- Plaques de petri medi CYA (*A.nigri* i *A.circumdati*) i CAM (*A.flavi*)

4.1.4.2. En el **2n pas**, per a l'extracció dels aïllats d'*A.nigri* i *A.circumdati*:

- Plaques de petri medi CYA (*A.nigri* i *A.circumdati*)
- Ansa
- Fogonet bunsen
- Alcohol (desinfectant)
- Vials
- Metanol
- Vòrtex
- “Sacabocado”: estri per a fer cercles en la colònia de la floridura en el procés d'extracció
- Pipeta de 10 ml

4.1.4.3. En el **3r pas**, per a la filtració i evaporació dels aïllats d'*A.nigri* i *A.circumdati*:

- Plaques de petri amb medi CYA (*A.nigri* i *A.circumdati*)
- Agulles
- Xeringues
- Filtres
- Vials
- Concentrador de mostres (evaporació)
- Metanol/aigua 50:50 (resuspendre mostres)

4.1.4.4. En el **4rt pas**, per a la selecció d'*A.flavi* productors de micotoxina:

- Plaques de petri no contaminades dels *A.flavi*
- Cabina de fluorescència
- Nevera (emmagatzemar plaques productores de micotoxina *A.flavi*)

4.1.4.5. En el **5è pas**, per a la sembra i incubació dels *A.flavi* en medi CYA:

- Plaques de medi CAM amb *A.flavi* micotoxigènics
- Plaques de petri amb medi CYA
- Ansa
- Fogonet bunsen
- Nevera
- Tubs amb medi PDA (sembra de colònies dels tres tipus de toxines utilitzades posteriorment en HPLC)
- Cabina de flux laminar
- Cambra d'incubació

4.1.4.6. En el **6è pas**, per a l'extracció dels *A.flavi* micotoxigènics:

- Plaques de petri de medi CYA amb *A.flavi* micotoxigènics
- Bisturí
- Erlenmeyers
- Balança
- Metanol
- Parafilm
- Imants
- Agitador de mostres
- Pipeta de 10 ml

4.1.4.7. En el **7è pas**, per a la filtració i evaporació dels vials amb *A.flavi* micotoxigènics:

- Erlenmeyers agitats amb *A.flavi* micotoxigènics
- Tubs
- Embuts

Materials i mètodes

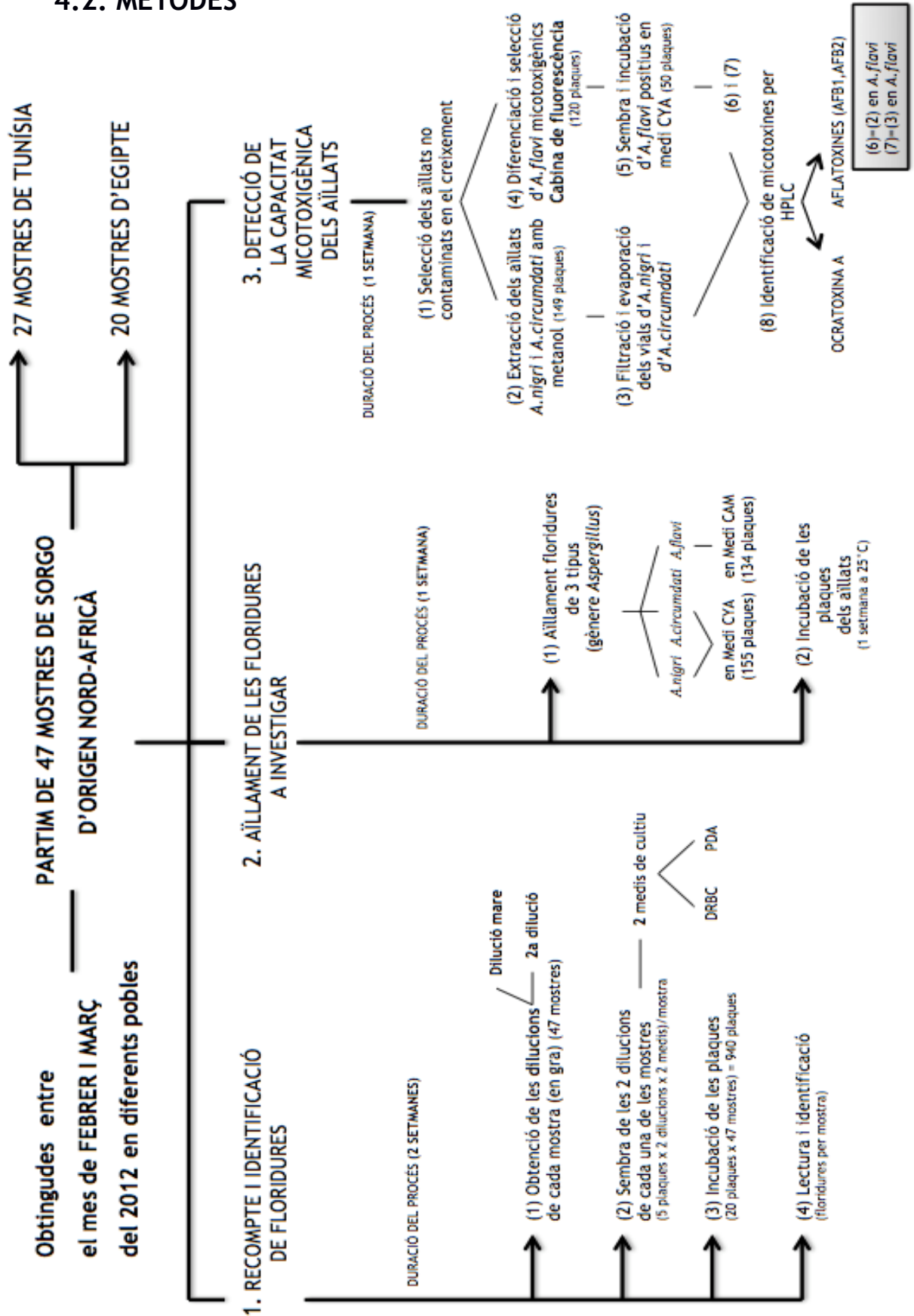
- Paper de filtre
- Concentrador de mostres
- Metanol/aigua 50:50
- Vials

4.1.4.8. En el **8è pas**, per a la detecció i identificació de micotoxines, en HPLC (high pressure liquid chromatography):

- Patrons mare (toxina liofilitzada)
- Metanol
- Espectrofotòmetre
- Bateria de patrons de les diferents micotoxines
- Cromatògraf
- Agitador magnètic
- Fase Mòbil
- Vials amb les mostres preparades per al cromatògraf (*A.flavi*, *A.nigri*, *A.circumdati*) possibles productores de micotoxines

4.2. MÈTODES

PROCEDIMENT PRÀCTIC SEGUIT EN LA INVESTIGACIÓ



4.2.1. RECOMPTE I IDENTIFICACIÓ DE FLORIDURES A LES MOSTRES DE SORGO

4.2.1.1. 1r pas: OBTENCIÓ DE LA DILUCIÓ MARE I DE LA SEGONA DILUCIÓ A PARTIR DELS GRANS DEL CEREAL (DIFERENTS MOSTRES)

Normalment a partir de cada mostra sòlida (els grans de cereal) es realitza un banc de dilucions en dissolvent (peptona salina). En aquest cas només es necessari realitzar una dilució mare i una segona dilució. El nombre de la dilució no és una dada rellevant per a l'obtenció de resultats sinó que es fan dues dilucions per a obtenir resultats més fiables, ja que aquestes van reduint la concentració de la mostra. D'aquesta manera, amb menys concentració, es permet que les floridures que es desenvolupen en les plaques quedin més separades i puguin aïllar-se sense perill de quedar contaminades per espores d'altres tipus de floridures.

Primerament, per a la formació de la dilució mare es pesen, en condicions de màxima asèpsia (cabina de flux laminar), 10 grams del gra i s'aboquen, seguidament, en un flascó de 250 ml de capacitat. En aquest recipient, anteriorment, s'hi introdueixen 90 ml del dissolvent (peptona salina).



Imatge 3: Mostres, dissolvent i plaques amb medis de cultiu (Cabina de flux laminar)



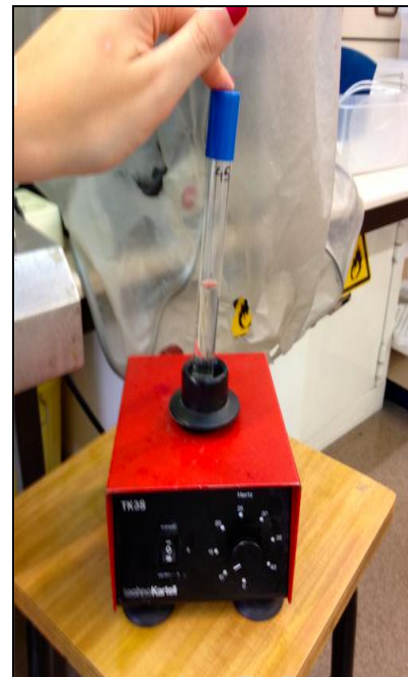
Imatge 4: Pesar 10 g del gra per preparar la dilució mare

Per a homogeneïtzar bé la mostra, es col·loca el flascó amb la dilució mare, que conté un imant (introduït inicialment al pot) en un agitador. Després d'haver-se mesclat entre 10-15 minuts es retira el flascó de l'agitador i s'extreu 1 ml de la mescla. Aquest es passa a un tub d'assaig amb 9 ml de peptona salina per a obtenir una dilució 10 vegades més petita que la inicial (segona dilució).

De la mateixa manera que agitem la dilució mare, també agitem els tubs de la segona dilució, encara que aquests no es col·loquen en l'agitador amb l'imant sinó al vòrtex.



Imatge 5: Agitador de la dilució mare



Imatge 6: Agitant tub al vòrtex

Aquest procés es realitza amb totes les mostres.

4.2.1.2. 2n pas: SEMBRA DE LES DOS DILUCIONS DE CADA MOSTRA

A partir de cada tub (2a dilució) i del flascó (dilució mare), un de cada per mostra, s'agafen 0,1 ml de cada dilució per separat (concentració diferent segons la dilució) i es pipetegen a la superfície d'una placa amb medi de cultiu estenent-la bé per aquesta amb una nansa de Drigalsky.

Els dos medis de cultiu que s'utilitzen per a cada mostra són DRBC (Dicloran Rosa de Bengala) i PDA (Agar Patata Glucosada) (**Annex 1**).

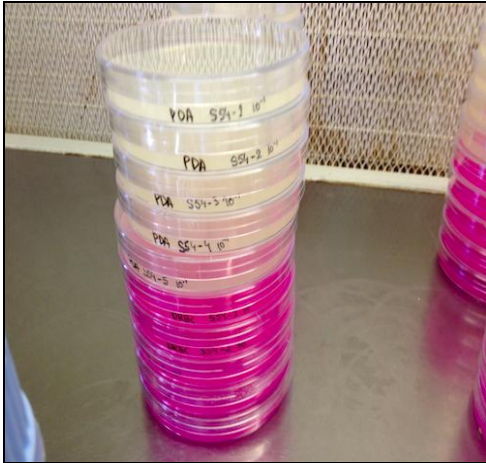
El medi DRBC s'utilitza per a conèixer la microflora d'un “aliment”. La característica que té és que en la seva composició conté cloranfenicol (que és un antibiòtic), dicloran (que inhibeix el creixement de llevats) i també conté rosa de bengala (el qual dóna color al medi, i s'utilitza per a evitar la formació de fongs de creixement ràpid).

El medi PDA és un medi format a base de patata que serveix per al creixement en general de fongs.

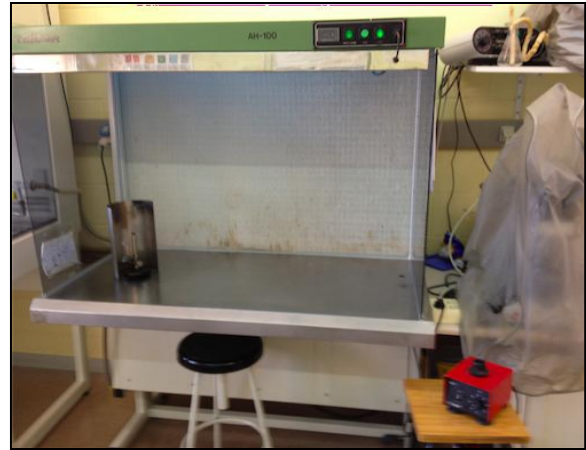
Per obtenir uns resultats més fiables, s'utilitzen 5 plaques de cada medi de cultiu anomenat anteriorment per a cada dilució; és a dir, com tenim dues dilucions i dos medis de cultiu utilitzaríem 20 plaques per a cada mostra de cereal.

La nomenclatura que s'utilitza per a nomenar les plaques, per tant, per a la distinció de cada soca en cada dilució i en la seva determinada placa és per exemple: PDA S54-1 10^{-1} .

S'anota el nom del medi, de la mostra, del nombre de placa i de la dilució a la qual pertany el contingut a cada placa de petri.



Imatge 7: Plaques sembrades (PDA i DRBC)



Imatge 8: Cabina de flux laminar on es treballa

4.2.1.3. 3r pas: INCUBACIÓ DE LES PLAQUES

Les plaques s'incuben en una cambra d'incubació a 25 °C durant una setmana.



Imatge 9: Plaques preparades per a la incubació en bossa estèril

4.2.1.4. 4t pas: LECTURA I IDENTIFICACIÓ

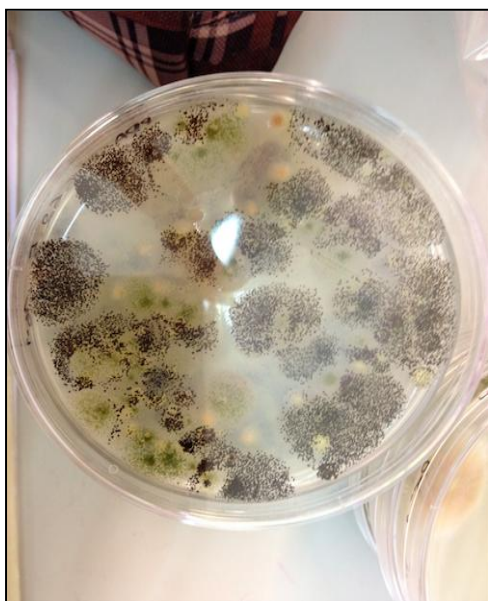
Un cop les mostres han estat incubades s'anoten el nombre de colònies fúngiques per placa obtenint així el nombre de colònies totals per mostra. (Ex, per cada mostra tantes colònies).

D'altra banda s'identifiquen i s'anoten els tipus de floridures que conté cada mostra i es seleccionen quins són els gèneres interessants per a realitzar-ne el seu aïllament i descobrir si són productors de micotoxines o no.

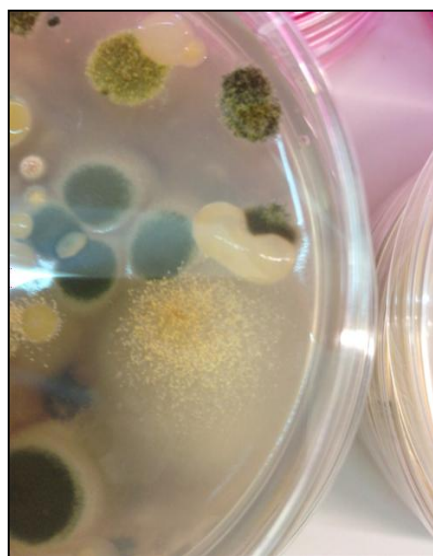
Per a la identificació a nivell de gènere i secció (subgènere) de les floridures als medis de cultiu únicament es distingeixen les característiques més rellevants a ull nu (color tant de la part superior com de la part inferior, forma, textura, mida, forma d'expansió) que diferencien el tipus del qual es tracta.

Tot i això, en algun cas concret, pot donar-se el cas de dubtar entre dos tipus de floridures diferents perquè poden ser molt semblants, llavors s'utilitza el microscopi per a observar bé la floridura i identificar-la.

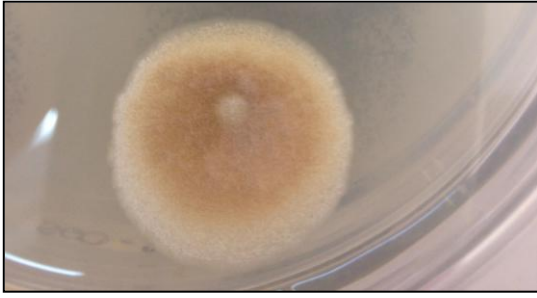
DIFERENTS TIPUS (GÈNERES) DE FLORIDURES TROBADES A LES MOSTRES:



Imatge 10: *A.nigri* (negre)/*A.flavi* (verd)



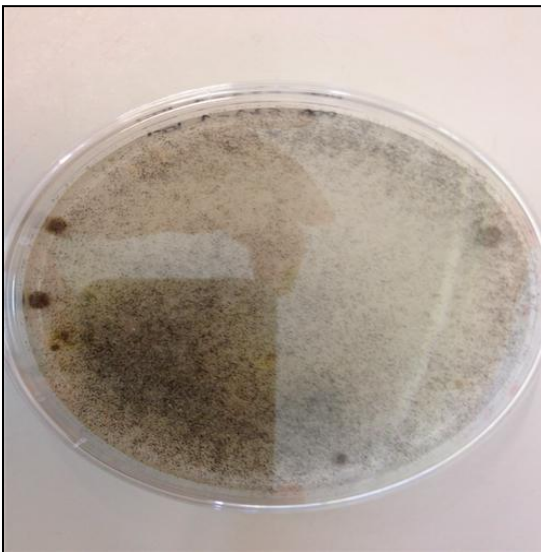
Imatge 11: *A.circumdati* (punts grocs)



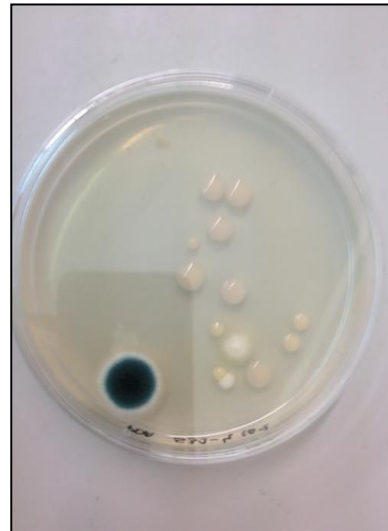
Imatge 12: *A.terreus*



Imatge 13: *Alternaria*



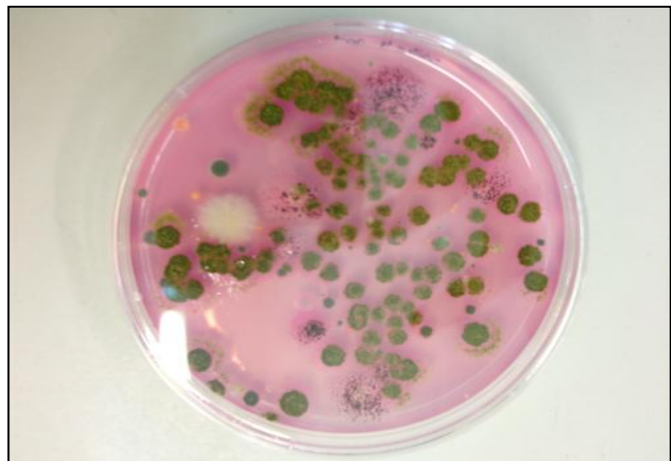
Imatge 14: *Rhizopus*



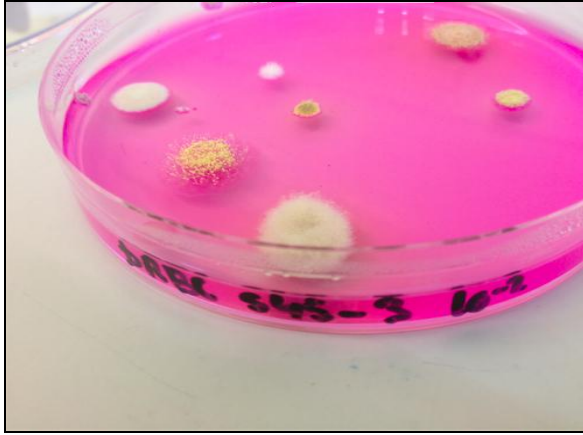
Imatge 15: *Penicillium*



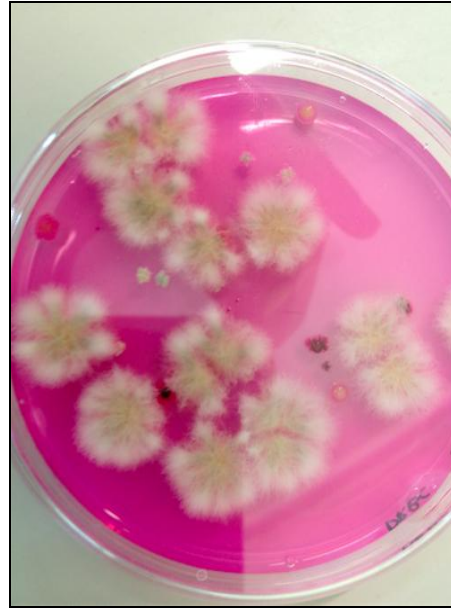
Imatge 16: *Eurotium* (grocs-verds)



Imatge 17: *Claudosporium*



Imatge 18: *Fusarium*



Imatge 19: *Mycelium Sterile*
(Micelis estèrils)

4.2.2. AÏLLAMENT DE LES FLORIDURES ESCOLLIDES

4.2.2.1. 1r pas: AÏLLAMENT EN DOS MEDIS DE CULTIU DIFERENTS DE LES FLORIDURES A INVESTIGAR

Un cop ja fet el recompte i identificació de les floridures de cada plaqueta i per tant calculat el nombre de colònies de cada mostra, es procedeix a realitzar l'aïllament de tres d'aquests tipus de floridures.

Els tres tipus de floridures escollides són del mateix gènere, encara que corresponents a diferents espècies de tres seccions determinades d'aquest gènere. Són floridures del gènere *Aspergillus* i s'aïllen espècies de les següents seccions:

- *Aspergillus nigri* (Imatge 10)
- *Aspergillus flavi* (Imatge 10)
- *Aspergillus circumdati* (Imatge 11)

Es trien aquestes floridures perquè són les que estan més associades a la producció de les micotoxines a investigar (Ocratoxina A i Aflatoxines). Tot i que en aquesta recerca també s'han trobat floridures del gènere *Penicillium*, aquestes no s'han diferenciat a nivell d'espècie perquè no formava part dels objectius plantejats inicialment. Per la qual cosa, no s'ha pogut saber si pertanyen a *Penicillium verrucosum*, productor d'Ocratoxina A.

L'organització de les floridures és complexa, perquè hi han gèneres, subgèneres (seccions) i espècies molt similars que no poden arribar a diferenciar-se si no es fa mitjançant tècniques de biologia molecular observant la seqüència d'ADN que determina cada floridura.

Dins del gènere *Aspergillus* es poden trobar les seccions anomenades anteriorment. L'*Aspergillus* secció *nigri* conté una espècie anomenada *Aspergillus niger* relacionada amb la producció d'Ocratoxina A. L'*Aspergillus* secció *circumdati* conté l'*Aspergillus ochraceus* també relacionat amb la producció d'aquesta micotoxina. En canvi l'*Aspergillus* secció *flavi* presenta una espècie anomenada *A.flavus* que es productora d'Aflatoxines.

A part d'aquestes espècies indicades aquestes seccions contenen més espècies no remarcades, perquè les que estan associades majoritàriament a les micotoxines a estudiar són les anomenades.

Per tant, l'estudi dels *A.nigri* i *A.circumdati* porta a investigar sobre la presència d'Ocratoxina A i els *A.flavi* seran possibles productors d'Aflatoxines.

La distinció d'aquestes diferents seccions (en les quals s'engloben diferents espècies) d'*Aspergillus* es duu a terme macroscòpicament. Per a la determinació del gènere es poden percebre com a característiques comunes la formació de colònies de creixement ràpid, de forma arrodonida i de textura variable segons l'espècie.

Materials i mètodes

En la distinció d'aquestes tres seccions a ull nu es té en compte el tret que més les caracteritza macroscòpicament, el color: Tot i que el gènere *Aspergillus* està molt desenvolupat i actualment se'n coneixen gairebé unes 900 espècies, les que s'investiguen en aquest cas (sense determinar), associades a les seccions anomenades, posseeixen diferents tonalitats de verds (*A.flavi*), groc (*A.circumdati*) i negre (*A.nigri*).

Hi ha dos medis òptims per als quals les colònies poden desenvolupar-se, encara que no s'utilitzen els dos per als tres tipus de floridura, perquè un és més adequat que l'altre per un determinat tipus de floridura.

El medi de cultiu CYA (zapeck extracte d'agar) és un medi que serveix per a investigar la producció d'Ocratoxina A. S'utilitza inicialment per a l'aïllament dels *Aspergillus nigri* i dels *Aspergillus circumdati*.

En aïllar aquests dos tipus de floridures no es fa una separació per seccions en la detecció de la capacitat productora en les plaques en les que es sembren, ja que les dues porten al descobriment de la mateixa micotoxina (Ocratoxina A) i al créixer tenen un aspecte molt similar.

El medi de cultiu CAM (Coconut Agar Medium) és un medi constituït a base de coco i gràcies a la seva composició es pot saber, quan es sembren els *Aspergillus flavi*, si són productors d'aflatoxines, per la seva fluorescència. S'utilitza únicament per al primer aïllament dels *Aspergillus flavi*, ja que aquests són inoculats posteriorment en CYA. Abans de ser inoculats en CYA, s'identifica en la cambra de fluorescència quins són productors de micotoxines.

L'aïllament d'aquests tres tipus de floridures es realitza a partir de les plaques de les diferents mostres que les contenen, tant procedents del medi DRBC com del medi PDA, tant de la dilució mare com de la segona dilució. De cada placa s'aïlla una colònia de cada tipus de floridura a investigar (segons les que estiguin presents).

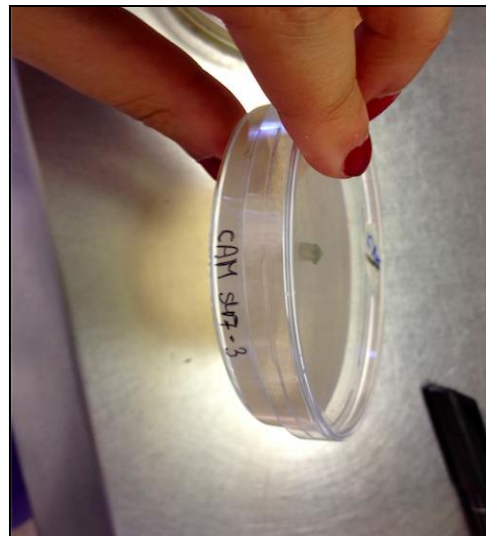
En el cas dels *A.nigri* i *A.circumdati* resulten ser 155 plaques (CYA) les que es sembren a partir de cada una de les colònies d'aquestes dues floridures. Els *A.flavi* són sembrats en 134 plaques (CAM) (una colònia per placa).

Per aïllar aquests tres tipus de floridures es rasca o es fa una mena de quadrat amb una ansa a una colònia de cada una d'aquestes, per separat, una darrera de l'altra, i es col·loca en el medi de cultiu corresponent.

En el procés cada cop que s'utilitza l'ansa s'ha de netejar i esterilitzar al fogonet bunsen (Imatge 22) abans de tornar-la a utilitzar, ja que sinó poden contaminar-se les floridures i no donar resultats adequats.



Imatge 20: Ansa sobre placa preparada per aïllar *A.flavi*



Imatge 21: *Aspergillus flavi* aïllat en CAM



Imatge 22: Esterilització ansa per tornar a usar

4.2.2.2. 2n pas: INCUBACIÓ DE LES PLAQUES DELS AÏLLATS

Les plaques s'incuben en una cambra d'incubació a 25 °C durant una setmana.

Per a que les colònies de floridures es desenvolupin, creixin correctament i no es contaminin les plaques es col·loquen en bosses estèrils per tal d'emmagatzemar-les millor i també poder cobrir les plaques sense perill de contaminació.

Per altra banda les bosses es tallen pels laterals per deixar una lleu transpiració a les floridures, ja que aquests en créixer evaporen molta aigua i d'aquesta manera no s'acumula tota dins i no deixa un ambient humit.



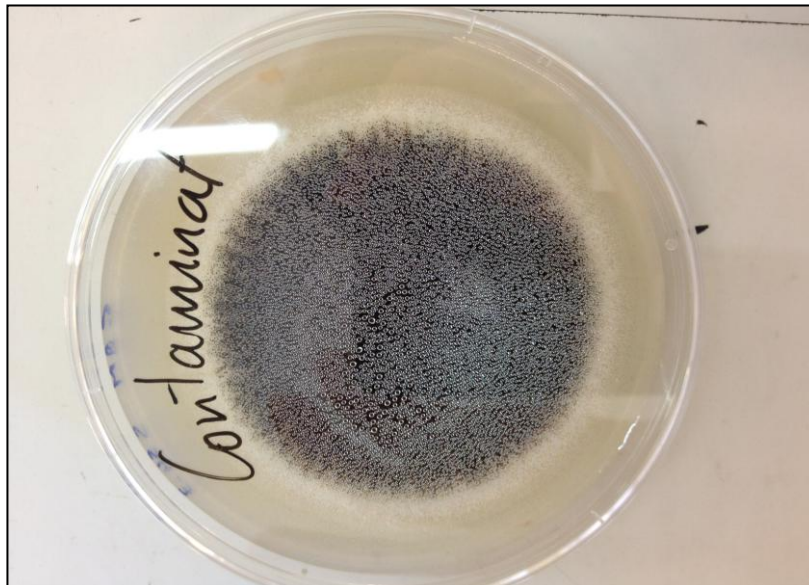
Imatge 23: Cambra d'incubació amb els aïllats a les bosses estèrils (al prestatge superior)

4.2.3. DETECCIÓ DE LA CAPACITAT MICOTOXIGÈNICA (PRODUCTORA DE MICOTOXINES) DELS AÏLLATS

4.2.3.1. 1r Pas: SELECCIÓ DELS AÏLLATS QUE HAN CRESCUT CORRECTAMENT

Un cop transcorreguda una setmana s'extreuen les floridures aïllades en els dos tipus de medi diferent, en aquest cas CYA i CAM, de la cambra d'incubació i es seleccionen i anoten les plaques en les quals s'observa que les colònies han crescut correctament. Per altra banda es descarten aquelles que han estat contaminades en el seu procés de creixement.

Per identificar aquelles colònies que han estat contaminades es pot fer a simple vista veient en la placa que el color d'aquesta floridura canvia (no és el previst), la seva disposició i estructura no corresponen a la floridura que s'ha sembrat prèviament (**Imatge 24**).



Imatge 24: Floridura contaminada per un altra en el seu aïllament

Materials i mètodes

Si les plaques queden contaminades significa que la colònia que teòricament ha de créixer ha estat sembrada erròniament juntament amb alguna espora d'un altre tipus de floridura.

Consegüentment aquesta floridura no ha estat capaç de desenvolupar-se correctament ja que l'altre tipus d'espora ho ha impedit volent créixer també.

4.2.3.2. 2n Pas: EXTRACCIÓ DELS AÏLLATS D'ASPERGILLUS NIGRI I ASPERGILLUS CIRCUMDATI AMB METANOL

Tenint en compte només les plaques amb les floridures d'*Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati* havent descartat les contaminades, (149 plaques sense contaminar) s'extreuen de cada placa tres mostres d'una sola colònia (en una placa poden haver-ne gran quantitat).

L'extracció es fa en forma circular seleccionant tres punts des del centre de la colònia cap a un dels laterals formant una línia recta (Imatge 25).

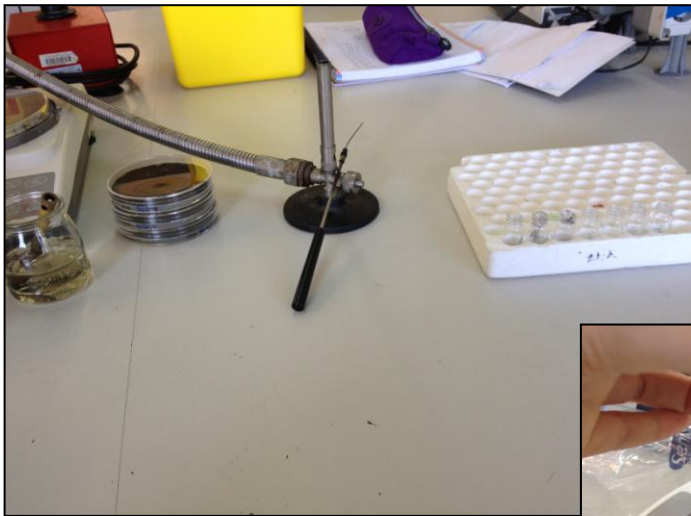


Imatge 25: Extracció d'*A.nigri* aïllat prèviament (d'una colònia)

Una vegada realitzats aquests cercles amb el “sacabocado” (Imatge 27), s'extreuen de la placa i es posen els tres en un sol vial, el qual s'enumera per tal d'identificar després de quina soca es tracta i poder saber si aquesta és productora de micotoxina o no.

Cada cop que es canvia de placa s'ha d'esterilitzar l'ansa amb la que es treballa (introduint-la en un recipient amb alcohol i posant-la sobre el fogonet treient els residus de la colònia anterior) ja que sinó pot contaminar-se una colònia amb un altra i això no permetria obtenir resultats correctes.

A continuació s'afegeix al vial 1 ml de metanol per a concentrar la toxina i quan es té una quantitat considerable de vials preparats d'aquesta manera, amb les diferents mostres de cada placa, s'agiten al vòrtex i es deixen reposant durant una hora.



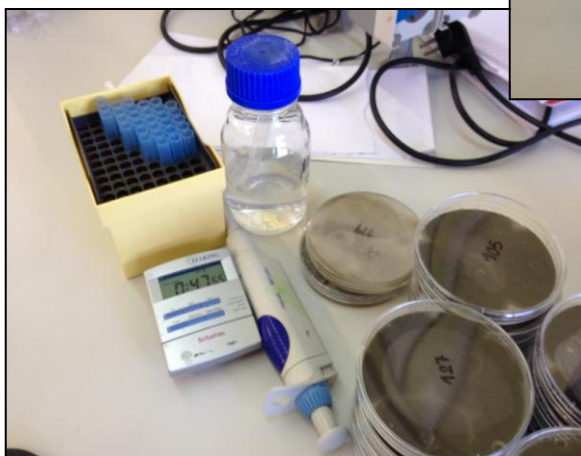
Imatge 26: Ansa amb que es fa l'extracció i vials (gradeta blanca) amb el contingut dels aïllats d'*A.nigri* i *A.circumdati*



Imatge 27: Netejant “Sacabocado” amb alcohol per tornar-lo a utilitzar en un altra placa (esterilització)



Imatge 28: Vials d'*A.nigri* i *A.circumdati* extrets amb metanol disposats a la gradeta per a vials i enumerats



Imatge 29: Pipeta, puntes i metanol per a l'extracció als nous vials (a la imatge 28)

4.2.3.3. 3r Pas: FILTRACIÓ I EVAPORACIÓ DELS VIALS DELS *ASPERGILLUS NIGRI* I ELS *ASPERGILLUS CIRCUMDATI*

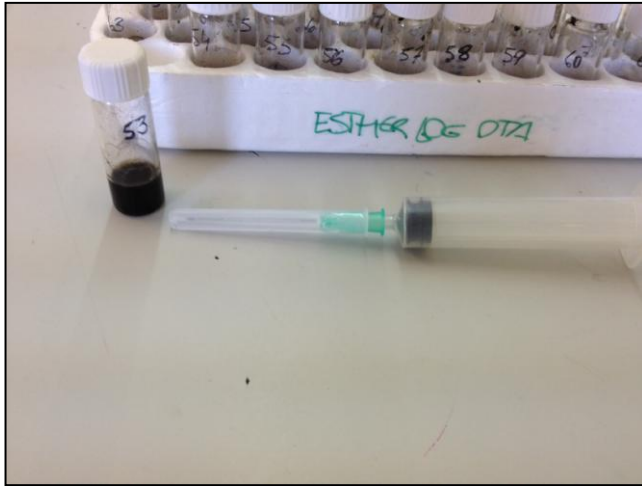
Transcorreguda una hora després d'haver extret amb metanol les colònies d'*Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati* el procés que segueix és el de filtració dels vials.

La filtració és un procés necessari i imprescindible perquè el que s'utilitza posteriorment en el cromatògraf són mostres líquides, per tant, les restes sòlides han de ser eliminades.

Per fer-ho s'extreu amb una agulla i xeringa la part líquida de la mostra en cada vial i amb un filtre es deixa caure en un nou vial (**Imatges 30 i 31**).

D'aquesta manera s'aconsegueix la mostra líquida que ha quedat impregnada de la floridura pel procés anterior.

Els nous vials també són enumerats amb el nombre del corresponent vial d'on s'extreu el component líquid i tot seguit són tapats per a que no influeixin aspectes externs en la detecció i identificació de micotoxina.



Imatge 30: Preparació de la xeringa per absorbir el contingut semilíquid del vial

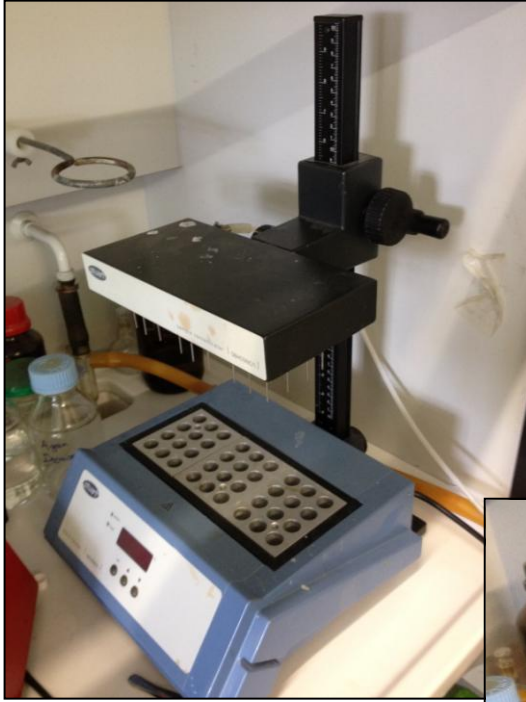


Imatge 31: Filtres per a afagar el líquid de la txeringa

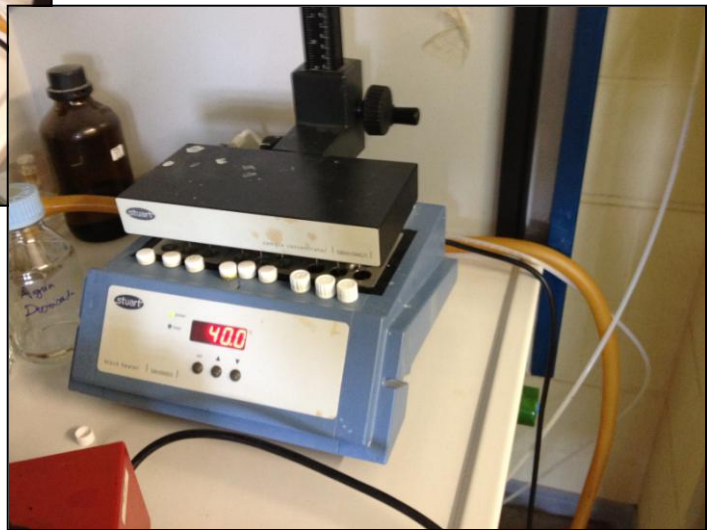
A continuació els vials s'evaporen en un concentrador de mostres, el temps que sigui necessari, majoritàriament un quart d'hora.

El concentrador de mostres actua mitjançant nitrogen gas el qual a alta temperatura evapora les mostres i deixa en elles la toxina concentrada (**Imatge 32**).

Seguidament es resuspenen els vials en metanol-aigua 50:50, es tapen i es guarden a la nevera en gradetes per a vials per a ser conservats fins que s'utilitzin en el procés d'HPLC.



Imatge 32: Concentrador de mostres



Imatge 33: Concentrador de mostres evaporant vials filtrats d'*A.nigri* i *A.circumdati*

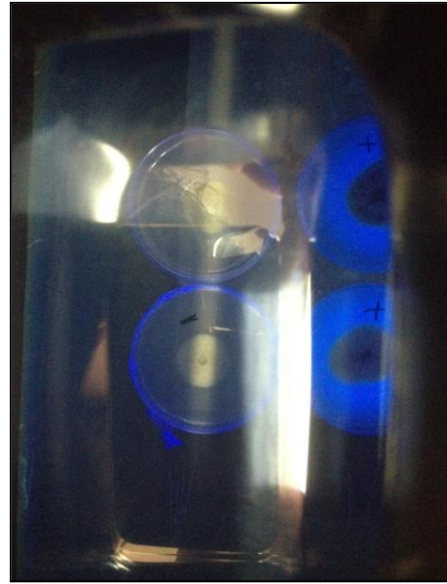
4.2.3.4. 4t Pas: DIFERENCIACIÓ I SELECCIÓ DE LES SOQUES PRODUCTORES DE MICOTOXINA D'*ASPERGILLUS FLAVI* PER MITJÀ DE LA CABINA DE FLUORESCÈNCIA

Es seleccionen les soques d'*Aspergillus flavi* que no han estat contaminades, (120 plaques) i es procedeix a utilitzar la cabina de fluorescència amb totes elles.

Aquesta cabina conté una llum ultraviolada que permet detectar la presència de toxina (micotoxina) provocant fluorescència a les plaques (Imatge 35), gràcies a la composició del medi CAM.



Imatge 34: Cabina de fluorescència



Imatge 35: Fluorescència de les plaques CAM amb *A. flavi* disposades a la cabina (Fluorescència blava)

Amb aquest mètode el que es pretén és estalviar feina, ja que d'aquesta manera es redueixen el nombre de soques d'*Aspergillus flavi* que s'han de sotmetre a la tècnica d'HPLC (high-pressure liquid chromatography) per identificar les micotoxines presents.

El color de la fluorescència determina quines toxines són les que estan presents en aquesta floridura (comentat en la introducció). En aquest cas el color de fluorescència és blau i no verd, per tant les aflatoxines presents corresponen a les AFB1 i AFB2 (blue).

Aquest procés només es dur a terme amb els *Aspergillus flavi* perquè és l'únic mètode que hi ha validat científicament per a fongs, encara que d'altres micotoxines també resulten fluorescents sota llum UV.

Les altres micotoxines fluorescents sota llum UV són detectades amb aquesta llum directament al cromatògraf, posteriorment, no en la cabina de fluorescència.

Les plaques positives, és a dir, les que han donat positiu en la identificació de micotoxina mitjançant la cabina de fluorescència s'emmagatzemen a la nevera.

4.2.3.5. 5è Pas: SEMBRA I INCUBACIÓ DELS *ASPERGILLUS FLAVI* POSITIUS EN MEDI CYA

Després d'haver seleccionat els *Aspergillus flavi* positius (portadors de micotoxina) (50 plaques positives de 120 plaques sense contaminar) i de ser guardats mentre es fa el procés dels *Aspergillus nigri*, aquests són sembrats en un altre medi de cultiu, en el medi CYA, en el qual anteriorment s'han inoculat els *Aspergillus nigri*.



Imatge 36: Soques d'*A.flavi* positives (baix) i negatives (dalt) després de passar per la cabina de fluorescència

Es realitza el procés de sembra de la mateixa manera que es fa en els processos anteriors, rasant la floridura amb una ansa i impregnant la placa corresponent de medi CYA (mateix nombre de placa de la qual procedeix la floridura anterior) realitzant tres punts, destapant la placa de l'inrevés i posant-los com si es punxés en el medi, en tres parts diferents de la placa formant un triangle. Cada colònia es sembrada en un placa diferent.

Un altra manera de sembrar la floridura en la nova placa es realitzar un quadrat de la colònia que volem traspasar a la plaqueta i col·locar-lo sobre el medi de cultiu. Pot fer-se així també perquè de l'altra manera podem no agafar prou mostra.

Depenent de la quantitat de floridura que es té i de la facilitat que aquesta té per rascar-se es realitza d'una manera o d'un altra, però les dos són vàlides i correctes.

Les plaques van enumerant-se amb el nombre de la mostra a la qual corresponen i el nombre de placa de la qual s'obtenen.

Un cop sembrada una colònia d'*A.flavi* en cada nova placa de medi CYA aquestes s'apilen en columnes i es tapen amb bosses estèrils, realitzant talls laterals en aquestes per a evitar que l'aigua que s'evapora durant el creixement dels fongs no es quedi continguda dins.

Consecutivament es porten a la cambra d'incubació i a 25°C es deixen créixer durant una setmana.

Les plaques del medi CAM amb *Aspergillus flavi* positius es guarden a la nevera juntament amb les plaques de CYA amb *Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati* guardats després d'haver-se fet el procés d'extracció amb metanol.



Imatge 37: Cambra de refrigeració

Materials i mètodes

D'aquestes plaques guardades a la nevera s'agafa una colònia de cada (del tipus de floridura que contingui) i es sembra en un tub de medi PDA, apuntant de la soca de la qual prové.

Aquests tubs es guarden en la cambra d'incubació per a conservar els fongs desenvolupats que s'han extret finalment per a la investigació amb HPLC de les mostres de sorgo inicials (*Aspergillus flavi* positius i *Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati* no contaminats). Si hi hagués algun error es podria tornar a repetir el procés.



Imatge 38: *A. nigri* positiu que s'ha desenvolupat en un tub de medi PDA (sembrat)



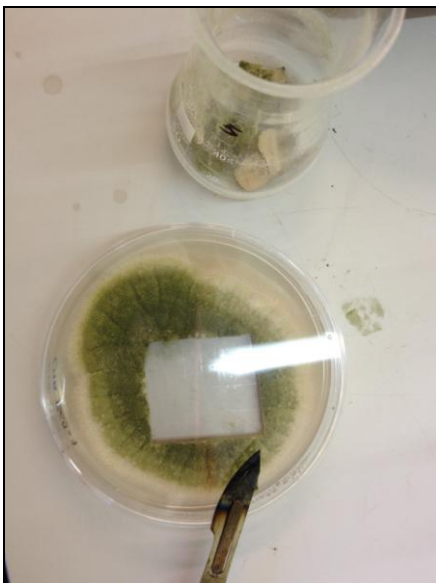
Imatge 39: Tubs sembrats amb *Aspergillus* positius i plaques d'*A. flavi* per extreure amb metanol

4.2.3.6. 6è Pas: EXTRACCIÓ DELS AÏLLATS D'ASPERGILLUS FLAVI AMB METANOL

S'agafen les plaques d'*Aspergillus flavi* incubades en medi CYA durant una setmana en la cambra d'incubació i es procedeix a realitzar el procés d'extracció de micotoxina.

Aquest procés és diferent del que es segueix amb els *A.nigri* i els *A.circumdati*. En aquest cas utilitzant un bisturí es realitza un rectangle a cada placa tallant d'aquesta manera gran part del contingut de la placa, el medi de cultiu (CYA) juntament amb la colònia de floridura, que es el que interessa per a obtenir bons resultats.

D'aquest mateix rectangle es tallen (**Imatge 39**) quadradets per a posar-los posteriorment en un petit erlenmeyer el qual es numera per a identificar de quina mostra prové aquella micotoxina.



Imatge 39: Bisturí, placa amb *A.flavi* positiu i erlenmeyer amb quadradets



Imatge 40: Erlenmeyers amb la mostra sòlida d'*A.flavi* i enumerats

Es numera amb nombres simples (començant per l'1) i a la llibreta s'apunta el numero de l'erlenmeyer i el corresponen nombre de soca i placa de la qual procedeix el seu contingut (Ex, (1) S53-1).

Materials i mètodes

Abans de col·locar els petits quadradets en l'erenmeyer, aquest es posa sobre la balança amb un imant (per a que només es mogui el contingut) i es tara ja que sol es vol saber la massa que contindrà en el seu interior. A continuació els quadradets s'introdueixen en el recipient i aquest torna a posar-se sobre la balança. A mesura que això va fent-se s'apunta el pes de cada mostra en la llibreta ja que d'això depèn la quantitat de metanol que s'hi ha d'afegir.

Si les mostres contenen entre 4 i 10 g de contingut sòlid (colònies d'*Aspergillus flavi*) s'ha d'afegir a cada erlenmeyer 10 ml de metanol, en canvi si contenen entre 10 i 20 g s'afegeixen 15 ml de metanol.

En aquest cas les mostres pesen totes menys de 5 g per tant s'utilitzen 10 ml de metanol per cada erlenmeyer. Un cop afegits 10 ml de metanol en cada erlenmeyer amb una pipeta de 10 ml de capacitat, aquests es tapen amb parafilm i es situen sobre l'agitador de mostres. Aquestes s'agiten durant 10 minuts fen així que el metanol i la substància sòlida (*Aspergillus flavi*) es barregin (imatge 41 i 42)



Imatge 41: Metanol i pipeta preparat per a afegir metanol als erlenmeyers



Imatge 42: Agitador de mostres amb els erlenmeyers d'*A. flavi* remenant el seu contingut

4.2.3.7. 7è Pas: FILTRACIÓ I EVAPORACIÓ DELS VIALS D'ASPERGILLUS FLAVI

Havent agitat els diferents erlenmeyers de les diferents soques d'*Aspergillus flavi* amb metanol es segueix el procediment filtrant les solucions obtingudes dins d'aquests recipients.

Per a la filtració en aquest cas s'utilitza paper de filtre i embuts per tal de que el filtre absorbeixi la part sòlida del contingut i deixi anar dins d'un tub (el qual es numera amb el corresponent nombre que conté l'erlenmeyer d'on prové la mostra) la part líquida que és el que interessa per al mètode d'HPLC.

El primer pas en la filtració es duu a terme tallant diversos quadrats de paper de filtre, doblegant-los (fent la meitat i la meitat de la meitat), obrint-los de manera que quedi una cavitat similar a la part superior de l'embut i col·locant-los en l'embut en aquesta disposició, el qual al seu torn és introduït dins d'un tub.

Seguidament s'aboca el contingut de l'erlenmeyer dins l'embut amb el paper de filtre i així es fa amb totes les mostres d'*Aspergillus flavi* positives anteriorment extretes amb metanol.

Es deixa que el paper filtri i a continuació es retira l'embut, juntament amb el paper i els residus sòlids (d'*Aspergillus flavi* en CYA) i es tapen els tubs amb el contingut a evaporar (**Imatge 43**).

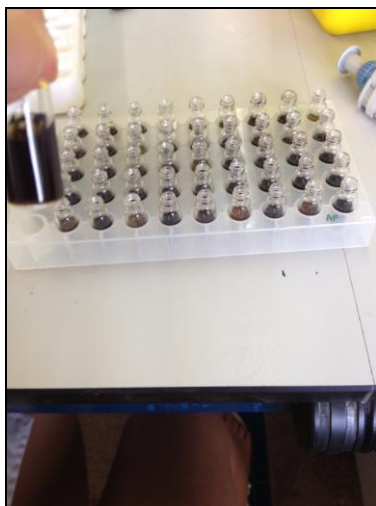


Imatge 43: Filtració del contingut dels erlenmeyers (*A.flavi*) en tubs

Materials i mètodes

L'evaporació es fa exactament igual que amb els *Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati*. Els tubs amb metanol i micotoxina es dipositen en el concentrador de mostres que n'evapora el contingut.

Les mostres evaporades són resuspeses amb metanol-aigua 50:50 i s'introdueixen en vials més petits per a poder ser punxades en el cromatògraf (**Imatge 44**).



Imatge 44: Vials am la toxina concentrada preparats per a HPLC (en aquest cas d'*A.nigri*)

4.2.3.8. 8è Pas: IDENTIFICACIÓ DE MICOTOXINES A PARTIR DE TÈCNIQUES DE HPLC (high-pressure liquid chromatography)

Per a la detecció de micotoxines de les mostres preparades s'han de realitzar un seguit de patrons amb diferents concentracions de toxina pura corresponent a investigar en cada cas. Aquest procés es fa per a poder comparar el contingut de les mostres amb la toxina pura al gràfic que es forma en el cromatògraf i així poder identificar la presència o no de micotoxina en cada mostra. Com més semblant sigui el pic del gràfic de la mostra al del patró més pura és la micotoxina.

Aquests patrons, els quals serveixen de base per a la detecció de micotoxina, són preparats a partir d'un patró mare que es compra comercialment. La toxina liofilitzada, (sotmesa a baixes temperatures i baixa humitat) es rehidrata amb metanol (1 mg toxina/4 ml metanol) per a quantificar posteriorment la concentració de toxina en l'espectrofotòmetre.

A partir d'uns determinats paràmetres obtinguts en aquest aparell mitjançant la lectura del patró mare es troba la concentració de toxina que permet realitzar una bateria de patrons per a injectar al cromatògraf.

Els valors donats en l'espectrofotòmetre corresponen a la longitud d'ona de la llum al travessar el patró (\square), a l'absorbància (A), al pes molecular de la toxina (MW) i a ϵ , que és un valor que ve determinat pel reactiu que es mira en l'aparell (metanol).

Mitjançant aquests paràmetres físics i químics, amb uns valors determinats per a cada patró mare (cada toxina diferent), es determina la concentració de toxina:

$$C (\mu\text{g/ml}) = (A \times MW \times 1000 \times 1) / \epsilon$$

L'absorbància (A) és la intensitat de quantitat de llum que absorbeix la mostra. Tenint en compte la concentració de toxina del patró mare es calcula la quantitat de volum inicial (patró mare) necessari per a formar els diferents patrons. Depenent del volum i concentració amb el qual es vulguin formar els patrons la quantitat de volum del patró mare serà una o un altra.

Fórmula utilitzada per al càlcul de patrons:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

Materials i mètodes

Ex.

Ci del patró mare (obtinguda en l'espectrofotòmetre) = 16,18 µg/ml

I volem un patró de 500 ppb en 10 ml

Cf = 500 ppb = 0,5 ppm (ppm = µg/ml) (1 ppm = 1000 ppb)

Vi = ?

$V_i = (V_f \times C_f) / C_i$

$V_i = (10 \text{ ml} \times 0,5 \text{ ppm}) / 16,18 \text{ ppm}$

Vi = 0,309 ml Patró mare

9,69 ml metanol (Per aconseguir 10 ml)

Un cop s'han format els patrons aquests es disposen al cromatògraf i es punxen per obtenir un cromatograma, el qual mostra el resultat en àrea de l'energia obtinguda de cada patró (pic) respecte el temps de retenció de la toxina que contenen (en minuts).

Primerament en el cromatograma es poden observar uns pics desiguals que representen el front del reactiu pel quan han estat transportats els patrons (toxina) i a continuació es mostren els pics dels diferents patrons.

Els resultats dels diferents patrons s'utilitzen per fer una corba de regressió amb la qual es comparen les mostres preparades, extrapolant-la als resultats de les mostres.

Les mostres preparades, segons poden ser productores d'Ocratoxina A (OTA), procedent dels *Aspergillus nigri* i *Aspergillus circumdati*, o d'Aflatoxines (AFB1, AFG1, AFB2, AFG2) procedents dels *Aspergillus flavi*, són sotmeses a processos separats d'HPLC.

Per una banda es duu a terme el procés pel qual es detecta la presència d'OTA i la concentració d'aquesta per a cada soca (vials).

La dissolució mare dels patrons d'Ocratoxina A conté aquestes quantitats dels paràmetres mesurats en l'espectrofotòmetre:

OTA (en metanol): - MW = 403 g/mol
- $\lambda = 333$ nm
- $\epsilon = 640$

Un cop preparats els patrons d'Ocratoxina A, a diferents concentracions es realitza el cromatograma d'aquests mitjançant el cromatògraf i els seus resultats es traspassen a una corba de regressió.

Després es passa a utilitzar el cromatògraf per a fer la lectura de les mostres d'*Aspergillus niger* i *Aspergillus circumdati*.

Primerament es prepara la fase mòbil, que és una dissolució que serveix per a transportar les mostres en el circuit de diferents fases que aquestes segueixen en el cromatògraf.

S'utilitzen 2 L d'aquesta solució per aquest procés i abans de posar-la a establir al cromatògraf es barreja i sacseja amb un agitador magnètic mentre es filtra, mitjançant filtres Millipore, per a que no quedin impureses.



Imatge 45: Filtració i agitació de la fase mòbil

Materials i mètodes

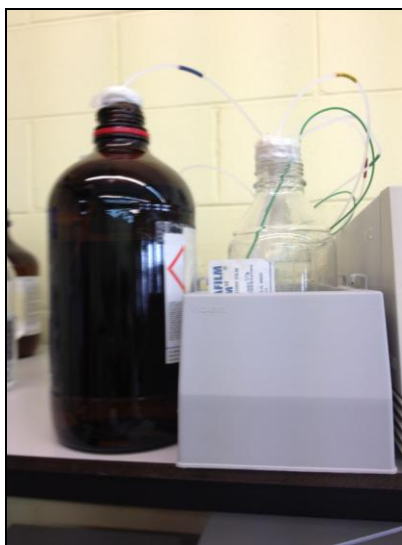
La composició de la fase mòbil en és la següent:

- 57% d'Acetonitril
- 41% d'Aigua milliq (aigua bidestil·lada que passa per un aparell per treure ions) (**Imatge 46**)
- 2% d'Àcid acètic



Imatge 46: Preparació de l'aigua milliq

Un cop preparada la fase mòbil s'introdueix al cromatògraf i es deixa reposar, fent que aquest s'ompli d'aquesta dissolució per a poder-lo utilitzar posteriorment amb les mostres.



Imatge 47: Fase mòbil reposant al cromatògraf

Quan la fase mòbil ja ha estat reposada es col·loquen les mostres a l'interior del cromatògraf per a ser “injectades” i per a que recorrin un circuit que porti finalment a detectar la concentració d'Ocratoxina A present en les mostres.

El cromatògraf utilitza la fase mòbil per a formar un circuit el qual és impulsat per una bomba que provoca un flux determinat a alta pressió. El circuit continua fins que arriba un punt on un injector punxa la mostra i la inserta en el circuit de la fase mòbil, fent així que aquest compost arribi a una part del cromatògraf anomenada columna. A la columna, també anomenada fase estacionària, els components de la mostra a analitzar es retarden diferencialment depenent de les interaccions físiques i químiques amb la fase estacionària a mesura que avancen per la columna.

A continuació, el circuit amb els components de la mostra passen pel detector de fluorescència i aquest detecta una λ d'excitació i una λ d'emissió.

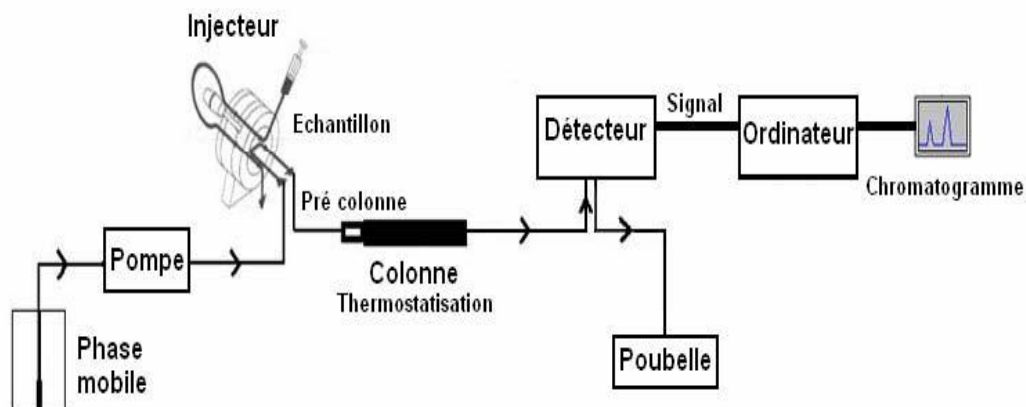
El grau de retenció dels components de la mostra depèn de la naturalesa del compost, de la composició de la fase estacionària i de la fase mòbil.

El temps que tarda un compost a ser eluït de la columna es denomina temps de retenció i es considera una propietat identificadora característica d'un compost en una determinada fase mòbil i estacionària.

El detector de fluorescència en la sortida de la columna supervisa contínuament el pas dels compostos separats. Els senyals registrats en funció del temps, processats per l'ordinador, es donen en forma d'un cromatograma. La bona separació resultarà en un senyal de pic aïllat, i simètric d'extrem específic format per una superfície determinada mitjançant un integrador, formant una funció de la seva concentració.

Materials i mètodes

El registre i el processament de senyals es duen a terme pel programari apropiat. Per micotoxines, la seva concentració es calcula utilitzant una corba de calibratge (corba de regressió) prèviament preparada amb solucions de concentracions conegudes de micotoxines (patrons).



M. NGUYEN MINH TRI. Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialise dans cinq provinces de la region centrale du vietnam - etude des conditions pouvant reduire la production des mycotoxines. 2007. Pàg.59.

ESQUEMA 3: Esquema d'una cadena d'HPLC

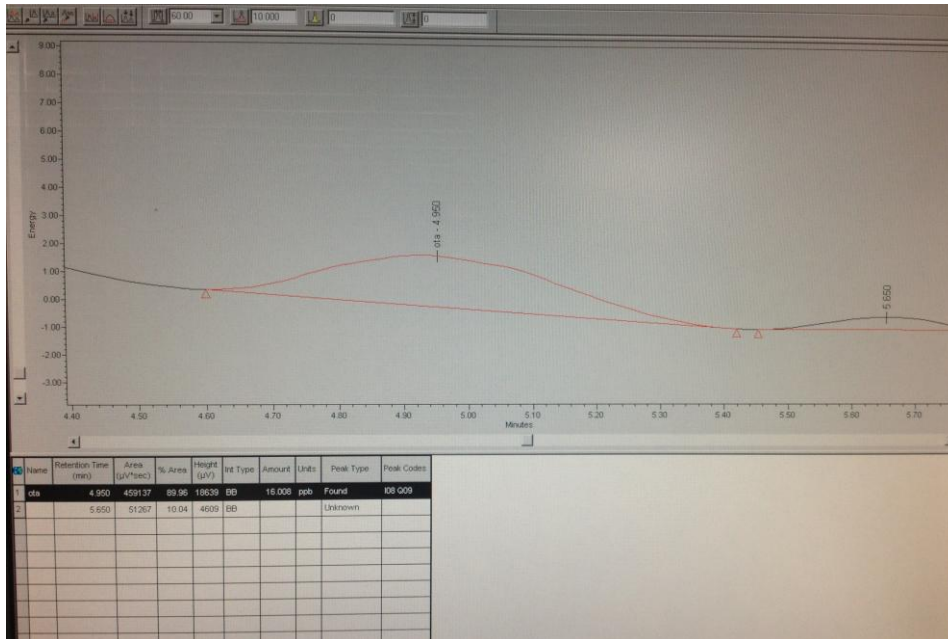


Imatge 48: Cromatògraf

Els cromatogrames obtinguts d'Ocratoxina A s'observen en l'ordinador de la manera següent:

EXEMPLES DELS CASSOS POSSIBLES:

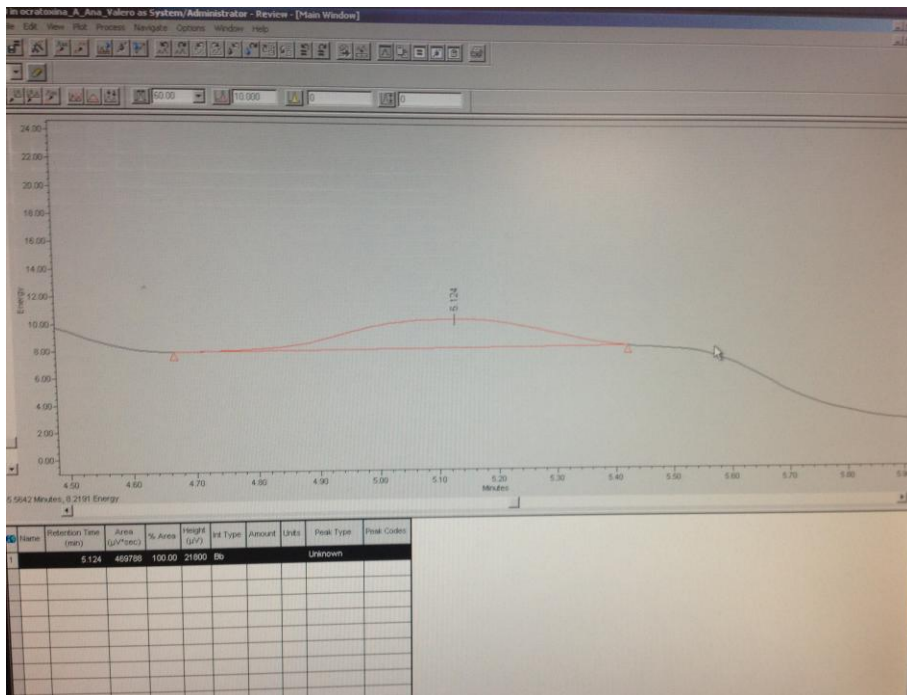
Cromatograma 1:



En aquest cas es poden veure dos pics un dels quals queda enregistrat per OTA (vermell) l'altre no, per la qual cosa una de les molècules contingudes en aquesta mostra no correspon a aquesta toxina.

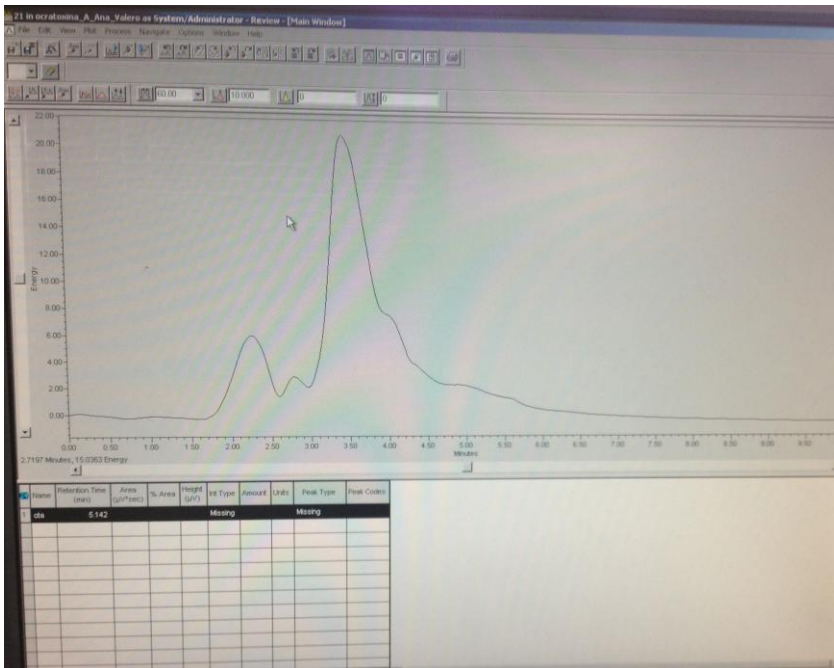
L'ordinador per si mateix per mitjà del temps de retenció i l'energia que allibera aquesta molècula en el seu pas per la columna la compara amb la corba de regressió dels patrons de la micotoxina i mitjançant aquesta àrea detecta la concentració d'aquesta en la mostra.

Cromatograma 2:



En aquest cas el pic està marcat en vermell però no com OTA , és a dir, aquesta molècula en principi no pertany a l'Ocratoxina A. És una molècula amb similar pes molecular (com podria ser una proteïna), és a dir, amb semblant temps de retenció.

Cromatograma 3:



En aquest gràfic, en canvi, no hi ha cap pic marcat, és a dir, cap molècula correspon a Ocratoxina A, encara que s'observin diferents pics, corresponents a d'altres molècules presents en la mostra.

D'altra banda es realitza el procés de detecció d'aflatoxines anàlogament al de l'Ocratoxina A, però amb diferents valors en les variables.

Encara que el color de la fluorescència indiqui que les aflatoxines presents són la B₁ i B₂ també s'utilitzen patrons de G₁ i G₂, per assegurar-ne la seva absència.

Paràmetres fisicoquímics de les aflatoxines obtinguts en l'espectrofotòmetre:

- AFB1: MW = 312 g.mol⁻¹, λ_{abs} = 362 nm i ε = 21800 (en metanol)
- AFG1: MW = 328 g.mol⁻¹, λ_{abs} = 362 nm i ε = 16100 (en metanol)
- AFB2: MW = 314 g.mol⁻¹, λ_{abs} = 363 nm i ε = 24000 (en metanol)
- AFG2: MW = 330 g.mol⁻¹, λ_{abs} = 365 nm i ε = 19500 (en metanol)

Materials i mètodes

La fase mòbil està composta per (Aigua/Metanol/Acetonitril 70/17/17), s'ajusten els paràmetres dels mòduls del cromatògraf als següents valors:

- Temperatura del forn termostàtic: 40°C (COLUMNA)
- Flux: 1 ml/min
- Volum d'injecció: 100 µl
- Longitud d'ona d'excitació: 365 nm
- Longitud d'ona d'emissió: 0-13 min 455 nm i 13-25 min 425 nm.

Aplicant les condicions cromatogràfiques exposades anteriorment, es van obtenir els següents temps de retenció: AFG2 ≈ 9,5 min; AFG1 ≈ 11,9 min; AFB2 ≈ 13,1 min y AFB1 ≈ 16,7 min.

5. RESULTATS I DISCUSSIONS

5.1. RESULTATS

5.1.1. MICOBIOTA DE LES MOSTRES DE SORGO

La microbiota fa referència al conjunt de microorganismes presents en un determinat substrat, tant poden ser protozous, fongs (**micobiota**), bacteris o llevats. En la present investigació els objectes d'estudi han estat uns tipus de fongs, les floridures, i les micotoxines produïdes per aquests.

A la Taula 9 es poden observar els diferents tipus de floridures presents en cada mostra (desenvolupades en plaques). Els resultats són expressats de forma qualitativa, ja que en el procés de recompte es va determinar el nombre de colònies presents en cada mostra (20 plaques per mostra) sense diferenciar quantes n'hi havia de cada tipus. Tot i això, es va poder determinar els diferents tipus de floridures presents en cada mostra.

A la Taula 10, d'altra banda, s'exposen la proporció de mostres en que són presents els diferents tipus de floridures. D'aquesta manera els resultats obtinguts en la Taula 9 permeten comparar la presència de les diferents floridures i determinar així quines han estat les més desenvolupades en aquest cereal. Això facilita la comparació dels percentatges de contaminació per les diferents floridures en les mostres dels dos països de procedència.

TAULA 9: Determinació dels tipus de floridures desenvolupades en cada mostra

Mostra	CODI	Penicillium	Aspergillus				Fusarium	Cladosporium	Eurotium	Rhizopus	Alternaria	Altres tipus
			c	n	f	t						
1	S21	X	X	X	X	X	X	X	X			
2	S22	X		X	X		X		X	X		
3	S23			X	X		X			X		
4	S24	X	X	X	X	X	X	X	X			
5	S25	X		X			X	X	X			
6	S26	X		X	X		X	X	X	X	X	
7	S27			X	X	X	X		X	X	X	
8	S28	X			X		X	X	X		X	
9	S29							X	X		X	X
10	S30	X		X			X		X			
11	S31	X		X	X		X	X		X		
12	S32	X		X	X		X	X				
13	S33	X		X	X	X	X		X			
14	S34	X	X	X	X	X				X		
15	S35			X					X			
16	S36	X		X	X		X	X	X	X	X	
17	S37	X	X	X	X	X	X		X			
18	S38	X	X	X	X		X	X			X	
19	S39	X	X	X	X		X	X	X		X	
20	S40	X	X	X	X	X			X			
21	S41	X		X	X	X	X			X	X	

TAULA 9: Continuació

Mostra	CODI	Penicillium	Aspergillus				Fusarium	Cladosporium	Eurotium	Rhizopus	Alternaria	Altres tipus
			c	n	f	t						
22	S42	X	X	X	X		X	X	X			
23	S43	X		X	X	X	X		X		X	
24	S44	X		X	X		X				X	
25	S45	X	X	X	X	X	X	X	X			
26	S46	X		X	X		X		X	X		
27	S47	X		X	X	X			X	X		
28	S51	X	X	X	X	X			X	X		
29	S52	X	X	X	X	X			X	X		
30	S53	X		X	X	X	X	X	X	X		
31	S54	X		X				X		X	X	
32	S55			X	X			X			X	
33	S56	X		X	X	X				X	X	
34	S57	X			X	X	X	X	X	X		
35	S58	X		X	X					X	X	
36	S59	X	X	X	X			X			X	
37	S60	X		X	X	X			X			
38	S61	X						X	X	X		
39	S62			X	X	X						
40	S63	X	X	X	X				X	X	X	
41	S64	X		X			X		X	X	X	
42	S65	X		X	X	X	X			X	X	

TAULA 9: Continuació

Mostra	CODI	Penicillium	Aspergillus				Fusarium	Cladosporium	Eurotium	Rhizopus	Alternaria	Altres tipus
			c	n	f	t						
43	S66	X		X	X		X	X	X	X		
44	S67	X		X	X			X	X			
45	S68			X	X			X	X	X		
46	S69	X	X	X	X			X		X		
47	S70	X		X	X		X	X	X			

Llegenda:

c: *A.circumdati* n: *A.nigri*

f: *A.flavi* t: *A.terreus*

Els altres tipus de floridures sense determinar són conegudes com micelis estèrils (mycelium sterile), ja que aquestes no poden distingir-se a causa de la seva incapacitat per produir estructures reproductores com les espores per permetre'n la seva identificació. De fet, els criteris particulars de reproducció d'un fong (ambientals, fisiològics o bioquímics), són molt complexos i la incapacitat d'un medi de cultiu de coincidir amb aquests de vegades porta al fracàs d'una espècie concreta per produir espores i estructures portadores d'aquestes.

Aquestes floridures no són representatives de les mateixes espècies, el que les agrupa és la seva incapacitat en comú per expressar els caràcters que els diferencien (fan distingir l'espècie) en unes determinades condicions.

TAULA 10: Percentatge de mostres que contenen els diferents tipus de floridures

MICROBIOTA		% DE MOSTRES QUE EN CONTENEN		
		% MOSTRES TUNÍSIA (27)	% MOSTRES EGIPTO (20)	% MOSTRES TOTALS (47)
<i>Penicillium</i>		85,18%	85%	85,10%
<i>Aspergillus</i>	<i>A.circumdati</i>	33,33%	25%	29,79%
	<i>A.nigri</i>	92,59%	90%	91,49%
	<i>A.flavi</i>	85,19%	85%	85,10%
	<i>A.terreus</i>	40,74%	40%	40,43%
<i>Fusarium</i>		81,48%	30%	59,57%
<i>Claudosporium</i>		48,15%	45%	46,80%
<i>Eurotium</i>		74,07%	60%	68,08%
<i>Rhizopus</i>		44,44%	75%	57,45%
<i>Alternaria</i>		37,04%	55%	44,68%
Altres tipus (sense determinar)		3,70%	0%	2,13%

5.1.2. CAPACITAT PRODUCTORA DE MICOTOXINES

Per a conèixer la potencialitat d'una mostra de ser contaminada en el cas que es donin les condicions de temperatura, activitat d'aigua, temps...es necessita saber si aquesta mostra té aïllats amb capacitat de produir micotoxines. Per a conèixer aquesta capacitat no només s'ha de tenir en compte que hi hagin aïllats, sinó el nombre d'aïllats i si aquests són productors de la toxina. Per això, es realitza el procés amb la major quantitat possible d'aïllats per a veure la concentració de toxina que aquests produeixen. D'aquesta manera es pot conèixer la variabilitat de les concentracions de les diferents soques d'una mateixa mostra i determinar així la potencialitat d'aquesta per produir micotoxines.

Resultats i discussions

D'una mateixa mostra podrien aïllar-se, com a màxim, 20 soques (20 plaques per mostra inicialment) de cada una de les floridures a estudiar (*A.nigri*, *A.circumdati*, *A.flavi*) en el cas que fossin les tres presents en totes les plaques sembrades inicialment en PDA i DRBC i en les dues dilucions, per tant, es tindrien 60 soques totals d'una mateixa mostra (suposant la màxima presència). Pel cas del procés d'HPLC (cromatografia líquida d'alta pressió) per la detecció d'Ocratoxina A, es tindrien 40 soques, 20 d'*A.nigri* i 20 d'*A.circumdati*, i per les Aflatoxines 20 d'*A.flavi*, que podrien produir els quatre tipus d'aflatoxines (no en el nostre cas).

En aquest projecte no s'ha estudiat la concentració i presència de micotoxines en les mostres de sorgo, sinó la capacitat que tenen les soques de les floridures micotoxigèniques escollides presents en les mostres (*A.nigri*, *A.circumdati* i *A.flavi*) per a produir micotoxines. En el cas que el gra fos exposat als factors externs (anomenats en la introducció) aptes per a la síntesi de micotoxines, els resultats obtinguts serien els que realment trobaríem en aquestes mostres de sorgo, per la qual cosa, els resultats podrien extrapolar-se, en el cas que aquestes quedessin contaminades.

Les condicions de cultiu de les soques micotoxigèniques (medi CYA i CAM, durant una setmana a 25°C) al laboratori han permès la síntesi de toxines per aquestes floridures estudiades.

A la Taula 11 es descriuen els resultats de la capacitat productora d'Ocratoxina A dels aïllats d'*A.nigri* i d'*A.circumdati*. Amb ells es podria determinar en quin dels dos països les mostres d'aquest cereal tindrien més capacitat de producció d'Ocratoxina A (presència) i en quin d'aquests la toxina estaria més concentrada en les mostres de sorgo si aquestes fossin exposades a les condicions més favorables per a la producció d'Ocratoxina A. Aquests resultats són el recull de les dades obtingudes en el procés d'HPLC; a partir d'ells s'han realitzat mitjanes i percentatges per a poder comparar i discutir els resultats.

TAULA 11: Percentatge de les soques (aïllats) totals (*A.nigri* i *A.circumdati*) productores d'Ocratoxina A i concentracions mitjanes d'Ocratoxina A de les soques productores, diferenciant la seva procedència (Tunísia i Egipte)

AÏLLATS (149) <i>A.nigri</i> i <i>A.circumdati</i>	PERCENTATGE MITJÀ PRESENCIA OTA (total d'aïllats)	CONCENTRACIÓ MITJANA OTA (ppb) (94 aïllats positius)
TOTAL	63,09%	20,81 ppb
TUNÍSIA	61,90%	26,31 ppb
EGIPTE	64,62%	13,98 ppb

De la mateixa manera que en la Taula 11, en les dues Taules 12 i 13 es representen el resultats obtinguts en la detecció de la capacitat productora d'Aflatoxines dels aïllats.

TAULA 12: Percentatge de soques totals (*A.flavi*) productores d'Aflatoxina B₁ i concentracions mitjanes d'Aflatoxina B₁ de les soques productores, diferenciant la seva procedència (Tunísia i Egipte)

AÏLLATS (120) <i>A.flavi</i>	PERCENTATGE MITJÀ PRESENCIA AFB1 (total d'aïllats)	CONCENTRACIÓ MITJANA AFB1 (ppb) (50 aïllats positius)
TOTAL	41,66%	2106,33 ppb
TUNÍSIA	41,10%	2138,10 ppb
EGIPTE	44,68%	2067,66 ppb

El percentatge mitjà de presència d'Aflatoxines en els dos casos (**TAULA 12 i 13**) s'ha calculat a partir de la suma de les soques (plaques) que donaven positiu en la cabina de fluorescència utilitzades en el cromatògraf (totes productores) i les que s'han descartat per no ser fluorescentes (no productores d'aflatoxines).

Resultats i discussions

Aquestes dues taules (TAULA 12 i 13) són equivalents pel que fa a la presència mitjana, ja que totes les soques donen positiu en els dos tipus d'aflatoxines i per tant, hi ha el mateix percentatge tant d'una toxina com de l'altra (AFB1, AFB2) i de cada lloc (Tunísia i Egipte).

TAULA 13: Percentatge de soques totals (*A.flavi*) productores d'Aflatoxina B₂ i concentracions mitjanes d'Aflatoxina B₂ de les soques productores, diferenciant la seva procedència (Tunísia i Egipte)

AÏLLATS (120) <i>A.flavi</i>	PERCENTATGE MITJÀ PRESENCIA AFB2 (total d'aïllats)	CONCENTRACIÓ MITJANA AFB2 (ppb) (50 aïllats positius)
TOTAL	41,66%	68,16 ppb
TUNÍSIA	41,10%	65,66 ppb
EGIPTE	44,68%	71,93 ppb

Moltes de les soques disposades al cromatògraf (TAULA 14) provenen d'una mateixa mostra com S37-2 i S37-5 (mostra S37). També pot donar-se el cas que diferents soques d'una mateixa mostra tinguin el mateix nombre de placa, com passa amb S37-3 i S37-3. Aquesta coincidència en el nombre de placa s'esdevé perquè dins d'una mateixa mostra principalment es sembren 5 plaques per cada medi (2) i dilució (2) a les quals se les enumera de 1-5 en cada cas. Si en dues plaques de la mateixa mostra amb el mateix nombre (diferent dilució o medi o ambdós) hi ha presència d'*Aspergillus flavi* (en aquest cas per a la detecció d'aflatoxines) una de les colònies de cada placa és aïllada en un altra per a procedir al mètode d'extracció i d'HPLC. Quan s'anota el codi de la mostra i de la placa de la qual prové l'aïllat a la nova placa no es distingeix el medi del qual s'ha obtingut ni la dilució a la que pertany, per tant, trobaríem que el nom de la soca coincidiria pels dos aïllats.

TAULA 14: Concentracions de les soques d'*A.flavi* aflatoxigèniques obtingudes per HPLC i concentracions mitjanes de les mostres amb soques aflatoxigèniques (en el cas de que fossin exposades a condicions favorables per a la seva síntesi)

Nombre del Vial	Codi de la soca aïllada (mostra i nombre de placa)	Concentració AFB1 (ppb)	Concentració AFB2 (ppb)	Concentració Mitjana mostres (ppb) AFB1	Concentració Mitjana mostres (ppb) AFB2	País d'Origen
31	S22-5	1122,27	20,12			TUNÍSIA
43	S24-1	1861,80	34,68			
30	S26-2	1654,48	70,33			
29	S32-5	3216,24	93,84			
42	S33-4	1565,20	14,02			
50	S33-4	408,08	4,15	986,64	9,09	
36	S34-1	312,94	19,79			
37	S34-2	8163,13	287,97			
40	S34-2	2944,18	136,14			
38	S34-3	2205,60	66,38			
39	S34-3	7477,80	220,34	3572,65	131,30	
48	S34-3	1970,45	32,88			
49	S34-4	213,416	1,91			
41	S34-5	5293,70	284,99			
46	S37-2	515,86	12,69			
32	S37-3	171,55	7,28			
45	S37-3	986,80	26,47			
33	S37-5	477,11	21,46	537,83	16,98	
26	S39-2	4487,59	154,66			
28	S39-5	2257,27	68,90	3372,43	111,78	
24	S40-1	509,42	4,78			
25	S40-1	893,97	14,67			
23	S40-4	600,17	6,35	667,85	8,60	
51	S42-5	2756,52	65,19			
21	S44-1	3010,50	90,98			
22	S44-3	2187,55	28,86	2599,03	59,92	
35	S47-1	1538,97	45,60			
44	S47-2	1632,69	12,22			
34	S47-3	1680,10	81,00			
47	S47-3	2027,54	41,00	1719,83	44,96	

TAULA 14: Continuació

Nombre del Vial	Codi de la soca aïllada (mostra i nombre de placa)	Concentració AFB1 (ppb)	Concentració AFB2 (ppb)	Concentració Mitjana mostres (ppb) AFB1	Concentració Mitjana mostres (ppb) AFB2	País d'Origen
27	S52-3	2358,00	26,91			EGIPTE
1	S53-1	529,30	3,81	463,66	2,98	
8	S53-4	398,01	2,15			
2	S55-3	2055,43	1107,22			
4	S62-1	4013,18	16,80	2652,43	13,92	
5	S62-1	1425,68	11,26			
10	S62-2	no hi és				
6	S62-3	4318,80	21,23			
11	S62-3	2176,30	4,63			
3	S62-4	1646,75	21,75			
9	S62-5	2333,85	7,83			
19	S63-1	2173,73	28,13			
12	S63-2	2212,42	23,83			
18	S63-2	2644,69	32,14			
13	S63-3	1915,98	5,17			
20	S63-3	2281,63	27,88			
14	S63-4	1721,47	4,82			
15	S63-4	1456,27	34,04			
16	S63-5	2176,90	24,98			
17	S63-5	1728,23	19,14	2034,59	22,24	
7	S68-2	1786,55	14,95			

Els resultats de les concentracions de les soques ocratoxigèniques (productores d'OTA) no es veuen reflectits al treball encara que se'n faci alguna petita referència a l'apartat de discussions.

5.2. DISCUSSIONS DELS RESULTATS

5.2.1. DISCUSSIÓ DE LA MICROBIOTA DE LES MOSTRES DE SORGO

A la Taula 9 i a la Taula 10, independentment, s'observa que tant en el total de les mostres com en les mostres d'Egipte i de Tunísia la floridura més present és l'*Aspergillus nigri*, seguida per l'*Aspergillus flavi*. El gènere *Penicillium* també resulta abundant en les mostres dels dos països amb un percentatge molt similar (85,18% a Tunísia i 85% a Egipte).

Els percentatges que més divergeixen entre els dos països són els de mostres que contenen floridures del gènere *Fusarium* i *Rhizopus*.

Les mostres del sorgo tunisenc tenen una gran presència de *Fusarium* (81,48%) a diferència de les egípcies, que solament presenten aquest gènere en un 30% de les mostres.

Per contra, en el cas de la floridura *Rhizopus* la diferència de presència relativa és a la inversa. El sorgo egipci conté un 75% de les seves mostres contaminades per aquesta floridura, en canvi, el tunisenc el presenta en molt menor percentatge de mostres (44,44%).

Pel que fa al gènere *Alternaria* el percentatge de mostres en el que aquest està present és més elevat en les mostres procedents d'Egipte respecte les de Tunísia. El gènere *Eurotium* es més abundant en les mostres procedents de Tunísia, però amb una diferència molt petita.

Resultats i discussions

La majoria de floridures identificades són més freqüents en les mostres Tunisenques però amb un lleuger marge respecte a les d'Egipte, exceptuant les floridures del gènere *Rhizopus* i *Alternaria*. Aquest fet indica que molt possiblement els factors físics, químics i biològics que han afectat les mostres de sorgo de Tunísia són una mica més favorables per al creixement de floridures que els factors que han afectat les d'Egipte. Tot i això, cada floridura, té uns valors òptims propis per aquests factors.

Com que es sap que l'emmagatzematge ha estat idèntic per a les mostres dels dos països ja que es venen al mercat i són sotmeses a les mateixes condicions externes, pot dir-se que els factors que solen afectar aquest cereal al magatzem per produir floridures no han estat els causants d'una lleugera major presència de floridures a les mostres Tunisenques respecte les Egípcies.

Pel que fa als factors físics que han afavorit el creixement de floridures més presents a les mostres podria dir-se que l'activitat d'aigua present en les mostres dels dos països devia aproximar-se al de 0,7 a 25 °C per al creixement d'*Aspergillus* i *Penicillium* (emmagatzematge), en canvi en les mostres Tunisenques el valor era més proper a l'òptim (0,9) per a *Fusarium* (camp) respecte les d'Egipte, ja que aquestes tenen més presència d'aquesta floridura.

Els altres tipus de floridures tenen la capacitat de créixer en una activitat d'aigua de 0,85, per això possiblement l'*aw* del gra de les mostres d'aquest cereal es trobava entre 0,7-0,9, més proper a 0,9 a Tunísia. La composició gasosa per al creixement de fongs sol ser d'alta concentració d'O₂, tot i que algunes espècies com *A.flavus* toleren baixes pressions d'O₂ (10 vegades menors al valor atmosfèric), i baixa pressió de CO₂. Referent a la temperatura la majoria de floridures solen ser mesòfils, per tant, el seu creixement té lloc entre els 20-25°C i el llarg temps d'emmagatzematge n'afavoreix el creixement. Podria dir-se que l'emmagatzematge ha afavorit de la mateixa manera el creixement de floridures a les mostres de Tunísia i d'Egipte (mateix magatzem).

Sabent que els fongs solen créixer amb alta concentració d'O₂ i baixa de CO₂ podria dir-se que la majoria d'ells han crescut al camp o a la collita i aquest factor ha afavorit una mica més les mostres Tunisenques pel percentatge una mica més elevat de floridures en aquestes.

Els factors químics que afecten en el creixement de floridures són el pH (entre 5-6) i la composició del substrat (presència de nutrients i gran quantitat de glúcids) que afavoreixen una mica més el creixement de floridures a Tunísia que a Egipte exceptuant el cas de *Rhizopus* i *Alternaria*.

Els factors biològics que afecten les mostres també influeixen en la contaminació per floridures. La interacció microbiana al camp per presència simultània de diferents espècies dificulta el creixement d'unes i afavoreix el d'altres. En els dos casos (Tunísia i Egipte) aquesta interacció ha afavorit els *Aspergillus* i *Penicillium* respecte les altres floridures. La presència d'insectes també ha pogut influir en la contaminació per floridures, ja que aquests actuen com a vectors d'espores. Més concretament en l'emmagatzemament de cereals aus i rosegadors actuen com a vectors.

D'aquesta manera es podria explicar el motiu de l'estudi ja que en alt percentatge, les mostres de sorgo dels dos països contenen les floridures associades a la producció d'Aflatoxines i Ocratoxina A les quals han estat relacionades amb gran quantitat de malalties presents en aquests països. Tot i això les floridures de tipus *A.circumdati* no són tant presents en les mostres com les d'*A.nigri*, les dos productores d'Ocratoxina A.

A la Taula 9 també pot veure's com totes les mostres tenen almenys dos tipus de floridures, això ens podria indicar que el gra de les mostres dels dos països té propietats que permeten desenvolupar gran varietat de floridures, en aquest cas les distingides i identificades.

Resultats i discussions

Encara que no s'hagin mostrat tots els resultats del nombre de colònies trobats per mostra perquè no és útil si no es sap el nombre de colònies de cada tipus (mostrat qualitativament en les taules) s'han obtingut resultats en diverses mostres que es diferencien de la majoria.

Les mostres S44, S46, S32, S25, S28 i S23 (d'origen Tunisenc) contenen un major nombre de colònies en la segona dilució respecte les altres mostres. Cada una d'aquestes presenta més de 100 colònies de diferents floridures en la segona dilució. Entre les floridures presents d'aquestes mostres hi són presents *A.flavi* i *A.nigri*, productors de les micotoxines a investigar.

La mostra S61 (d'Egipte) resulta estar molt poc contaminada tant pel que fa al nombre de colònies presents com per la poca variabilitat de floridures que conté (només de quatre tipus). Aquesta mostra no presenta les floridures relacionades amb la producció de les micotoxines a investigar, per tant, ja no s'utilitza per al procés de detecció de micotoxines.

La mostra S29 (de Tunísia) no presenta cap de les floridures a investigar en aquest projecte pel que fa a la detecció de micotoxines, per tant, pot dir-se que no sintetitzarà les toxines que s'estudien i que el seu gra resultaria vàlid per al consum gràcies a l'absència d'aquestes, tot i que podria ser que presentés micotoxines d'altres tipus com les associades a la floridura *Alternaria* i no es pogués consumir per culpa d'aquestes (dependria de la concentració que presentés). Els factors del camp i de collita que han influït en aquesta mostra no han permès el desenvolupament de gran varietat de floridures.

El nombre de colònies (no indicat en els resultats) present en totes les altres mostres es molt variat i és inferior en la segona dilució de totes les mostres, ja que aquesta és menys concentrada (floridures més disperses) i així es pot aïllar millor les que ens interessin (*A.flavi*, *A.nigri* i *A.circumdati*) sense que s'impregnin d'espores d'altres floridures properes.

El nombre màxim de colònies (100) obtingudes en la segona dilució de les mostres és, lògicament, inferior al nombre màxim de colònies (600) obtingudes en la primera dilució. És a dir, que la diferent concentració de nutrients presents en el gra incideix en un major o menor desenvolupament de floridures. Si el nombre de colònies de la primera dilució d'una mostra és alt també ho serà el de la segona dilució, encara que aquest sigui inferior, i a la inversa.

Ex: Mostra S32 (PDA); 367 colònies en la dilució mare i 118 en la segona dilució

Ex: Mostra S30 (PDA); 28 colònies en la dilució mare i 5 colònies en la segona dilució

Ex: Mostra S32 (DRBC); 703 colònies en la dilució mare i 184 en la segona dilució.

Ex: Mostra S30 (DRBC); 17 colònies en la dilució mare i 3 colònies en la segona dilució.

La diferència entre el nombre de colònies entre la segona dilució i la dilució mare també és molt variada, com es veu en els exemples. El tipus de medi en el que es sembra una mostra, en aquest cas, no permet el major o menor creixement de colònies de les diferents floridures.

Altres factors que influeixen les diferents mostres al camp i en la collita són també causants de la major o menor presència de colònies en aquestes.

La inhibició d'algunes floridures pel creixement d'altres fa que hi hagi menys tipus de floridures, per tant, menys variabilitat de colònies.

5.2.2. DISCUSSIÓ DE LA CAPACITAT PRODUCTORA DE MICOTOXINES

Observant la Taula 11 es pot veure que un gran percentatge de les soques de les floridures d'*A.nigri* i d'*A.circumdati* sotmeses al procés d'HPLC serien productores d'Ocratoxina A en les condicions apropiades pel seu creixement en aquest cereal. La presència d'Ocratoxina A seria lleugerament més elevada en les mostres procedents d'Egipte que en les de Tunísia.

Que hi hagi un alt creixement d'un determinat tipus de floridures no significa que totes aquestes tinguin la capacitat de produir micotoxines, encara que hi podria haver un cert risc de contaminació. Això dependria dels factors intrínsecs de la soca i de determinats factors extrínsecs (factors físics, químics i biològics) com pot ser la temperatura o la presència d'oxigen.

Les soques aïllades al laboratori d'*A.nigri* i d'*A.circumdati* de les mostres Tunisenques han produït una major concentració (mitjana) d'Ocratoxina A, respecte de les d'Egipte. Per tant, les condicions que afectarien la floridura en les mostres Tunisenques al camp i en la collita fins a la realització de l'estudi afavoririen una síntesi més elevada d'Ocratoxina A. Les condicions d'emmagatzematge (idèntiques per a les mostres dels dos països) no seria un factor diferenciador per al desenvolupament de micotoxines. Les soques toxigèniques d'aquestes mateixes floridures són més freqüents en les mostres d'Egipte encara que no tinguin tanta capacitat per produir Ocratoxina A com les de Tunísia.

La concentració màxima d'Ocratoxina A permesa en cereals dirigits al consum humà marcada per la normativa establerta per la Unió Europea (Apartat 2.2.2 de l'Annex 2) és de 3 µg/kg (3 ppb). La concentració mitjana obtinguda per les soques de sorgo dels dos països que correspon als aïllats totals és de 20,81 ppb, en les soques de Tunísia de 26,31 ppb i en les d'Egipte de 13,98 ppb.

D'aquesta manera, en el cas que durant l'emmagatzematge de les mostres es reproduïssin les condicions ambientals similars a les del laboratori la concentració d'Ocratoxina A superaria gairebé 7 vegades el límit permès en cereals dirigits al consum humà directe. A les mostres de Tunísia el superarien gairebé 9 (8,77) vegades i a les d'Egipte el superarien unes 5 (4,66) vegades. Segons aquestes mitjanes i comparacions totes les mostres amb presència d'Ocratoxina A, per tant, haurien de ser retirades del mercat pel perill que representarien per la salut humana.

Dels resultats de les concentracions corresponents a cada soca utilitzada en el procés d'HPLC (no presents en l'apartat de resultats) s'ha pogut veure que la soca S45-2 presenta una concentració molt més elevada d'Ocratoxina A que les altres (717,47 ppb). En contraposició, les soques S62-5, S58-4, S58-3 i S38-3 tenen una concentració menor a 2 ppb (Ex. Concentració S62-5= 1,197 ppb).

També hi ha valors intermedis de concentracions trobats en la majoria de soques. Aquests corresponen a un rang d'entre 2 i 36 ppb, per tant, hi ha molta variabilitat pel que fa a les concentracions de cada una de les soques.

En el cas de l'Aflatoxina B₁ es pot dir que unes condicions ambientals propícies afavoririen un grau de contaminació lleugerament superior en les mostres de Tunísia respecte les d'Egipte. Les propietats intrínseques del gra Egipci serien lleugerament més favorables a la presència de soques productores d'AFB₁.

D'altra banda l'Aflatoxina B₂ s'ha trobat en més concentració en els medis de cultiu en que s'han desenvolupat les soques aflatoxigèniques presents en el sorgo Egipci. A diferència dels resultats obtinguts per l'AFB₁ i l'OTA, en aquest cas els valors potencials de contaminació concorden amb la major presència de soques d'*A. flavi* toxigèniques respecte a les mostres de Tunísia.

Resultats i discussions

La concentració d'Aflatoxina B₁ és molt superior respecte les concentracions de les altres dues micotoxines estudiades i això és conseqüència del metabolisme de les soques aflatoxigèniques.

En aquestes condicions de laboratori no s'ha aconseguit la síntesi d'AFG1 i d'AFG2 per part de les soques aflatoxigèniques incubades.

El contingut màxim d'Aflatoxina B₁ establert per la Unió Europea pel que fa als cereals (Apartat 2.1.6 de l'Annex 2) és de 2 µg/kg (2 ppb). Si les condicions ambientals afavorissin la síntesi d'AFB1 la concentració mitjana produïda per les soques d'*A.flavi* toxigèniques de les mostres de sorgo seria de 2106,33 ppb.

D'altra banda la concentració mitjana de les soques de Tunísia seria de 2138,10 ppb i en les soques procedents d'Egipte la concentració mitjana correspondria a 2067,66 ppb. Per tant, podria dir-se que tant les concentracions mitjanes de les soques aïllades positives totals com les dels dos països superarien més de 1000 vegades la concentració màxima permesa d'aquesta micotoxina.

No hi ha límits establerts per la UE referents a la concentració d'AFB2 en els cereals ni en cap aliment però sí que n'hi ha per a totes les aflatoxines en conjunt (Apartat 2.1.6. de l'Annex 2). Per tant, si es sumen les concentracions mitjanes de les soques totals d'AFB1 i d'AFB2 (aflatoxines presents en les soques) i de les mostres de Tunísia i Egipte s'obté respectivament: 2174,49 ppb, 2203,76 ppb i 2139,59 ppb. El límit establert per les aflatoxines en conjunt per als cereals és de 4 µg/kg (4 ppb) i aquestes soques estudiades el superarien 543,62, 550,94 i 534,90 vegades respectivament (unes 550 vegades aproximadament).

Les concentracions de les diferents soques aflatoxigèniques poden veure's a la Taula 14. Igualment pot observar-se la variabilitat de les concentracions de les diferents soques que poden influir molt en els valors de la concentració mitjana de les soques aflatoxigèniques de cada país i de la concentració mitjana total d'aquestes. També pot observar-se la concentració mitjana d'aflatoxines resultant del cultiu en laboratori de les soques toxigèniques de cada mostra.

Dels resultats obtinguts al cromatògraf (**TAULA 14**) s'observa que la soca amb més concentració d'AFB1 a Tunísia resulta ser la S34-2 (8163,13 ppb), seguida per la S34-3 (7477,80 ppb) i per S34-5 amb 5293,70 ppb. La soca amb menys concentració d'AFB1 a Tunísia seria la S37-3 (171,55 ppb).

El rang de concentracions de les soques productores no destacades d'AFB1 seria d'entre 312,94 ppb i 4487,5 ppb, per la qual cosa s'observa que les concentracions de les soques són molt variades i la mitjana total de concentració d'AFB1 per les soques Tunisenques (**TAULA 12**) no permetria adonar-nos d'aquests valors tant diferenciats.

Pel que fa a les mostres Tunisenques més contaminades per AFB1 a causa de la presència de soques aflatoxigèniques trobem la S34 amb una concentració mitjana de 3572,65 ppb i la S39 amb 3372,43 ppb. Aquestes mostres superarien el límit establert en cereals per més de 1600 vegades.

Les soques Tunisenques més productores d'AFB2 serien les mateixes que per AFB1 amb un màxim de 287,97 ppb (S34-2) i la menys toxigènica seria la S34-4 (1,19 ppb). El rang de concentracions de les altres soques es troba entre les concentracions indicades, per tant hi hauria variabilitat però no tanta com per les soques d'AFB1. Les mostra Tunisenca més contaminada per aquesta toxina seria la S34 (131,30 ppb) i la S39 (111,78 ppb) de la mateixa manera que per AFB1.

Resultats i discussions

Com que no hi ha límit establert de concentració permessa en cereals per AFB2 sumant les concentracions mitjanes d'AFB1 i AFB2 per S34 veiem que tenim 3703,95 ppb i per S39 tenim 3484,21 ppb que superarien el límit permès per la suma de totes les aflatoxines més o menys en 926 vegades i 870 vegades respectivament.

Les soques de les mostres Egípcies que destaquen com a productores d'AFB1 són la de més concentració S62-3 (4318,80 ppb) i la de menys concentració S53-4 (2,15 ppb). El rang de variabilitat de les concentracions de les altres soques d'AFB1 d'Egipte oscil·la entre 398,01 ppb i 4318,80 més o menys igual que a Tunísia.

La mostra Egípcia més contaminada per AFB1 seria S62 amb una mitjana de concentració (conté diferents soques productores d'AFB1) de 2652,43 ppb que superaria 1326 vegades el límit establert.

Pel que fa a les soques de les mostres Egípcies productores d'AFB2 veiem que la soca amb més concentració és S55-3 (1107,22 ppb) i la de menys concentració és S53-4 (2,15 ppb). El rang de variabilitat de les concentracions de les altres soques en aquest cas correspondria a 3,81-34,04 ppb, més limitat respecte les concentracions de les soques productores d'AFB2 de les mostres de Tunísia. La mostra Egípcia més contaminada per AFB2 seria la S55 amb 1107,22 ppb. Sumant la concentració d'aquesta micotoxina amb la d'AFB1 per aquesta mostra obtindríem 3162,65 ppb de concentració total per aflatoxines per tant es superaria el límit unes 791 vegades.

És curiós veure com les soques de més concentració (S34-3, S34-2 i S34-5) pertanyen a la mateixa mostra (S34) que la que en té menys (S34-4). Això indicaria la variabilitat de les soques d'una mateixa mostra per a produir aquesta micotoxina.

Les mostres amb més concentració respectivament d'Ocratoxina A i d'Aflatoxines (S45, S34) no coincideixen amb les mostres amb més colònies, per tant això podria demostrar que les mostres amb més floridures no resulten ser les més toxigèniques.

Pel que fa a les malalties causades per la ingesta d'aquest cereal seria més probable patir trastorns cancerígens, mutàgens o teratògens provocats per l'Aflatoxina B₁, per la seva major concentració en les mostres.

Per la major presència d'Ocratoxina A en les mostres dels dos països respecte l'AFB₁ (encara que la concentració d'aquesta sigui menor), una ingesta a llarg termini d'aquest cereal també podria comportar problemes associats a aquesta micotoxina com: malalties carcinogèniques, nefrotòxiques, teratògenes, immunotòxiques i possiblement neurotòxiques. El principal òrgan afectat per Ocratoxina A és el ronyó, però també el fetge pot veure's afectat.

Si aquestes mostres, la gran majoria micotoxigèniques (63,09% OTA i 41,66% AFB₁, AFB₂), fossin retirades del mercat pel seu perill potencial per la salut humana això provocaria un gran davallament econòmic pel que fa a la venda d'aquest cereal. S'hauria de dur a terme per evitar possibles intoxicacions.

Segons un estudi (Sala, 1993) de soques potencialment aflatoxigèniques d'*Aspergillus flavi* de diferents mostres de diferents aliments i, concretament pel sorgo, 12 de 81 soques assajades (aïllades per a determinar la seva capacitat productora d'aflatoxines) van resultar ser positives en la cabina de fluorescència. És a dir, un 15% de les soques d'*A. flavi* d'aquest cereal van resultar aflatoxigèniques a diferència dels resultats obtinguts en aquesta investigació en la que 41,66% de les soques aïllades resulten ser aflatoxigèniques.

6. CONCLUSIONS

- La melca és un substrat ideal per al desenvolupament de diferents floridures i en especial les del gènere *Aspergillus*, implicades en la producció d'*Aflatoxines* i *Ocratoxina A*
- Dins del gènere *Aspergillus* les floridures de les seccions *nigri* i *flavi* són les més abundants en les mostres de sorgo. Les espècies d'*A. terreus* són menys abundants i encara en menys percentatge trobem les espècies d'*A. circumdati*
- El creixement de floridures del gènere *Penicillium* també és abundant en les mostres de sorgo així com també, en menys percentatge, trobem floridures del gènere *Eurotium*, *Fusarium*, *Rhizopus* i *Alternaria*
- La majoria de floridures identificades es troben lleugerament més presents en les mostres Tunisenques que en les Egípcies, exceptuant les del gènere *Rhizopus* i *Alternaria* les quals són més abundants en les mostres provinents d'Egipte
- Les mostres de sorgo investigades en el present estudi han demostrat una més gran capacitat productora d'Aflatoxina B₁ que d'Aflatoxina B₂ i d'Ocratoxina A. Potencialment podrien causar malalties en els consumidors que estarien relacionades amb trastorns cancerígens, mutàgens o teratògens (provocats per l'AFB1)
- Les mostres amb més floridures no resulten ser les més toxigèniques
- Les mostres S34 (aflatoxines) i S45 (OTA), d'origen Tunisenc, resultarien ser les més toxigèniques i per tant, les més potencialment perilloses per a la salut humana

- Els resultats obtinguts indiquen que hi ha major presència de soques micotoxigèniques en les mostres Egípcies; pel contrari, les soques micotoxigèniques de les mostres Tunisenques han produït una concentració superior per AFB1 i Ocratoxina A
- Les mostres investigades, sotmeses a les condicions de laboratori, podrien contenir més de 1000 vegades la concentració màxima d'AFB1 permesa per la Unió Europea (UE) per al consum humà
- En relació a l'OTA el contingut mitjà total va ser aproximadament 7 vegades superior al legalment permès per la UE
- Les condicions d'incubació (1 setmana, 25°C i diferents medis de cultiu) resulten favorables per al creixement de floridures i micotoxines
- Aquest treball realitzat esdevé molt útil per valorar el perill potencial de les mostres de sorgo procedents d'aquests dos països (Egipte i Tunísia) sobre la salut humana i poder determinar el risc en cas de ser destinat al consum
- Les tècniques i materials de laboratori utilitzats permeten dur a terme amb seguretat i fiabilitat el procediment seguit per a la diferenciació de floridures i la detecció de micotoxines produïdes per diferents soques

7. PROPOSTES DE MILLORA

Un cop realitzada la part pràctica del treball des d'un punt de vista objectiu i veient els resultats obtinguts s'ha vist que s'haguessin pogut seguir diferents procediments per millorar-lo o per aconseguir més dades comparatives amb les que s'haguessin pogut obtenir més conclusions.

Si les floridures del gènere *Penicillium* haguessin correspost a *Penicillium verrucosum* (no s'ha pogut determinar) associat a la producció d'Ocratoxina A haguessin pogut formar part de la via d'investigació d'aquest treball. Per la qual cosa s'haguessin diferenciat les soques d'aquesta floridura a nivell d'espècies i s'haguessin determinat les soques toxigèniques.

D'altra banda també s'hagués pogut diferenciar la producció d'Ocratoxina A per una part d'*A.nigri* i per l'altra d'*A.circumdati* fent el procés d'extracció i d'HPLC per separat i així saber quin fong esdevé més toxigènic en el cas d'aquest cereal.

El recompte de les colònies fúngiques de cada una de les plaques corresponents a una dilució (mare o segona) i a un medi de cultiu determinat (DRBC o PDA) no ha estat valorat diferenciant les dilucions i els medis i només s'han usat els resultats obtinguts per saber quines mostres presentaven més floridures; per la qual cosa s'hagués pogut realitzar una diferenciació a nivell de medis per saber quin era més apte per al creixement de floridures o per determinar si el substrat influïa en el desenvolupament de fongs.

La diferenciació a nivell de dilucions no hauria tingut sentit ja que es fa perquè en la segona dilució la menor concentració (més dissolvent) fa que les floridures quedin més separades (es dispersin) i al aïllar-les resulti més fàcil que no quedin contaminades per espores d'altres floridures.

Tot i que les condicions aplicades al treball han estat les indicades i són les que de moment s'usen en aquestes investigacions, la comparació de les plaques incubades en aquest i d'altres amb diferents condicions d'incubació referents al mateix cereal, hauria pogut ser interessant per portar-nos a determinar o a constatar quines serien més favorables per al creixement de floridures.

A la vista dels resultats obtinguts seria convenient obrir noves línies d'investigació (possiblement ja es porten en pràctica) destinades a eliminar el perill potencial per la salut humana del consum de cereals contaminats per floridures productores de micotoxines com en el cas investigat. Aquestes possibles línies d'investigació podrien ser:

1. Investigació per a l'obtenció mitjançant la selecció genètica de cereals (melca) resistent a la possible contaminació per floridures
2. Investigació de tractaments amb noves substàncies que impedeixin que una vegada que el cereal hagi estat contaminat per la floridura aquesta no pugui sintetitzar la micotoxina
3. Tractament dels terrenys de cultiu en origen per impedir la contaminació del sòl amb espècies fúngiques que puguin parasitar els cultius

8. BIBLIOGRAFIA

La bibliografia emprada en el treball és la següent:

1. AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Cadena Alimentaria, Gestión de Riesgos Químicos, Micotoxinas.
2. ANDINO RUGAMA, Flavia i CASTILLO, Yorling. Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Estelí, Febrero 2010. Curso de microbiología de los alimentos.UNI-NORTE. (<http://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>)
3. Document en línia: CARRILLO, Leonor. Los hongos de los alimentos y forrajes (<http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/04htextoaspergilos.pdf>)
4. Diario Oficial de la Unión Europea: REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios
5. Enciclopèdia Catalana. Història natural dels Països Catalans.
Volum 5. FONGS I LÍQUENS
6. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN 2011-002) en relación al efecto sobre la población española de la derogación de la normativa nacional sobre límites máximos permitidos para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimentos.
7. Revista ciència online: MÉNDEZ ALBORES, Abraham i MORENO MARTÍNEZ, Ernesto. Les micotoxinas, contaminantes naturales de los alimentos. (<http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/619-Albores%20Micotoxinas.pdf>)

8. NGUYEN MINH, M. Triidentification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam - étude des conditions pouvant réduire la production des micotoxines.
(<http://ethesis.inptoulouse.fr/archive/00000487/01/nguyen.pdf>)
9. PFOHL-LESZKOWICZ, Annie. Écologie des moisissures et des micotoxines. Situation en France.
10. Química, Ciencia y Tecnología de los Cereales. BORNEO, Rafael. Ph.D. Cereal Science, North Dakota State University. Cereales en el mundo: Sorgo.
(<http://cytcereales.blogspot.com.es/2008/08/cereales-en-el-mundo-sorgo.html>)
11. SALA I MARTÍ, Núria. Contaminació fúngica i de micotoxines de grans destinats a l'alimentació animal a Catalunya. Capacitat toxigènica de les soques. Universitat de Lleida. ETS d'Enginyeria Agrària. 1993.
12. Document en línia: SÁNCHEZ MÁRQUEZ, M^a Salud. Estudio de la microbiota endofítica asociada a las gramíneas: *Dactylis glomerata*, *Holcus lanatus*, *Ammophila arenaria* y *Elymus farctus*. 2009.
(<http://digital.csic.es/bitstream/10261/24831/1/ESTUDIO%20DE%20LA%20MICOBIO%20ENDOFÍTICA%20ASOCIADA%20A%20LAS%20GRAMÍNEAS%20.pdf>)
13. Agricultura y Ganadería. Cultivo del sorgo granífero.
Web: <http://www.monografias.com/trabajos/sorgo/sorgo.shtml>
14. Classificació dels fongs. Categories taxonòmiques.
Web: <http://www.isona.org/boletus%20seccio/professional/classificacio%20dels%20fongs.htm>
15. Colección FAO: Producción y protección vegetal N° 29, Roma, 2003. Web oficial de la FAO: <http://www.fao.org/docrep/007/x7660s/x7660s09.htm>

Bibliografía

16. El cereal y su importancia en la salud del ser humano. Cereales. Alimentos. Web: http://alimentacion.org.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=59:el-cereal-y-su-importancia-en-la-salud-del-ser-humano&catid=92:cereales&Itemid=54

17. En Buenas Manos (EBM). Portada. Nutrición. Cereales. El sorgo. El sorgo un cereal a tener en cuenta.

Web: <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=2802>

18. FAO. Depósito de Documentos: La Economía del Sorgo y del Mijo en el Mundo. Hechos, Tendencias y Perspectivas, 1997.

Web: <http://www.fao.org/docrep/W1808S/w1808s04.htm>

19. Horticulture and Landscape Architecture. Purdue University. Search crops.

Web: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/sorghum.html>

20. Manual sobre la aplicación del sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control en la prevención y control de micotoxinas). Web oficial de la FAO: <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y1390S/y1390s04.htm#TopOfPage>

21. RAMPHO.E.T. National Herbarium. Pretoria, January 2005.

Web: <http://www.plantzafrica.com/plantqrs/sorghum.htm>

22. Sporometrics resources. Fungal descriptions. Sterile mycelium. Web: <http://www.sporometrics.com/resources/fungal-descriptions/sterile-mycelium/>

23. Toxicología y Química legal. Guía de seminarios. Contenido segunda parte. Intoxicaciones alimentarias: Micotoxinas.

Web: www.biol.unlp.edu.ar/toxicologia/seminarios/parte_2/micotoxinas.html

9. ANNEXOS

9.1. COMPOSICIÓ I CARACTERÍSTIQUES DELS MEDIS DE CULTIU UTILITZATS

Els quatre tipus de medis de cultiu utilitzats es preparen al laboratori i s'aboquen a les plaques de petri per a poder utilitzar-los al procés.

S'empren els medis de cultiu DRBC I PDA per al creixement de floridures:

Composició (g/L) de DRBC (Dicloran Rosa de Bengala):

- Glucosa	7,5 g
- Peptona bacteriològica	0,75 g
- KH ₂ PO ₄	0,75 g
- MgSO ₄ - 7H ₂ O	0,375 g
- Agar	11,25 g
- Rosa de Bengala	18,75 mg
- Dicloran	1,5 mg
- Cloranfenicol	75 mg
- Aigua destil·lada	750 ml

Aquest medi té un pH a 25 °C d'entre 5,5 -5,8 el qual afavoreix el creixement d'*Aspergillus nigri*. Pot conservar-se 2 mesos entre 2-8 °C en plaques de petri.

Composició (g/L) de PDA:

- Extracte de patata	100 ml
- Glucosa	10 g
- Agar	6 g
- Aigua destil·lada	400 ml
- Cloranfenicol	50 mg

És un medi universal nutritiu per al creixement i l'aïllament de fongs.

Annexos

S'utilitzen els medis de cultiu CYA i CAM per a l'aïllament de les floridures a investigar:

Composició per 1L de CYA (*A.nigri*, *A.circumdati*) (Zapeck extracte d'Agar):

- K_2HPO_4 1 g
- Zapeck concentrat 10 ml
- Solució d'extracte de metall 1 ml
- Extracte de llevat 5 g
- Sacarosa 30 g
- Agar 15 g
- Aigua destil·lada 1L

Es fa servir solament per a la identificació de fongs.

També s'utilitza per al creixement de les soques aflatoxigèniques (*A.flavi* positius en la cabina de fluorescència)

Composició de Zapeck concentrat (100 ml):

- $NaNO_3$ 30 g
- KCl 5 g
- $MgSO_4 - 7H_2O$ 5 g
- $FeSO_4 - 7H_2O$ 0,1 g
- Aigua destil·lada 100 ml

Aquesta solució passa per un procés d'esterilització i s'ha d'agitar abans d'utilitzar

Composició de la solució d'extracte de metall (100 ml):

- $CuSO_4 - 5H_2O$ 0,5 g
- $ZnSO_4 - 7H_2O$ 1 g
- Aigua destil·lada 100 ml

També passa per un procés d'esterilització aquesta solució.

Composició per 1L de CAM (Coconut Agar Medium):

- Sacarosa	30 g
- (NH ₄)H ₂ PO ₄	10 g
- MgSO ₄ - 7H ₂ O	0,5 g
- K ₂ HPO ₄	1 g
- FeSO ₄ - 7H ₂ O	0,01 g
- HgCl ₂	0,135 g
- Agar	18 g
- Extracte de coco	100 ml
- Aigua destil·lada	900 ml

S'empra extracte de coco sense conservants ni additius.

9.2. NIVELLS MÀXIMS ESTABLERTS D'AFLOATOXINES I D'OCRATOXINA A EN ALIMENTS (LEGISLACIÓ EUROPEA)

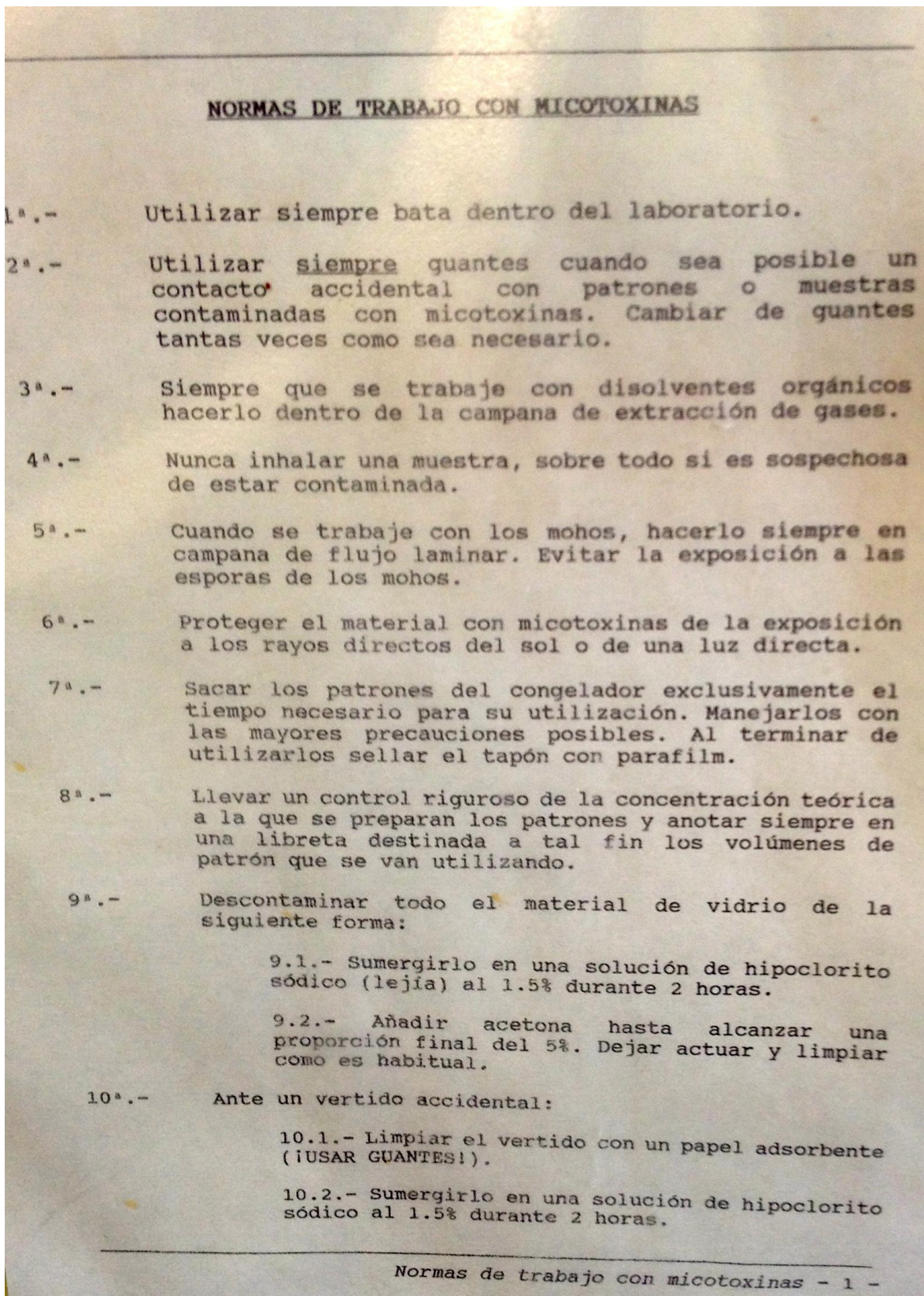
Sección 2: Micotoxinas

Productos alimenticios (1)		Contenidos máximos (µg/kg)		
2.1	Aflatoxinas	B ₁	Suma de B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂	M ₁
2.1.1	Cacahuets destinats a ser sotmetidos a un proceso de selecció, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	8,0 (2)	15,0 (2)	—
2.1.2	Frutos de cáscara destinats a ser sotmetidos a un proceso de selecció, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingredientes de productos alimenticios	5,0 (2)	10,0 (2)	—
2.1.3	Cacahuets y frutos secos y productos derivados de su transformación, destinats al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios	2,0 (2)	4,0 (2)	—
2.1.4	Frutos secos destinats a ser sotmetidos a un proceso de selecció, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo, o a ser usados como ingredientes en los productos alimenticios	5,0	10,0	—
2.1.5	Frutos secos y productos derivados de su transformación, destinats al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes de los productos alimenticios	2,0	4,0	—
2.1.6	Todos los cereales y todos los productos a base de cereales, incluidos los productos derivados de la transformación de cereales, a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.1.7, 2.1.10 y 2.1.12	2,0	4,0	—
2.1.7	Maíz destinado a ser sotmetido a un proceso de selecció, u otro tratamiento físico, antes del consumo humano directo o de su uso como ingrediente de productos alimenticios	5,0	10,0	—
2.1.8	Leche cruda (2), leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos	—	—	0,050

Productos alimenticios ⁽¹⁾		Contenidos máximos (µg/kg)		
2.1.9	Los siguientes tipos de especias: Capsicum spp. (frutos desecados, enteros o triturados, con inclusión de los chiles, el chile en polvo, la cayena y el pimentón) Piper spp. (frutos, con inclusión de la pimienta blanca y negra) Myristica fragrans (nuez moscada) Zingiber officinale (jengibre) Curcuma longa (cúrcuma)	5,0	10,0	—
2.1.10	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad ⁽²⁾ ⁽³⁾	0,10	—	—
2.1.11	Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación ⁽⁴⁾ ⁽⁵⁾	—	—	0,025
2.1.12	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ dirigidos específicamente a los lactantes	0,10	—	0,025
2.2	Ocratoxina A			
2.2.1	Cereales no elaborados	5,0		
2.2.2	Todos los productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano directo a excepción de los productos alimenticios enumerados en los puntos 2.2.9 y 2.2.10	3,0		
2.2.3	Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10,0		
2.2.4	Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5,0		
2.2.5	Café soluble (café instantáneo)	10,0		
2.2.6	Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol.) y vino de frutas ⁽⁸⁾	2,0 ⁽⁹⁾		
2.2.7	Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas ⁽¹⁰⁾	2,0 ⁽⁹⁾		
2.2.8	Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo ⁽¹¹⁾	2,0 ⁽⁹⁾		
2.2.9	Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad ⁽²⁾ ⁽³⁾	0,50		
2.2.10	Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ dirigidos específicamente a los lactantes	0,50		
2.2.11	Café verde, frutos secos distintos de las uvas pasas, cerveza, cacao y productos del cacao, vinos de licor, productos cárnicos, especias y regaliz	—		

Reglamento 1881/2006, de 19 de Diciembre de 2006, de la Comisión, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios

9.3. NORMES DE TREBALL AMB MICOTOXINES



- 10.3.- Añadir acetona hasta alcanzar una proporción final del 5%. Dejar actuar y desechar.
- 10.4.- Si el vertido ha tocado la piel, lavar la zona inmediatamente con lejía.
- 11ª.- Descontaminación de material biológico, patrones puros, micotoxinas en solución aceitosa y en solución acuosa:
- 11.1.- Añadir al menos un 3% de hipoclorito sódico homogeneizando la mezcla utilizando un agitador magnético o una batidora. Dejar actuar 2 horas.
- 11.2.- Diluir hasta alcanzar una proporción de hipoclorito sódico del 1.5% y añadir acetona hasta alcanzar el 5%. Dejar actuar y desechar.
- 12ª.- Descontaminación de micotoxinas en disolventes orgánicos:
- 12.1.- Evaporar hasta sequedad.
- 12.2.- Añadir una pequeña cantidad de metanol.
- 12.3.- Añadir al menos un 3% de hipoclorito sódico y dejar actuar 2 horas.
- 12.4.- Diluir hasta alcanzar una proporción de hipoclorito sódico del 1.5% y añadir acetona hasta alcanzar el 5%. Dejar actuar y desechar.
- 13ª.- Nunca añadir hipoclorito sódico para descontaminar un disolvente orgánico, sobre todo si es un disolvente clorado (→ emisión de gas cloro: ¡VENENO!).
- 14ª.- No destapar nunca bolígrafos o rotuladores con la boca, sobre todo si se cogen con los guantes puestos.
- 15ª.- Nunca pipetear con la boca un líquido sospechoso de estar contaminado.

-Document extret del laboratori de recerca on s'han fet les pràctiques

9.4. GUIA DE MATERIAL I MÈTODES UTILITZATS EN AQUESTS TIPUS D'INVESTIGACIONS

PROTOCOL A SEGUIR PEL TREBALL D'IDENTIFICACIÓ DE FONGS I MICOTOXINES:

1. Recuento de mohos en alimentos.¹

- a. A partir de la muestra sólida se realiza un banco de diluciones en un diluyente (peptona salina). Para ello se pesan, en condiciones de máxima asepsia, 10 gramos del alimento o grano en una balanza i se vierten en una bolsa de Stomacher. A esta bolsa se añaden 90 mL del diluyente para obtener la dilución madre. A partir de aquí, y siempre homogeneizando bien la muestra, se toman 1 mL de la mezcla y se pasa a un tubo con peptona salina y obtener una dilución 10 veces mas pequeña. Este proceso se realiza varias veces.
- b. A partir de cada tubo del banco de diluciones, se toman 0,1 ml y se pipetea en la superficie de una placa de medio de cultivo, extendiéndola con un asa de Drigalsky. EL medio/s de cultivo pueden ser Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Patata Glucosada (PDA) o/y Dicloran Rosa de Bengala.
- c. Las placas se incuban en una estufa de 25°C durante 5-7 días.
- d. LECTURA. Se anotan el número de colonias fúngicas y se calcula el recuento fúngico de las muestras.

2. Grado de infección de los alimentos

- a. El alimento/grano es sometido a un proceso para eliminar la carga fúngica que se encuentra en la superficie de él, y así permitir determinar los mohos que están infectando el grano. Para ello, se realiza una desinfección en una solución de hipoclorito sódico al 1% durante 2 minutos.

¹ Els apartats remarcats en color groc són els processos que s'han seguit en aquest estudi

A continuación se realiza dos lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar los restos de desinfectante.

b. Se colocan 5 de cada uno de los granos desinfectados en la superficie de placas de medio de cultivo. Los medios de cultivo utilizados son los comentados en el apartado anterior.

c. Las placas se incuban en una estufa de 25°C durante 5-7 días.

d. LECTURA. Se anotan el número de granos con presencia de colonias fúngicas y se expresa el porcentaje de infección fúngica de cada una de las muestras.

3. Identificación de los mohos

a. Los mohos detectados en las placas de cultivo de recuento (1) e infección (2) son sembrados en los medios de cultivo MEA y PDA.

b. Las placas de cultivo se incuban en una estufa de 25°C durante 5-7 días.

c. Se utilizan claves de identificación para la identificación a nivel de género y especie de los mohos aislados en los medios de cultivo.

4. Identificación por técnicas de Biología Molecular

a. Los aislados identificados por las técnicas clásicas son sometidos a un proceso de extracción del DNA.

b. El DNA de los aislados son sometidos a un proceso de PCR con la utilización de cebadores de las principales especies fúngicas para su identificación.

c. Realización de el gel de electroforesis que confirmen la especie fúngica.

5. Detección de la capacidad micotoxigénica de los aislados.

a. Los aislados identificados son sometidos a una siembra en medios específicos que permitan en condiciones óptimas la producción de las siguientes micotoxinas Aflatoxinas, Patulina, Ocratoxina A y Zearalenona. Las placas se incuban en una estufa de 25°C durante 5-7 días.

b. Los aislados son sometidos a un proceso de extracción con metanol para concentrar la toxina en un extracto que posteriormente será sometido a una identificación mediante técnicas de HPLC. Se utilizan patrones comerciales de las micotoxinas antes referenciadas que permitan cuantificar la producción de la toxina.

6. Interpretación de los resultados

a. Los resultados obtenidos con respecto a la presencia de mohos toxigénicos son sometidos a una discusión en base a una bibliografía existente que nos permitirá conocer el peligro potencial que tiene para la salud humana y animal su posible presencia en los alimentos.

b. Conclusiones. Se intentará extraer conclusiones acerca de la presencia de mohos en los alimentos.