

I. RESUM

L'ocratoxina A (OTA) és un metabolit secundari tòxic produït essencialment per fongs dels gèneres *Aspergillus* i *Penicillium*, sota diverses condicions. La seva presència en el cos humà es deguda a la ingestió de petites quantitats provingudes d'un ampli ventall d'aliments, tant d'origen vegetal com animal. Després dels cereals, el vi és l'element en la dieta europea que més contribueix a l'ingesta d'OTA.

L'OTA és una potent toxina que afecta principalment els ronyons, on pot provocar tant lesions agudes com cròniques. A part de la nefrotoxicitat, estudis toxicològics amb animals han demostrat que també té propietats genotòxiques, carcinogèniques i immunosupressives. A més, es sospita que és la causa d'una malaltia mortal per als humans observada en l'Europa de l'Est i coneguda com la 'Nefropatia Endèmica dels Balcans', així com de la formació de tumors en el tracte urinari d'humans.

Breument, els objectius del present treball són: (i) fer una valoració del nivell de contaminació per OTA en begudes espanyoles derivades del raïm i estudiar la possible influència de diverses variables en el contingut d'OTA de vins i productes derivats; (ii) estudiar la micoflora de diverses vinyes espanyoles durant quatre anys consecutius mitjançant mostrejos de camp, per tal d'aclarir on, quan i fins a quin punt existeix OTA en aquest país; (iii) identificar i estudiar l'efecte de diversos factors ecofisiològics i de les seves interaccions en fongs potencialment productors d'OTA aïllats de raïm de vinificació, per tal de trobar les condicions que puguin minimitzar o prevenir el seu creixement i la formació de la toxina. Es van dur a terme estudis addicionals per investigar, en primer lloc, els efectes *in vitro* de l'aplicació de fungicides en raïm, i tot seguit, l'efecte del diferents tractaments fungicides en raïm al camp. També s'ha aconseguit visualitzar la colonització i els primers estadis d'infecció d'*Aspergillus carbonarius* en raïm, amb l'ajut de la microscòpia de fluorescència làser confocal, epi- i estereomicroscòpia, després de transformar aquest fong amb el gen de la proteïna de fluorescència verda (*gfp*).

S'ha vist que prop d'un 20 % dels vins espanyols analitzats contenien OTA, la majoria a concentracions per sota dels límits establerts per la UE, i que els *Aspergillus* negres són els responsables de la producció d'aquesta toxina en aquest país, sobretot *Aspergillus carbonarius*. Malgrat el domini de les espècies de l'agregat *A. niger* en el raïm, i degut a la seva modesta capacitat de produir la toxina i a les baixes quantitats produïdes, la seva contribució al problema de l'OTA és ínfima. Les espècies uniseriades foren descartades en aquest aspecte, doncs no es va detectar toxina en cap de les soques aïllades.

Els *Aspergillus* negres foren presents en el raïm des del quallat fins a la collita, en la majoria de vinyes. Tanmateix, la seva incidència augmentà amb la maduració del raïm, doncs les altes temperatures i humitat afavoriren el desenvolupament i producció d'OTA d'aquests fongs. Es va demostrar l'habilitat d'*A. carbonarius* de créixer en l'interval 10-

45 °C i 0,88-0,995 d'activitat d'aigua (a_w), amb l'òptim al voltant de 30 °C i a les més altes a_w . Les condicions de temperatura favorables per a la producció d'OTA foren més restringides, essent 20 °C i les altes a_w les condicions òptimes. També s'estudiaren altres factors ecofisiològics com el país d'origen de les soques, les condicions de fotoperiode, l'alternança de temperatures, etc., doncs el coneixement dels factors que donen lloc a la producció d'OTA pot ajudar a dissenyar estratègies per limitar la seva formació.

En la part final d'aquesta tesi s'han suggerit diverses maneres de prevenir i controlar els *Aspergillus* negres i la seva micotoxina. Com que s'ha vist que la producció d'OTA per *Aspergillus* negres és òptima poc temps després de la seva inoculació, la reducció del temps de collita i transport al celler serà decisiva per reduir els nivells d'aquesta toxina. També s'ha de procurar minimitzar els danys en la pell del raïm, doncs s'ha vist que les obertures fomenten la entrada del fong que es troba colonitzant la superfície, probablement afavorint la màxima producció d'OTA. L'execució d'altres mesures preventives com el control de fongs patògens i d'insectes durant el creixement del raïm – es varen fer assaigs amb diversos fungicides *in vitro* i *in vivo*-, i d'altres bones pràctiques agronòmiques, poden ajudar a reduir la contaminació per OTA del raïm.

Com a conclusió general, s'ha vist que diversos factors poden ajudar a prevenir el desenvolupament dels fongs ocratoxigènics, però és necessari aplicar un sistema de mètodes combinats per tal de controlar el creixement i subseqüent producció d'OTA per aquests microorganismes. Les mesures preventives són sempre preferibles a les accions correctores, i junt amb un degut control de l'OTA en els derivats del raïm, asseguraran una adequada protecció del consumidor.

I. RESUMEN

La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario tóxico producido esencialmente por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, bajo diversas condiciones. Su presencia en el cuerpo humano es debida a la ingestión de pequeñas cantidades provenidas de un amplio abanico de alimentos, tanto de origen vegetal como animal. Después de los cereales, el vino es el elemento en la dieta europea que más contribuye a la ingesta diaria de OTA.

La OTA es una potente toxina que afecta principalmente los riñones, dónde puede provocar tanto lesiones agudas como crónicas. A parte de la nefrotoxicidad, estudios toxicológicos en animales han demostrado que también tiene propiedades genotóxicas, carcinogénicas e inmunosupresivas. Además, se sospecha que es la causa de una enfermedad mortal para los humanos observada en la Europa del Este y conocida como la ‘Nefropatía Endémica de los Balcanes’, así como de la formación de tumores en el tracto urinario de humanos.

Brevemente, los objetivos del presente trabajo son: (i) valorar el nivel de contaminación por OTA en bebidas españolas derivadas de la uva y estudiar la posible influencia de varias variables en el contenido de OTA de vinos y productos derivados; (ii) estudiar la micoflora de distintos viñedos españoles durante cuatro años consecutivos mediante muestreos de campo, para esclarecer dónde, cuándo y hasta qué punto existe OTA en este país; (iii) identificar y estudiar el efecto de varios factores ecofisiológicos y de sus interacciones en hongos potencialmente productores de OTA aislados de uva de vinificación, para encontrar las condiciones que puedan minimizar o prevenir su crecimiento y la formación de OTA. Se llevaron a cabo estudios adicionales para investigar en primer lugar los efectos *in vitro* de la aplicación de fungicidas en uva, seguido del efecto de diferentes tratamientos fungicidas en uva en el campo. También se ha conseguido visualizar la colonización y los primeros estadios de infección de *Aspergillus carbonarius* en uva, gracias a la microscopía de fluorescencia láser confocal, epi- y estereomicroscopía, después de transformar este hongo con el gen de la proteína de fluorescencia verde (*gfp*).

Se vio que aproximadamente un 20 % de los vinos españoles analizados contenían OTA, la mayoría a concentraciones por debajo de los límites establecidos por la UE, y que los *Aspergillus* negros son los responsables de la producción de esta toxina en este país, sobretodo *Aspergillus carbonarius*. Pese al dominio de las especies del agregado *A. niger* en la uva, y debido a su modesta capacidad de producir la toxina y a las bajas cantidades producidas, su contribución al problema de la OTA es ínfima. Las especies uniseriadas fueron descartadas en este aspecto, ya que no se detectó toxina en ninguna de las cepas aisladas.

Se detectaron *Aspergillus* negros en la uva desde el cuajado hasta la cosecha, en la mayoría de viñedos. No obstante, su incidencia aumentó con la maduración de la uva, pues las altas temperaturas y humedad favorecieron el desarrollo y producción de OTA por estos hongos. Se demostró la capacidad de *A. carbonarius* de crecer en el intervalo 10-45 °C y 0,88-0,995 de actividad de agua (a_w), con el óptimo alrededor de 30 °C y a las más altas a_w . Las condiciones de temperatura favorables para la producción de OTA fueron más restringidas, siendo 20 °C y las altas a_w las condiciones óptimas. También se estudiaron otros factores ecofisiológicos como el país de origen de las cepas, las condiciones de fotoperiodo, la alternancia de temperaturas, etc., pues el conocimiento de los factores que dan lugar a la producción de OTA pueden ayudar a diseñar estrategias para limitar su formación.

En la parte final de esta tesis se han sugerido varias maneras de prevenir y controlar los *Aspergillus* negros y su micotoxina. Como que se ha visto que la producción de OTA por los *Aspergillus* negros es óptima poco tiempo después de su inoculación, la reducción del tiempo de cosecha y transporte a la bodega será decisivo para reducir los niveles de esta toxina. También se ha de procurar minimizar los daños en la piel de la uva, pues se ha visto que las aperturas fomentan la entrada del hongo que se encuentra colonizando la superficie, probablemente permitiendo la máxima producción de OTA. La implementación de otras medidas preventivas como el control de hongos patógenos y de insectos durante el crecimiento de la uva –se ensayaron varios fungicidas *in vitro* e *in vivo*-, y de otras buenas prácticas agronómicas, pueden ayudar a reducir la contaminación por OTA de la uva.

Como conclusión general, se ha visto que varios factores pueden ayudar a prevenir el desarrollo de los hongos ocratoxigénicos, pero es necesario aplicar un sistema de métodos combinados para controlar el crecimiento y subsiguiente producción de OTA por estos microorganismos. Las medidas preventivas son siempre preferibles a las acciones correctoras, y junto con un debido control de la OTA en los derivados de la uva, asegurarán una adecuada protección del consumidor.

I. SUMMARY

Ochratoxin A (OTA) is a toxic secondary metabolite produced by moulds belonging essentially to the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, under diverse conditions. Its presence in the human body is due to the ingestion of small quantities present in a wide range of food commodities, both of vegetable and animal origin. Next to cereals, wine in the European diet is the second major source of OTA.

OTA is a potent toxin affecting mainly the kidneys, in which it can cause both acute and chronic lesions. Besides nephrotoxicity, toxicological studies on animals have demonstrated that it has mainly, genotoxicity, carcinogenicity and immunosuppressive properties. Furthermore, it is suspected to be a possible cause of the fatal human disease known as Balkan endemic nephropathy observed in South Eastern Europe, and of the urinary tract tumours in humans.

Briefly, the objectives of the present project are: (i) to assess the level of OTA contamination in Spanish grape-based beverages and to study the possible influence of several variables in the OTA content of wines and derivatives; (ii) to survey the mycoflora of several Spanish vineyards during four-year consecutive field samplings, in order to clarify where, when and to what extent OTA occurs in this country; (iii) to identify and study the effect of various ecophysiological factors and their interactions on potential ochratoxigenic fungi isolated from wine grapes, in order to find out the conditions that might minimize or prevent their growth and OTA formation. Additional studies to investigate, first the impact of application of fungicides to grapes *in vitro*, and later the effect of different fungicide treatments on grapes in the field, were carried out. Visualization of *Aspergillus carbonarius* grape colonization and early infection was also achieved with epi-, stereo- and confocal fluorescence microscopy, after the transformation of this fungus with the reporter green fluorescent protein gene (*gfp*).

It has been shown that nearly 20 % of the Spanish wines tested contained OTA, most of them at concentrations below the EU limits, and that black aspergilli are responsible for the production of this toxin in this country, mainly *A. carbonarius*. Despite *A. niger* aggregate species were dominant in grapes, because of their modest ability and low amounts produced, their contribution to the OTA problem is rather small. Uniseriate species were discarded as a source of OTA in the surveyed regions, as no toxin was detected in any of the isolates.

Black aspergilli were present on grapes from setting to harvest in most of the vineyards. However, their occurrence increased with grape maturity in the field, related to the fact that high temperature and humidity favoured black aspergilli development and OTA production. It was shown the growing ability of *A. carbonarius* in the range 10-45 °C and 0.88-0.995 of water activity (a_w), with an optimum around 30 °C and at the highest a_w .

Temperature conditions for OTA production were more restrictive, with optimum detected at 20 °C and at the highest water availability. Other ecophysiological factors such as the country of origin of the strains, photoperiod conditions, alternation of temperatures, etc. were also studied, as understanding the factors leading to OTA synthesis will enable strategies to limit its formation.

Several effective ways for prevention and control of black aspergilli and their dangerous mycotoxin have been suggested in the final part of this thesis. As OTA production by black aspergilli has been shown to occur optimally very early after inoculation, minimizing the harvesting and transport time to wine cellars might be crucial to reduce the toxin levels. Attention should also be paid in minimizing damages on grape skin, as it was shown that openings trigger the entrance of the fungi colonizing the berry surface, probably enabling production of maximum amounts of OTA. The implementation of other preventive measures such as controlling pathogenic fungi and insects during grape growing –some fungicides have been tested *in vitro* and *in vivo*-, and other good agricultural practices, may help in the reduction of OTA contamination in grapes.

As a general conclusion, several factors were found to help in the prevention of ochratoxigenic fungi development, but it may be necessary to apply a multiple barrier approach to control the growth and subsequent OTA production of these microorganisms. Prevention measures are always preferable to corrective actions, and together with a proper control of OTA in grape-derivatives, should ensure the adequate protection of the consumer.