

73970

PENA, GABRIELA ALEJA

Marcadores morfolo

2014

73970



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**MARCADORES MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y GENÉTICOS PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE *Aspergillus fumigatus* AISLADOS DE ALIMENTOS
PARA ANIMALES. GLIOTOXINA**

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

Mic. Gabriela Alejandra Pena

Directora: Dra. Lilia R. Cavaglieri

Co-director: Dr. Carlos Alberto Da Rocha Rosa

Miembros del Jurado:

Dra. Sofía N. Chulze

Dra. Ofelia Tapia

Dra. Virginia Fernández Pinto

Río Cuarto, 10 de marzo de 2014

7.9370

MFN:
Clasif:
T. 937

El presente trabajo fue realizado por la Mic. Gabriela Alejandra Pena en la orientación Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto. Es presentado como requerimiento para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas.



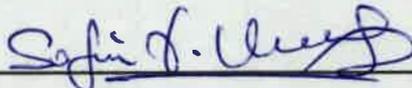
Tesista: Mic. Gabriela A. Pena



Directora: Dra. Lilia R. Cavaglieri

Co-director: Dr. Carlos Alberto da Rocha Rosa

APROBADA POR EL TRIBUNAL EVALUADOR



Dra. Sofia Noemí Chulze



Dra. Virginia Fernández Pinto

Dra. Ofelia Tapia

Río Cuarto, 10 de Marzo de 2014.

"Son cosas chiquitas. No acaban con la pobreza, no nos sacan del subdesarrollo, no socializan los medios de producción y de cambio, no expropián las cuevas de Alí Babá. Pero quizá desencadenen la alegría de hacer, y la traduzcan en actos. Y al fin y al cabo, actuar sobre la realidad y cambiarla, aunque sea un poquito, es la única manera de probar que la realidad es transformable".

E. Galeano

A mis papás

A Fer...

A TODOS LOS QUE SIEMPRE ME DIERON ÁNIMO, ME ACOMPAÑARON Y ME APOYARON EN CADA PASO QUE DÍ, A LOS QUE APORTARON SUS CONOCIMIENTOS, SU AMOR, SU PACIENCIA, SUS OÍDOS, SUS CONSEJOS, SUS VALORES.. **LES DEDICO ESTE PROYECTO Y LES AGRADEZCO DE CORAZÓN.**

Agradezco también a la Universidad Nacional de Río Cuarto por permitirme el uso de sus instalaciones para llevar a cabo esta investigación, a mis directores y a los miembros del jurado evaluador.

La contaminación fúngica de los alimentos para animales es uno de los problemas más frecuentes durante su elaboración, transporte y almacenamiento, y puede afectar la salud animal con graves pérdidas económicas. En los climas cálidos, los alimentos pueden contaminarse con especies del género *Aspergillus*, entre ellas *A. fumigatus*, una especie distribuida mundialmente, saprófita aunque puede ser patógeno oportunista del hombre y de los animales. En éstos, causa procesos respiratorios tales como rinitis alérgica en equinos y aspergillosis en pollos y pavos así como también mastitis clínica o subclínica en vacas, cabras y ovejas. La gliotoxina es la toxina más potente producida por esta especie; debido a sus efectos inmunosupresores, genotóxicos, citotóxicos y apoptóticos se cree que actúa como un factor de virulencia. En función de estos antecedentes, se evaluó la incidencia de las especies de la sección *Fumigati* en alimentos destinados a animales, la capacidad de producir gliotoxina, la ecofisiología de *A. fumigatus* sensu stricto y la variabilidad genotípica y fenotípica de cepas seleccionadas de *Aspergillus* sección *Fumigati*. Todas las muestras analizadas mostraron contaminación con al menos dos de los principales géneros toxicogénicos y de todas ellas, excepto de los alimentos terminados para cerdos, se aislaron cepas de dicha sección. El 61% de las cepas analizadas fue capaz de producir gliotoxina en amplios rangos de concentraciones, siendo las cepas aisladas de alimentos para perros y las de ensilaje de maíz las que produjeron la toxina en los rangos más amplios y las concentraciones más elevadas. El estudio de la ecofisiología de las cepas *A. fumigatus* Af16 y *A. fumigatus* RC2108, confirmadas como *A. fumigatus* sensu stricto mediante el secuenciamiento del gen *benA*, demostró que los parámetros que tuvieron mayor influencia en la fase de latencia y la velocidad de crecimiento a tensión normal de oxígeno fueron la temperatura y la actividad de agua (a_w); mientras que a tensión reducida de oxígeno y a 37 °C, el parámetro más influyente fue la a_w . La producción de gliotoxina fue diferente a lo encontrado al analizar el crecimiento de las cepas. El efecto de la interacción de todos los factores fue variable y la concentración más elevada se obtuvo bajo incubación a tensión normal de oxígeno por una cepa aislada de ensilaje de maíz. Se caracterizaron las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante la aplicación de marcadores moleculares neutros. Los RFLPs permitieron un rápido "screening" del conjunto de las cepas analizadas y demostraron que todas presentaron perfiles correspondientes a la especie *A. fumigatus* sensu stricto. Los marcadores RAPD evidenciaron variabilidad genética intra-específica y demostraron un 78% de similitud genética sugiriendo que las cepas estudiadas constituyen un grupo genéticamente homogéneo. Estos resultados fueron confirmados por secuenciamiento del gen de la β -tubulina y por análisis preliminar de máxima parsimonia. Los estudios estadísticos multivariados evidenciaron variabilidad fenotípica entre las cepas estudiadas, no obstante, no hubo asociación entre éstas y su origen de aislamiento. El presente trabajo aporta datos relevantes sobre la caracterización genética y fisiológica de especies epidemiológicamente importantes como *A. fumigatus* y especies relacionadas que colonizan los alimentos para animales en Argentina.

Fungal contamination of animal feeds is one of the most common problems during processing, transport and storage, and it can affect animal health with great economic losses. In warmer climates, feed may be contaminated with *Aspergillus* species such as *A. fumigatus*, a globally distributed fungus, saprophytic but an opportunistic pathogen to both human and animals. In animals, *A. fumigatus* produces respiratory processes such as equine allergic rhinitis and aspergillosis in chickens and turkeys as well as clinical or subclinical mastitis in cows, goats and sheep. The most potent toxin produced by this fungus is gliotoxin; due to their immunosuppressive, genotoxic, cytotoxic and apoptotic effects, it could be a virulence factor. Based on this background, the incidence of section *Fumigati* species in animal feedstuffs, the gliotoxin production ability, the *A. fumigatus* sensu stricto ecophysiology and the genotypic and phenotypic variability of selected strains of *Aspergillus* section *Fumigati* were evaluated. All analyzed samples were contaminated with at least two of the main toxigenic genera and from all the samples, except in finished feeds for pigs, *Aspergillus* section *Fumigati* strains were isolated. The gliotoxin production ability studies showed that 61% of the strains were able to produce the toxin in wide ranges of concentrations. The strains isolated from pet food and corn silage produced gliotoxin at the widest ranges and the highest concentrations. The ecophysiology studies of *A. fumigatus* Af16 and *A. fumigatus* RC2108 strains, which were confirmed as *A. fumigatus* sensu stricto by *benA* gene sequencing, showed that the most influencing parameters on the lag phase and growth rate at normal oxygen tension were the temperature and water activity (a_w), while at reduced oxygen tension and 37 ° C was the a_w . In general, gliotoxin production did not show a similar pattern to that found in growth assays. The effect of the interaction of all factors was varied and the highest concentration was obtained at normal oxygen tension by a strain isolated from corn silage. For genotypic studies, *Aspergillus* section *Fumigati* isolates were characterized by applying neutral molecular markers. The RFLPs allowed rapid "screening" of the assayed strains and showed that all of them had band profiles corresponding to *A. fumigatus* sensu stricto specie. Furthermore, RAPD markers showed intra-specific genetic variability but a 78% of genetic similarity between the strains was obtained suggesting that was a genetically homogeneous group. These results were confirmed by *benA* gene sequencing and preliminary analysis of maximum parsimony. Multivariate statistic studies showed phenotypic variability among *Aspergillus* section *Fumigati* isolates, however, there was no association between species and their origin of isolation. This study provides relevant data regarding genetic and physiological characterization of epidemiologically important species such as *A. fumigatus* and related species that colonize animal feeds in Argentina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

ATP: adenosina trifosfato.

a_w: actividad de agua.

C18: carbono 18.

CO₂: dióxido de carbono.

CTP: citidinaa trifosfato.

g: gramo.

GTP: guanosina trifosfato.

h: hora.

H₂O: agua.

ha: hectárea/s.

HPLC: cromatografía líquida de alta precisión.

HPLC-MS/MS: cromatografía líquida de alta precisión acoplado a espectrómetro de masas en tándem.

IGS: región espaciadora intergénica.

ITS: región espaciadora interna transcripta.

Kb: kilo base.

Kg: kilogramo.

kV: kilovoltio.

l: litro.

M: molar.

mg: miligramo.

min: minutos.

ml: mililitro.

mm: milímetros.

mM: milimolar.

ms: milisegundos.

N₂: nitrógeno gaseoso.

ng: nanogramo.

nm: nanómetro.

O₂: oxígeno gaseoso.

pb: pares de bases.

PCR - RT: reacción en cadena de la polimerasa - reversa transcriptasa.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PM: peso molecular.

R²: coeficiente de correlación lineal.

RAPD: polimorfismo en el ADN amplificado al azar.

RFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

tn: tonelada/s.

TTP: timidina trifosfato.

U: unidades enzimáticas.

UV: luz ultravioleta.

v/v: volumen en volumen.

V: voltio.

λ: lamda.

μg: microgramo.

μl: microlitro.

μm: micrómetro.

μM: micromolar.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1- Aspectos generales de la alimentación animal y su importancia en Argentina.....	1
1.1- Alimentación animal.....	1
1.2- Producción animal en Argentina.....	2
1.3- El departamento Río Cuarto.....	4
2- Contaminación fúngica de alimentos para animales y producción de micotoxinas.....	5
2.1- El género <i>Aspergillus</i>	6
2.1.1- Taxonomía e identificación.....	7
2.1.2- ¿Cómo definir una especie dentro del género <i>Aspergillus</i> ?.....	8
2.1.3- El enfoque polifásico como estrategia para la correcta identificación de las especies.....	9
2.2.- Sección <i>Fumigati</i>	11
2.3- <i>Aspergillus fumigatus</i> (sensu stricto).....	11
2.4- Micotoxinas.....	13
2.4.1- Micotoxinas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
2.4.1.1- Gliotoxina y sus efectos biológicos.....	14
2.5- Aspergilosis.....	16
3- <i>Aspergillus fumigatus</i> como contaminante de los alimentos destinados a la alimentación animal.....	17
3.1- Virulencia y patogenicidad.....	18
3.2- Consecuencias de la exposición de los animales a <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
4- El enfoque polifásico para la caracterización de <i>Aspergillus fumigatus</i> y especies relacionadas en la sección <i>Fumigati</i>	23
4.1- Los marcadores morfológicos para la identificación fúngica.....	23
4.2- Ecofisiología de hongos toxicogénicos.....	23
4.2.1- Parámetros ambientales que determinan el crecimiento y producción de micotoxinas.....	23
4.2.2- Influencia de los parámetros ambientales sobre el crecimiento de <i>Aspergillus fumigatus</i> y la producción de gliotoxina.....	24
4.3- Caracterización molecular de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	26

4.3.1- Generalidades.....	26
4.3.2- Marcadores moleculares neutros basados en PCR para la tipificación de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	26
4.3.2.1- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción.....	27
4.3.2.2- Polimorfismo de ADN amplificado al azar.....	29
4.3.3- Utilidad taxonómica de las secuencias de genes conservados para la identificación de especies. Secuenciamiento de genes de proteínas.....	31
4.4- Revisión taxonómica de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	32
5- Estudios fenotípicos y genotípicos para la caracterización de especies de la sección <i>Fumigati</i>	33
5.1- Estadística multivariada.....	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	36

SECCIÓN I

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Materiales.....	38
1.1- Medios de cultivo.....	38
1.2- Soluciones.....	39
1.3- Solventes.....	40
2- Métodos.....	40
2.1- Obtención de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	40
2.1.1- Aislamiento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> y análisis de la microflora de alimentos para animales.....	40
2.1.1.1- Origen y composición de las muestras.....	40
2.1.1.2- Recuento, aislamiento e identificación de la microflora contaminante.....	43
2.2- Identificación morfológica de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	43
2.2.1- Identificación según la clave taxonómica de Klich y Pitt (2002).....	43
2.2.2- Identificación morfológica según Samson y col. (2007).....	45
2.3- Estudio del perfil gliotoxicogénico de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	48
2.3.1- Cepas.....	48
2.3.2- Capacidad de producción de gliotoxina.....	48
2.3.3- Extracción.....	48

2.3.4- Detección y cuantificación por HPLC-MS/MS.....	49
2.3.5- Ensayos de recuperación, repetitividad y reproducibilidad del método.....	50
3- Mantenimiento de las cepas.....	51

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- Aislamiento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> y de la microflora acompañante a partir de alimentos destinados a animales.....	52
1.1- Recuentos fúngicos.....	52
1.2- Frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos aislados.....	54
1.3- Distribución de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> en los alimentos para animales.....	58
2- Identificación morfológica de aspergilos de la sección <i>Fumigati</i>	59
3- Capacidad de producción de gliotoxina por <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	61
3.1- Parámetros evaluados durante la puesta a punto del método cromatográfico.....	62
3.1.1- Curva de calibración y límites de detección y cuantificación.....	62
3.1.2- Ensayos de recuperación, repetitividad y reproducibilidad.....	62
3.2- Capacidad gliotoxicogénica.....	63

SECCIÓN II

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Evaluación del efecto de parámetros ambientales interactuantes sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por <i>Aspergillus fumigatus</i> sensu stricto.....	68
1.1- Materiales.....	68
1.1.1- Medios de cultivo.....	68
1.1.2- Soluciones.....	68
1.1.3- Solventes.....	68
1.2- Métodos.....	69
1.2.1- Incubación bajo atmósfera normal de oxígeno.....	69
1.2.1.1- Cepas.....	69
1.2.1.2- Medio de cultivo.....	69
1.2.1.3- Inoculación e incubación.....	70
1.2.1.4- Medición de los parámetros de crecimiento.....	70
1.2.1.5- Determinación de gliotoxina.....	71

1.2.1.5.1- Extracción de la toxina.....	71
1.2.1.5.2- Detección y cuantificación por HPLC.....	71
1.2.1.5.3- Detección y cuantificación por HPLC-MS/MS.....	72
1.2.2- Incubación bajo atmósfera reducida de oxígeno y 37 °C.....	74
1.2.2.1- Cepas.....	74
1.2.2.2- Medio de cultivo.....	74
1.2.2.3- Inoculación e incubación.....	74
1.2.2.4- Medición de los parámetros de crecimiento.....	75
1.2.2.5- Determinación de gliotoxina.....	75
1.2.2.5.1- Extracción de la toxina.....	75
1.2.2.5.2- Detección y cuantificación por HPLC.....	76
1.2.2.5.3- Detección y cuantificación por HPLC-MS/MS.....	76
1.2.3- Análisis estadístico de los datos.....	76
2- Identificación molecular a nivel de especie de las cepas incluidas en los estudios ecofisiológicos mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina.....	77
2.1- Materiales.....	77
2.1.1- Medio de cultivo.....	77
2.1.2- Soluciones y reactivos.....	77
2.1.2.1- Soluciones y reactivos utilizados para la extracción del ADN.....	77
2.1.2.2- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa.....	77
2.1.2.3- Reactivos utilizados para la amplificación del gen de la β -tubulina.....	78
2.2- Métodos.....	78
2.2.1- Cepas.....	78
2.2.2- Producción de la biomasa fúngica.....	78
2.2.3- Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico.....	79
2.2.4- Reacción de amplificación.....	79
2.2.5- Alineamiento de secuencias nucleotídicas.....	81
3- Mantenimiento de las cepas.....	83
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1- Evaluación del efecto de parámetros ambientales interactuantes sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por <i>Aspergillus fumigatus</i> sensu stricto.....	84

1.1- Influencia de la a_w , temperatura y pH sobre el crecimiento de las cepas bajo atmósfera normal de oxígeno.....	84
1.2- Influencia de la a_w , tensión de oxígeno, pH y sus interacciones sobre el crecimiento de las cepas a 37 °C.....	90
1.3- Efecto de la interacción de los diferentes factores de crecimiento sobre la producción de gliotoxina.....	96
2- Identificación a nivel de especie de las cepas incluidas en los estudios ecofisiológicos mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina.....	103

SECCIÓN III

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Caracterización fenotípica de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	106
1.1- Análisis estadístico multivariado.....	106
2- Marcadores moleculares para la caracterización de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	107
2.1- Materiales.....	107
2.1.1- Medio de cultivo.....	107
2.1.2- Soluciones y reactivos.....	107
2.1.2.1- Soluciones y reactivos utilizados para la extracción del ADN.....	107
2.1.2.2- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa.....	107
2.1.2.3- Soluciones y reactivos utilizados para la obtención de los marcadores moleculares PCR-RFLP.....	108
2.1.2.3.1- Reactivos utilizados para la amplificación del gen de la β -tubulina.....	108
2.1.2.3.2- Reactivos utilizados para la digestión del amplicón β -tubulina con la enzima de restricción <i>BccI</i>	108
2.1.2.3.3- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa.....	108
2.1.2.4- Soluciones y reactivos utilizados para la obtención de los marcadores moleculares RAPD.....	109
2.1.2.4.1- Reactivos utilizados para la reacción de PCR.....	109
2.1.2.4.2- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por	

electroforesis en gel de agarosa.....	109
2.2- Métodos.....	109
2.2.1- Caracterización de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> mediante marcadores moleculares generados por el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto de amplificación de β -tubulina.....	109
2.2.1.1- Cepas.....	109
2.2.1.2- Producción de la biomasa fúngica.....	110
2.2.1.3- Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico.....	111
2.2.1.4- Obtención de los marcadores moleculares PCR-RFLP.....	111
2.2.1.4.1- <i>In silico</i> PCR-RFLP.....	111
2.2.1.4.2- <i>In situ</i> PCR-RFLP.....	112
2.2.1.4.2.1- Amplificación de gen de la β -tubulina (<i>benA</i>).....	112
2.2.1.4.2.2- Digestión de los amplicones de β -tubulina con <i>Bccl</i>	113
2.2.1.4.2.3- Análisis de los resultados.....	113
2.2.2- Caracterización de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> mediante amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD).....	115
2.2.2.1- Determinación de la repetitividad y reproducibilidad de la técnica utilizando los cebadores PELF y URP1F.....	115
2.2.2.1.1- Cepas.....	115
2.2.2.1.2- Producción de la biomasa fúngica, extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico.....	115
2.2.2.1.3- Reacción de amplificación.....	116
2.2.2.1.4- Análisis de los resultados.....	117
2.2.2.2- Generación de los marcadores RAPD para la caracterización genética de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	118
2.2.2.2.1- Cepas.....	118
3- Identificación a nivel de especie de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina.....	120
3.1- Materiales.....	120
3.1.1. Soluciones y reactivos.....	120
3.2- Métodos.....	120
3.2.1- Cepas.....	120

3.2.2- Producción de la biomasa fúngica, extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico.....	120
3.2.3- Amplificación de gen de la β -tubulina (<i>benA</i>).....	121
3.2.4- Análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas.....	121
4- Mantenimiento de las cepas.....	122
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1- Caracterización fenotípica de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	124
2- Caracterización de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> mediante la aplicación de marcadores moleculares neutros.....	139
2.1- PCR-RFLPs.....	139
2.1.1- <i>In silico</i> PCR-RFLP.....	139
2.1.2- <i>In situ</i> PCR-RFLP.....	140
2.2- RAPDs.....	142
2.2.1- Determinación de la repetitividad y reproducibilidad de la técnica utilizando los cebadores PELF y URP1F.....	142
2.2.2- Generación de los marcadores RAPD para la caracterización genética de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	146
3- Confirmación del estado taxonómico a nivel de especie de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> mediante el secuenciamiento del gen parcial de la β -tubulina.....	151
CONCLUSIONES	155
PERSPECTIVAS FUTURAS	158
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO ESTADISTICA	176
ANEXO CEPAS	207

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Comparación de los perfiles de extrolitos producidos por <i>A. fumigatus</i> , <i>A. lentulus</i> y especies relacionadas en la sección <i>Fumigati</i>	12
Tabla 2. Cepas obtenidas de la Colección Micológica de la UNRC.....	41
Tabla 3. Esquema de muestreo y procedencia de los diferentes tipos de muestras de alimentos destinados a la alimentación animal.....	42
Tabla 4. Características macro- y microscópicas de <i>Aspergillus fumigatus</i> , según Klich y Pitt (2002).....	44
Tabla 5. Parámetros usados para investigar la producción de gliotoxina por HPLC-MS/MS.....	51
Tabla 6. Detalle del gradiente utilizado para la determinación de gliotoxina por HPLC-MS/MS.....	51
Tabla 7. Recuento fúngico en muestras de alimentos destinados a caballos, vacas, pollos, cerdos y perros y porcentaje de muestras que exceden el límite de calidad higiénica.....	53
Tabla 8. Repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio.....	63
Tabla 9. Capacidad gliotoxicogénica de cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> determinada por HPLC-MS/MS.....	64
Tabla 10. Mezcla de reacción para la amplificación del gen parcial de la β -tubulina.....	80
Tabla 11. Secuencias y cepas usadas en el análisis preliminar de parsimonia.....	82
Tabla 12. Significancia de la temperatura, a_w , pH y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa Af16.....	85
Tabla 13. Significancia de la temperatura, a_w , pH y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa <i>A. fumigatus</i> RC2108.....	85
Tabla 14. Efecto de la interacción de la temperatura, a_w y pH sobre la fase de latencia de las cepas de <i>A. fumigatus</i> sensu stricto en estudio.....	86

Tabla 15. Significancia estadística de la a_w , pH, tensión de oxígeno y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa Af16, a 37°C.....	91
Tabla 16. Significancia estadística de la a_w , pH, tensión de oxígeno y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa <i>A. fumigatus</i> RC2108, a 37°C.....	91
Tabla 17. Fases de latencia y velocidades de crecimiento de las cepas de <i>A. fumigatus</i> sensu stricto en medio de cultivo ARC al 3%, en función de la a_w , pH y tensión de oxígeno a 37 °C de incubación.....	93
Tabla 18. Significancia estadística de las cepas, días de incubación, temperatura, a_w , pH y sus interacciones sobre la producción de gliotoxina, a tensión de oxígeno normal...	97
Tabla 19. Significancia estadística de las cepas, tensión de oxígeno, días de incubación, a_w , pH y sus interacciones sobre la producción de gliotoxina, a 37°C.....	98
Tabla 20. Niveles de gliotoxina producidos por las cepas de <i>A. fumigatus</i> sensu stricto bajo las diferentes condiciones de temperatura, a_w , pH y días de incubación, a tensión normal de oxígeno.....	100
Tabla 21. Niveles de gliotoxina producidos por las cepas Af16 y <i>A. fumigatus</i> RC2108 bajo diferentes pH y días de incubación, a a_w 0,93 y 37 °C.....	101
Tabla 22. Cepas analizadas mediante la aplicación de los marcadores PCR-RFLP.....	110
Tabla 23. Secuencias y temperaturas de melting (T_m) de los cebadores β -tubulina utilizados.....	113
Tabla 24. Mezcla de reacción para la amplificación del gen de la β -tubulina.....	114
Tabla 25. Mezcla de reacción para la digestión de los amplicones β -tubulina con <i>Bccl</i> ...	114
Tabla 26. Secuencia y T_m (°C) de los cebadores utilizados.....	116
Tabla 27. Mezcla de reacción optimizada para la generación de los RAPDs.....	117
Tabla 28. Cepas caracterizadas a través de los marcadores genéticos RAPD.....	119
Tabla 29. Secuencias y cepas usadas en el análisis preliminar de parsimonia.....	123
Tabla 30. Macromorfología de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> en diferentes medios de cultivo, según el origen de aislamiento.....	125

Tabla 31. Micromorfología y fisiología (producción de gliotoxina) de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> en diferentes medios de cultivo, según el origen de aislamiento.....	126
Tabla 32. Variables de clasificación determinadas a las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> en función del origen de aislamiento.....	127
Tabla 33. Análisis de correlación entre las variables estudiadas.....	136
Tabla 34. Ejemplos de los patrones de restricción teóricos resultantes del análisis <i>in silico</i>	139
Tabla 35. Resultados obtenidos mediante BLAST.....	153

Anexo Estadística

Tabla 1. Análisis de la varianza de la variable cepa.....	176
Tabla 2. Test LSD de Fisher de los significancia individual de los diferentes parámetros de crecimiento sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de las cepas Af16 y <i>A. fumigatus</i> RC2108.....	176
Tabla 3. Efecto de la interacción entre la temperatura, a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento radial de las cepas <i>A. fumigatus</i> sensu stricto en estudio.....	177
Tabla 4. Test LSD de Fisher de los significancia individual de los parámetros de crecimiento sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de las cepas de <i>A. fumigatus</i> sensu stricto, a 37°C.....	178
Tabla 5. Test LSD de Fisher de los significancia individual de las cepas y los diferentes parámetros de crecimiento sobre la producción de gliotoxina, a tensión de oxígeno normal.....	179
Tabla 6. Test LSD de Fisher de los significancia individual de las cepas y los diferentes parámetros de crecimiento sobre la producción de gliotoxina a 37°C.....	180

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Regiones ganaderas de la República Argentina.....	3
Figura 2. Departamento Río Cuarto ubicado en el mapa de la provincia de Córdoba.....	4
Figura 3. Características microscópicas del género <i>Aspergillus</i> que permiten su identificación por taxonomía clásica.....	8
Figura 4. Esquema que muestra el conjunto de datos que pueden ser combinados en una clasificación taxonómica polifásica de un taxón de <i>Aspergillus</i>	10
Figura 5. Estructura molecular de la gliotoxina (PM: 326,4).....	16
Figura 6. Modelo del desarrollo de la AI.....	20
Figura 7. Esquema de obtención de los RFLP y su visualización por electroforesis.....	28
Figura 8. Origen del polimorfismo generado mediante los marcadores RAPD.....	30
Figura 9. Estructura del gen de la β -tubulina. Los cebadores Bt2a y Bt2b amplifican un fragmento de aproximadamente 550 pb en los miembros de la sección <i>Fumigati</i>	31
Figura 10. Macro y micromorfología (conidióforos) de colonias en MEA luego de su incubación a 25 °C durante 7 días. A: <i>A. fumigatus sensu stricto</i> , B: <i>A. lentulus</i> , C: <i>A. novofumigatus</i> , D: <i>A. fumigatiaffinis</i>	32
Figura 11. Esquema de inoculación para la identificación morfológica de aspergilos de la sección <i>Fumigati</i>	46
Figura 12. Frecuencia de aislamiento (%) de diferentes géneros fúngicos aislados a partir de ensilaje de maíz y alimentos terminados destinados a la alimentación de vacas lecheras.....	55
Figura 13. Frecuencia de aislamiento (%) de diferentes géneros fúngicos aislados de alimentos terminados destinados a la alimentación de pollos y cerdos.....	56
Figura 14. Frecuencia de aislamiento del género <i>Aspergillus</i> (%) aislados de alimentos destinados a la alimentación animal.....	57

Figura 15. Frecuencia de distribución de cepas de <i>A. fumigatus</i> aisladas a partir de diferentes alimentos para animales.....	59
Figura 16. Variabilidad en el color y los surcos de las colonias de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> . Cepas aisladas de alimento para perros (izq. arriba), ensilaje de maíz (der. arriba), alimento para chinchillas (izq. abajo) y alimento para caballos (der. abajo).....	60
Figura 17. Morfología de las colonias de una cepa de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> aislada de residuo de la industria cervecera para cerdos en los diferentes medios de cultivo y a las temperaturas de incubación.....	61
Figura 18. Cromatogramas HPLC-MS/MS de (A) solución testigo de gliotoxina (25 ng inyectados), (B) gliotoxina detectada en los extractos fúngicos de la cepa <i>A. fumigatus</i> RC2082 (origen de aislamiento: alimento para perros), (C) Gliotoxina no detectable en los extractos de la cepa <i>A. fumigatus</i> RC2139 (origen de aislamiento: ensilaje de maíz).	67
Figura 19. Confirmación del tiempo de retención de la gliotoxina mediante la técnica de co-inyección.....	72
Figura 20. Efecto de diferentes a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento (mm/h) de las cepas Af16 (izquierda) y <i>A. fumigatus</i> RC2108 (derecha) en medio de cultivo ARC al 3% a 37 °C.....	87
Figura 21. Efecto de diferentes a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento (mm/h) de las cepas Af16 (izquierda) y <i>A. fumigatus</i> RC2108 (derecha) en medio de cultivo ARC al 3% a 25 °C.....	88
Figura 22. Efecto de diferentes a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento (mm/h) de las cepas Af16 (izquierda) y <i>A. fumigatus</i> RC2108 (derecha) en medio de cultivo ARC al 3% a 18 °C.....	89
Figura 23. Efecto de diferentes niveles de pH y a_w sobre el crecimiento de la cepa Af16 (aislada de ensilaje de maíz) a los 5 días de incubación bajo atmósfera reducida de oxígeno y 37 °C.....	94
Figura 24. Resultado del BLAST correspondiente a la cepa Af16 (aislada de ensilaje de maíz para vacas lecheras).....	103

Figura 25. Resultado del BLAST correspondiente a la cepa <i>A. fumigatus</i> RC2108 (aislada de residuo de la industria cervecera para cerdos).....	104
Figura 26. Agrupamiento de las cepas en estudio inferido por el análisis de Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen de la β -tubulina.....	105
Figura 27. Biplot resultado del ACP de las variables morfomacrométricas según el origen de aislamiento de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	128
Figura 28. Biplot resultado del ACP de las variables morfomicrométricas, fisiológicas y de clasificación según el origen de aislamiento de las cepas.....	129
Figura 29. Biplot resultado del ACP de las variables macromorfométricas analizadas según las diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> estudiadas.....	130
Figura 30. Biplot resultado del ACP de las variables micromorfométricas, fisiológicas y de clasificación, según las cepas en estudio.....	131
Figura 31. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados de las diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> y sus orígenes de aislamiento.....	133
Figura 32. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados de las diferentes variables morfométricas, fisiológicas y de clasificación estudiadas en conjunto.....	134
Figura 33. Gel de agarosa del producto de amplificación de la β -tubulina.....	141
Figura 34. Gel de agarosa de los RFLP obtenidos luego de la digestión de los amplicones <i>benA</i> con <i>Bccl</i>	141
Figura 35. Perfiles RAPD con primer PELF de 7 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> analizadas.....	143
Figura 36. Perfiles RAPD con primer URP1F de 7 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> analizadas.....	144
Figura 37. Dendrograma de las cepas de referencia de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> generados por el software NTSYS utilizando el análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice.....	145
Figura 38. Perfiles RAPD con el cebador PELF de 34 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> analizadas.....	147

Figura 39. Perfiles RAPD con los cebadores PELF (A) y URP1F (B) de las 17 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> procedentes de Brasil (líneas 1-9 y 11-18) y de una cepa (AS19) aislada de alimentos para chinchillas (Argentina).....	148
Figura 40. Dendrograma de 70 cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> generados por el software NTSYS utilizando análisis de clusters UPGMA con el índice de similitud Dice...	150
Figura 41. Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de secuencias <i>benA</i> de las 14 cepas secuenciadas en este estudio (subrayadas) y de 42 secuencias <i>benA</i> disponibles en GenBank.....	154

INTRODUCCIÓN



1- Aspectos generales de la alimentación animal y su importancia en Argentina

1.1- Alimentación animal

En la producción animal aproximadamente entre el 60 y 90% de los costos totales están representados por costos de alimentación (FAO, 2004). Los productores se encuentran en la búsqueda constante de alternativas alimentarias que permitan mejorar los márgenes de ganancias. Se ha llegado así a la utilización de forrajes conservados por prácticas de ensilado y de subproductos de las industrias (un ejemplo es el residuo de la industria cervecera) como alternativas altamente energéticas y económicas que permiten cubrir los requerimientos nutricionales necesarios del animal. El objetivo de la alimentación animal es determinar la combinación óptima de los ingredientes disponibles para la formulación de raciones que cumplan determinadas condiciones. Así, en el caso de los animales de producción es fundamental que la ración proporcione todos los nutrientes que el animal necesita para conseguir un máximo rendimiento productivo en cuanto a la cantidad y calidad de los productos, su costo sea el más bajo posible y prevenga la aparición de trastornos digestivos o metabólicos. En el caso de animales de compañía no suele ser especialmente importante el costo de la alimentación, por lo que el objetivo básico de la ración es la prevención de trastornos para conseguir la mayor longevidad y bienestar del animal. (Flores Mengual y Rodríguez Ventura, 2014).

Dependiendo de la edad del animal y el propósito de su alimentación, se formulan diferentes dietas basadas, generalmente, en una misma composición pero variando los porcentajes de cada ingrediente. Fosfatos minerales, derivados animales, vitaminas y micronutrientes se mezclan con granos de cereales y otros componentes para lograr el alimento terminado. En la producción lechera es muy importante la administración de forrajes al ganado vacuno. Éstos contienen una alta proporción de fibra que contribuye a estimular la rumia y la salivación (importante para mantener un ambiente sano en el rumen), estimular la contracción y el ritmo de la salida de la digesta del rumen, que a su vez mejora la eficiencia del crecimiento de las bacterias en dicho órgano y evita la disminución de grasa en leche (resultado de dietas altas en concentrados). Generalmente, los forrajes se producen en los mismos establecimientos, pueden ser pastoreados directamente o cosechados y preservados como heno o ensilaje. Constituyen la fuente más económica de alimentos (Pinto de Almeida Castro, 2012).

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias acidolácticas (BAL) epífitas que se encuentran en el forraje a ensilar, fermentan los hidratos de carbono hidrosolubles, produciendo ácido láctico y ácido acético. De este modo el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Weinberg y Muck, 1996; Merry y col., 1997, Oude Elferink y col. 2001). La práctica del ensilaje permite conservar el estado físico del forraje de forma semejante al que presenta en el momento de la recolección. En Argentina, el uso de ensilajes ha cobrado mayor importancia en los últimos 20 años siendo una fuente de energía importante en las dietas para bovinos de carne y leche, ofreciendo la posibilidad de suministrar forraje durante todo el año.

La alimentación porcina y avícola generalmente se basa en la administración de alimentos balanceados; éstos constituyen la base de la dieta de la producción animal moderna. Las mezclas de alimentos y concentrados son principalmente producidas por molinos y en menor medida por grandes granjas. Los alimentos concentrados son mezclas de cereales (molidos o aplastados), utilizados para alimentar cerdos, pollos y rumiantes, pudiendo utilizarse solos o mezclados con forraje. Los ingredientes que se utilizan para producir estos alimentos le aportan un alto contenido proteico y graso.

1.2- Producción animal en Argentina

El sector agrícola-ganadero es el área que representa el mayor aporte al desarrollo económico del país. La producción de vacunos de carne y leche, porcinos, ovinos, caprinos, equinos y aves se distribuye a lo largo de las diferentes regiones del país, siendo la región pampeana la que concentra la mayor parte de los establecimientos de cría de bovinos y porcinos; sus óptimas condiciones agro-ecológicas la hacen la región ganadera por excelencia (Fig. 1).

En nuestro país, la producción de carne de cerdo ha incrementado notablemente en los últimos años, obteniéndose en 2012 una producción de 331000 tn. El consumo también continúa en ascenso; en 2013 se observó un incremento del 21,31% con respecto al año anterior. Actualmente, se consumen en promedio 10,01 kg por habitante por año

(kg/hab/año) (SAGPyA, 2013a). En cuanto a la participación de la carne porcina a nivel mundial, nuestro país produce el 0,32% del volumen total.

Con respecto a la producción de carne aviar, específicamente de pollos parrilleros, nuestro país se posiciona en el 9º lugar con 1600000 tn en 2012, lo cual representó el 2% del total producido a nivel mundial. Se observa una tendencia creciente a la incorporación de tecnología (automatización de las granjas) y una reorganización productiva que ha mejorado sustancialmente la competitividad del sector (Ministerio de Industria, 2012).

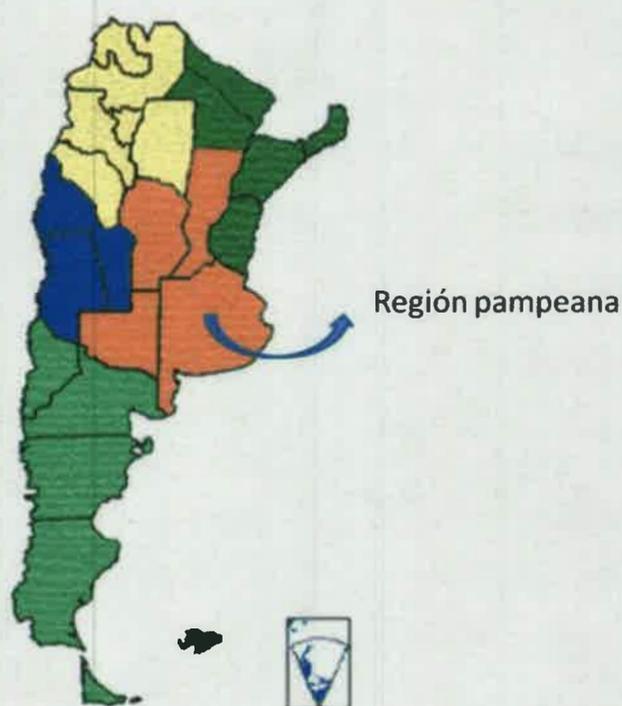


Figura 1. Regiones ganaderas de la República Argentina. Región pampeana (■), región del noreste argentino (■), región del noroeste argentino (■), región semiárida (■) y región patagónica (■).

Otro sector productivo de gran importancia en nuestro país es el lechero, el cual representa un entramado productivo de larga tradición que por su envergadura y dispersión geográfica tiene un gran impacto social y regional. En la actualidad representa cerca del 15% de la producción total de alimentos y bebidas del país y genera más de 85000 puestos directos de trabajo entre la producción primaria, la industrialización y las actividades relacionadas con la logística y distribución (Ministerio de Industria, 2012).

Según datos de la SAGPyA, en 2013 se produjeron 11338 millones de litros de leche fluida. El consumo local ha aumentado a 216 l/hab/año debido a mejoras macroeconómicas. Se consumen en promedio 43,88 l/hab/año de leche fluida y 29,75 Kg/hab/año de derivados lácteos (promedio año 2012). Las cuencas lecheras se ubican en centro y sur de Córdoba, centro y sur de Santa Fe, centro y sur de Entre Ríos, Buenos Aires (cuenca Abasto, norte y sur y Mar y Sierra, oeste) y este de la Pampa (SAGPyA, 2013b).

1.3- El departamento Río Cuarto

Ubicado al oeste de la región pampeana limitando con la región semiárida, se encuentra el departamento Río Cuarto (Fig. 2), el de mayor importancia en la provincia de Córdoba en cuanto a producción agrícola-ganadera. Según el último censo agropecuario nacional, en 2008 el Departamento Río Cuarto poseía 5987 explotaciones agropecuarias (correspondientes al 11,5 % de las explotaciones de la provincia) sobre una superficie de 1861684 ha, de las cuales el 66% estaban destinadas a la ganadería (Sociedad Rural de Río Cuarto, 2014).

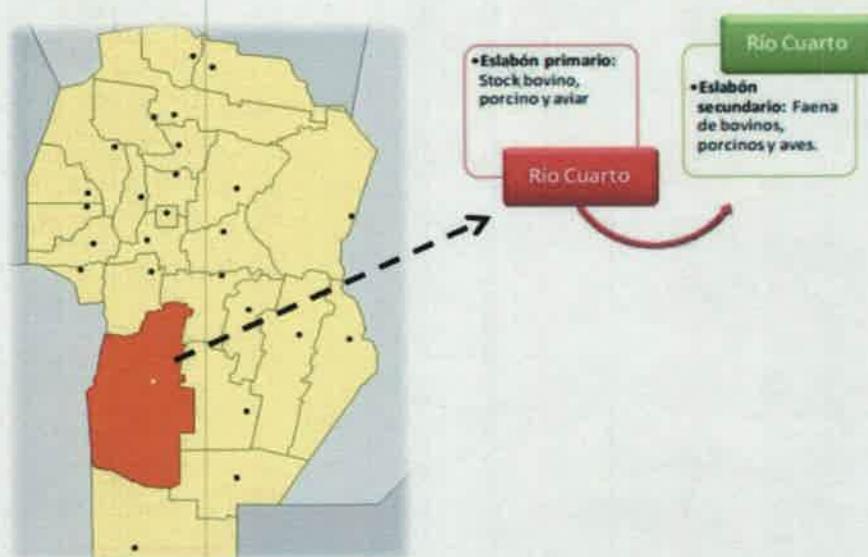


Figura 2. Departamento Río Cuarto (naranja oscuro) ubicado en el mapa de la provincia de Córdoba.

2- Contaminación fúngica de los alimentos para animales y producción de micotoxinas

La contaminación fúngica de los alimentos destinados a animales es uno de los problemas más frecuentes durante su elaboración, transporte y almacenamiento. En muchas ocasiones las condiciones climáticas adversas y el manejo deficiente de los procesos son responsables de una mala conservación del alimento que lleva al desarrollo indeseable de hongos filamentosos y levaduras (Gedek y col., 1981). Dicha contaminación puede afectar la salud animal con pérdidas económicas graves en los productos de carne y leche.

Los hongos filamentosos son los agentes biológicos de mayor tolerancia a las bajas actividades de agua (a_w) y por lo tanto, capaces de colonizar granos y alimentos balanceados, presentando una gran influencia en los ecosistemas de almacenamiento como agentes de deterioro (CAST, 2003). El aislamiento y la identificación de la micoflora contaminante a partir de diferentes sustratos, son prácticas esenciales para el control de la calidad higiénica y sanitaria de las materias primas y/o productos que son susceptibles a la colonización por una variedad de especies fúngicas. Cuando las condiciones ambientales no favorecen el desarrollo de los hongos, los granos pueden llegar a la cosecha sin contaminación apreciable, pero manteniendo toda la carga de esporas fúngicas adquirida durante el crecimiento en el campo. Esto significa que el peligro de deterioro fúngico o contaminación con sus toxinas continuará presente durante todo el período de post-cosecha. Es por ello que el almacenamiento de granos y alimentos para animales es un punto crítico en la trazabilidad de los mismos, porque a menos que se adopten todos los recaudos para impedir que se acumule humedad, aumente la temperatura o se prevenga el ataque por insectos, inevitablemente se producirán condiciones favorables para el desarrollo fúngico (Barberis, 2009). Dicha contaminación fúngica ocasiona una disminución significativa de la calidad de los alimentos debida a la alteración de las características organolépticas (mal olor, sabor y aspecto) y al consumo de los nutrientes, produciendo el deterioro y reducción de su contenido nutritivo. La presencia de estos microorganismos provoca en los animales el rechazo del alimento, aumento del índice de conversión por una deficiencia nutritiva y energética, y problemas de micosis y micotoxicosis (CAST, 2003). En los climas más cálidos, los cereales pueden contaminarse con especies tales como *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. sydowii*, *A.*

terreus y *A. versicolor*, asociadas normalmente con el almacenamiento de alimentos destinados al consumo animal (Lacey, 1991). Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de humedad del sustrato, la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica antes del almacenamiento y la actividad de insectos y ácaros que facilitan la diseminación.

En el caso del ensilaje, los hongos pueden desarrollarse en cualquier sitio donde encuentren oxígeno. En un ensilaje de buena calidad esto ocurre sólo al inicio del almacenamiento y se restringe a la capa exterior de la masa ensilada. Pero si las condiciones de almacenamiento no son buenas, es decir, si por ejemplo se rompe la cubierta y se produce la entrada de aire o agua, durante el deterioro aeróbico todo el material puede ser invadido por hongos. Las especies que se aíslan con mayor frecuencia a partir del ensilaje de maíz pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (El-Shanawany y col., 2005; Garon y col., 2006; Richard y col., 2007; Alonso y col., 2013; González Pereyra y col., 2011) y *Mucor* (Khosravi y col., 2008; Reyes-Velázquez y col., 2008). También especies como *Byssoschlamys nivea* y *Monascus ruber*, son frecuentes en estos sustratos. Hongos pertenecientes a otros géneros también colonizan el ensilaje aunque su incidencia es menor (Richard y col., 2007, Bíro y col., 2009). Las condiciones de microaerofilia y pH moderadamente bajo que ocurren dentro del silo pueden inhibir el desarrollo de *Fusarium*. No obstante, especies como *A. fumigatus*, *Penicillium roqueforti* y *B. nivea* están adaptados a dichas condiciones y pueden sobrevivir en el ensilaje. Por lo tanto, su incidencia en estos sustratos es elevada (El-Shanawany y col., 2005; Richard y col., 2007; Keller y col., 2012).

2.1- El género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* pertenece a los *Hyphomycetes* e incluye más de 260 especies que pueden crecer sobre un amplio rango de sustratos naturales (maderas, textiles, medicamentos, granos de cereales y frutos oleaginosos) en climas tropicales y subtropicales, encontrándose en mayor abundancia entre las latitudes 26° a 35° norte o sur del ecuador (Pitt y Hocking, 1997; Klich y Pitt, 2002). Este género reviste particular importancia debido a que posee especies capaces de desarrollar y producir metabolitos a bajas a_w y altas temperaturas (Moss, 1991). Además, poseen gran versatilidad metabólica

y habilidad para dispersar sus esporas en el ambiente. Varias de estas especies son importantes como patógenos humanos y animales (alergénicas y toxicogénicas representando un riesgo potencial para su salud), agentes de deterioro de alimentos y productores de metabolitos tóxicos. No obstante, otras poseen cualidades benéficas y tienen aplicaciones biotecnológicas (Pitt y Hocking, 1997; Varga y Samson, 2008; Samson y col., 2004a).

2.1.1- Taxonomía e identificación

Hasta hace unos años, el género *Aspergillus* se encontraba dividido en 6 subgéneros, cada uno con una o más secciones que incluían aproximadamente 200 especies (Pitt y Hocking, 1997; Klich y Pitt, 2002). Características microscópicas tales como: tamaño y forma de las cabezas conidiales, morfología de los conidióforos, fiálides y métulas, y presencia de células de Hülle y de esclerocios, combinadas con otras características primarias y secundarias constituyeron la base para la taxonomía clásica del género *Aspergillus* (Fig. 3). Su sistemática ha sido estudiada durante años por numerosos taxonomistas. No obstante, aún continúa en revisión (Samson y Varga, 2009). Los estudios más importantes se basan estrictamente en caracteres fenotípicos, lo cual ha provocado errores en la literatura, especialmente en lo referido a la producción de micotoxinas (Samson y col., 2006).

En los últimos años, el número de especies reconocidas de *Aspergillus* se ha modificado en base a la construcción de filogenias a partir de secuencias de genes conservados y a la aplicación del concepto filogenético de especie (Pitt, 2000; Samson y col., 2006). Recientemente, se han descrito más de 40 taxones nuevos dentro del género, se propuso una nueva división en 8 subgéneros y 22 secciones y se incluyeron más de 260 especies (Geiser y col., 2007; Peterson y col., 2008).

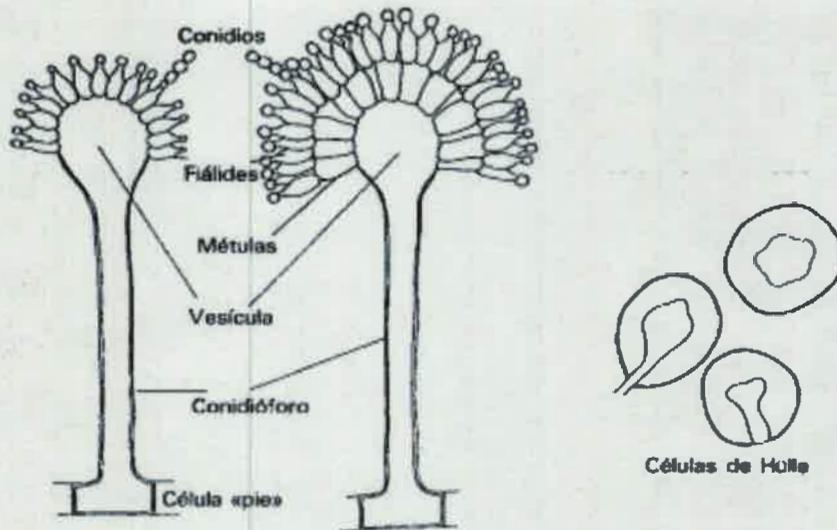


Figura 3. Características microscópicas del género *Aspergillus* que permiten su identificación por taxonomía clásica. El conidióforo de la izquierda presenta solo fiálides y es, por lo tanto, **uniseriado**. Mientras que el de la derecha es **biseriado** ya que posee métulas y fiálides.

2.1.2- ¿Cómo definir una especie dentro del género *Aspergillus*?

El concepto de especie morfológica, biológica y filogenética

El concepto de **especie morfológica** o fenotípica (Hey, 2001; Tibayrenc, 2006) se basa en la similitud de caracteres morfológicos (y usualmente fisiológicos) observables, como por ejemplo forma y tamaño de esporas o características culturales. En base a estos caracteres morfológicos la mayoría de las especies de *Aspergillus* fueron originalmente descritas por Raper y Fennell (1965). Vale la pena señalar que la mayoría de ellas resultaron ser las especies correctas cuando se aplicaron, años más tarde, otros enfoques para su reclasificación (Samson y Varga, 2009). Una **especie filogenética** corresponde a un grupo monofilético, compuesto por el menor conjunto diagnosticable de organismos individuales dentro del cual existe un patrón parental de ascendencia y descendencia. Mientras que el concepto de **especie biológica** se refiere a aquellas poblaciones cuyos miembros son capaces de entrecruzarse libremente bajo condiciones naturales. Este

concepto asume que los miembros de la misma especie son sexualmente fértiles, que se cruzan entre y sí y dan progenie viable y fértil. Para la definición de especies en el género *Aspergillus*, este último concepto presenta valor limitado, debido a que solo puede ser aplicado a especies heterotálicas. En respuesta a la constante introducción de tecnología molecular, existe una asidua tendencia a sobrevaluar la contribución de criterios (filo)genéticos para la descripción de las especies. Sin embargo, no existe ningún método (morfológico, fisiológico o molecular) que por sí solo funcione a la perfección en el reconocimiento de las mismas. En consecuencia, se ha propuesto un **enfoque polifásico** de clasificación de especies con el objetivo de integrar diferentes tipos de información (datos fenotípicos, genotípicos y fisiológicos) para lograr un consenso en la taxonomía.

2.1.3- El enfoque polifásico como estrategia para la correcta identificación de las especies

Los caracteres moleculares proporcionan el mayor número de características variables para la taxonomía de hongos. Sin embargo, la descripción de las especies debe incluir datos del mayor número de fuentes como sea posible, de los cuales la morfología, fisiología (crecimiento a diferentes temperaturas y a_w , crecimiento en agar sacarosa-creatina), y los datos moleculares, pueden ser utilizadas no sólo como herramientas para la identificación de un aislado, sino también para comprender su biología (Geiser y col., 2007) (**Fig. 4**). Se recomienda combinar al menos dos de estas técnicas independientes para caracterizar *Aspergillus* según un enfoque polifásico. Los metabolitos secundarios se pueden utilizar en el reconocimiento de las especies debido a que tienen gran especificidad de especie (Frisvad y col., 1989; Larsen y col., 2005). Prácticamente todas las especies de *Aspergillus* producen una combinación única de diferentes tipos de metabolitos (**Tabla 1**). Para la descripción de especies es recomendable examinar varias secuencias de genes (2-3) (por ejemplo ITS, calmodulina, β -tubulina y actina) y remitirse a las bases de datos. En cuanto a los extrolitos, se sugiere utilizar un conjunto de 4-8 compuestos, en lugar de una sola molécula (Samson y Varga, 2009).

Actualmente, este método de clasificación, se utiliza para la delimitación de taxones a todos los niveles (Hong y col., 2006). En algunos casos, la clasificación consenso

contiene un mínimo de contradicciones. Se cree que más parámetros estarán disponibles en el futuro que conferirán estabilidad a este enfoque de clasificación. En principio, toda la información filogenética, fenotípica y genotípica puede ser incorporada en la taxonomía polifásica (Samson y Varga, 2009).

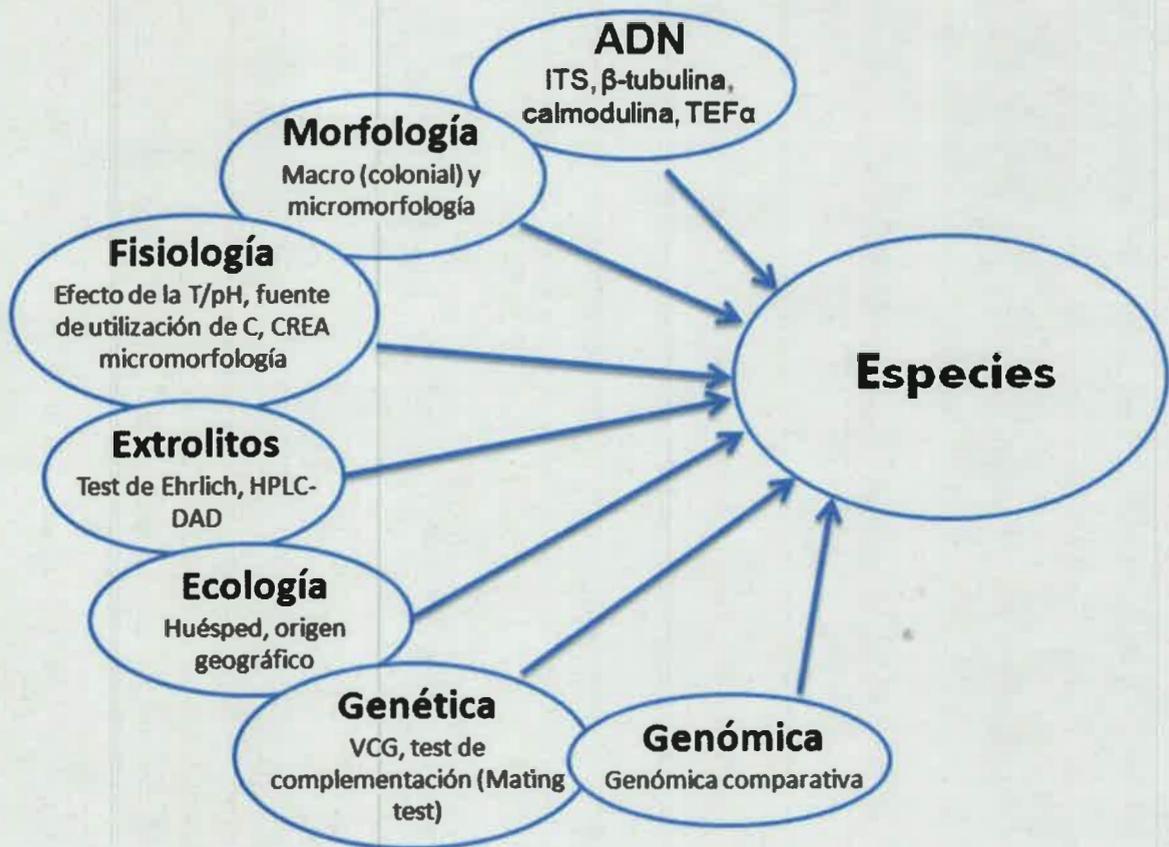


Figura 4. Esquema que muestra el conjunto de datos que pueden ser combinados en una clasificación taxonómica polifásica de un taxón de *Aspergillus*. (Adaptado al español de Samson y Varga, 2009).

2.2.- Sección *Fumigati*

Aspergillus sección *Fumigati* incluye especies que se caracterizan por ser uniseriadas, presentar cabezas conidiales columnares en tonos verdosos y vesículas en forma de frasco (Klich y Pitt, 2002). Las especies teleomórficas fueron ubicadas en el género *Neosartorya* (familia *Trichocomaceae*) por Malloch y Cain (1972). Varias especies de esta sección son de gran relevancia debido a que pueden ser patogénicas o alérgicas para el hombre y los animales, causar deterioro de alimentos y producir micotoxinas. Una especie particularmente importante es *A. fumigatus*, ya que es el principal patógeno oportunista causante de aspegilosis y otras enfermedades pulmonares en pacientes inmunocomprometidos (Marr y col., 2002; Hong y col., 2005).

Actualmente, la sección *Fumigati* cuenta con un total de 33 especies, 10 anamórficas (*Aspergillus*) y 23 especies de *Neosartorya* (homotálicas y heterotálicas), designadas en base a taxonomía polifásica (Samson y col., 2007).

2.3- *Aspergillus fumigatus* (sensu stricto)

Aspergillus fumigatus es un hongo distribuido mundialmente, saprófito y patógeno oportunista del hombre y de los animales. Su función ecológica primaria es la de reciclar carbono y nitrógeno al medioambiente (Wilson y col., 2002; Tekaia y Latgé, 2005), no obstante, es responsable de micotoxícosis, reacciones alérgicas y de una enfermedad pulmonar mortal llamada aspergilosis invasiva (AI) en individuos inmunocomprometidos. Estos individuos poseen mecanismos de defensa inmune (innata y adquirida) insuficientes, resultando en altas tasas de mortalidad (Stanzani y col., 2005; Woo Bok y col., 2006). También puede causar aspergilosis broncopulmonar alérgica y aspergilomas en este grupo de individuos. Este hongo es de gran importancia para la salud pública, debido a que es capaz de producir micotoxinas tremorgénicas e inducir síndromes neurológicos en personas que manipulan alimentos contaminados, tanto en plantas de producción de alimentos balanceados como para trabajadores rurales (Gordon y col., 1993; Pitt, 1994).

En animales, *A. fumigatus* causa procesos respiratorios como rinitis alérgica en equinos (Guida y col., 2005) y aspergilosis en pollos y pavos (Lair-Fulleriger y col., 2003; Arné y

col., 2011) así como también mastitis clínica o subclínica en vacas, cabras y ovejas (Aller Gancedo y col., 2000).

Tabla 1. Comparación de los perfiles de extrolitos producidos por *A. fumigatus*, *A. lentulus* y especies relacionadas en la sección *Fumigati*.

Extrolitos	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus lentulus</i>	<i>Aspergillus fumigatiaffinis</i>	<i>Aspergillus novofumigatus</i>	<i>Neosartorya fischeri</i>
Acido ciclopiazónico	-	+	-	-	-
Acido helvólico	+	-	+	+	+
Alcaloides del indol apolares	-	-	-	+	-
Aszonalenina	-	-	-	+	+
Aurantina	-	+	+	-	-
Cicloequinulina	-	-	+	+	-
Indol dimétrico	-	+	-	-	-
Fiscalinas	-	+	-	+	+
Fischerina	-	-	-	-	+
Fumagilina	+	-	-	-	-
Fumiclavinas	+	-	+?	-	-
Fumigatina	+/-	-	-	-	-
Fumitremorginas y Verruculogeno	+	-	-	-	+
Fumiquinazolinas	+	-	-	-	-
Gliotoxina	+	-	-	-	-
Neosartorina	-	+	+	+	+
Palitantina	-	-	+	+	-
Poliquétidos apolares	-	-	-	+	-
Pseurotinas	+	-	-	-	-
Pyrypiropenos	+	+	+	-	+
Terreina	-	+	-	+	-
Territrem B	-	-	-	+/-	-
Tripacidina	+	-	-	-	+
Triptoquivalinas y Triptoquivalonas	+	+	+	-	+
Compuestos desconocidos	-	-	+	+	-

* Determinados por espectro de UV. Adaptado al español de Hong y col. (2005).

2.4- Micotoxinas

Se puede definir a las micotoxinas como metabolitos fúngicos secundarios cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, causa la enfermedad o muerte del hombre y los animales (Wilson, 1995; Pitt y Hocking, 1997). Esta definición es un tanto arbitraria, ya que no todos los compuestos tóxicos producidos por hongos son micotoxinas (Bennett y Klich 2003; Frisvad y col., 2007). Aquellos metabolitos fúngicos que son activos contra bacterias, protozoos y animales inferiores incluyendo los insectos, quedan excluidos, además de las toxinas de hongos *Basidiomycetes* debido a que éstas son ingeridas por el consumo de los cuerpos fructíferos, un problema diferente a la ingestión de toxinas producidas por "micro-hongos". La definición de "micro-hongos" no es rigurosa, pero debe entenderse como referida principalmente a los *Ascomycetes*, incluidos aquellos a los que no se les conoce aún su estado sexual (Hocking y col., 2006).

La incidencia de las micotoxinas en la producción animal, representa uno de los mayores problemas que preocupa a este sector agroproductivo. El consumo de alimentos contaminados, ocasiona una drástica reducción de la productividad caracterizada por una disminución de la velocidad de crecimiento y una baja eficiencia alimentaria en animales de producción (Osuna, 1989). Esta influencia negativa se debe principalmente a interferencias que las micotoxinas producen sobre diversos sistemas enzimáticos ligados al proceso digestivo y del metabolismo de los nutrientes, así como del sistema inmunosupresor (Reddy y col., 1982). Efectos aditivos o sinérgicos de distintas combinaciones de micotoxinas son bien conocidos tanto *in vitro* (Tammer y col., 2007) como *in vivo* (Domijan y col., 2007), aunque también se han informado efectos antagónicos (Wangikar y col., 2005). Los factores que determinan su producción son: la resistencia genética del cultivo, las condiciones climatológicas caracterizadas por altas temperaturas y alta humedad relativa, condiciones de transporte y almacenamiento inadecuado y secado deficiente (Wood, 1992). Por lo tanto, la contaminación del producto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena alimenticia ya sea durante la cosecha, recolección, almacenaje, transporte y/o conservación.

Las micotoxinas son producidas por un diverso número de especies fúngicas que pertenecen principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* e inciden directamente en la industria agroalimentaria (Kale y Bennet, 1992; Bragulat y col.,

1995; Pitt, 2002). Los alimentos más susceptibles a la contaminación fúngica además de los cereales son el maní y otras semillas, así como también las harinas mal procesadas de subproductos animales almacenadas en locales húmedos, utilizadas como materias primas en la elaboración de raciones para la alimentación de cerdos, bovinos y otros animales. Además de los cereales, los forrajes también hacen su aporte a la contaminación con micotoxinas de las raciones animales. Tanto forrajes procesados secos, como los fardos de alfalfa, o fermentados, como los ensilajes, pueden ser sustrato de hongos productores de micotoxinas.

2.4.1- Micotoxinas de *Aspergillus fumigatus*

La principal micotoxina producidas por *A. fumigatus* es la gliotoxina entre otras como el *verruculogeno*, que tiene actividad tremorgénica y genotóxica (Land y col., 1987; Sabater-Vilar y col., 2003), la *fumagilina*, un inhibidor de la angiogénesis no usado terapéuticamente debido a su alta citotoxicidad y genotoxicidad (Ingber y col., 1990; Amitani y col., 1995), y el *ácido helvólico*, un esteroide antibiótico que también posee actividad citotóxica. Éstas junto con otras toxinas producidas por esta especie (*fumiclavina C* y *aurasperon C*) parecen tener efectos aditivos y/o sinérgicos (Amitani y col., 1995).

2.4.1.1- Gliotoxina y sus efectos biológicos

La gliotoxina es la toxina más potente producida por *A. fumigatus* y la principal en importancia toxicológica en los animales (Dos Santos y col., 2002, Kwon-Chung y Surgui, 2009). En los últimos años ha recibido particular atención debido a sus efectos inmunosupresores, genotóxicos, citotóxicos y apoptóticos (Waring y col., 1988; Nieminen y col., 2002; Upperman y col., 2003). Esta micotoxina también es producida por otras especies fúngicas tales como *A. terreus* y *A. niger* (kosalec y col., 2005), *Candida albicans* (Bertling y col., 2010), entre otras. Pertenece a la familia de las epipolítiodioxopiperazinas, que se caracterizan por la presencia de un puente disulfuro en el anillo de piperazina que es esencial para su toxicidad (Gardiner y Howlett, 2005) (Fig. 5).



Esta toxina exhibe varios roles inmunosupresivos incluyendo inhibición de la fagocitosis por macrófagos, inhibición de la proliferación de células T activadas por mitógenos y de la respuesta citotóxica de estas últimas, además de la apoptosis de macrófagos (Yamada y col., 2000; Stanzani y col., 2005). Existen fundamentos suficientes de que la gliotoxina es producida tanto en la aspergillosis animal experimental como en la AI humana, con concentraciones séricas de 166-785 ng/ml en el 80% de los pacientes con AI. Debido a sus particulares actividades biológicas, se cree que actúa como un factor de virulencia (Richard y col., 1996; Latgé, 1999; Lewis y col., 2005). Algunos estudios han informado un bajo porcentaje de cepas de *A. fumigatus* productoras de gliotoxina. Sin embargo, un estudio más reciente indicó que esta toxina es producida por más del 95% de los aislados tanto de origen clínico como ambiental (Kupfahl y col., 2008). Ha sido encontrada en tejidos infectados con *A. fumigatus* como ubre de vaca, pulmón de pavo, pulmón de ratones y en suero de pacientes con AI (Bauer y col., 1989; Kosalec y col., 2005). Los rumiantes, debido a la alta proporción de forrajes que consumen diariamente, estarían particularmente expuestos a la gliotoxina, ya que *A. fumigatus* es comúnmente encontrado en forrajes conservados (Morgavi y col., 2004, González Pereyra y col., 2008a, 2011, Pena y col., 2010, Keller y col. 2012).

Recientemente, se encontró gliotoxina aunque en pequeñas cantidades en los conidios de *A. fumigatus*, lo cual indicaría un posible rol temprano en el proceso de infección. Es decir, la toxina podría ser incorporada durante la conidiogénesis, no obstante también podría ser producida durante la germinación (Fischer y col., 2006; Abad y col., 2010).

A pesar de su reconocida toxicidad hay escasa información que describa la producción y estabilidad de las toxinas de *A. fumigatus* en alimentos (Boudra y Morgavi, 2005). Alimentos contaminados con esta toxina son potencialmente tóxicos para los animales.

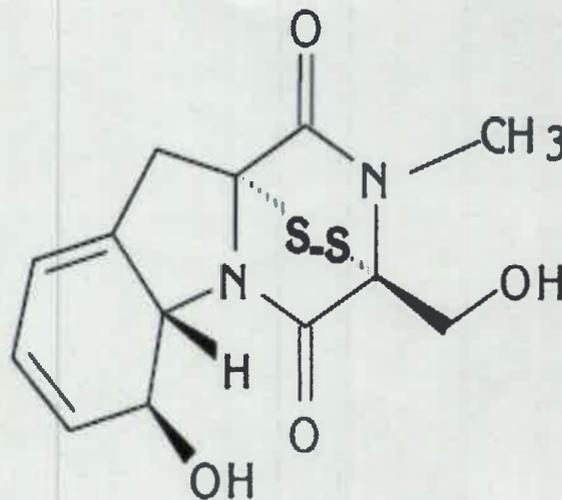


Figura 5. Estructura molecular de la gliotoxina (PM: 326,4).

2.5- Aspergilosis

Desde un punto de vista clínico, el término aspergilosis incluye enfermedades de diferente patogenia, como son la aspergilosis broncopulmonar alérgica, las formas pulmonares crónicas no invasivas o semi-invasivas, las formas invasivas de la vía aérea (AI), las formas cutáneas y las formas extrapulmonares y/o diseminadas. Todas ellas pueden ser producidas por diversas especies del género *Aspergillus* (de la sección *Fumigati* como *A. lentulus* y *A. fumigatiaffinis*, entre otros, y también de otras secciones como *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*) pero *A. fumigatus* sensu stricto es el agente etiológico más frecuente, independientemente de la forma clínica y la afección de base del paciente. Este hongo como fue mencionando antes, es ubicuo en la naturaleza y por lo tanto la inhalación de sus conidios es un fenómeno habitual y constante. Sin embargo, la invasión tisular es infrecuente y ocurre fundamentalmente en pacientes neutropénicos o sometidos a algún grado de inmunosupresión celular (Segal, 2009).

La incidencia de estas enfermedades, fundamentalmente de la AI, se ha incrementado en las últimas décadas debido principalmente a un aumento de la población de pacientes inmunodeprimidos en riesgo después de un trasplante de órganos, terapia contra el cáncer o en aquellos con enfermedad preexistente en pulmón (Denning, 1998; Fraser,

1993; Daly y Kavanagh, 2001; Stanzani y col., 2005). A pesar de los avances en el diagnóstico precoz y de una nueva terapia antifúngica, Al sigue siendo la causa principal de muerte en estos pacientes, con tasas de mortalidad que oscilan entre 80 y 95% (Denning, 1998; Woo Bok y col., 2006).

En términos generales, las tres formas de presentación clínica de las aspegilosis son:

a) Invasiva: que afecta fundamentalmente a los pacientes neutropénicos, donde la afección pulmonar predomina y hay también diseminación a cerebro, corazón, riñón, tracto gastrointestinal, hígado, tiroides y bazo; tiene mal pronóstico y la mortalidad es muy elevada,

b) Semi-invasiva: compromete fundamentalmente a pacientes con patología pulmonar preexistente,

c) No invasiva: afecta cavidades preexistentes, cavernas tuberculosas o quistes, donde coloniza el hongo y se produce lo que se denomina aspergiloma o micetoma (masa fúngica) (Oxilia y col., 2007).

3- *Aspergillus fumigatus* como contaminante de los alimentos destinados a la alimentación animal

Aspergillus fumigatus puede ser aislado prácticamente de cualquier tipo de sustrato, en especial del suelo y materiales orgánicos en descomposición. Es frecuentemente encontrado en alimentos para **animales** contaminados, siendo uno de los hongos toxicogénicos que con más frecuencia contaminan los alimentos ensilados (Cavaglieri y col., 2005; González Pereyra y col., 2008a; Alonso y col., 2013).

En estudios previos se demostró su prevalencia respecto de las demás especies toxicogénicas presentes en ensilado y alimentos terminados, destinados al consumo de bovinos sometidos a cría intensiva (Cavaglieri y col., 2005). En Argentina varios investigadores han aislado esta especie a partir de diferentes alimentos para animales. Entre ellos Dalcero y col. (1998), **Magnoli** y col. (1998), Pereyra y col. (2007, 2008b); González Pereyra y col. (2008 a,b,c), Fernández Juri y col. (2009) y Pena y col. (2010)

aislaron *A. fumigatus* en altos niveles a partir de raciones para aves, y alimentos destinados a cerdos, conejos, caballos, vacas y perros.

Recientemente, Pereyra y col. (2008b), Pena y col. (2010) y Keller y col. (2012) estudiaron la capacidad gliotoxicogénica de *A. fumigatus* aislados de ensilaje de maíz y sorgo para vacas lecheras, y alimentos terminados para vacas, cerdos, pollos, caballos, chinchillas y perros, y encontraron que la mayoría de las cepas estudiadas fueron capaces de producir la toxina en niveles elevados.

3.1- Virulencia y patogenicidad

La patogenicidad de *A. fumigatus* no depende solamente del estado inmunológico de huésped sino también de la virulencia de la cepa fúngica, la cual no está dada por un único factor de virulencia esencial, sino que se encuentra bajo control poligenético. Los factores de virulencia se definen como determinantes de patogenicidad que pueden causar daños en el huésped infectado (Casadevall, 2005). Esta definición incluye a genes cuya supresión reduce la virulencia de la cepa sin afectar el crecimiento fúngico normal, quedando excluidos por lo tanto, aquellos genes que codifican proteínas biosintéticas (Osherov, 2007). Otros genes relacionados con la virulencia de *A. fumigatus* como los de catalasa o proteasas secretadas, no se ajustan a esta definición debido a la redundancia de las familias génicas, y a la dificultad de deletar todos los genes de una familia en una sola cepa. No obstante, todos los genes que ayudan y promueven el crecimiento de *A. fumigatus* en su nicho ecológico, estarían también implicados en la patogénesis de la AI (Askew, 2008). Por lo tanto, la virulencia de *A. fumigatus* es multifactorial y debida a la combinación de características biológicas del hongo y el estado inmunológico del paciente. Algunas de estas características del hongo incluyen el tamaño pequeño de sus conidios (2-3 μm de diámetro) que le permiten alcanzar rápidamente los alveolos pulmonares, su termotolerancia y resistencia al estrés oxidativo y su alta tasa de crecimiento y versatilidad nutricional, entre otras (Latgé, 2001; Tekaia y Latgé, 2005; Askew, 2008; Abad y col., 2010). Además, ciertos componentes de la pared celular como glucanos, galactomananos y manoproteínas, han sido implicadas en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped por *A. fumigatus* (Hof y Kupfahl, 2009). Otros hongos probablemente comparten algunas de estas características pero *A. fumigatus*

presenta posiblemente una única combinación que lo hace el principal hongo patógeno en el mundo (Osherov, 2007).

En el huésped, la producción "*in situ*" de gliotoxina por *A. fumigatus*, puede jugar un rol importante en la patogénesis de la AI, por facilitar el crecimiento fúngico y la colonización del tejido pulmonar a través de la inducción de inmunosupresión local o generalizada (Pahl y col., 1996; Daly y Kavanagh, 2002; Watanabe y col., 2003; Reeves y col., 2004) (Fig. 6). Por lo tanto, sus características tóxicas e inmunosupresivas implicarían que esta micotoxina posee un rol sustancial en la patogénesis de la AI, sin embargo, como se mencionó anteriormente no es el único factor de virulencia que participa en el establecimiento de la enfermedad (Scharf y col., 2012).

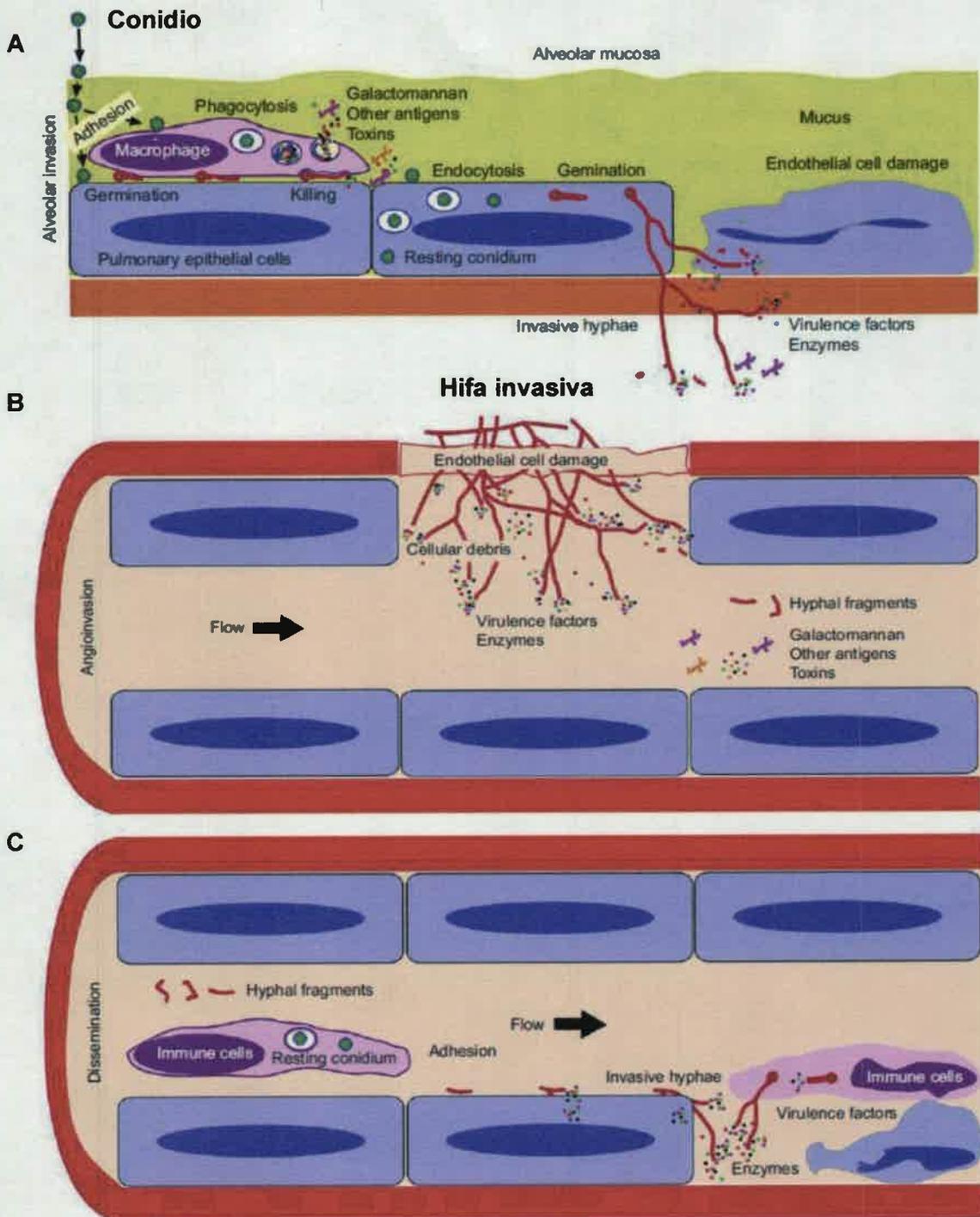


Figura 6. Modelo del desarrollo de la AI. **A:** Primera etapa de colonización e invasión del epitelio pulmonar. **B:** invasión de capilares sanguíneos y diseminación en sangre de fragmentos de hifas, galactomananos y otras moléculas. **C:** diseminación y primera etapa de invasión de órganos profundos. Extraído y modificado de Abad y col. (2010).

3.2- Consecuencias de la exposición de los animales a *Aspergillus fumigatus*

En animales, la exposición a las esporas de *A. fumigatus* puede resultar en infecciones fúngicas particularmente en aquellos órganos expuestos a la invasión externa como lo son las vías aéreas, la glándula mamaria y el útero durante el parto. Sus pequeñas esporas son fácilmente esparcidas por el aire, lo cual representa un elevado riesgo para salud del hombre y de los animales (Land y col., 1987). Las enfermedades respiratorias en aves de consumo son frecuentes, llevando a pérdidas económicas importantes (Lair-Fullerenger y col., 2003). En estos animales, *A. fumigatus* es el principal patógeno respiratorio, causando infecciones agudas en pollitos y pavos bebés con altas tasas de mortalidad (Arné y col., 2011). Este hongo también ha sido aislado de la cavidad nasofaríngea de equinos y es responsable de enfermedades respiratorias en ellos (Guida y col., 2005).

En rumiantes *A. fumigatus* causa procesos respiratorios, aborto, mastitis y otros cuadros clínicos (Ainsworth y Austwick, 1973; Gourreau y col., 1988; Smith, 1989). Pepin (1988), aisló *A. fumigatus* a partir de leche de vacas sin sintomatología, algunas de las cuales posteriormente sufrieron mastitis aspergilar (manifestado por elevados recuentos de células somáticas). Recientemente, Pellegrino y col. (2013) estudiaron la asociación entre las condiciones higiénicas y sanitarias en el ambiente de vacas lecheras y la presencia de cepas gliotoxicogénicas de *A. fumigatus*. Ellos encontraron que la presencia de ésta especie fue asociada con elevados recuentos de células somáticas en la leche. Por otra parte, las buenas prácticas higiénicas y sanitarias se asociaron con ausencia de *A. fumigatus* y recuentos relativamente bajos de células somáticas (<250.000 células/ml), demostrando el efecto positivo de las buenas prácticas de manejo en el control de *A. fumigatus* y especies relacionadas en tambos. En ovejas, este hongo produce casi exclusivamente procesos pulmonares (Nicolas y col., 1985; González y col., 1993) y en ocasiones mastitis, que puede cursar sintomática o asintomáticamente (Aller y col., 1996; Pérez y col., 1998). En estos animales, Aller Gancedo y col. (2000), informaron varios brotes de mastitis causada por *A. fumigatus*, vinculados al tratamiento antibacteriano intramamario durante el período seco. El proceso cursó sintomáticamente y de modo agudo, y se observaron daños en pulmón (nódulos) y en glándula mamaria (abscesos), manifestándose por microscopía la presencia de las hifas de este hongo, las cuales también fueron observadas en la leche entera.

El peligro potencial inherente a *A. fumigatus* radica en dos posibilidades. La primera, involucra la incorporación del hongo al organismo animal. Esta ocurre principalmente de dos maneras: 1- Inhalación de esporas fúngicas presentes en el alimento contaminado (o medioambiente) y posibilidad de desarrollo de enfermedades respiratorias, lo cual será dependiente del estado inmune del animal y de la virulencia de la cepa, y 2- Afección de tejidos expuestos al ambiente contaminado, por ejemplo: colonización de las ubres de vacas lecheras y desarrollo de mastitis (junto con otros patógenos bacterianos). A este peligro potencial para el animal u hombre en contacto con ambientes contaminados por *A. fumigatus* debe sumarse la producción de gliotoxina y otras toxinas tremorgénicas que puede desencadenarse en el organismo del huésped.

La segunda posibilidad, sería la incorporación de la toxina formada previamente por el hongo durante su desarrollo en el alimento. Este aspecto ha sido muy poco estudiado, ya que no se conoce qué concentración mínima de gliotoxina debería encontrarse en el alimento para que en el huésped se desencadenen sus actividades biológicas, tampoco se conoce qué efecto tendría sobre la estabilidad de la toxina el pasaje por el tracto gastrointestinal del animal o del hombre. No obstante, el peligro radica en la exposición del animal a esta micotoxina, **debido a** que podrían producirse problemas de **micotoxicosis**. Este término **se refiere a un** cuadro clínico-patológico que las toxinas fúngicas ocasionan en el **organismo** animal o del hombre cuando son ingeridas o inhaladas en concentraciones determinadas. Las micotoxicosis se clasifican en primarias o secundarias, según como haya llegado la toxina al organismo. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados y una secundaria al ingerir carne o leche de animales que **se alimentaron** con forrajes o alimentos contaminados con micotoxinas. Las micotoxicosis también pueden ser agudas o crónicas dependiendo de la cantidad de toxina ingerida. La ingestión de una cantidad elevada en un período corto de tiempo, lleva al desarrollo de una enfermedad aguda con la manifestación de síntomas visibles y que pueden resultar **en** la muerte de varios o todos los animales implicados, dependiendo del nivel de contaminación. Por el contrario, la ingestión de pequeñas cantidades de micotoxinas durante un período de tiempo prolongado, lleva a un proceso crónico de características no tan evidentes, donde los principales síntomas son la pérdida de peso, la inmunosupresión y por lo tanto, la disminución de los parámetros productivos.

4- El enfoque polifásico para la caracterización de *Aspergillus fumigatus* y especies relacionadas en la sección *Fumigati*

4.1- Los marcadores morfológicos para la identificación fúngica

Aspergillus fumigatus se identifica microscópicamente por sus característicos conidios verdes azulados sobre conidióforos uniseriados con vesículas subclavadas. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las especies de *Aspergillus* fueron originalmente descritas por Raper y Fennell (1965) en base a caracteres morfológicos y muchas de ellas resultaron coincidentes cuando fueron reclasificadas años más tarde por otros taxónomos. No obstante, esta especie puede ser morfológicamente variable y nuevas especies han sido definidas en base a taxonomía polifásica, sobre la base de mínimas diferencias fenotípicas. Recientemente, métodos basados en genética indicaron que organismos fenotípicamente identificados como *A. fumigatus* constituyen actualmente un complejo fúngico designado *Aspergillus* sección *Fumigati* subgénero *fumigati* (Vinh y col., 2009a). La designación basada únicamente en características morfológicas es controversial debido a que la morfología es ampliamente dependiente de las condiciones de crecimiento (Guarro y col., 1999). Varias especies como *A. fumigatus*, *A. novofumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus* y *A. lentulus* presentan una gran semejanza morfológica y son difíciles de diferenciar al microscopio óptico. Por ello, se sugiere utilizar el nombre "complejo" si la identificación está basada únicamente en caracteres morfológicos, ya que generalmente no distinguen entre especies estrechamente relacionadas, y en lo posible llevar a cabo esquemas polifásicos para una correcta identificación, incluyendo siempre análisis de secuencias de DNA (Samson y Varga, 2009).

4.2- Ecofisiología de hongos toxicogénicos

4.2.1- Parámetros ambientales que determinan el crecimiento y producción de micotoxinas

El crecimiento fúngico es el resultado de la interacción compleja de diversos factores como la a_w , temperatura, pH y tiempo de permanencia en un sustrato, por lo tanto, el

conocimiento de cada factor individual involucrado es esencial para comprender el proceso general y para predecir el deterioro fúngico en materias primas y alimentos terminados (Pardo y col., 2005). Los factores ambientales más importantes que influyen la germinación, crecimiento, esporulación y producción de micotoxinas en hongos son la a_w y la temperatura (Magan y col., 2003; Bellí y col., 2004; Astoreca y col., 2009). La **temperatura** es uno de los factores ambientales más importantes que influye en la proliferación y sobrevivencia de los organismos (Lillehoj y Elling, 1983). Las reacciones enzimáticas en las células ocurren a mayor velocidad conforme aumenta la temperatura, aunque dentro de ciertos límites. Al sobrepasar una determinada temperatura máxima se produce la desnaturalización irreversible de las proteínas. Mientras que, por debajo de la mínima los microorganismos detienen su crecimiento pero mantienen su viabilidad. La medida más usada de disponibilidad de agua para los microorganismos es la a_w , que se define como la relación entre la presión de vapor del agua del alimento (p) y la del agua pura (p_0) a la misma temperatura. Estas características del crecimiento tienen importantes aplicaciones prácticas, ya que la producción de micotoxinas se ve favorecida generalmente por una elevada a_w en combinación con temperaturas relativamente altas.

En cuanto a la **disponibilidad de oxígeno**, descensos en su presión parcial y, particularmente, incrementos en el nivel de dióxido de carbono llevan a una marcada reducción de la toxicogénesis. El **pH** puede influir también en el crecimiento del hongo y la producción de sus toxinas, sin embargo, su efecto parece no ser tan limitante como el de los otros factores abióticos, por lo que se suele estudiar en modelos que incluyen otras variables (Patterson y Damoglou, 1986). El **tiempo de incubación** también condiciona la cantidad de micotoxina que se puede encontrar en el sustrato. La mayor producción va a depender tanto de la cepa como de la vía biosintética de cada micotoxina y de los factores anteriormente mencionados (De Vries y col., 2002).

4.2.2- Influencia de los parámetros ambientales sobre el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y la producción de gliotoxina

Aspergillus fumigatus, un hongo saprófito capaz de crecer y proliferar en una gran variedad de ambientes, puede colonizar el cuerpo humano o animal donde es desafiado por diversas condiciones físicas y químicas, tales como la presencia de enzimas que

digieren su pared celular, agentes oxidantes, limitada disponibilidad de nutrientes, o condiciones fluctuantes de pH, osmolaridad y temperatura (Tekaiia y Latgé, 2005). Para lograr sobrevivir en el huésped, *A. fumigatus* debe adaptarse a ciertos microambientes que a menudo se caracterizan por una baja disponibilidad de oxígeno y nutrientes (Barker y col., 2012). Diversos investigadores sugieren que la capacidad de *A. fumigatus* y otros hongos patógenos de adaptarse a condiciones de hipoxia contribuye a su virulencia (Hall y Denning, 1994; Willger y col., 2009). La adaptación a los diversos nichos ecológicos y, lo más importante, el elevado grado de resistencia a condiciones ambientales estresantes ha contribuido sin duda, al desarrollo de *A. fumigatus* como un patógeno humano. En este punto de vista, es razonable suponer que la mayoría de los determinantes de virulencia de este hongo cumplen un “doble rol” ya que aseguran su supervivencia en el ambiente natural y apoyan el crecimiento y, por lo tanto, su virulencia en un huésped susceptible (Casadevall y col., 2003; Rhodes, 2006).

Unos pocos trabajos disponibles en la bibliografía han informado el efecto de ciertos parámetros ambientales sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por *A. fumigatus*, aunque siempre se investigaron aislados clínicos. Algunos de estos artículos, proponen que una condición de elevado suministro de oxígeno es responsable de la rápida producción de gliotoxina por *A. fumigatus* y que este hongo es capaz de crecer a baja tensión de oxígeno (mínimo 0,1%) (Hall y Denning, 1994; Watanabe y col., 2004; Willger y col., 2009). Esta última capacidad fisiológica tiene importantes implicancias para la patogenicidad de *A. fumigatus*. Esto significa que órganos adecuadamente aireados como el pulmón, como así también otros tejidos donde la presión parcial de oxígeno es reducida, pueden ser colonizados. La genética de la regulación de los perfiles de metabolitos secundarios es compleja y depende fuertemente del medio de crecimiento y factores medioambientales. En condiciones de laboratorio, la gliotoxina por ejemplo, es solamente producida sobre medios de cultivo con baja o ausente fuente de carbohidratos, como agar extracto de levadura (YES) y agar pulmón de cerdo sometidos a una temperatura de incubación de 25°C (más que de 37°C) (Frisvad y col., 2009). No obstante, los factores ambientales que influyen en la producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus* no se conocen en detalle.

Recientemente, algunos autores estudiaron la influencia del pH, temperatura y metales pesados sobre la actividad de la enzima amilasa y la detoxificación de aquellos por cepas

ambientales de *A. fumigatus* (Faryal y col., 2006; Nwagu y Okolo, 2011). No obstante, no existe información disponible que evalúe el efecto de los parámetros ambientales interactuantes de temperatura, a_w , pH, disponibilidad de oxígeno y tiempo de incubación sobre la fase de latencia, velocidad de crecimiento y producción de gliotoxina por cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* aisladas de alimentos destinados a animales.

4.3- Caracterización molecular de *Aspergillus* sección *Fumigati*

4.3.1- Generalidades

La identificación fúngica a nivel de especie es importante desde el punto de vista de la calidad e inocuidad alimentaria ya que permite una mejor evaluación del riesgo toxicológico en los alimentos. A tal fin, numerosas técnicas moleculares han sido empleadas y optimizadas para lograr la identificación rápida y certera de las especies fúngicas contaminantes de los alimentos. En los últimos años, se han desarrollado y aplicados diferentes métodos moleculares para la caracterización de cepas de *A. fumigatus*, incluyendo polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés fragment length polymorphism analysis) (Fridkin y Jarvis, 1996; Staab y col., 2009), análisis de isoenzimas, análisis de secuencias moderadamente repetidas (Girardin y col., 1994; Rinyu y col., 1995) y amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD, del inglés Random amplification of polymorphic DNA (Hong y col., 2005, 2010; Álvarez-Pérez y col., 2009, 2010). La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió una serie de avances tecnológicos tanto en el diagnóstico basado en el ADN como en tecnologías de secuenciamiento.

4.3.2- Marcadores moleculares neutros basados en PCR para la tipificación de *Aspergillus* sección *Fumigati*

Un marcador de ADN es una pequeña región de ADN que muestra polimorfismo de secuencia en individuos diferentes dentro de una misma especie o entre especies distintas. Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria y muy útil en varios campos de la biología como evolución, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. No son influidos por el ambiente y son selectivamente neutros.

Además, se utilizan para localizar y aislar genes de interés. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997). La principal ventaja del uso de marcadores moleculares es que se puede detectar un número casi ilimitado de *loci* polimórficos en los individuos permitiendo una estimación directa de la variación genética en las poblaciones (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Las técnicas moleculares que se utilizan para discriminar taxones incluyen tanto las que se basan en polimorfismos del ADN (RFLPs, AFLPs, RAPDs) como en la amplificación de fragmentos de genes codificantes de proteínas (calmodulina, β -tubulina, factor de elongación 1-alfa) y de regiones genómicas no codificantes del ADNr (ITS e IGS). Variantes de la técnica de PCR permiten amplificar las secuencias de ADN copia (RT-PCR) y detectarlas en tiempo real permitiendo la estimación de la cantidad inicial de ADN (o ADNc) presente en las muestras (PCR cuantitativa o en tiempo real).

4.3.2.1- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

El polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) fue el primer marcador de ADN utilizado por biólogos poblacionales. Este método expresa diferencias específicas del ADN que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas de origen bacteriano). Cada una de estas endonucleasas, reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre y cuando estas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente, cualquier ADN que no este metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000). Dependiendo de la región amplificada, es decir de su tamaño o nivel de variabilidad, este marcador se aplica para la diferenciación de cepas o linajes a nivel intraespecífico o entre especies o géneros. Existen dos técnicas para detectar RFLPs: southern blots e hibridización y PCR.

Southern blots e hibridización. El ADN genómico (total) es cortado con una o más endonucleasas de restricción. Los fragmentos resultantes se separan en geles de agarosa por electroforesis y se transfieren a una membrana que puede ser de nylon o de

nitrocelulosa (southern blotting). La subsecuente hibridación con una sonda marcada y detección por autorradiografía, luminografía o quimioluminiscencia hará visible un fragmento de ADN específico, que puede ser comparado con el fragmento resultante de otros genomas tratados de la misma forma (Parker y col., 1998).

PCR-RFLP. Los RFLPs son causados por rearrreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que genera una ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción (**Fig. 7**). Con el producto amplificado de PCR (genes o secuencias de ADN polimórfico) se realiza la digestión con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o en geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata (Karl y col., 1992); luego se comparan los perfiles obtenidos y se analiza el polimorfismo.

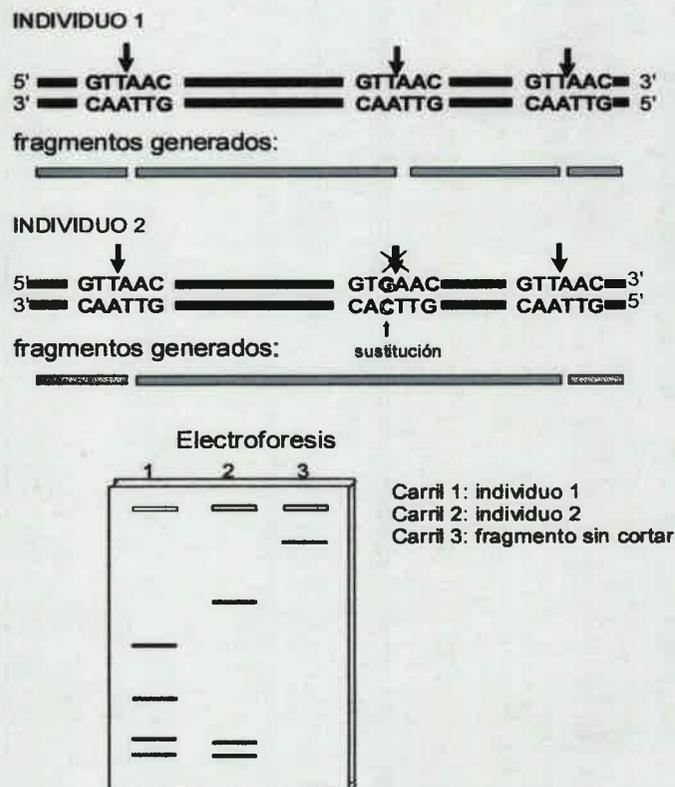


Figura 7. Esquema de obtención de los RFLP y su visualización por electroforesis.

Este método es más económico y rápido que la detección de RFLPs por southern blots e hibridización. Los RFLPs generalmente se han utilizado para construir mapas genéticos, para la clonación de genes basados en mapas y para estudios de diversidad genética. Sin embargo, una desventaja de esta técnica es que solamente se detecta una fracción de la variabilidad de secuencias existentes en el genoma, es decir, su información es limitada. No obstante, constituye un método sencillo y rápido que resulta de gran utilidad para la agrupación de aislados (con posibilidad de secuenciar seguidamente para confirmar dicha agrupación) y son altamente reproducibles intra- e interlaboratorio.

Diversos trabajos han demostrado la utilidad del análisis por RFLP para inferir relaciones filogenéticas dentro del género *Aspergillus* (Varga y col., 2000a) y para distinguir entre organismos estrechamente relacionados, como el caso de los miembros de la sección *Fumigati* (Staab y col., 2009).

4.3.2.2- Polimorfismo de ADN amplificado al azar

El polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD) es un marcador genético que amplifica aleatoriamente segmentos de ADN (anónimo) en una gran variedad de especies. Se basa en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido (cebador) de aproximadamente 10-15 pares de bases (pb) a lo largo del genoma. Estos cebadores se diseñan sin tener en cuenta la información de la secuencia genómica de la especie a analizar, presentan un alto contenido en G+C y se utiliza uno solo por reacción de PCR. El polimorfismo de las bandas entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del oligonucleótido, por inserción o delección de los fragmentos en estos sitios (Williams y col., 1990) (Fig. 8). Es un marcador genético dominante es decir, no puede discernir los homocigotas dominantes de los heterocigotas para un segmento particular, lo cual brinda menor información genotípica al compararlo con aquellos codominantes (Backeljau y col., 1995). Los RAPDs son útiles en la elaboración de mapas genéticos, en estudios de diversidad genética, de parentesco (establecimiento de genealogías) y en el análisis de la estructura poblacional, ya que ayudan a estimar tamaño efectivo, aislamiento reproductivo y niveles de fecundación cruzada.

Dado el gran polimorfismo que detectan una de sus mejores aplicaciones es la identificación genética de individuos, que incluye casos de clones, híbridos somáticos y mutantes. Otra aplicación paralela es la detección de uniformidad genética; es un marcador eficiente y rápido que resulta útil en la determinación de estabilidad en programas de reforestación (Otero y col., 1997).

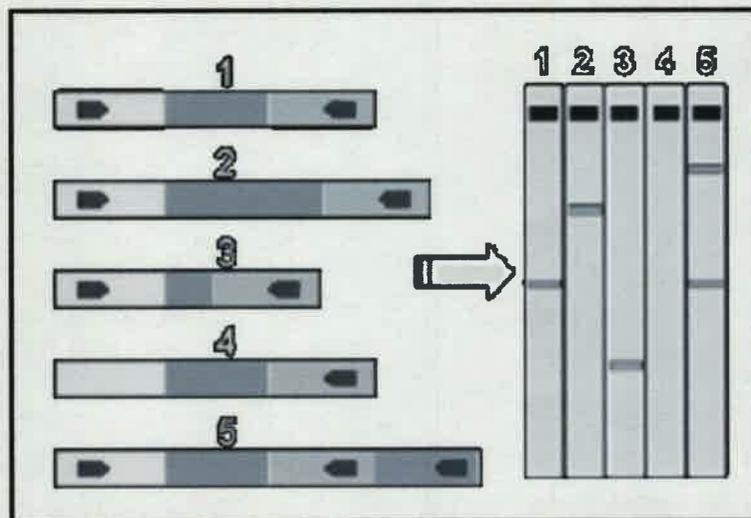


Figura 8. Origen del polimorfismo generado mediante los marcadores RAPD. Éste puede deberse a inserciones (2), delecciones (3) o mutaciones puntuales que impiden el acoplamiento del cebador (4) o crean un nuevo sitio de unión (5).

Una de las principales ventajas de los RAPD es que amplifican regiones tanto codificantes como no codificantes del ADN y revelan niveles de variación más altos que los RFLPs e isoenzimas (Otero y col., 1997; Russell y col., 1997; Parker y col., 1998); es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo del genoma, no requiere la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de *loci* que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas (Reiter y col., 1992; Whitkus y col., 1994). Sin embargo, uno de los problemas prácticos detectados con los RAPDs es la reproducibilidad de los resultados. No obstante, en la actualidad estos marcadores moleculares continúan aplicándose para la tipificación de microorganismos, ya que permiten una rápida determinación de la variabilidad genética del conjunto de

individuos estudiados y se puede mejorar la reproducibilidad optimizando las condiciones de amplificación e incluyendo en todas las reacciones duplicados y controles positivos.

Los marcadores RAPD han sido ampliamente utilizados para la genotipificación de aislados clínicos (Rath y col., 1997; Khan y col., 1998; Alvarez-Pérez y col., 2009) y también con fines taxonómicos durante estudios de reclasificación de especies de la sección *Fumigati* (Hong y col., 2005, 2010).

4.3.3- Utilidad taxonómica de las secuencias de genes conservados para la identificación de especies. Secuenciamiento de genes de proteínas

En los últimos años se ha extendido la utilización de genes de proteínas con fines taxonómicos y para estudios filogenéticos, incorporando principalmente el análisis de los genes codificantes de proteínas (Berbee y Taylor, 2001). Secuencias parciales de los genes de β -tubulina, calmodulina, actina y rodlet A han sido utilizadas comparativamente para investigar las relaciones filogenéticas entre las especies de la sección *Fumigati* (Balajee y col., 2005a,b; Hong y col., 2005, 2008, 2010; Samson y col., 2007, Yaguchi y col., 2007). Se reconoce al gen *benA*, codificante de la β -tubulina, como una valiosa herramienta para la delimitación de especies de la sección *Fumigati* (Geiser y col., 1998; Varga y col., 2000a, 2000b; Hong y col., 2005, 2006). Su utilidad radica en que es un gen conservado con alto grado de variabilidad interespecie y de lenta evolución. Este gen codifica para las tubulinas, entre las cuales se incluyen la β , α , γ , δ , y ϵ -tubulinas. La β -tubulina, junto con la α -, forman los microtúbulos.



Figura 9. Estructura del gen de la β -tubulina. Los cebadores Bt2a y Bt2b amplifican un fragmento de aproximadamente 550 pb en los miembros de la sección *Fumigati*. Las cajas sombreadas indican las regiones codificantes de proteína (exones) y las cajas con trama las no codificantes (regiones intrónicas).

4.4- Revisión taxonómica de *Aspergillus* sección *Fumigati*

Utilizando el enfoque polifásico de identificación de especies Balajee y col. (2005a), Hong y col. (2005, 2008), Samson y col. (2007) y Yaguchi y col. (2007) lograron resolver la gran variabilidad observada entre cepas fenotípicamente identificadas como *A. fumigatus* y otras consideradas "atípicas" mediante la reclasificación en nuevas especies. Estos autores combinaron métodos de identificación de especies como lo son macro- y micromorfología, perfil de extrolitos, crecimiento a regímenes de temperatura y estudios filogenéticos, y las separaron en cuatro grupos, incluyendo a: *A. fumigatus sensu stricto*, *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis* y *A. novofumigatus* (Fig. 10). Las dos últimas especies mencionadas fueron propuestas como nuevas en la sección *Fumigati*. También, *A. turcosus* y especies de *Neosartorya* como *N. denticulata*, *N. assulata*, *N. galapagensis* (Hong y col., 2008) y *N. warcupii*, *N. papuensis*, *N. ferenczii* y *N. australensis* (Samson y col., 2007) fueron incorporadas a esta sección como nuevas especies. La inferencia filogenética entre estas nuevas especies y las anteriormente incluidas en la sección *Fumigati* fue realizada en base al análisis de secuencias de ADN de genes parciales, codificantes para β -tubulina, calmodulina y actina.

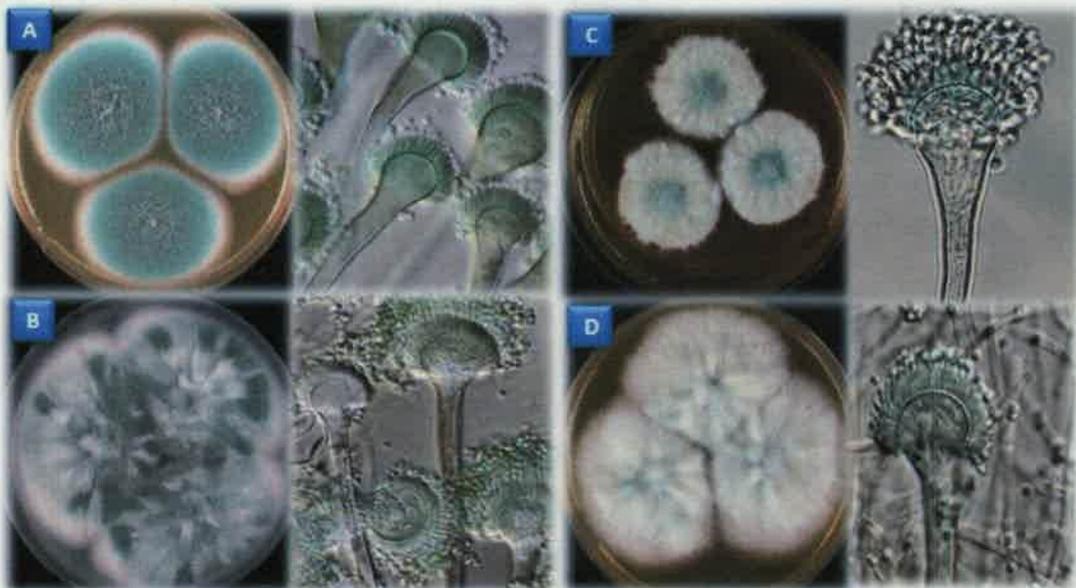


Figura 10. Macro y micromorfología (conidióforos) de colonias en MEA luego de su incubación a 25 °C durante 7 días. **A:** *A. fumigatus sensu stricto*, **B:** *A. lentulus*, **C:** *A. novofumigatus*, **D:** *A. fumigatiaffinis*. Extraído y modificado de Samson y col. (2007).

Además de *A. fumigatus* sensu stricto, otras especies como *N. fischeri*, *N. pseudofischeri* y *N. hiratsukae* han sido informadas patogénicas para humanos (Jarv y col., 2004; Balajee y col., 2005a,b). Recientemente se informó AI producida por *A. ustus* y otros aspergilos raros como *A. alliaceus* (Balajee y col., 2007), *A. lentulus* (Balajee y col., 2005a; Montenegro y col., 2009) y *A. udagawae* (Balajee y col., 2006). Estos aportes pueden ser importantes en clínica debido a que diferentes especies tienen susceptibilidades variables frente a múltiples drogas antifúngicas e implica, además, que en el huésped apropiado todas ellas pueden causar enfermedad (Balajee y col., 2007). Patogenicidad para humanos con valores elevados de concentración inhibitoria mínima (CIMs) frente a anfotericina B y varios triazoles, ha sido también informada recientemente para las especies de esta sección que presentan fuerte semejanza morfológica con *A. fumigatus* sensu stricto, tales como *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus*, *A. lentulus* y el complejo de especies *A. viridinutans* (Balajee y col., 2005b; Alhambra y col., 2006; Yaguchi y col., 2007; Alcazar-Fuoli y col., 2008).

5- Estudios fenotípicos y genotípicos para la caracterización de especies de la sección *Fumigati*.

Existen actualmente pocos estudios disponibles acerca de la caracterización fenotípica de *A. fumigatus*. Los más importantes han reportado variabilidad en el pigmento y textura de las colonias, tasa de crecimiento a diferentes temperaturas, tamaño y forma de los conidios, fiálides atípicas y diferencias en el tamaño y forma de las cabezas conidiales (Leslie y col., 1988; Rinyu y col., 1995; Schmidt y Wolff, 1997; Chanteperdrix y col., 2008). Otros estudios han explorado la utilidad de caracteres fenotípicos y genotípicos para la clasificación de *A. fumigatus* (Leslie y col., 1988; Matsuda y col., 1992; Rinyu y col., 1995; Debeaupuis y col., 1997; Katz y col., 2005). Algunos investigadores han intentado encontrar relaciones entre características fenotípicas y genotípicas de *A. fumigatus*, pero éstos no han logrado obtener una correlación estricta entre los atributos comparados (Rinyu y col., 1995, Schmidt y Wolff, 1997). No obstante, es muy importante considerar ciertas características fenotípicas ya que son útiles desde un punto de vista epidemiológico y pueden exhibir diferencias entre cepas de la misma especie o entre

especies diferentes. Diferencias en las características fenotípicas también pueden ayudar a la identificación de nuevas especies como lo fue el caso de *A. lentulus*, quien mostraba diferencias en el grado de esporulación y el tamaño de las cabezas conidiales y una baja susceptibilidad antifúngica (Balajee y col., 2005b).

5.1- Estadística multivariada

Con el objetivo de estudiar la relación entre dos o más variables simultáneamente, es posible utilizar métodos estadísticos multivariados. En términos generales, el análisis multivariado se refiere a todos aquellos métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples (más de dos variables) de cada individuo. Los métodos estadísticos multivariados más utilizados en estudios biotecnológicos son las distancias genéticas, los coeficientes de similitud, dendrogramas y conglomerados (Martínez, 1995).

El agrupamiento de objetos multivariados es frecuentemente utilizado como método exploratorio de datos con la finalidad de obtener mayor conocimiento sobre la estructura de las observaciones y/o variables en estudio. Cuando se dispone de numerosas variables para realizar el agrupamiento, es común utilizar técnicas de reducción de dimensión tales como el **análisis de componentes principales (ACP)**, para obtener un número menor de variables capaces de expresar la variabilidad en los datos. El ACP es una técnica estadística que sintetiza la información, es decir, construye nuevas variables resultado de la combinación lineal de las variables originales, reduciendo así su número y analizándolas como componentes para la explicación de un todo (Crow Santos, 2002). Con el ACP se construyen ejes artificiales (componentes principales) que permiten obtener gráficos de dispersión de observaciones y/o variables con propiedades óptimas para la interpretación de la variabilidad y co-variabilidad subyacente. Los gráficos más utilizados son los Biplots, propuestos por Gabriel (1971), que muestran las observaciones y variables en el mismo gráfico, de forma tal que se pueden hacer interpretaciones sobre las relaciones conjuntas entre observaciones y variables (Baltarini y col., 2008). El **análisis de conglomerados** se utiliza para agrupar observaciones, variables o entidades de un conjunto de datos en base a sus semejanzas o diferencias. Esta tiene como finalidad ubicar los objetos en grupos o "clusters" de forma sugerida por los datos, no

definidos "a priori", tal que los objetos en un grupo dado tiendan a ser semejantes en algún aspecto y los objetos en diferentes grupos tiendan a ser distintos (Crow Santos, 2002). Otra opción para el análisis de un conjunto numeroso de variables, es el análisis de **correlaciones de Pearson** (AC de Pearson) (Hotelling, 1936) que se utiliza para determinar la relación lineal entre dos grupos de variables métricas, unas consideradas como variables dependientes y otras como independientes. El AC de Pearson provee una medida de correlación entre una combinación lineal de las variables en un conjunto, con una combinación lineal de las variables en el otro conjunto.

Rinyu y col. (1995) compararon cepas de *A. fumigatus* obtenidas a partir de colecciones de diferentes países en cuanto a sus características morfológicas, perfil de isoenzimas y polimorfismos de DNA utilizando métodos de análisis multivariado. Los resultados indicaron que las cepas exhibieron una gran variabilidad de morfología de colonias y rangos de crecimiento a diferentes temperaturas, sin embargo sus características micromorfométricas fueron similares. Por otro lado, demostraron que la técnica de RAPD fue más eficiente que el perfil de isoenzimas para caracterizar a las cepas de *A. fumigatus*. Los dendrogramas obtenidos para el RAPD y el perfil de isoenzimas presentaron una buena correlación pero no correlacionaron con la patogenicidad, la producción de pigmentos ni el origen geográfico de las cepas.

Otros estudios aplicando la estadística multivariada permitieron la caracterización fenotípica de cepas de diferentes orígenes, además de ser propuestas como herramientas promisorias para la adecuada comprensión de la significancia funcional y ecológica de la presencia de diferentes cepas de un microorganismo en los ecosistemas microbianos naturales. Recientemente, Frías de León y col. (2011) realizaron estudios epidemiológicos con cepas de *A. fumigatus* de origen clínico humano de diferentes países de Latinoamérica. Estos investigadores observaron que dichas cepas exhibían una importante diversidad fenotípica y genotípica que consideraron de gran interés para la eficacia en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades causadas por este hongo. El estudio relacionó la variabilidad fenotípica, el origen geográfico y las características genotípicas. Las cepas de Perú mostraron características fenotípicas que permitieron separarlas claramente del resto de cepas y se relacionaron además al origen. La asociación entre las características fenotípicas y genotípicas fue significativa y demostrada a través de la aplicación de la estadística multivariada.



HIPÓTESIS Y

OBJETIVOS

En base a los antecedentes descriptos se plantean las siguientes **hipótesis**:

- ✦ *Aspergillus fumigatus* potenciales productores de gliotoxina prevalecen en ingredientes, materias primas y alimentos terminados destinados a animales domésticos y mascotas.
- ✦ *Aspergillus fumigatus* aislados a partir de alimentos destinados al consumo de animales domésticos y mascotas presentan un alto grado de variabilidad en su perfil genético.

Con la finalidad de demostrar las hipótesis planteadas se propusieron y cumplimentaron los siguientes objetivos:

Objetivos generales:

- ◇ Evaluar la incidencia de *Aspergillus fumigatus* y su potencialidad para producir gliotoxina en alimentos balanceados destinados a animales domésticos y mascotas.
- ◇ Determinar la variabilidad genética de cepas de *Aspergillus* de la sección *Fumigati* potencialmente gliotoxicogénicas.

Objetivos específicos SECCIÓN I: Estudios morfológicos y fisiológicos de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* aisladas de alimentos destinados a la alimentación animal:

1. Aislar e identificar *Aspergillus fumigatus* a partir de alimentos destinados a cerdos, vacas, caballos, pollos y perros.
2. Establecer la frecuencia de distribución de *A. fumigatus* en relación al total de cepas de *Aspergillus* spp.
3. Evaluar la capacidad de producción de gliotoxina de las cepas de *A. fumigatus* previamente aisladas.

4. Determinar las condiciones culturales más adecuadas para la producción de gliotoxina en medio de cultivo.
5. Poner a punto una metodología de detección y cuantificación de gliotoxina por HPLC MS/MS.

Objetivos específicos SECCIÓN II: *Estudio de la ecofisiología de Aspergillus fumigatus sensu stricto:*

1. Estudiar la influencia de factores físicos sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus sensu stricto*.
2. Evaluar y analizar los resultados estadísticamente.

Objetivos específicos SECCIÓN III: *Estudios fenotípicos y genotípicos de cepas de Aspergillus sección Fumigati*

1. Caracterizar fenotípicamente cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* para el estudio de variabilidad en sus caracteres.
2. Comparar mediante métodos moleculares el perfil genético de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*.
3. Aplicar métodos de estadística multivariada para evidenciar la variabilidad en los caracteres fenotípicos de las cepas en estudio.

..... **SECCIÓN I**

Estudios morfológicos y fisiológicos de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* aisladas de alimentos destinados a la alimentación animal

.....

Materiales y Métodos

1- Materiales

1.1- Medios de cultivo

- **Agar diclorán rosa de bengala cloranfenicol (DRBC):** glucosa 10 g; peptona 5 g; KPO_4H_2 1 g; $MgSO_4 + 7 H_2O$ 0,5 g; diclorán 2 mg; cloranfenicol 100 mg; rosa de bengala 2,5 mg; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 ml (Pitt y Hocking, 1997).
- **Agar diclorán- glicerol al 18% (DG18):** glucosa 10 g; peptona 5 g; KPO_4H_2 1 g; $MgSO_4 + 7 H_2O$ 0,5 g; diclorán 2 mg; cloranfenicol 100 mg; glicerol 220 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 ml (Pitt y Hocking, 1997).
- **Agar semisólido (0,2%):** Tween 80 0,05 ml; agar-agar 0,2 g; agua destilada 100 ml (Pitt y Hocking, 1997).
- **Agar extracto de malta (MEA):** extracto de malta 20 g; glucosa 20 g; peptona 1 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 ml. pH final: 5,0 - 5,5 (Klich y Pitt, 2002).
- **Agar Czapek Dox (CZA):** K_2PO_4H 1 g; sacarosa 30 g; agar-agar 17,5 g; solución Czapek concentrado 10 ml; agua destilada 1000 ml. pH final: $6,2 \pm 0,2$ (Samson y col., 2004a).
- **Agar Czapek Dox- extracto de levadura (CYA):** K_2PO_4H 1 g; $NaNO_3$ 3 g; KCl 0,5 g; $MgSO_4 + 7 H_2O$ 0,5 g; $FeSO_4 + 7 H_2O$ 0,01 g; extracto de levadura 5 g; sacarosa 30 g; agar-agar 20 g; agua corriente 1000 ml. pH final: 6,0 - 6,5 (Samson y col., 2004a).

Nota: Si se utiliza agua destilada es recomendable adicionar 1 ml de solución de metales traza (1 g $ZnSO_4 + 7 H_2O$ y 0,5 g $SO_4Cu + 5 H_2O$ en 100 ml de agua destilada).

- **Agar creatinina-sacarosa (CREA):** creatinina (1 H_2O) 3 g; sacarosa 10 g; KCl 0,5 g; $MgSO_4 + 7 H_2O$ 0,5 g; $FeSO_4 + 7 H_2O$ 0,01 g; $K_2HO_4 + 3 H_2O$ 1,3 g; púrpura de bromocresol 0,05 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 ml. pH final: $8,0 \pm 0,2$ (ajustar después de autoclavar el medio) (Samson y col., 2004a).
- **Agar harina de avena (OA):** harina de avena 3 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 ml (Samson y col., 2004a).

Preparación: Calentar 30 g de copos de avena en 1 l de agua, mantener hirviendo a fuego lento durante 2 h. Filtrar utilizando una tela (gasa) y completar a 1 l. Agregar 15 g de agar-agar. Cuando se utiliza avena en polvo no es necesario filtrar.

- **Agar sacarosa extracto de levadura (YES):** extracto de levadura 20 g; sacarosa 150 g; agar-agar 20 g; agua destilada 1000 ml (Samson y col., 2004a).

Este medio de cultivo también se utiliza para la determinación de la capacidad toxicogénica de *Aspergillus* sección *Fumigati*.

NOTA: Puede ser modificado agregando 0,5 g $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min.

1.2- Soluciones

- **Solución stock de diclorán:** 200 mg de diclorán se llevaron a 100 ml con etanol al 95%.
- **Solución stock de cloranfenicol:** 250 mg de cloranfenicol se disolvieron en 100 ml de etanol al 95%.
- **Solución rosa de bengala al 5%:** 25 mg de rosa de bengala se mezclaron con 30 ml de etanol al 95% y se llevó a 100 ml con agua destilada.
- **Solución Czapek concentrado:** 30 g de NaNO_3 ; 5 g de KCl ; 5 g de $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g de $\text{FeSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{ZnSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,05 g de $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 100 ml de agua destilada.
- **Soluciones testigo de gliotoxina:** se prepararon disolviendo en fase móvil una de las soluciones stock de la toxina (1 mg). Para obtener estas soluciones stock se resuspendió la toxina pura en 5 ml de metanol. Luego esta solución (5 mg/5ml) fue fraccionada en cinco viales a una concentración de 1 mg/ml cada uno, que fueron secados bajo corriente de N_2 y almacenados a -20 °C. Las concentraciones de las soluciones testigo utilizadas se describen en la sección 2.3.4.

1.3- Solventes

Todos los solventes orgánicos utilizados (acetonitrilo, ácido acético glacial 99,5%, cloroformo y metanol) fueron calidad HPLC de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). El agua (calidad HPLC) se obtuvo de un purificador de agua Labconco WaterPro Mobile purification system modelo 90901-01.

2- Métodos

2.1- Obtención de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*

Las cepas utilizadas en todas las experiencias de la presente tesis se obtuvieron de la Colección Micológica de la Universidad Nacional de Río Cuarto (RC) (**Tabla 2**). Además se evaluaron otras cepas que se aislaron de muestras de alimentos para animales obtenidas de establecimientos productivos y fábricas de alimentos balanceados ubicadas en la ciudad de Río Cuarto y alrededores (zona rural). Estas muestras se analizaron con el objetivo de obtener un mayor número de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*.

2.1.1- Aislamiento de *Aspergillus* sección *Fumigati* y análisis de la micoflora de alimentos para animales

2.1.1.1- Origen y composición de las muestras

Las muestras de alimentos balanceados y ensilaje de maíz (35), fueron provistas por establecimientos productivos ubicados al sur de la provincia de Córdoba y por dos fábricas ubicadas en las afueras de la ciudad de Río Cuarto (Córdoba). Los alimentos terminados para pollos (11), cerdos (7) y vacas (10), procedieron tanto de establecimientos productivos como de fábricas. Aquellos destinados a la alimentación de perros (3), caballos (2), chinchillas (1) y corderos-cabras (1), fueron recolectados sólo de fábricas (**Tabla 3**). Los establecimientos productivos, se dedican a la cría de pollos en sistemas intensivos y destinados al consumo familiar, y a la cría de vacas lecheras cuya alimentación se basa en ensilaje de maíz y alimento balanceado. Las muestras de alimentos fueron procesadas en los mismos establecimientos, obtenidas al azar y de

aproximadamente 3 Kg cada una. La recolección se realizó desde junio de 2009 hasta mayo de 2010. En el laboratorio, las muestras primarias fueron homogeneizadas, mezcladas y cuarteadas hasta obtener muestras representativas de 1 Kg. En el caso de los alimentos extrusados (pellets), las muestras representativas de laboratorio se molieron en un molinillo de laboratorio y se homogeneizaron nuevamente. La evaluación micológica fue realizada inmediatamente después de su llegada al laboratorio o fueron almacenadas a 4 °C hasta su análisis dentro de las 24 h.

Tabla 2. Cepas obtenidas de la Colección Micológica de la UNRC.

Cepas <i>Aspergillus fumigatus</i>	Cantidad	Origen de aislamiento
<i>A. fumigatus</i> RC2073- RC2082	27	Alimento* para perros
<i>A. fumigatus</i> RC2067		
<i>A. fumigatus</i> RC2068	38	Alimento† para cerdos
<i>A. fumigatus</i> RC2101- RC2136		
<i>A. fumigatus</i> RC2137- RC2149	13	Alimento‡ para vacas
<i>A. fumigatus</i> RC2150	9	Alimento* para pollos
<i>A. fumigatus</i> RC2071		
<i>A. fumigatus</i> RC2072	5	Alimento* para caballos
<i>A. fumigatus</i> RC2151- RC2153		
<i>A. fumigatus</i> RC2069		
<i>A. fumigatus</i> RC2070	20	Alimento* para chinchillas
<i>A. fumigatus</i> RC2154- RC2166		

* Alimento terminado

† Residuo de la industria cervecera

‡ Ensilaje de maíz.

Tabla 3. Esquema de muestreo y procedencia de los diferentes tipos de muestras de alimentos destinados a la alimentación animal.

Destino de los alimentos	Tipo	Composición centesimal	Nº de muestras	Origen
Cerdos	Inicial ¹	75% maíz, 25% concentrado ⁴	2	Fábricas
	Crecimiento ²	80% maíz, 17% concentrado, 3 % alfalfa	2	Establecimiento
	Finalizador ³	82% maíz, 15% concentrado, 3 % alfalfa	3	Fábricas
Pollos	Parrillero	Principalmente maíz y soja (65%). Completado con trigo, cebada, harina de carne y de hueso	11	Establecimientos (9) y Fábrica (2)
Perros	Premium	Proteína bruta 21% (mín.), humedad 12% (máx.), grasa 10%, Fibra 4%.	3	Fábrica
Caballos	estándar	60% maíz, 20% avena, 20% ensilaje de alfalfa	2	Fábrica
Vacas lecheras	Ensilaje: Sección alta, media y baja del silo	100% ensilaje de maíz	3	Establecimientos
	Vacas Lecheras 18% ⁵	Proteína 18% (mín.), humedad 10% (mín.), Grasa 4% (mín.), E.L.N* 55% (mín.), Fibra 5% (máx.)	5	Establecimientos
Chinchillas	Reproductores	Principalmente: alfalfa (60%). Complementado con avena, trigo, cebada, girasol, soja y lino	1	Fábrica
Corderos-cabras	Engorde ⁶	Proteína bruta 15% (mín.), humedad 13% (máx.), E.L.N* 1.5% fibra 11% (máx.), minerales totales 13% (máx.).	1	Fábrica

¹ Destinado a cerdos entre 10-25 Kg. ² Destinado a cerdos entre 25-30 Kg. ³ Destinado a cerdos de más de 60 kg. ⁴ Concentrado: 36% proteína, 2% materia grasa, 9% fibra, humedad 12%, cenizas 18%. ⁵ Para vacas de hasta 18 litros de producción diaria de leche. ⁶ Destinado a animales a partir de los 60 días. * E.L.N: Extracto Libre de Nitrógeno.

2.1.1.2- Recuento, aislamiento e identificación de la micoflora contaminante

El aislamiento de los aspergilos de la sección *Fumigati* y de la micobiota en general a partir de las muestras de alimentos para animales se realizó mediante el método de diseminación en placa. Diez gramos de cada muestra se homogeneizaron con 90 ml de agua peptonada al 0,1% durante 30 min en un agitador rotatorio. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} y alícuotas de 0,1 ml de cada dilución se sembraron por triplicado en los medios de recuento general: DRBC (Abarca y col., 1994), para el recuento total de la micoflora y DG18 (Pitt y Hocking, 1997), para el recuento de hongos xerofílicos. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días en oscuridad. Para el recuento fueron seleccionadas aquellas placas que contenían entre 10 - 100 colonias. Al final del período de incubación, se determinaron las unidades formadoras de colonias por gramo de alimento (UFC/g) en ambos medios de cultivo y se identificaron a nivel de género, de acuerdo a las claves taxonómicas de Pitt y Hocking (1997) y Samson (2000). Las colonias que presentaban características macroscópicas semejantes a las de *A. fumigatus*, fueron transferidas a agar extracto de malta (MEA) e incubadas nuevamente a 25 °C durante 7 días en oscuridad para su posterior identificación.

Una vez identificada la micobiota contaminante a nivel de géneros y confirmados los aspergilos de la sección *Fumigati* por claves taxonómicas adecuadas (Pitt y Hocking, 1997 y Klich y Pitt, 2002), se procedió al cálculo de la **frecuencia de aislamiento** de los diferentes géneros fúngicos (porcentaje de muestras en las que estuvo presente cada género) y de la **frecuencia de distribución de *Aspergillus* sección *Fumigati*** (porcentaje de cepas de esta sección, en relación al total de cepas de *Aspergillus* spp.) en las muestras de ensilaje y todos los alimentos terminados analizados.

2.2- Identificación morfológica de *Aspergillus* sección *Fumigati*

2.2.1- Identificación según la clave taxonómica de Klich y Pitt (2002)

Las especies del género *Aspergillus* tienen una característica taxonómica en común tales como la disposición de sus conidios en cabezas aspergilaes y la presencia de la célula pie en el origen del conidióforo (Fig. 2). Estas características estables combinadas con otras primarias y secundarias constituyen la base de la taxonomía clásica del género.

La clave dicotómica de Klich y Pitt (2002) es la más utilizada y permite la identificación morfológica de las especies del género *Aspergillus*.

Todas las colonias presuntivas de pertenecer a la sección *Fumigati* que fueron transferidas a placas de medio MEA e incubadas como se indicó anteriormente, fueron identificadas morfológicamente según dicha clave taxonómica. Para ello, se realizaron preparados en fresco a partir de cada colonia y se determinaron los caracteres macroscópicos y microscópicos más relevantes como color, diámetro y reverso de la colonia, y disposición de los conidióforos, forma y tamaño de la vesícula, estipe y conidios, respectivamente (Tabla 4). Además se re-examinaron mediante esta metodología todas las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* tomadas de la Colección Micológica.

Tabla 4. Características macro- y microscópicas de *Aspergillus fumigatus*, según Klich y Pitt (2002).

Características macroscópicas	Micelio reproductivo (conidios)	Micelio	Diámetro de las colonias	Reverso
	Turquesa a grisáceos, o de verde claro a verde intenso (en CYA 25, MEA, CY20S y CYA 37)	Blanco, inconspicuo	Varía en promedio de 30 a 35 mm en MEA, CYA 25 y CY20S, y es de 57 mm en promedio, en CYA 37.	Incoloro, amarillento, grisáceo, verde o marrón rojizo.
Características microscópicas	Conidióforos	Cabeza Conidial	Estipe	Conidios
	Uniseriados. Fiálides ubicadas sobre la mitad o los dos tercios superiores de la vesícula.	Predominantemente columnar.	Incoloros o grisáceos, de pared lisa, expandidos gradualmente en una vesícula piriforme o espatulada.	Globosos a elipsoidales. Lisos, levemente rugosos o espinosos, 2-3 µm de diámetro.

2.2.2- Identificación morfológica según Samson y col. (2007)

Durante la identificación basada en la observación de los caracteres morfológicos en medio MEA (sección 2.2.1) se observó que existía variabilidad en ciertas características macroscópicas al comparar cepas de diferentes orígenes. Por lo tanto, para un estudio morfológico más detallado de las cepas, se aplicó la metodología de clasificación de especies de la sección *Fumigati* propuesta recientemente por Samson y col. (2007). Ésta utiliza el enfoque polifásico de clasificación de especies y describe de forma detallada los caracteres morfológicos de cada una de ellas, perfil de extrolitos, distribución geográfica de las especies, entre otros aspectos relevantes y considera las relaciones filogenéticas entre los miembros de esta sección (incluidos los teleomorfos *Neosartorya*).

Se escogieron 35 cepas que fueron seleccionadas representativamente de cada origen de aislamiento para ser analizadas por esta metodología. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: MEA, CZA, CYA, CREA, OA y YES. Una vez inoculado, el medio CYA se incubó a 25 ± 1 °C y 37 ± 1 °C, mientras que MEA, CZA, CREA, OA y YES sólo a 25 ± 1 °C. A partir de cada cepa se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido (0,2%) y desde aquí se inocularon los medios de cultivo en tres puntos equidistantes entre sí, en relación al borde y centro de la placa. Estos se incubaron durante 7 días a las temperaturas anteriormente mencionadas, siguiendo el esquema de inoculación e incubación que se muestra en la Fig. 11.

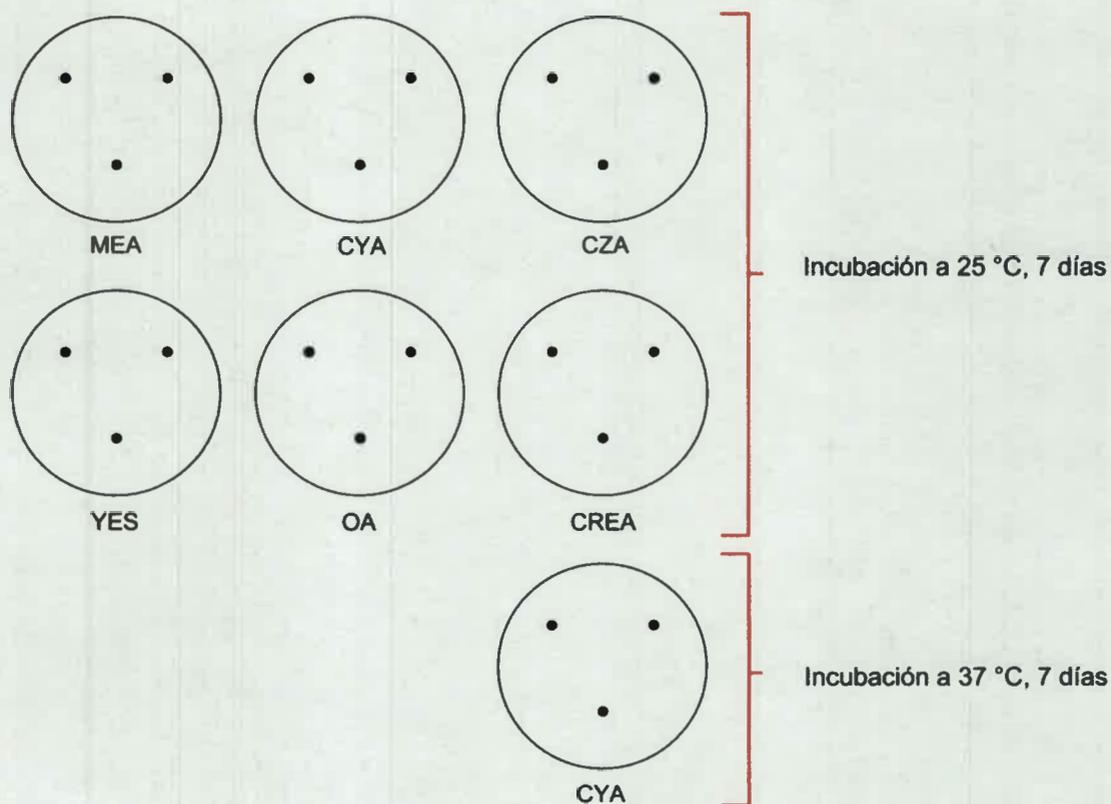


Figura 11. Esquema de inoculación para la identificación morfológica de aspergilos de la sección *Fumigati*.

Luego del período de incubación se observaron y registraron los siguientes caracteres morfológicos para cada cepa desarrollada en los diferentes medios de cultivo:

Macroscópicos:

- ◆ Diámetro de las colonias (en todos los medios de cultivo)
- ◆ Crecimiento y producción de ácidos en CREA
- ◆ Color y textura de las colonias en MEA
- ◆ Color del reverso de la colonia en CZA
- ◆ Conidiación (grado de esporulación)

El **color de la colonia** está determinado por el color de los conidios y constituye una de las características más importantes en la clasificación de las distintas secciones en el caso del género *Aspergillus*. La **textura del micelio** está determinada por la disposición de los conidióforos, y puede variar desde velutinosa, velutinosa-flocosa, flocosa, etc. Mientras que la **coloración del reverso** también puede resultar una característica distintiva de las diferentes especies.

Microscópicos:

- ◆ Disposición de las cabezas conidiales
- ◆ Forma y diámetro de la vesícula
- ◆ Longitud y ancho del estipe
- ◆ Tamaño, forma y textura de los conidios

El conidióforo está compuesto de tres partes: la célula pie, el pie propiamente dicho y la **vesícula**. Ésta es el ápice engrosado del conidióforo; su forma puede variar de globosa a subglobosa, clavada, piriforme, etc. Está presente sólo en el género *Aspergillus*. La disposición de las fiálides sobre la vesícula determina la forma de la **cabeza conidial** que puede variar de columnar a radiada. Los **conidios** son estructuras reproductoras asexuales que sirven fundamentalmente para la dispersión. Pueden ser uni- o multinucleados y su forma, diámetro, tamaño y textura son características taxonómicas relevantes. Finalmente, la **longitud del estipe** se refiere a la distancia existente desde la célula pie hasta donde comienza a formarse la vesícula.

2.3- Estudio del perfil gliotoxicogénico de *Aspergillus* sección *Fumigati*

2.3.1- Cepas

Se determinó la capacidad de producción de gliotoxina de 143 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*; este conjunto incluyó 41 cepas procedentes de alimentos terminados para perros, 27 de alimentos para vacas lecheras (ensilaje de maíz $n=26$ y alimento terminado $n=1$), 39 de alimentos para cerdos (residuo de la industria cervecera), 20 de alimentos terminados para chinchillas, 6 de alimentos para equinos y 10 de alimentos terminados para pollos. Todas ellas se preservaron en medio de cultivo MEA a 4 °C hasta el momento del análisis.

2.3.2- Capacidad de producción de gliotoxina

Las cepas se inocularon en el centro de placas de Petri conteniendo agar YES y se incubaron a 25 °C durante 7 días en oscuridad. El inóculo consistió de un taco de hongo de aproximadamente 4 mm x 4 mm tomado de un cultivo en agar MEA (de no más de 5 días). Estas condiciones de cultivo e incubación fueron escogidas como las más adecuadas para la producción de gliotoxina en el laboratorio en base a una experiencia previa donde se evaluaron tres medios de cultivo (YES, CZ y CYA), dos temperaturas de incubación (25 y 37 °C) y dos metodologías de extracción de la toxina (sonicado durante 60 min y centrifugación durante 20 min a 9500 rpm).

2.3.3- Extracción

La extracción de la gliotoxina se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996) con modificaciones. Se tomaron con un sacabocado, 3 tacos de agar del área central, media y periférica de la colonia, se introdujeron en un microtubo Eppendorf vacío y previamente pesado, y se pesaron. Se obtuvo por diferencia el peso del micelio + medio de cultivo. Se adicionó 1 ml de cloroformo, se centrifugó la mezcla solvente-muestra durante 20 min a 9500 rpm y se recuperó la fase clorofórmica (sobrenadante). Este extracto fue filtrado a través de filtros de membrana de nylon (Titan filtration system, 17 mm; 0,45 µm; Rockwood TN; USA) y 800 µl se evaporaron a sequedad bajo corriente

de N₂. Finalmente, se resuspendió en 200 µl de fase móvil y se usó para el análisis de gliotoxina por HPLC-MS/MS. Los niveles de esta toxina se expresaron como ng/g de micelio en agar YES.

2.3.4- Detección y cuantificación por HPLC-MS/MS

La detección y cuantificación de gliotoxina se realizó de acuerdo a lo propuesto por Sulyok y col. (2007), con modificaciones. Dicha metodología debió ser puesta a punto para llevar a cabo el análisis de los extractos fúngicos de las cepas en estudio. Todos los análisis fueron realizados en un HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Alliance 2685, un autoinyector Waters Alliance 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tándem (Quattro Ultima Platinum) y fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una XBridge™ C18 3,5 µm (2,1 x 150 mm) acoplada a una precolumna.

La interface se trabajó en modo de ESI positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150 °C y 200 °C, respectivamente. El voltaje del capilar fue de 3,00 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 104 l/h y 678 l/h para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. El voltaje del cono fue de 35 V, el dwell time fue de 100 ms y la energía de colisión de 35 V. Para la determinación de gliotoxina se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de la gliotoxina [M+H]⁺ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. Las transiciones y condiciones de MRM se muestran en la **Tabla 5**. La adquisición de los datos y el procesamiento de los mismos se realizaron mediante un software Mass Lynx V.4.1 - Copyright 2005, Waters INC. El ion producto MRM de m/z (relación masa/carga) 327>263 fue utilizado para la cuantificación. Luego, cuatro puntos de identificación se usaron para reconocer la gliotoxina en los extractos fúngicos: tiempo de retención, el ion precursor y ambos productos iónicos (327>263 y 327>245) (Tabla 5).

La fase móvil, eluída a un flujo de 0,2 ml/min, consistió de un gradiente de 1% de ácido acético en agua con 5 mM acetato de amonio (solvente A) y 1% de ácido acético en

metanol con 5 mM de acetato de amonio (solvente B) (Tabla 6). La temperatura de la columna fue mantenida a 22 °C. Alícuotas de 50 µl de los extractos fúngicos finales fueron inyectados en la unidad. Para obtener una curva de calibración se inyectaron por triplicado volúmenes crecientes (1 - 30 µl) de dos soluciones de trabajo de gliotoxina en fase móvil de 5000 y 50 ng/ml preparada sobre extracto de medio YES para tener en cuenta el efecto de matriz en la determinación (calibración AM). La cuantificación de la gliotoxina en los extractos se realizó por medición del área de los picos y su extrapolación a esta curva de calibración. El límite instrumental de detección y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), fueron determinados en extractos fúngicos y soluciones testigo de gliotoxina basados en la relación señal/ruido (S/N) de 3:1 para LOD y de 10:1 para LOQ.

2.3.5- Ensayos de recuperación, repetitividad y reproducibilidad del método

Se realizaron estudios de recuperación de gliotoxina a partir del medio YES con el objetivo de determinar la eficacia del cloroformo como solvente de extracción. Para ello, placas de medio YES fueron fortificadas a dos niveles (25 y 70 µg) con 200 µl de una solución de gliotoxina apropiada diluida en metanol:agua (20:80, v/v), e incubadas a 25 °C durante 24 h, obteniéndose una concentración final en los tacos de medio de cultivo de 2,5 y 7 µg/g, respectivamente. Se tuvo especial cuidado en la homogeneización de la toxina en el medio de cultivo. Los medios de cultivo fortificados fueron sometidos al proceso de extracción, en tres réplicas. Las cantidades de gliotoxina recuperadas fueron determinadas a partir de una curva de calibración y expresadas como el valor medio (porcentaje) de tres réplicas y su desviación estándar relativa (RSD). Se utilizó, en todos los casos, calibración ajustada por matriz (AM) para corregir la eventual supresión iónica resultante de la co-elusión de compuestos matriciales. Los resultados no fueron corregidos por el recuperero.

Se computaron las desviaciones estándar relativas de las determinaciones llevadas a cabo el mismo día (RSD_r) como en días diferentes (RSD_R) para analizar la repetitividad y reproducibilidad, respectivamente. La repetitividad se estimó analizando extractos fúngicos fortificados con gliotoxina a niveles de 0,5; 50; 500 y 1000 ng inyectados (n=3). Las muestras fueron analizadas el mismo día por el mismo analista. Mientras que la

reproducibilidad intra-laboratorio fue determinada en los mismos extractos fúngicos pero medidos en días diferentes.

Tabla 5. Parámetros usados para investigar la producción de gliotoxina por HPLC-MS/MS.

Compuesto	[M + H] ⁺	t _R (min)	Iones producto (m/z)	CV (V)	CE (V)
Gliotoxina	327	14,97	263	35	15
			245	35	25

Nota: [M + H]⁺, Ion precursor; t_R, tiempo de retención; MS/MS (m/z), iones producto; CV (V), voltaje del cono; CE (V), energía de colisión.

Tabla 6. Detalle del gradiente utilizado para la determinación de gliotoxina por HPLC-MS/MS.

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0,00	10,5	89,5
2,00	10,5	89,5
14,00	97,5	2,5
17,00	97,5	2,5
17,10	10,5	89,5
22,00	10,5	89,5

3- Mantenimiento de las cepas

Las cepas aisladas fueron mantenidas en glicerol al 15% a -80 °C, a fin de evitar mutaciones o cambios en las características fisiológicas de las mismas.

Resultados y Discusión

1- Aislamiento de *Aspergillus* sección *Fumigati* y de la micoflora acompañante a partir de alimentos destinados a animales

1.1- Recuentos fúngicos

Los recuentos fúngicos (UFC/g) obtenidos a partir de las muestras de ensilaje de maíz destinado a vacas lecheras y de los alimentos terminados para caballos, vacas, pollos, cerdos y perros, en diferentes medios de cultivo se muestran en la **Tabla 7**. En general, todas las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica en un amplio rango de recuentos, en ambos medios de cultivo. En el caso del ensilaje para vacas y de los alimentos terminados destinados a cerdos se obtuvo la mayor variabilidad, ya que se obtuvieron recuentos desde el límite de detección de la técnica a 1×10^6 UFC/g de alimento, en DRBC y DG18. Las muestras de alimentos terminados para caballos presentaron un recuento general de 1×10^2 a $6,7 \times 10^3$ UFC/g, en DRBC y de 1×10^2 a $7,6 \times 10^2$ UFC/g, en DG18. Los alimentos destinados a cerdos presentaron la mayor cantidad de muestras (es decir, los porcentajes más elevados) que exceden el límite de calidad higiénica establecido por GMP (2008) en 1×10^4 UFC/g de alimento, seguido de los alimentos destinados a pollos y vacas (ensilaje de maíz y alimento terminado). Finalmente, si bien las muestras de alimentos para perros presentaron adecuada calidad higiénica según los recuentos obtenidos (inferiores al límite), a partir de éstas se obtuvo la mayor cantidad de cepas de *Aspergillus* de la sección *Fumigati*. Por lo tanto, **el límite de 1×10^4 UFC/g debe ser adoptado con precaución ya que se puede asegurar la calidad higiénica del alimento pero no su grado de peligrosidad, debido a que ésta dependerá del tipo de flora fúngica presente.**

Se determinó también la micobiota en muestras destinadas al consumo de chinchillas y pequeños rumiantes (corderos-cabras). La muestra de alimento terminado para chinchillas presentó recuentos de $4,5 \times 10^2$ y $2,5 \times 10^2$ UFC/g en DRBC y DG18, respectivamente. Mientras que la muestra destinada a pequeños rumiantes presentó recuentos que fueron superiores a 1×10^4 UFC/g de alimento en ambos medios de cultivo evidenciando su baja calidad higiénica.

Tabla 7. Recuento fúngico en muestras de alimentos destinados a caballos, vacas, pollos, cerdos y perros y porcentaje de muestras que exceden el límite de calidad higiénica.

Alimento		Recuentos (UFC/g)		% de muestras con recuentos > al límite [†]
		DRBC	DG18	
Destinado a	Tipo	Rango (Mín - Máx)	Rango (Mín - Máx)	
caballos	terminado [*]	$1 \times 10^2 - 6,7 \times 10^3$	$1 \times 10^2 - 7,6 \times 10^2$	ND
vacas	terminado	$3,5 \times 10^2 - 7,8 \times 10^4$	$1 \times 10^2 - 9,4 \times 10^4$	60
	ensilaje	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$	60
pollos	terminado	$1,45 \times 10^3 - 1 \times 10^6$	$1,05 \times 10^3 - 1 \times 10^6$	63,6
cerdos	terminado	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$	$1 \times 10^2 - 1 \times 10^6$	71,4
perros	terminado	$3,5 \times 10^2 - 1,5 \times 10^3$	$1 \times 10^2 - 2,5 \times 10^3$	ND

*Alimentos terminados. UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de alimento. Límite de detección: 1×10^2 UFC/g. DRBC: diclorán rosa de bengala cloranfenicol. DG18: diclorán glicerol 18%.

[†]Nivel máximo recomendado para calidad higiénica: 1×10^4 UFC/g (GMP, 2008).

Estos resultados sugieren, en general, una elevada actividad fúngica en los alimentos determinando baja calidad higiénica e inadecuadas prácticas de almacenamiento de los productos.

La presencia de hongos en los alimentos puede afectar la palatabilidad y reducir la absorción de nutrientes en el organismo animal. Diferentes investigadores obtuvieron resultados similares a partir de alimentos balanceados destinados a pollos (Dalcero y col., 1998; Magnoli y col., 1998, 2002; Pereyra y col., 2008a), conejos (Magnoli y col., 2005) y cerdos (González Pereyra y col., 2008b). González Pereyra y col. (2008a) analizaron muestras de ensilaje de maíz pre- y post- fermentado procedentes de la región central de Argentina y encontraron, al igual que en este trabajo, elevados recuentos generales en las muestras tomadas luego de la apertura del silo (período de post-fermentación). Los recuentos encontrados por estos autores fueron de 8×10^3 a $2,8 \times 10^8$ UFC/g en DRBC y de 1×10^2 a $2,8 \times 10^8$ UFC/g en DG18. Otros autores informaron recuentos fúngicos

totales bajos (10-100 UFC/g) en muestras de alimentos terminados comerciales destinados a perros, gatos y aves en Portugal (Martins y col., 2003). La determinación de los recuentos fúngicos en alimentos destinados a animales sirve como complemento del análisis de micotoxinas además de constituir un indicador útil de calidad micológica en materias primas y alimentos terminados y de prácticas de almacenamiento.

1.2- Frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos aislados

Se determinó la frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos obtenidos de los alimentos terminados destinados a caballos. Las muestras estuvieron contaminadas con los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Eurotium* que fueron aislados con una frecuencia del 50%. *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. no se encontraron en dichas muestras. En el caso de los alimentos destinados a perros, estuvieron contaminados con 4 géneros de hongos filamentosos y con levaduras; *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y las levaduras fueron aislados de todas las muestras analizadas (frecuencia de aislamiento= 100%), mientras que *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp. se aislaron con frecuencias del 67 y 33%, respectivamente.

La frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos (%) a partir del ensilaje de maíz y de los alimentos terminados destinados a vacas lecheras se muestra en la Fig. 12. Los alimentos terminados presentaron contaminación con una mayor diversidad de géneros fúngicos en relación al ensilaje. Se aislaron de este último, especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, del orden Mucorales y levaduras. Las levaduras predominaron en ambos tipos de alimento (frecuencia de aislamiento= 80%) y en el caso de los alimentos terminados, junto a los géneros *Penicillium* y *Cladosporium*. El género *Aspergillus* estuvo presente en el 60% de las muestras de ensilaje de maíz y alimentos terminados, mientras que *Fusarium* spp. sólo se aisló de los alimentos terminados y *Penicillium* spp. del ensilaje (frecuencia de aislamiento del 40% en ambos casos).

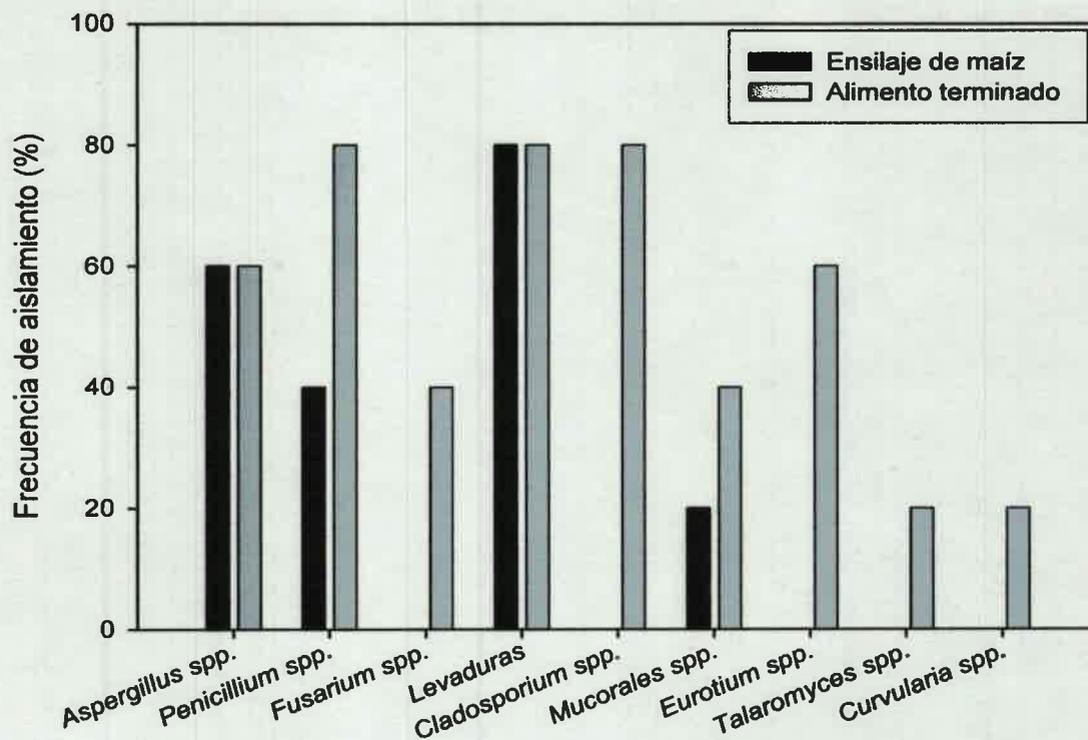


Figura 12. Frecuencia de aislamiento (%) de diferentes géneros fúngicos aislados a partir de ensilaje de maíz y alimentos terminados destinados a la alimentación de vacas lecheras.

En los alimentos terminados para pollos y cerdos, *Fusarium* spp. fue el género filamentoso más frecuentemente aislado con frecuencias del 90,9 y 85,7%, respectivamente. Ambas clases de alimento, presentaron elevada contaminación con levaduras; éstas se aislaron de todas las muestras de alimentos para pollos (100%) y del 71,4% de las de alimentos para cerdos. Especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* fueron aislados de los alimentos para pollos y cerdos con frecuencias del 45,4 y 54,5% y del 28,6 y 42,9%, respectivamente (Fig. 13). Especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium* y *Trichoderma* y del orden Mucorales se aislaron de ambos tipos de alimento pero en frecuencias de aislamiento menores.

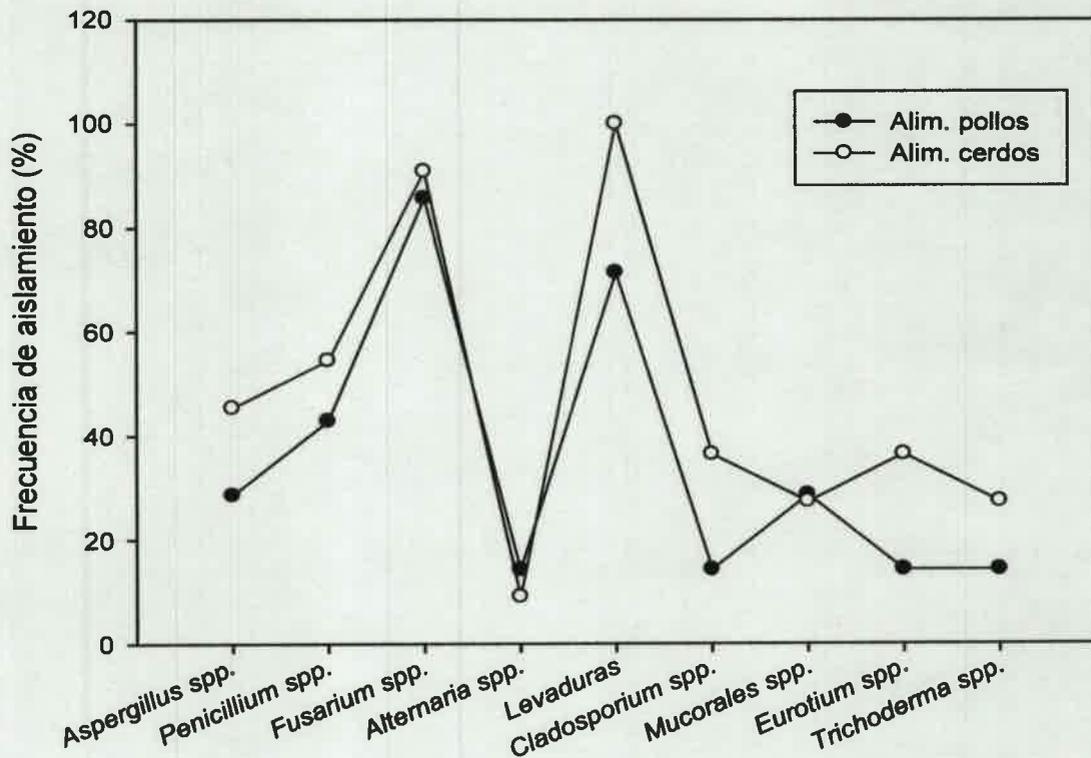


Figura 13. Frecuencia de aislamiento (%) de diferentes géneros fúngicos aislados de alimentos terminados destinados a la alimentación de pollos y cerdos.

Todas las muestras analizadas destinadas a las diferentes especies animales estuvieron contaminadas con al menos dos de los principales géneros micotoxigénicos. *Penicillium spp.* fue encontrado en todas ellas, mientras que *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* se aislaron de la mayoría de las muestras analizadas (incluidas las destinadas a la alimentación de chinchillas, perros y pequeños rumiantes). Un aspecto importante a destacar es que las levaduras estuvieron presentes en altos porcentajes en la mayoría de los alimentos analizados. Éstas fueron aisladas de todas las muestras de alimentos para pollos, y del 80 y 71,4% de los alimentos para vacas y cerdos, respectivamente. Si bien no se conoce aún cuál es el rol que desempeñan en los alimentos, distintos autores indicaron que su presencia generó la disminución de la biodisponibilidad de ciertas

toxinas, como por ejemplo las aflatoxinas debido a su adsorción (Shetty y col., 2007; Kamalzadeh y col., 2009).

El género *Aspergillus* fue aislado de todos los alimentos analizados y en algunos casos, con elevadas frecuencias (Fig. 14). Todas las muestras de alimentos para perros presentaron contaminación con especies de este género, mientras que se aisló de los demás alimentos con frecuencias mayores al 28%.

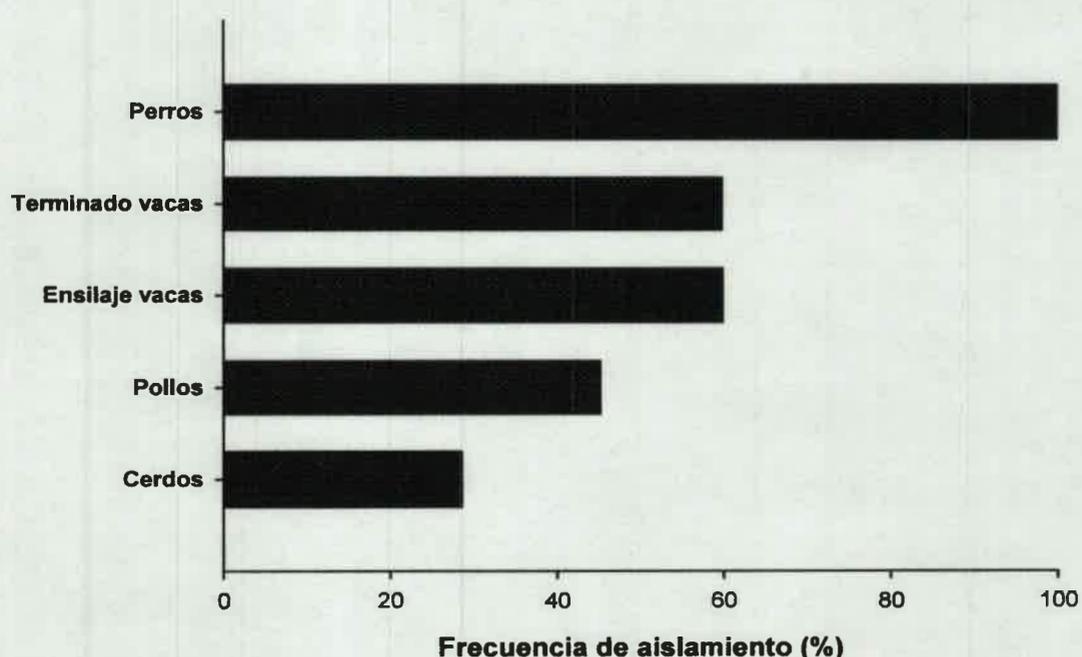


Figura 14. Frecuencia de aislamiento del género *Aspergillus* (%) aislados de alimentos destinados a la alimentación animal.

La presencia de este género en los alimentos para animales es de gran relevancia debido a las especies toxicogénicas y/o patógenos oportunistas que incluye, como por ejemplo *A. fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. terreus*, entre otros. Resultados similares a los observados en el presente estudio han sido informados por otros investigadores en ensilaje de maíz para vacas lecheras (Oude Elferink y col., 2001; Dos Santos y col., 2002; Cavaglieri y col., 2005; Pereyra y col., 2008b) y en alimentos terminados para pollos y perros (Dalcero y col., 1998; Pereyra y col., 2008a, Fernández Jurí y col., 2009). González Pereyra y col. (2008a,b) encontraron que especies de

Aspergillus eran prevalentes en las muestras de ensilaje para vacas lecheras, mientras que en los alimentos terminados para cerdos eran las especies de *Fusarium*. Los resultados coinciden también con los obtenidos en este trabajo a partir de los alimentos terminados para cerdos. La elevada frecuencia de aislamiento del género *Fusarium* en los alimentos terminados para cerdos y pollos estaría relacionada principalmente a su composición, debido a que se obtienen a partir de un porcentaje elevado de maíz (aproximadamente 65%). Chulze y col. (1996) y Ramírez y col. (1996) demostraron que diferentes especies de *Fusarium* pueden contaminar el maíz durante el estadio de pre-cosecha.

1.3- Distribución de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* en los alimentos para animales

Se estudió la distribución de *Aspergillus* sección *Fumigati* en los diferentes alimentos para animales analizados. De todos aquellos en los que el género *Aspergillus* estuvo presente, el ensilaje de maíz destinado a vacas lecheras fue el que mostró mayor porcentaje de cepas de la sección *Fumigati*, seguido de los alimentos para perros y pollos. Mientras que la frecuencia de distribución en alimentos terminados para vacas fue sólo del 3,4%. No se aislaron cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* a partir de los alimentos destinados a cerdos (Fig. 15).

La prevalencia de *A. fumigatus* en el ensilaje puede ser explicada por las condiciones microaerofílicas y bajo pH presentes en el material ensilado. Éstas inhiben el desarrollo de otros hongos aeróbicos y favorece otros como *A. fumigatus* que son capaces de tolerarlas. Dos Santos y col. (2002), Garon y col. (2006) y González Pereyra y col. (2008a) demostraron también la prevalencia de esta especie en ensilajes de maíz provenientes de Portugal, Francia y Argentina, respectivamente.

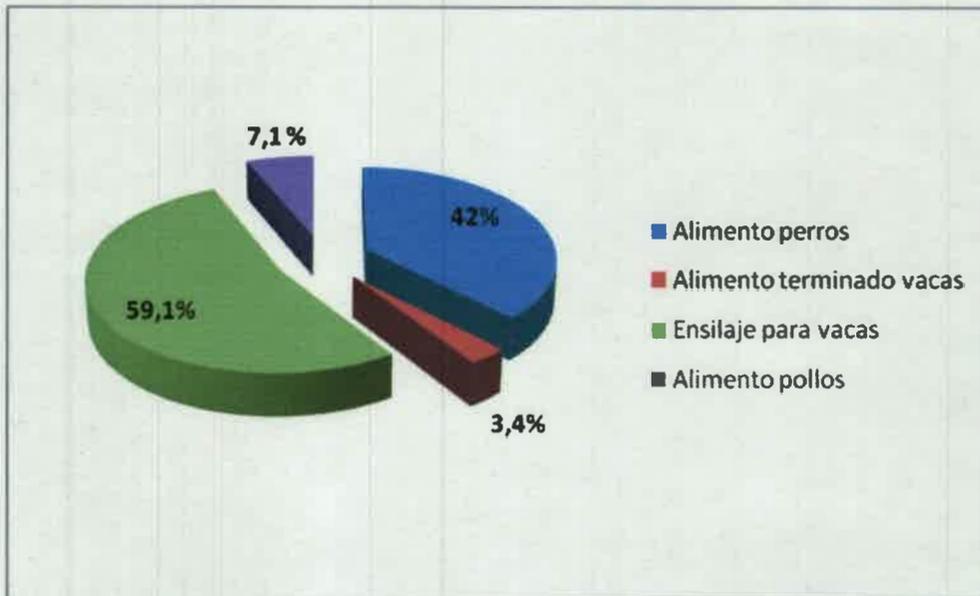


Figura 15. Frecuencia de distribución de cepas de *A. fumigatus* aisladas a partir de diferentes alimentos para animales.

2- Identificación morfológica de aspergilos de la sección *Fumigati*

Durante la observación de los caracteres macro y microscópicos de todos los aspergilos de la sección *Fumigati* en estudio, se observó variabilidad en algunos caracteres macroscópicos, tanto durante la identificación mediante la clave taxonómica de Klich y Pitt (2002) como en la metodología de Samson y col. (2007). El color de las colonias fue la característica más manifiesta, ya que en ocasiones presentaron tonalidades que variaron de turquesa, turquesa verdoso a verde oliva (Fig. 16).

Debido a la reciente revisión de la sección *Fumigati* y la consecuente descripción de nuevas especies las cuales presentan mínimas diferencias morfológicas, difíciles de distinguir al microscopio óptico, las cepas identificadas morfológicamente como *A. fumigatus* se clasificaron como *Aspergillus* sección *Fumigati* hasta la confirmación de la identificación a nivel de especie por métodos moleculares.

La Fig. 17 muestra la apariencia de las colonias de una cepa aislada de residuo de la industria cervecera para cerdos (cepa de Colección Micológica) en los medios de cultivo utilizados por Samson y col. (2007) en su metodología taxonómica polifásica.

La presencia de especies de la sección *Fumigati* en alimentos para animales conlleva un riesgo potencial en la salud, no sólo de los animales que los consumen, sino también para las personas que los manipulan. Muchas de las especies de esta sección (incluidos *A. fumigatus* sensu stricto y las especies estrechamente relacionadas) han sido informados como patógenos oportunistas y productores de metabolitos altamente tóxicos, como la gliotoxina y otras micotoxinas tremorgénicas. Magnoli y col. (2010) recomendaron la evaluación de *A. fumigatus* en alimentos para animales debido a que esta especie se encuentra frecuentemente asociada al deterioro y calentamiento de forrajes ensilados, y a su peligro inherente en estos sustratos.

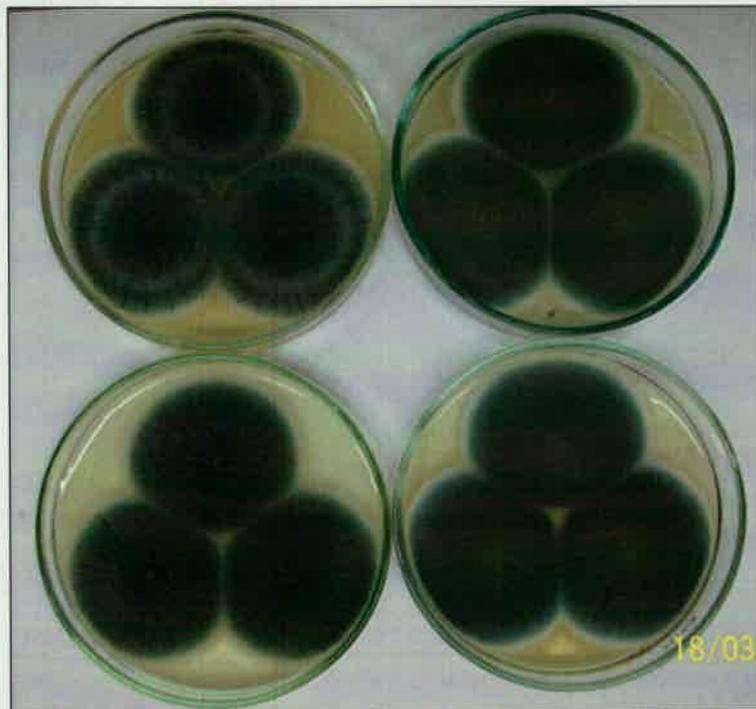


Figura 16. Variabilidad en el color y los surcos de las colonias de *Aspergillus* sección *Fumigati*. Cepas aisladas de alimento para perros (izq. arriba), ensilaje de maíz (der. arriba), alimento para chinchillas (izq. abajo) y alimento para caballos (der. abajo).

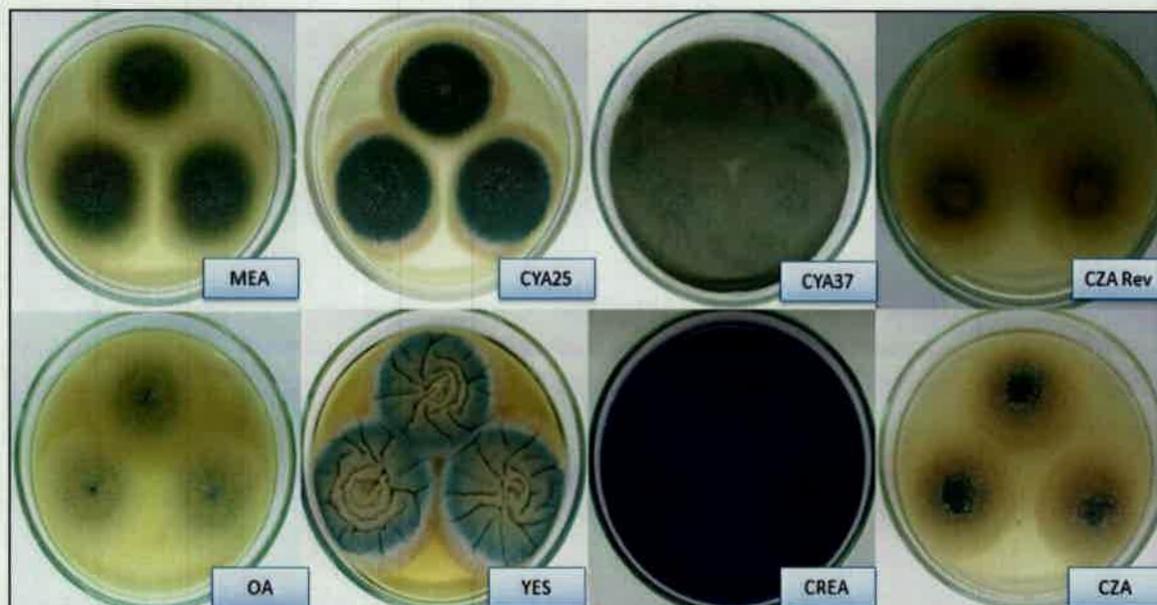


Figura 17. Morfología de las colonias de una cepa de *Aspergillus* sección *Fumigati* aislada de residuo de la industria cervecera para cerdos en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación.

3- Capacidad de producción de gliotoxina por *Aspergillus* sección *Fumigati*

Previo al estudio de la capacidad gliotoxicogénica de las cepas, se llevó a cabo un ensayo a través del cual se comparó cualitativamente la producción de gliotoxina en diferentes condiciones de cultivo, incubación y extracción de un grupo de cepas. Se seleccionó la mejor condición por cepa y luego se comparó entre cepas a fin de observar si el comportamiento se repetía en todas. La condición de cultivo e incubación más adecuada para la producción de gliotoxina fue el cultivo en medio YES a 25 °C. Mientras que los dos procedimientos de extracción ensayados no mostraron diferencias en la cantidad de toxina extraída del medio de cultivo para todas las cepas ensayadas. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Kosalec y col. (2005), quienes observaron mayor producción de gliotoxina a 37 °C de incubación. No obstante, Frisvad (2009) observó que la mayoría de los metabolitos secundarios de *A. fumigatus* son producidos a 25 °C en comparación con 37 °C.

Diferentes autores han enfatizado la importancia de estudiar la habilidad de producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus*, debido a las particulares actividades biológicas que esta toxina presenta y a su activo rol en la patogénesis de la AI (Upperman y col. 2003, Watanabe y col. 2003, Morgavi y col. 2004, Boudra y Morgavi 2005).

3.1- Parámetros evaluados durante la puesta a punto del método cromatográfico

3.1.1- Curva de calibración y límites de detección y cuantificación

Se observó un comportamiento lineal en la curva de calibración AM $y = 5.474,5 x$ ($R^2 = 0,9925$, $n=12$) en el rango de 0,25 a 3000 ng de gliotoxina inyectada. El límite instrumental de detección ($S/N=3$) fue de 0,25 ng. Mientras que el LOD y el LOQ obtenidos en extractos fúngicos y soluciones testigo de gliotoxina fueron 3,5 y 10,5 ng/g, respectivamente.

3.1.2- Ensayos de recuperación, repetitividad y reproducibilidad

Los porcentajes de recuperación media de gliotoxina a los niveles fortificación de 2,5 y 7 $\mu\text{g/g}$ ensayados fueron 100,3 y 92,4% con RSD_r de 6,6 y 3,8%, respectivamente. Estos valores están en concordancia con el criterio adoptado por la Comisión Europea para la Estandarización que establece un rango de 70-110% como porcentajes de recuperación aceptables para el método de extracción evaluado (CEN, 1999). Además, se obtuvieron adecuados valores de repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio, expresados como RSD_r y RSD_R , respectivamente, para diferentes concentraciones de gliotoxina (Tabla 8).

Tabla 8. Repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio.

Gliotoxina inyectada (ng)	Repetitividad *	Reproducibilidad intra-laboratorio †
	RSD _r (%)	RSD _R (%)
0,5	2,5	7,7
1	1,8	-
1,5	2,3	-
50	5,4	12,7
500	0,3	3,9
1000	1,6	6,5

* La repetitividad fue estimada ensayando extractos fúngicos fortificados con gliotoxina (n=3); las muestras fueron analizadas el mismo día por el mismo analista. † La reproducibilidad intra-laboratorio fue estimada sobre extractos fúngicos fortificados con gliotoxina en diferentes días.

3.2- Capacidad gliotoxicogénica

Los niveles mínimos y máximos de gliotoxina producidos por cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* aisladas de las diferentes muestras de alimentos para animales y aquellas seleccionadas de la Colección Micológica de la UNRC, se muestran en la **Tabla 9**. Se obtuvieron cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* gliotoxicogénicas a partir del ensilaje de maíz, residuo de cervecería y de los diferentes alimentos terminados. Un 80,5% de las cepas aisladas de alimento para perros fueron capaces de producir gliotoxina en un amplio rango de concentraciones, que variaron de 10,8 a 1156,1 ng/g, mientras que las cepas de alimentos para caballos produjeron la toxina en niveles más bajos. De aquellas aisladas de ensilaje de maíz para vacas lecheras, un 55,5% produjeron gliotoxina en amplios rangos, habiéndose detectado en uno de sus extractos el nivel más elevado de ésta toxina (3430,5 ng/g).

Tabla 9. Capacidad gliotoxicogénica de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* determinada por HPLC-MS/MS.

Alimento		<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> productores de gliotoxina	
Destino	Tipo	Cepas positivas †	Niveles de gliotoxina (ng/g)
			Rango (Mín-Máx)
perros	Terminado *	33/41	10,8 - 1.156,1
vacas	ensilaje de maíz	15/27	10,8 - 3.430,5
cerdos	residuo de cervecería	22/39	11,2 - 923,6
chinchillas	terminado	10/20	12,05 - 344,7
caballos	terminado	5/6	10,7 - 68,5
pollos	terminado	1/10	12,2

* Alimentos terminados. † Número de cepas productoras sobre el número total de cepas aisladas de cada alimento. Límite de detección de la técnica: 3,5 ng/g. Límite de cuantificación: 10,5 ng/g.

Rangos amplios de producción de gliotoxina fueron también observados en el 50 y 56,4% de las cepas aisladas de alimentos terminados destinados a chinchillas y del residuo de cervecería para cerdos, respectivamente. Solo una cepa de alimento balanceado destinado a vacas de producción lechera fue capaz de producir 239,6 ng/g de gliotoxina (resultado no mostrado) y sólo una de alimentos para pollos. Finalmente, se observó que un 12,5; 23,1; 30,8; 13,3 y 16,7% de las cepas aisladas de alimentos para perros, vacas, cerdos, chinchillas y caballos, respectivamente, produjeron gliotoxina en niveles detectables pero que se encontraron por debajo del límite de cuantificación de la técnica. La **Fig. 18** muestra un ejemplo de la clase de cromatogramas obtenidos durante el análisis de los extractos fúngicos de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* por HPLC-MS/MS. Como se observa en la Figura, la precisión en la identidad del analito en análisis, en este caso la gliotoxina, se consigue cuando los picos correspondientes al ión precursor y los iones producto (tres en este caso) están presentes y alineados verticalmente, es decir eluyen al mismo tiempo de retención. Estos cuatro puntos de identificación de la gliotoxina están en concordancia con lo establecido por la decisión número 2002/657 de la

Comisión Europea respecto a criterios y procedimientos para la validación de métodos analíticos (Commission Decision 2002/657 EC). La elección de una metodología de detección y cuantificación de gliotoxina por HPLC-MS/MS, la cual debió ser puesta a punto para su análisis a partir de extractos fúngicos, se llevó a cabo en respuesta a los inconvenientes surgidos en la observación de cromatogramas y en consecuencia, en la cuantificación de la gliotoxina mediante HPLC con detector UV. De ésta manera, utilizando una metodología sensible y específica se pudo verificar que los resultados obtenidos fueran confiables y precisos. Garon y col, (2006) utilizaron un método multitoxina para detectar y cuantificar gliotoxina, entre otras micotoxinas, por HPLC-MS/MS en muestras de ensilaje de maíz.

En este trabajo se observó que cepas procedentes de todos los sustratos evaluados fueron capaces de producir gliotoxina. Se obtuvieron rangos variados de producción, siendo las cepas aisladas de alimentos para perros y las de ensilaje de maíz las que produjeron la toxina en los rangos más amplios y en concentraciones más elevadas. En algunos casos, las cepas aisladas de estos sustratos produjeron más de 1100 ng/g de gliotoxina. Distintos autores han informado efectos inmunosupresivos sobre linfocitos maduros y macrófagos a concentraciones de 25 a 200 ng/ml de suero (Eichner y col., 1986; Murayama y col., 1996; Stanzani y col., 2005). Además, Waring y col. 1988 informaron que concentraciones mayores de 250 ng/ml de gliotoxina inducían apoptosis en estas células. Pereyra y col. (2008b), evaluaron cepas de *A. fumigatus* aisladas de alimentos terminados y ensilaje de maíz para bovinos de producción de leche e informaron que aquellas aisladas de alimentos terminados produjeron mayor cantidad de gliotoxina, en relación a las aisladas del ensilaje. Estos resultados contrastan con los obtenidos en este estudio, donde las cepas aisladas del ensilaje de maíz fueron capaces de producir los niveles más elevados de gliotoxina.

Boudra y Morgavi (2005), estudiaron la capacidad de producción de gliotoxina de 14 cepas de *A. fumigatus* ambientales (suelo, frutas y filtros de aire acondicionado) y clínicas en medios de cultivo sintéticos. Después de tres días de incubación, 10 cepas produjeron concentraciones de gliotoxina de 0,2 a 23,2 µg/ml de medio de cultivo, siendo éstas concentraciones mayores a las obtenidas en este trabajo. Dos Santos y col. (2002), informaron la capacidad toxicogénica de 27 cepas de *A. fumigatus* aisladas de ensilaje de maíz. Ellos encontraron que 16 fueron productoras de fumitremorgen B, mientras que sólo

tres cepas fueron capaces de producir gliotoxina. Si bien existen trabajos, como los mencionados anteriormente, donde se evaluó la producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus* obtenidas de diferentes orígenes, el alcance de los estudios en alimentos para animales es acotado, como también lo es la información disponible acerca de la contaminación con especies de esta sección.

En este estudio, la mayoría de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* procedentes de diferentes alimentos para animales, fueron capaces de producir gliotoxina en concentraciones variadas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Kupfahl y col. (2008), quienes encontraron que más del 95% de las cepas de *A. fumigatus* estudiadas produjeron la toxina, tanto las de origen clínico como ambiental. Otros estudios llevados a cabo por Upperman y col. (2003) demostraron efectos inmunosupresivos y apoptóticos sobre tejidos celulares a concentraciones de gliotoxina menores a 10 ng/ml. Las cepas evaluadas en el presente estudio produjeron concentraciones superiores a las encontradas por los mencionados autores.

La incidencia de aspergilos de la sección Fumigati en los alimentos destinados a animales reviste gran importancia debido al doble peligro que supone la presencia de especies patógenas oportunistas y toxicogénicas como A. fumigatus (sensu stricto) y especies relacionadas.

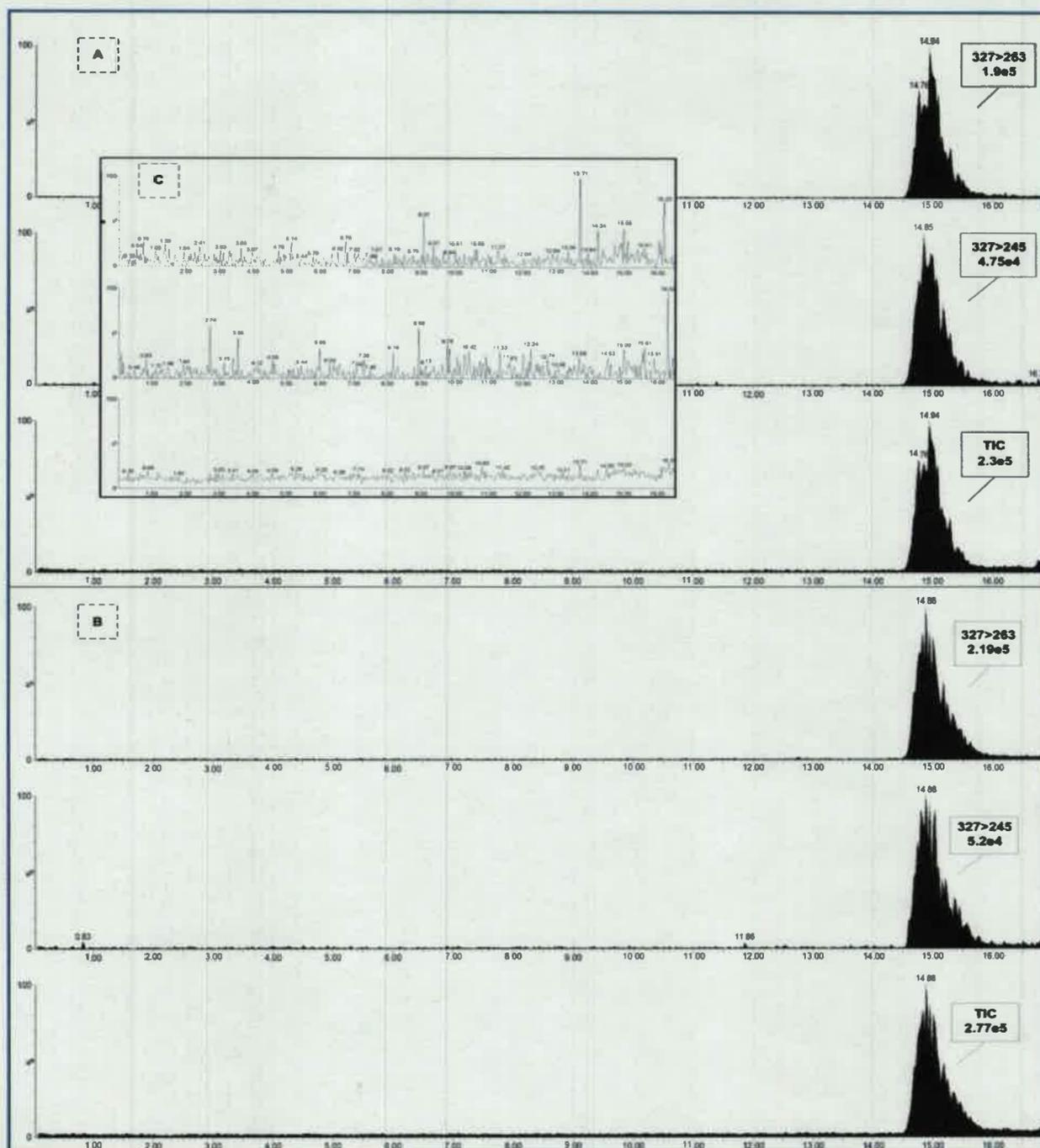


Figura 18. Cromatogramas HPLC-MS/MS de (A) solución testigo de gliotoxina (25 ng inyectados), (B) gliotoxina detectada en los extractos fúngicos de la cepa *A. fumigatus* RC2082 (origen de aislamiento: alimento para perros), (C) Gliotoxina no detectable en los extractos de la cepa *A. fumigatus* RC2139 (origen de aislamiento: ensilaje de maíz). El eje X representa el tiempo de retención (min); el eje Y representa la abundancia relativa de los productos iónicos 327>263 y 327>245.

SECCIÓN II

**Estudio de la ecofisiología de *Aspergillus fumigatus*
sensu stricto**

Materiales y Métodos

1- Evaluación del efecto de parámetros ambientales interactuantes sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por *Aspergillus fumigatus sensu stricto*

1.1- Materiales

1.1.1- Medios de cultivo

- *Agar extracto de malta (MEA)*: extracto de malta 20 g, glucosa 20 g, peptona 1 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 ml (Klich y Pitt, 2002).
- *Agar extracto residuo de la industria cervecera al 3% (ARC)*: residuo de cervecería molido 30 g, agar-agar (Britania) 20 g, agua corriente 1000 ml.
- *Agar semisólido (0,2%)*: Tween 80 0,05 ml; agar-agar 0,2 g; agua destilada 100 ml (Pitt y Hocking, 1997).

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 min.

1.1.2- Soluciones

- *Solución de HCl (1 M)*
- *Solución de NaOH (1 M)*
- *Soluciones testigo de gliotoxina*: se prepararon disolviendo en fase móvil una de las soluciones stock de la toxina (1 mg). Para obtener estas soluciones stock se resuspendió la toxina pura en 5 ml de metanol. Luego esta solución (5 mg/5ml) fue fraccionada en cinco viales a una concentración de 1 mg/ml cada uno, los que fueron secados bajo corriente de N₂ y almacenados a -20 °C. Las concentraciones de las soluciones testigo, de acuerdo a la metodología de detección utilizada, se describen en los puntos 1.2.1.5.2 y 1.2.1.5.3.

1.1.3- Solventes

Todos los solventes orgánicos utilizados (acetonitrilo, ácido acético glacial 99,5%, cloroformo y metanol) fueron calidad HPLC de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina). El

agua (calidad HPLC) se obtuvo de un purificador de agua Labconco WaterPro Mobile purification system modelo 90901-01.

1.2- Métodos

1.2.1- Incubación bajo atmósfera normal de oxígeno

Se evaluó el efecto de la interacción entre la a_w , pH, temperatura y tiempo de incubación sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus sensu stricto* bajo condiciones de incubación a tensión normal de oxígeno.

1.2.1.1- Cepas

Se seleccionaron dos cepas para ser evaluadas en los ensayos ecofisiológicos cuyo estado taxonómico a nivel de especie fue confirmado mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina. Esta metodología, que se detallará más adelante en este apartado, permitió confirmar que pertenecen a la especie *A. fumigatus sensu stricto* (véase punto 2). Una de ellas (Af16) se aisló a partir de una de las muestras de ensilaje de maíz para vacas lecheras analizadas en el estudio anterior (sección I) y la otra procedente de la Colección Micológica de la UNRC fue aislada de residuo de la industria cervecera destinado a cerdos (*A. fumigatus* RC2108). Ambas resultaron productoras de gliotoxina en medio de cultivo YES durante los ensayos de capacidad gliotoxicogénica expuestos anteriormente (Af16: 722,8 ng/g de gliotoxina y *A. fumigatus* RC2108: 923,6 ng/g). Las cepas se mantuvieron en glicerol (15%, Sigma-Aldrich) a -80 °C hasta el momento del ensayo.

1.2.1.2- Medio de cultivo

Se preparó un medio de cultivo sólido a partir de 3% de residuo de la industria cervecera molido (ARC). Para ello, se hirvieron a fuego lento 30 g del sustrato en 1 l de agua durante 30 min. Luego, se completó el volumen a 1 l y se agregó agar-agar al 2% (p/v). Posteriormente, se modificó la a_w del medio básico a 0,937; 0,955 y 0,982 por

adición de cantidades conocidas de glicerol según Dallyn y Fox (1980). Cada medio de cultivo fue esterilizado a 120 °C por 20 min; luego el pH se acondicionó a 5, 7 y 9 por adición de volúmenes variables de HCl o NaOH (1 M). Estos valores fueron confirmados por medio de la utilización de un peachímetro (ATI Orion 529 Main Street Boston, MA, USA). La a_w de muestras representativas de cada medio de cultivo fue medida con un Aqualab Series 3 (Labcell Ltd., Basingstoke, Hants, UK).

1.2.1.3- Inoculación e incubación

Los medios de cultivo fueron inoculados a partir de suspensiones conidiales de cada cepa en estudio en agar semisólido al 0,2%. Para ello, las cepas se desarrollaron individualmente en placas de medio MEA a 25 °C durante 7 días. Se tomó una porción de conidios, se resuspendió en el medio semisólido y se utilizó como fuente de inóculo para las experiencias siguientes. La inoculación se realizó por punción del agar con un ansa en punta en el centro de la placa para cada tratamiento (Pitt, 1979). Las placas inoculadas de la misma a_w fueron introducidas en bolsas de polietileno (aproximadamente 20 placas/bolsa) e incubadas en oscuridad a 18, 25 y 37 °C durante 14 días. El ensayo se realizó por triplicado.

1.2.1.4- Medición de los parámetros de crecimiento

Se determinó diariamente el radio de las colonias en crecimiento de cada réplica en dos ángulos perpendiculares entre sí, hasta que la colonia alcanzó el borde de la placa. Para cada tratamiento las medidas se realizaron por triplicado y todo el experimento fue repetido al menos una vez. La velocidad de crecimiento radial (mm/h) de cada cepa se calculó seguidamente como la pendiente de la regresión lineal, obtenida graficando el radio de la colonia de cada réplica vs. el tiempo, en la fase de crecimiento lineal. La fase de latencia previa al crecimiento micelial se definió en cada tratamiento como el tiempo (h) requerido por el hongo para que su colonia alcance 4 mm de radio y se determinó como la abscisa de las curvas de velocidad de crecimiento.

1.2.1.5.- Determinación de gliotoxina

1.2.1.5.1- Extracción de la toxina

Se evaluó la producción de gliotoxina por las dos cepas en las diferentes condiciones ensayadas a los 3, 7 y 14 días de incubación. La extracción de la toxina se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996), con modificaciones. De las placas correspondientes a cada tratamiento, se removieron con un sacabocado tres tacos de agar de diferentes sectores de la colonia, se introdujeron en un microtubo Eppendorf previamente pesado, y se pesaron. Se obtuvo por diferencia el peso del micelio más el medio de cultivo. Se adicionó 1 ml de cloroformo, se centrifugó la mezcla solvente-muestra durante 20 min a 9500 rpm y se recuperó la fase clorofórmica. Las soluciones fueron filtradas a través de filtros de membrana de nylon (Titan filtration system, 17 mm, 0,45 μm , Rockwood TN, USA) y el extracto obtenido evaporado a sequedad bajo corriente de N_2 . Finalmente, éste se resuspendió en 300 μl de fase móvil y se usó para el análisis de gliotoxina por HPLC.

1.2.1.5.2- Detección y cuantificación por HPLC

La gliotoxina se determinó siguiendo la metodología propuesta por Frisvad (1987), con algunas modificaciones. El HPLC usado consistió en un cromatógrafo Perkin Elmer 200 Series HPLC System equipado con un autoinyector y un detector UV. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo a temperatura ambiente en una columna de fase reversa C18 (2) Phenomenex Luna (150 mm x 4,6 mm, 5 μm de tamaño de partícula; Phenomenex, Inc, CA, USA), conectada a una pre-columna de protección. Se empleó un método isocrático y como fase móvil, una mezcla de ácido acético en agua (1%) y acetonitrilo (75:25). El flujo de la fase móvil fue 1,5 ml/min y el volumen de inyección de 20 μl . La longitud de onda usada para la detección fue de 268 nm y el tiempo de retención de 8,5 - 8,8 min. Entre cada corrida cromatográfica, se programó un lavado de la columna con 95% de acetonitrilo durante 5 min, seguido de 2 min de estabilización en las condiciones de la corrida. El tiempo de retención fue debidamente corroborado mediante la técnica de co-inyección (Fig. 19). Las soluciones testigo de gliotoxina en fase móvil, fueron preparadas a partir de una de las soluciones stock en metanol (1 mg/ml), luego de la evaporación del solvente. La cuantificación de la gliotoxina en los extractos se realizó

por medición del área de los picos y su extrapolación a una curva de calibración ajustada por matriz (AM) obtenida mediante la inyección por triplicado de 20 μ l de cada solución testigo (30; 20; 12,5; 7,5; 6 y 0,3 μ g/ml de fase móvil). Los límites instrumentales de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), fueron determinados en extractos fúngicos y soluciones testigo de gliotoxina basados en la relación señal/ruido (S/N) de 3:1 para LOD y de 7:1 para LOQ.

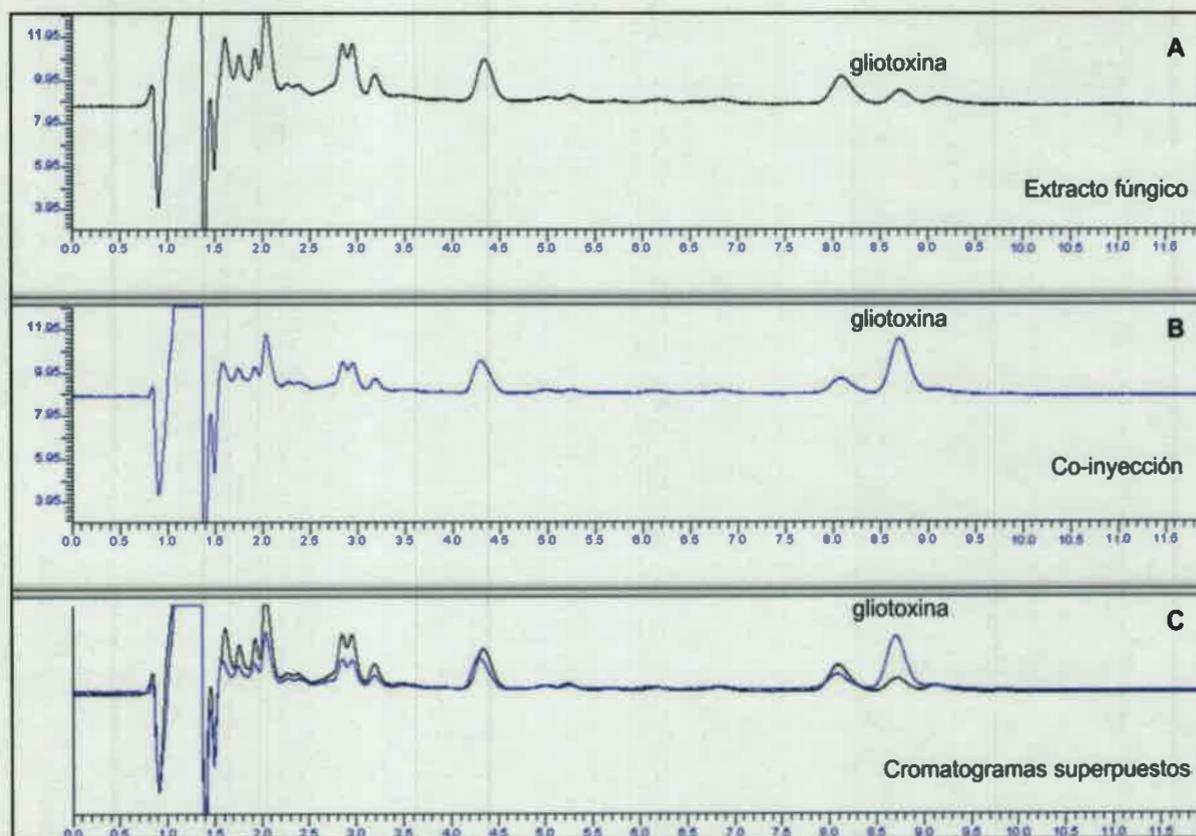


Figura 19. Confirmación del tiempo de retención de la gliotoxina mediante la técnica de co-inyección. Cromatogramas HPLC de un extracto fúngico de una cepa productora de la toxina (A) y confirmación de su tiempo de retención (B). C: cromatogramas superpuestos (A+B).

1.2.1.5.3- Detección y cuantificación por HPLC-MS/MS

Luego de la determinación de la gliotoxina por HPLC, aquellos extractos fúngicos que resultaron no detectables (nd) o dudosos fueron confirmados mediante HPLC-MS/MS,

siguiendo la metodología de Sulyok y col. (2007), con algunas modificaciones. Esta metodología altamente sensible, fue puesta a punto previamente durante los ensayos de capacidad gliotoxicogénica de las cepas en estudio (punto 2.3.5 apartado "Materiales y Métodos" y punto 3.1 apartado "Resultados y discusión", Sección I).

Todos los análisis fueron realizados en un HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Alliance 2685, un autoinyector Waters Alliance 2695, un detector de arreglo de diodos Waters 2996 PDA acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolos en tándem (Quattro Ultima Platinum) y fuente de electro spray ionización (ESI). La columna utilizada fue una A XBridge™ C18 3,5 μm (2,1 x 150 mm) acoplada a una pre-columna. La interface se trabajó en modo de ESI positiva. Como gas de nebulización y de desolvatación se utilizó nitrógeno calentado a temperaturas de 150 °C y 200 °C, respectivamente. El voltaje del capilar fue de 3,00 kV. El flujo de nitrógeno se ajustó a 104 l/h y 678 l/h para los gases de cono y desolvatación, respectivamente. El voltaje del cono fue de 35 V, el dwell time de 100 ms y la energía de colisión de 35 V. Para la determinación de gliotoxina se utilizó el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a las trazas de las transiciones del ión precursor de la gliotoxina $[\text{M}+\text{H}]^+$ a dos iones productos o hijas para dar cumplimiento a criterios cualitativos y cuantitativos. Las transiciones y condiciones de MRM se muestran en la Tabla 5. La adquisición de los datos y su procesamiento se llevó a cabo utilizando el software Mass Lynx V.4.1-Copyright 2005, Waters Inc. El ion producto MRM de m/z (relación masa/carga) 327>263 fue utilizado para la cuantificación. Luego, cuatro puntos de identificación se usaron para reconocer la gliotoxina en los extractos fúngicos: tiempo de retención, el ion precursor y ambos productos iónicos (327>263 y 327>245) (Tabla 5 y Fig. 18).

La fase móvil, eluída a un flujo de 0,2 ml/min, consistió de un gradiente de 1% de ácido acético en agua con 5 mM acetato de amonio (solvente A) y 1% de ácido acético en metanol con 5 mM de acetato de amonio (solvente B) (Tabla 6). La temperatura de la columna fue mantenida a 22 °C. Alícuotas de 50 μl de los extractos fúngicos finales se inyectaron en la unidad. Para obtener una curva de calibración se inyectaron por triplicado volúmenes crecientes (1 - 30 μl) de dos soluciones de trabajo de gliotoxina en fase móvil de 5000 y 50 ng/ml preparada sobre extracto de medio YES para tener en cuenta el

efecto de matriz en la determinación (calibración AM). La cuantificación de la gliotoxina en los extractos se realizó por medición del área de los picos y su extrapolación a esta curva de calibración. Los límites instrumentales de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), fueron determinados en extractos fúngicos y soluciones testigo de gliotoxina basados en la relación señal/ruido (S/N) de 3:1 para LOD y de 10:1 para LOQ.

1.2.2- Incubación bajo atmósfera reducida de oxígeno y 37 °C

*Se evaluó el efecto de la interacción entre la a_w , pH y tiempo de incubación sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus sensu stricto* bajo condiciones de incubación a tensión reducida de oxígeno y 37 °C.*

1.2.2.1- Cepas

Se utilizaron las cepas mencionadas en el punto 1.2.1.1 para ser evaluadas en los ensayos ecofisiológicos bajo condiciones de incubación a 37 °C y atmósfera reducida de oxígeno (0,4% O₂, 5% CO₂).

1.2.2.2- Medio de cultivo

Se utilizó el medio de cultivo sólido ARC al 3% cuya preparación fue descrita en el punto 1.2.1.2. Se modificó la a_w del medio básico a 0,937; 0,955 y 0,982 por adición de cantidades conocidas de glicerol según Dallyn y Fox (1980). Cada medio de cultivo fue esterilizado a 120 °C por 20 min; luego se acondicionó el pH a 5, 7 y 9 por adición de volúmenes variables de HCl o NaOH (1 M). Estos valores fueron confirmados por medio de la utilización de un peachímetro (ATI Orion 529 Main Street Boston, MA, USA). La a_w de muestras representativas de cada medio de cultivo fue medida con un Aqualab Series 3 (Labcell Ltd., Basingstoke, Hants, UK).

1.2.2.3- Inoculación e incubación

Los medios de cultivo fueron centralmente inoculados a partir de suspensiones de conidios de cada cepa en estudio en agar semisólido al 0,2%. Las suspensiones

conidiales fueron preparadas a partir de cultivos esporulantes de cada cepa crecida en MEA a 25 °C durante 7 días. Las placas inoculadas que tenían la misma a_w fueron introducidas en bolsas de polietileno (aproximadamente 20 placas/bolsa) e incubadas en oscuridad a 37 °C durante 14 días en atmósfera reducida de oxígeno (0,4% O₂, 5% CO₂). Para crear esta atmósfera modificada se utilizó una incubadora de CO₂ (New Brunswick Scientific Innova CO-48, USA). El ensayo se realizó por triplicado.

1.2.2.4- Medición de los parámetros de crecimiento

El diámetro de las colonias en crecimiento de cada réplica fue medido diariamente en dos ángulos perpendiculares entre sí, hasta que la colonia alcanzó el borde de la placa. Inmediatamente después de la medición, cada placa fue ingresada a la incubadora.

Para cada tratamiento las medidas se realizaron por triplicado y todo el experimento fue repetido al menos una vez. La velocidad de crecimiento radial (mm/h) de cada cepa fue seguidamente calculada como la pendiente de la regresión lineal, obtenida graficando el radio de la colonia de cada réplica vs. el tiempo, en la fase de crecimiento lineal. La fase de latencia previa al crecimiento micelial en cada tratamiento fue definida como el tiempo (h) para alcanzar 4 mm de radio y determinada como la abscisa de las curvas de velocidad de crecimiento.

1.2.2.5- Determinación de gliotoxina

1.2.2.5.1- Extracción de la toxina

Se evaluó la producción de gliotoxina por las dos cepas a los 3, 7 y 14 días de incubación a 37 °C y atmósfera reducida de oxígeno. La extracción de la toxina se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996), con modificaciones. De las placas correspondientes a cada tratamiento, se removieron con un sacabocado tres tacos de agar de diferentes sectores de la colonia, se introdujeron en un microtubo Eppendorf previamente pesado, y se pesaron. Se obtuvo por diferencia el peso del micelio más el medio de cultivo. Se adicionó 1 ml de cloroformo, se centrifugó la mezcla solvente-muestra durante 20 min a 9500 rpm y se recuperó la fase clorofórmica. Las soluciones fueron filtradas a través de filtros de membrana de nylon (Titan filtration system, 17 mm,

0,45 μm , Rockwood TN, USA) y el extracto obtenido evaporado a sequedad bajo corriente de N_2 . Finalmente, éste se resuspendió en 300 μl de fase móvil y se usó para el análisis de gliotoxina por HPLC.

1.2.2.5.2- Detección y cuantificación por HPLC

La gliotoxina fue determinada siguiendo la metodología propuesta por Frisvad (1987) con algunas modificaciones, como se describe en el punto 1.2.1.5.2.

1.2.2.5.3- Detección y cuantificación por HPLC-MS/MS

Con el mismo criterio utilizado en el ensayo anterior, luego de la determinación de la gliotoxina por HPLC, aquellos extractos fúngicos que resultaron no detectables (nd) o dudosos fueron confirmados mediante HPLC-MS/MS, siguiendo la metodología de Sulyok y col. (2007) con algunas modificaciones, tal como se detalla en el punto 1.2.1.5.3.

1.2.3- Análisis estadístico de los datos

De la misma manera que el ensayo se dividió en dos partes, los datos se analizaron primero entre sí dentro de cada ensayo y luego se evaluaron los obtenidos a la temperatura de incubación de 37 °C para incorporar el parámetro "tensión de oxígeno" al análisis. En todos los casos, se utilizó la regresión lineal del incremento del radio vs. el tiempo para obtener las velocidades de crecimiento en cada set de condiciones ensayadas. Los datos de fase de latencia y velocidad de crecimiento de cada cepa fueron evaluados mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software estadístico InfoStat para Windows 2012, versión 2.03 (SPSS Inc.). La significancia estadística fue juzgada a un valor de $p < 0,0001$. Cuando el análisis fue estadísticamente significativo, se aplicó el test LSD de Fischer ($p \leq 0,05$) para la determinación de la mínima diferencia significativa de cada parámetro individual sobre las fases de latencia y velocidades de crecimiento de las cepas.

Durante el análisis estadístico de la gliotoxina, el set de datos se transformó a $\log_{10}(x+1)$ para obtener la homogeneidad de varianza, finalmente se aplicaron los test (ANOVA y LSD de Fischer) descriptos anteriormente.

2- Identificación molecular a nivel de especie de las cepas incluidas en los estudios ecofisiológicos mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina

2.1- Materiales

2.1.1- Medio de cultivo

- *Medio líquido Wickerham*: glucosa 40 g, peptona 5 g, extracto de levadura (Britania) 3 g, Extracto de malta (Britania) 3 g, agua destilada 1000 ml (Mulé y col., 2006).

2.1.2- Soluciones y reactivos

2.1.2.1- Soluciones y reactivos utilizados para la extracción del ADN

- Buffer CTAB al 2%: 2% CTAB, 100 mM Tris-ClH (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl.
- Buffer TE 1X: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8
- Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1, v/v)
- Etanol al 70%
- 2- mercaptoetanol
- Isopropanol (2-propanol)
- Acetato de amonio 7,5 M (pH 8).

2.1.2.2- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa

- Buffer TAE (50X): 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial; 0,5 M EDTA (pH: 8).
- Bromuro de etidio: se agrega 1 μ l de una solución stock (10 mg/ml) cada 20 ml de agarosa fundida y templada a 45 °C.

- **Marcador de peso molecular:** ADN del bacteriófago λ digerido con HindIII (rango de los fragmentos: 125 bp - 23.1 kb) (Life technologies, USA).

2.1.2.3- Reactivos utilizados para la amplificación del gen de la β -tubulina

- **Buffer PCR 10X:** 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl. (10X Taq DNA Polymerase (Brasil)[®] Reaction Buffer, Invitrogen by Life Technologies).
- **MgCl₂:** 50 mM (Invitrogen by Life Technologies).
- **dNTPs:** Stock 2 mM (100 μ l): se prepara mezclando 2 μ l de cada dNTP (GTP, CTP, ATP y TTP, 100 mM, Invitrogen) en 92 μ l de agua bidestilada estéril calidad biología molecular.
- **Taq DNA polimerasa:** (5 U/ μ l Invitrogen by Life Technologies).
- **Cebadores Bt2a/Bt2b:** stock 10 μ M: se prepara por disolución del cebador seco (Invitrogen) en el volumen apropiado de agua bidestilada estéril calidad biología molecular.

2.2- Métodos

2.2.1- Cepas

Se realizó la caracterización molecular de las cepas *A. fumigatus* RC2108 y Af16 mediante el secuenciamiento del gen parcial de la β -tubulina (*benA*).

2.2.2- Producción de la biomasa fúngica

A partir de cada cepa desarrollada en MEA a 28 °C durante 7 días, se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido y se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio Wickerham. Las cepas se incubaron a 28 °C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm). El micelio se cosechó por filtración bajo presión negativa creada por vacío, se lavó con agua destilada estéril y se secó entre papel absorbente. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

2.2.3- Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

El micelio congelado se pulverizó en morteros utilizando nitrógeno líquido para lograr la ruptura mecánica de las células, y se distribuyó en microtubos Eppendorf de 1,5 ml estériles que fueron almacenados -20 °C. Para extraer el ADN, se utilizó el buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006), con algunas modificaciones. Al micelio congelado (aproximadamente 1,5 a 2 g) se le adicionó 700 µl de buffer CTAB al 2% (previamente calentado a 65 °C) y 15 µl de 2-mercaptoetanol, se agitó la mezcla durante 2 min en agitador vórtex y se incubó a 65 °C durante 15 min. Luego del tiempo de incubación los tubos fueron nuevamente agitados por 2 min e incubados a 65 °C durante 15 min. Se agregó 500 µl de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 1 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se tomó aproximadamente 600 µl de la fase acuosa y se la transfirió a un microtubo Eppendorf estéril. Se agregó igual volumen de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y mitad del volumen de acetato de amonio 7,5 M, mezclando por inversión. Luego se centrifugó la mezcla a 10000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El "pellet" fue lavado 2 veces con 500 µl de etanol frío al 70% (v/v) y se secó a temperatura ambiente durante 2 a 3 min invirtiendo los tubos sobre papel absorbente. Por último, los "pellets" fueron resuspendidos en 100 µl de buffer TE 1X para conservarlos hasta su posterior análisis.

El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con HindIII como ADN testigo, teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X. El voltaje y tiempo de la separación electroforética fue dependiente de la cuba de electroforesis utilizada. Se realizaron las diluciones correspondientes de cada muestra de ADN en buffer TE 1X hasta obtener una concentración aproximada de 5-10 ng/µl.

2.2.4- Reacción de amplificación

Para la amplificación parcial del gen de la β -tubulina (*benA*), se utilizaron los cebadores Bt2a/Bt2b (Glass y Donaldson, 1995), siguiendo la metodología propuesta por Samson y col. (2004b), con algunas modificaciones.

Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) en las condiciones que se muestran en la **Tabla 10**. La mezcla de reacción para el par de cebadores, consistió en un cebador direccionado en "forward" (Bt2a) y otro direccionado en "reverse" (Bt2b). Un control negativo que no contenía ADN templado se incluyó en el experimento a fin de corroborar posibles contaminaciones de los reactivos.

Tabla 10. Mezcla de reacción para la amplificación del gen parcial de la β -tubulina.

Componentes	1 reacción
ADN molde (aprox. 5 ng/ μ l)	2 μ l
Buffer de reacción 10X	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2 μ l
dNTPs (2 mM)	5 μ l
Cebador "forward" 10 μ M	2 μ l
Cebador "reverse" 10 μ M	2 μ l
Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l)	0,25 μ l
H ₂ O bidestilada estéril	31,75 μ l
<u>Volumen final:</u>	50 μl

Para obtener las secuencias, se utilizó el siguiente programa de PCR: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Se realizó además, una extensión final a 72 °C durante 7 min. Finalmente, la reacción se mantuvo a 4 °C durante 10 min.

Los productos de amplificación (5 μ l) se examinaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) utilizando como buffer de corrida Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1X, pH 8. El gel se visualizó por medio de un transiluminador UV a 302 nm y el tamaño del fragmento obtenido (aproximadamente 550

pb) se estimó por comparación visual con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100-2072 pb.

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambas cadenas de ADN, fueron secuenciadas en un secuenciador Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem) mediante el método enzimático de terminación de cadena de Sanger (1977) utilizando el par de cebadores Bt2a/Bt2b.

2.2.5- Alineamiento de secuencias nucleotídicas

Las secuencias de ambas cadenas de ADN de los productos de PCR se alinearon usando el programa informático BioEdit versión 7.0.9.0 (Thompson y col. 1994) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>), y en caso de ser necesario se realizaron algunos ajustes manuales. Las secuencias obtenidas (de aproximadamente 500 pb) se compararon con otras disponibles en la base de datos del GenBank (NCBI o National Center for Biotechnology Information) para determinar su homología. Para ello, se realizó un alineamiento básico local entre las secuencias (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)), lo cual permitió determinar el porcentaje de máxima identidad de las secuencias cargadas con las disponibles en la base de datos. Además, con el objetivo de observar el agrupamiento de las dos cepas en estudio con otras especies de la sección *Fumigati*, se aplicó el método de análisis Neighbor-Joining utilizando el programa MEGA versión 4 (Tamura y col., 2007). Se consideró un bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) para corroborar la certeza estadística de las diferentes ramas generadas. Las secuencias de las especies de la sección *Fumigati* que se usaron para estos análisis fueron tomadas del GenBank y se muestran en la **Tabla 11**. *Aspergillus brevipes* (n° de acceso: AY685179.1) fue utilizado como grupo externos para el análisis.

Tabla 11. Secuencias y cepas evaluadas en el análisis preliminar de parsimonia.

Cepa β -tubulina	Especie	Origen	N° de acceso al GenBank	Referencia
KACC 41954	<i>Aspergillus</i> sp.	desconocido	DQ534075	
CBS 121.53	<i>A. fumigatus</i>	Desconocido, Holanda	DQ534076	
CBS 315.60	<i>A. fumigatus</i>	secreción pulmonar humana, Holanda	DQ534077	
CBS 520.62	<i>A. fumigatus</i>	esputo humano, Holanda	DQ534078	
CBS 511.64	<i>A. fumigatus</i>	suelo, Holanda	DQ534079	
CBS 154.89	<i>N. udagawae</i>	Suelo de cítricos, USA	DQ534080	Hong y col. (2005)
CBS 612.97	<i>A. lentulus</i>	desconocido	DQ534081	
IBT13131	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Mejilla de ratón, USA	DQ094884	
IBT12703	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Suelo, USA	DQ094885	
IBT16806	<i>A. novofumigatus</i>	Suelo, Ecuador	DQ094886	
IBT16755	<i>A. novofumigatus</i>	Suelo, Ecuador	DQ094887	
IBT27920	<i>A. turcosus</i>	Aire Acondicionado, Corea	DQ534142	
IBT27921	<i>A. turcosus</i>	Aire Acondicionado, Corea	DQ534143	
IBT3016	<i>A. turcosus</i>	Aire Acondicionado de auto, Corea	DQ534144	Hong y col. (2008)
IBT16756	<i>N. galapensis</i>	Suelo, Ecuador	DQ534145	
IBT16763	<i>N. galapensis</i>	Suelo, Ecuador	DQ534146	
KACC41675	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534082	
KACC41676	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534083	
KACC 41677	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534084	
KACC 42228	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534085	
KACC 41680	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534086	
KACC F3746	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534087	
KACC F3747	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534088	
KACC F3748	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534089	
KACC F3760	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534090	
KACC F3762	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534091	
KACC F3763	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534092	Hong y col. (2006a)*
KACC F3765	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534093	
KACC 41687	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534094	
KACC 41688	<i>N. hiratsukae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534095	
KACC 41689	<i>N. hiratsukae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534096	
KACC 41692	<i>N. hiratsukae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534097	
KACC F3749	<i>N. quadricincta</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534098	
KACC F3768	<i>N. quadricincta</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534099	
KACC F3786	<i>N. quadricincta</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534100	
KACC F3810	<i>N. quadricincta</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534101	
KACC 41683	<i>N. udagawae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534102	
KACC F3759	<i>N. udagawae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534103	
IMI367415	<i>A. viridinutans</i>	Desconocido	DQ534153	
IBT 3016	<i>Neosartorya</i> sp.	Desconocido	DQ534154	
KACC 41626	<i>Neosartorya</i> sp.	Desconocido	DQ534155	
KACC 42092	<i>Neosartorya</i> sp.	Desconocido	DQ534156	
KACC 41181	<i>N. aureola</i>	Desconocido	DQ534157	Hong y col. (2006b)*
CBS 253.94	<i>N. quadricincta</i>	Conservas de Té, Japón	DQ534158	
CBS 100942	<i>N. quadricincta</i>	Jugo de fruta, Holanda	DQ534159	
KACC 41666	<i>N. tatenoi</i>	Desconocido	DQ534160	
IBT 23363	<i>N. udagawae</i>	Desconocido	DQ534161	

* Hong y col. (2006a, 2006b) datos no publicados.

3- Mantenimiento de las cepas

Las cepas aisladas fueron mantenidas en glicerol al 15% a -80 °C, a fin de evitar mutaciones o cambios en las características fisiológicas de las mismas.

Resultados y Discusión

1- Evaluación del efecto de parámetros ambientales interactuantes sobre el crecimiento y producción de gliotoxina por *Aspergillus fumigatus sensu stricto*

1.1- Influencia de la a_w , temperatura y pH sobre el crecimiento de las cepas bajo atmósfera normal de oxígeno

Todos los parámetros individuales (temperatura, a_w y pH) y sus interacciones de dos y tres vías ejercieron en general, influencia significativa sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento radial de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 ($p < 0,0001$) (Tablas 12 y 13). El estudio de la influencia de los diferentes factores ambientales sobre los parámetros de crecimiento de las cepas se llevó a cabo por separado debido a que existieron diferencias entre éstas (Tabla 1, Anexo Estadística). Todos los niveles de temperatura y a_w evaluados resultaron también significativos según el Test LSD de Fisher para la fase de latencia y velocidad de crecimiento de las dos cepas estudiadas ($p \leq 0,05$) (Tabla 2, Anexo Estadística).

Las fases de latencia aumentaron significativamente a medida que la temperatura y la a_w disminuyeron, siendo la temperatura el factor ambiental más influyente. A 37 °C, a_w 0,98 y a los tres pH analizados, sin diferencias estadísticas entre los mismos, se observaron para ambas cepas, las fases de latencia más cortas. Una disminución de la temperatura de 37 a 25 °C para la cepa *A. fumigatus* RC2108 bajo crecimiento a a_w 0,98, independientemente del pH, produjo un incremento promedio en la fase de latencia de 42,33 h (6,19 a 48,52 h), mientras que, el mismo cambio en la temperatura a a_w 0,93 produjo un incremento promedio más marcado (93,72 h, las fases de latencia variaron de 59,93 a 153,65 h). Similar comportamiento fue observado para la cepa Af16, cuando se llevó a cabo este análisis. Las cepas ensayadas provienen de sustratos de similares características, ambos son fermentados y presentan elevadas a_w y pH ligeramente ácidos (Alonso y col., 2013, Gerbaldo y col., 2013). No obstante, la cepa *A. fumigatus* RC2108, aislada de residuo de la industria cervecera para cerdos, presentó fases de latencia por lo general más cortas que la cepa Af16, aislada de ensilaje de maíz para vacas, a todos los niveles de temperatura y a_w evaluados. Este comportamiento, probablemente es atribuido a su mayor capacidad de adaptación al medio de cultivo de similar composición al sustrato del cual proviene. Finalmente, se observó que a 18 °C, a_w 0,93 y a pH 5, 7 y 9,

las fases de latencia fueron las más prolongadas ya que se extendieron a lo largo de todo el período de incubación (>336 h) ($p \leq 0,05$) (Tabla 14).

Tabla 12. Significancia de la temperatura, a_w , pH y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa Af16.

Tratamientos	gl	Fase de latencia (h)			Velocidad de crecimiento (mm/h)		
		CM	F	p-valor	CM	F	p-valor
T	2	360438,29	2221,2	<0,0001	0,12	10525,07	<0,0001
a_w	2	142446,58	877,83	<0,0001	0,06	5460,31	<0,0001
pH	2	1273,73	7,85	0,0011	2,30E-04	19,98	<0,0001
T* a_w	4	65622,34	404,4	<0,0001	0,01	805,63	<0,0001
T*pH	4	6222,04	38,34	<0,0001	4,70E-04	41,07	<0,0001
a_w *pH	4	819,13	5,05	0,0018	6,00E-04	52,82	<0,0001
T* a_w *pH	8	1054,94	6,5	<0,0001	2,70E-04	23,72	<0,0001

Nota: T: temperatura, gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio, F: valor F de Fisher.

Tabla 13. Significancia de la temperatura, a_w , pH y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa *A. fumigatus* RC2108.

Tratamientos	Fase de latencia (h)				Velocidad de crecimiento (mm/h)			
	gl	CM	F	p-valor	gl	CM	F	p-valor
T	2	109555,3	2234,48	<0,0001	2	0,13	5393,1	<0,0001
a_w	2	35026,7	714,4	<0,0001	2	0,04	1737,21	<0,0001
pH	2	446,1	9,1	0,0004	2	3,80E-04	15,3	<0,0001
T* a_w	4	102138,77	2083,21	<0,0001	4	4,90E-03	195,57	<0,0001
T*pH	4	510,67	10,42	<0,0001	4	5,20E-04	20,77	<0,0001
a_w *pH	4	261,85	5,34	0,0011	4	7,70E-04	30,8	<0,0001
T* a_w *pH	8	328,18	6,69	<0,0001	8	3,00E-04	11,87	<0,0001

Nota: T: temperatura, gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio, F: valor F de Fisher.

Tabla 14. Efecto de la interacción de la temperatura, a_w y pH sobre la fase de latencia de las cepas *A. fumigatus* sensu stricto en estudio.

T (°C)	a_w	pH	Fase de latencia (h)	
			Cepa Af16	Cepa RC2108
			Media \pm DS	Media \pm DS
37	0,98	9	12,45 \pm 0,74 a	5,75 \pm 1,69 a
		7	13,35 \pm 0,56 ab	5,25 \pm 1,14 a
		5	9,50 \pm 2,48 a	7,57 \pm 2,95 a
	0,95	9	41,63 \pm 2,16 cd	28,77 \pm 0,73 b
		7	36,58 \pm 0,76 c	21,95 \pm 1,18 b
		5	34,49 \pm 1,19 c	22,27 \pm 1,06 b
	0,93	9	81,89 \pm 3,05 f	65,65 \pm 3,64 ef
		7	78,27 \pm 2,45 ef	60,36 \pm 0,76 de
		5	58,47 \pm 2,79 de	53,77 \pm 1,23 cd
25	0,98	9	51,73 \pm 0,44 cd	46,62 \pm 0,96 c
		7	54,42 \pm 3,17 cd	49,56 \pm 1,44 cd
		5	33,95 \pm 18,79 bc	49,38 \pm 4,19 cd
	0,95	9	104,02 \pm 1,68 g	84,89 \pm 1,95 g
		7	108,51 \pm 9,58 g	81,01 \pm 0,28 g
		5	96,33 \pm 5,52 fg	74,13 \pm 0,24 fg
	0,93	9	200,60 \pm 6,65 i	149,06 \pm 0 h
		7	182,09 \pm 8,89 i	141,45 \pm 0 h
		5	190,13 \pm 4,27 i	170,46 \pm 11,08 i
18	0,98	9	138,65 \pm 0,67 h	144,01 \pm 0,076 h
		7	139,71 \pm 1,01 h	170,86 \pm 2,99 i
		5	181,06 \pm 1,93 i	197,05 \pm 3,61 j
	0,95	9	366,02 \pm 54,24 j	294,31 \pm 11,03 k
		7	443,66 \pm 19,51 k	299,28 \pm 31,61 k
		5	509,59 \pm 2,37 l	312,42 \pm 1,42 l
	0,93	9	550 \pm 0 m	336 \pm 0 m
		7	550 \pm 0 m	336 \pm 0 m
		5	550 \pm 0 m	336 \pm 0 m

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al Test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$).

T: temperatura. DS: desvío estándar. El análisis estadístico debe leerse por columna independientemente para cada cepa.

Durante la evaluación de la velocidad de crecimiento de las cepas, se observó que a medida que la temperatura y la a_w disminuyeron, la velocidad de crecimiento también lo hizo significativamente ($p \leq 0,05$). Las condiciones que ejercieron mayor influencia sobre la velocidad de crecimiento, fueron 37 °C, a_w 0,98 y pH 7, siendo éstas condiciones las óptimas para el crecimiento de ambas cepas estudiadas (Fig. 20). A esta misma temperatura y a a_w 0,98 y 0,95, todos los niveles de pH fueron significativamente diferentes, resultando pH 7 el óptimo para el crecimiento de las dos cepas a estas a_w , mientras que a las demás temperaturas evaluadas, el pH no fue un factor influyente para el crecimiento ($p \leq 0,05$) (Fig. 20 y Tabla 3, Anexo Estadística).

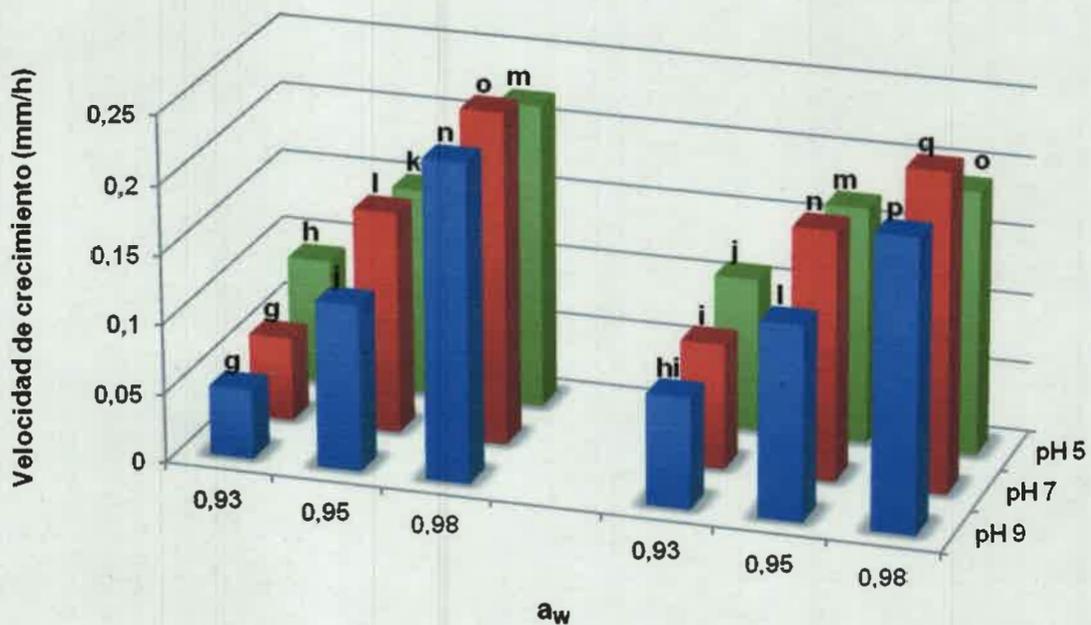


Figura 20. Efecto de diferentes a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento (mm/h) de las cepas Af16 (izquierda) y *A. fumigatus* RC2108 (derecha) en medio de cultivo ARC al 3% a 37 °C.

Al igual que lo observado a 37 °C de incubación, a 25 °C la velocidad de crecimiento de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 se redujo significativamente a medida que la a_w disminuyó. A a_w 0,93 indiferentemente del factor pH, la velocidad de crecimiento fue significativamente menor con respecto a las demás condiciones ensayadas ($p \leq 0,05$) (Fig. 21 y Tabla 3, Anexo Estadística). El mismo comportamiento fue observado a la menor temperatura evaluada, siendo 18 °C y a_w 0,93 las condiciones que inhibieron completamente el crecimiento de ambas cepas, independientemente del nivel de pH considerado ($p \leq 0,05$) (Fig. 22 y Tabla 3, Anexo Estadística).

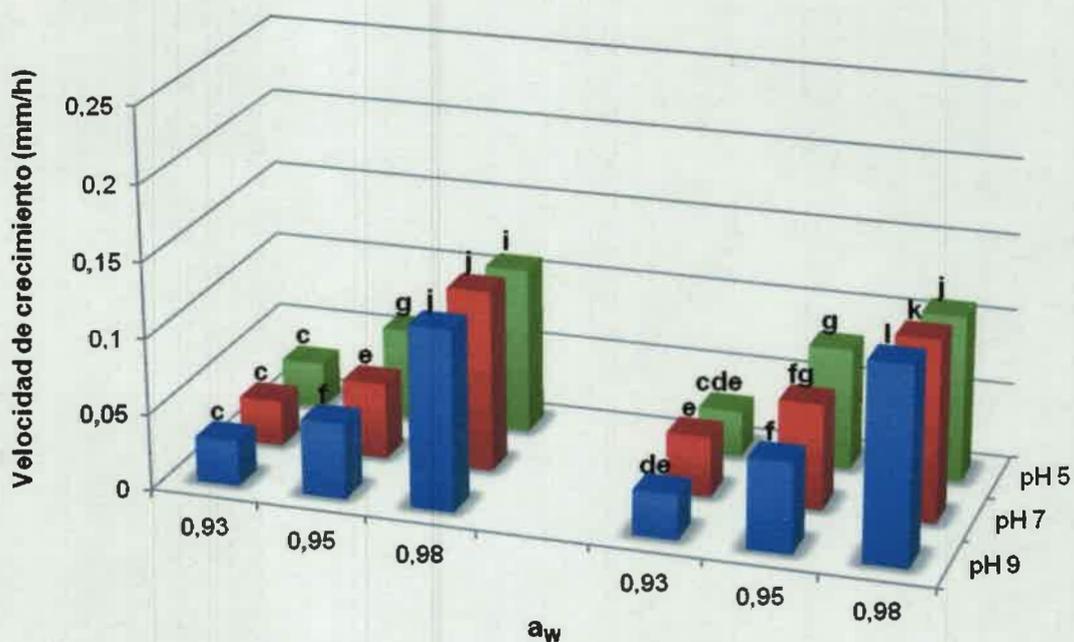


Figura 21. Efecto de diferentes a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento (mm/h) de las cepas Af16 (izquierda) y *A. fumigatus* RC2108 (derecha) en medio de cultivo ARC al 3% a 25 °C.

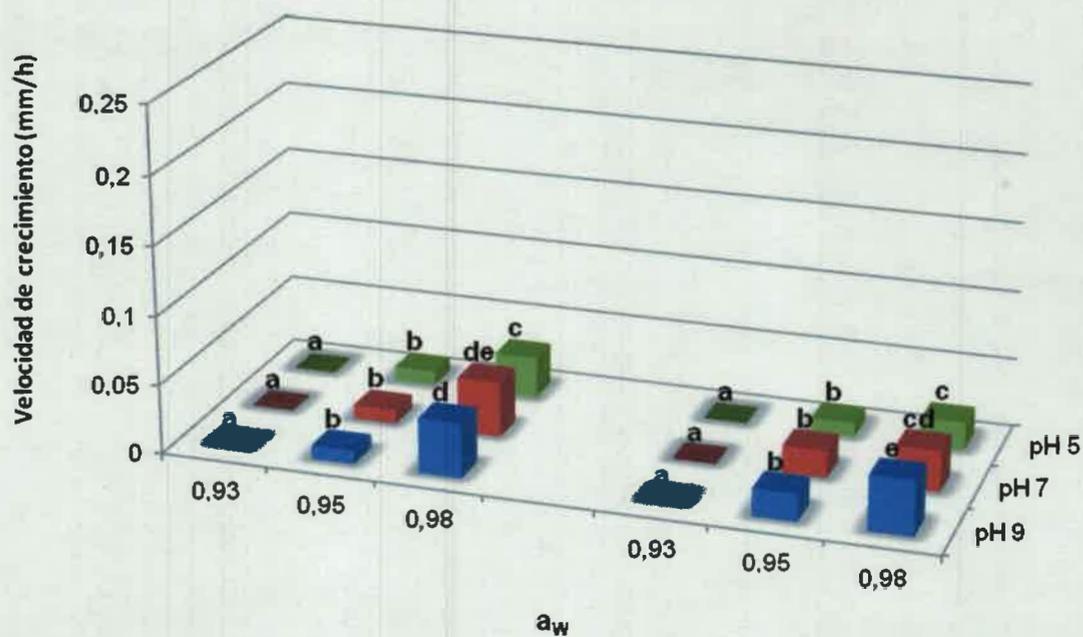


Figura 22. Efecto de diferentes a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento (mm/h) de las cepas Af16 (izquierda) y *A. fumigatus* RC2108 (derecha) en medio de cultivo ARC al 3% a 18 °C.

1.2- Influencia de la a_w , tensión de oxígeno, pH y sus interacciones sobre el crecimiento de las cepas a 37 °C

Se evaluaron los parámetros de crecimiento de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 sobre el medio de cultivo ARC al 3% y en condiciones de incubación a tensión reducida de oxígeno y 37 °C. Con el objetivo de determinar el efecto de la interacción entre la a_w , pH y tensión de oxígeno sobre las fases de latencia y velocidades de crecimiento de ambas cepas a 37 °C, los datos obtenidos del análisis de los parámetros de crecimiento a esta temperatura e incubación bajo atmósfera normal de oxígeno fueron combinados con los datos obtenidos durante este ensayo. El análisis de la varianza del efecto de los factores individuales (a_w , pH y tensión de oxígeno) y de las interacciones de dos y tres vías, mostró que éstos en su mayoría ejercieron influencia estadísticamente significativa sobre la fase de latencia y la velocidad de crecimiento de ambas cepas ($p < 0,0001$). Determinadas interacciones de factores no resultaron estadísticamente significativas con respecto al valor de p seleccionado, como por ejemplo la interacción de tres vías: a_w x pH x tensión de oxígeno sobre la fase de latencia de ambas cepas y sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *A. fumigatus* RC2108. Sin embargo, la influencia de estas interacciones sobre los parámetros de crecimiento de las cepas fue altamente significativa (Tablas 15 y 16). El estudio de la influencia de los diferentes factores ambientales sobre los parámetros de crecimiento de las cepas se llevó a cabo por separado debido a que existieron diferencias entre éstas (Tabla 1, Anexo Estadística).

El test LSD de Fisher que determina la significancia de cada parámetro de crecimiento individual, mostró que todos los niveles de a_w analizados tuvieron influencia estadísticamente significativa sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento de ambas cepas ($p \leq 0,05$). Por otra parte, todos los valores de pH analizados mostraron influencia significativa sobre la fase de latencia de ambas cepas, mientras que para la velocidad de crecimiento de éstas, sólo pH 9 fue estadísticamente diferente de los demás (Tabla 4, Anexo Estadística). La tensión de oxígeno tuvo influencia significativa en todos los casos excepto para la fase de latencia de la cepa *A. fumigatus* RC2108, la cual demostró su capacidad de adaptación para iniciar el crecimiento bajo las dos atmósferas de oxígeno evaluadas.

Tabla 15. Significancia estadística de la a_w , pH, tensión de oxígeno y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa Af16, a 37°C.

Tratamientos	gl	Fase de latencia (h)			Velocidad de crecimiento (mm/h)		
		CM	F	p-valor	CM	F	p-valor
a_w	2	14813,1	3168,07	<0,0001	0,24	21111,74	<0,0001
pH	2	431,38	92,26	<0,0001	1,10E-03	99,89	<0,0001
T°O ₂	1	236,86	50,66	<0,0001	0,03	2676,85	<0,0001
a_w *pH	4	174,77	37,38	<0,0001	7,80E-04	69,17	<0,0001
a_w *T°O ₂	2	183,23	39,19	<0,0001	0,02	2007,2	<0,0001
pH*T°O ₂	2	20,09	4,3	0,0212	1,70E-04	15,05	<0,0001
a_w *pH*T°O ₂	4	18,53	3,96	0,0091	3,10E-04	27,67	<0,0001

Nota: T: temperatura, gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio, F: valor F de Fisher. T°O₂: tensión de oxígeno.

Tabla 16. Significancia estadística de la a_w , pH, tensión de oxígeno y sus interacciones sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de la cepa *A. fumigatus* RC2108, a 37°C.

Tratamientos	gl	Fase de latencia (h)			Velocidad de crecimiento (mm/h)		
		CM	F	p-valor	CM	F	p-valor
a_w	2	11516,46	3840,93	<0,0001	0,19	1041,14	<0,0001
pH	2	123,3	41,12	<0,0001	6,70E-04	3,7	0,0346
T°O ₂	1	3,52	1,17	0,2856	0,09	496,5	<0,0001
a_w *pH	4	107,16	35,74	<0,0001	8,90E-04	4,91	0,0029
a_w *T°O ₂	2	150	50,03	<0,0001	0,03	180,83	<0,0001
pH*T°O ₂	2	25,36	8,46	0,001	8,00E-04	4,41	0,0194
a_w *pH*T°O ₂	4	18,86	6,29	0,0006	7,50E-04	4,14	0,0073

Nota: T: temperatura, gl: grados de libertad, CM: cuadrado medio, F: valor F de Fisher. T°O₂: tensión de oxígeno.

Luego del análisis de los datos a 37 °C de incubación, se observó al nivel más elevado de a_w analizado (a_w 0,98), que todas las interacciones a_w x pH a tensión reducida de oxígeno fueron en general, significativamente diferentes con respecto a las mismas interacciones a tensión normal de oxígeno, en relación a la fase de latencia y velocidad de crecimiento de ambas cepas ($p \leq 0,05$). A 37 °C y tensión reducida de oxígeno, la a_w fue el factor que ejerció mayor influencia sobre los parámetros de crecimiento de las cepas en estudio. A medida que ésta disminuyó, las fases de latencia incrementaron y las velocidades de crecimiento se redujeron significativamente ($p \leq 0,05$). Velocidades de crecimiento máximas y fases de latencia mínimas fueron observadas a la más elevada a_w , independientemente de la tensión de oxígeno considerada. Sin embargo, a 37 °C y a_w 0,98 las fases de latencia fueron más prolongadas a tensión reducida de oxígeno con respecto a la condición normal de oxígeno para ambas cepas; mientras que las velocidades de crecimiento medias fueron mayores ($p \leq 0,05$) (Tabla 17). No obstante, a 0,95 y 0,93 a_w para todos los niveles de pH analizados, las fases de latencia de ambas cepas fueron, en general, más cortas que a tensión normal de oxígeno. Por otra parte, cuando las cepas crecieron a tensión de oxígeno reducida, se obtuvieron en general velocidades de crecimiento mayores que bajo incubación bajo atmósfera normal de oxígeno, independientemente del nivel de a_w considerado.

Las condiciones que ejercieron mayor influencia sobre la velocidad de crecimiento de ambas cepas fueron a_w 0,98 y tensión reducida de oxígeno, sin diferencias significativas entre los niveles de pH evaluados. Por lo tanto, éstas condiciones podrían considerarse las óptimas para el crecimiento de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 a 37 °C ($p \leq 0,05$) (Tabla 17 y Fig. 23).

Tabla 17. Fases de latencia y velocidades de crecimiento de las cepas *A. fumigatus* sensu stricto en medio de cultivo ARC al 3%, en función de la a_w , pH y tensión de oxígeno a 37 °C de incubación.

a_w	pH	T°O ₂	Cepa Af16		Cepa <i>A. fumigatus</i> RC2108	
			Fase de latencia (h)	Velocidad de crecimiento (mm/h)	Fase de latencia(h)	Velocidad de crecimiento (mm/h)
			Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
0,98	9	reducida	14,46 ± 0,34 b	0,3563 ± 0,00172 l	13,27 ± 0,42 b	0,389 ± 0,00079 i
		normal	12,45 ± 0,75 ab	0,2293 ± 0,00378 jk	5,75 ± 1,69 a	0,214 ± 0,00916 gh
	7	reducida	15,34 ± 0,11 b	0,3648 ± 0,0019 m	13,66 ± 0,42 b	0,3897 ± 0,00078 i
		normal	13,35 ± 0,56 b	0,243 ± 0,001 k	5,25 ± 1,14 a	0,2333 ± 0,00451 h
	5	reducida	14,39 ± 0,29 b	0,3541 ± 0,0032 l	13,15 ± 0,19 b	0,3895 ± 0,00051 i
		normal	9,50 ± 2,48 a	0,218 ± 0,001 j	7,57 ± 2,96 a	0,194 ± 0,00435 fg
0,95	9	reducida	29,77 ± 0,88 d	0,1591 ± 0,0024 g	20,27 ± 4,43 c	0,2341 ± 0,0532 h
		normal	41,63 ± 2,16 f	0,121 ± 0,002 e	28,77 ± 0,73 d	0,136 ± 0,0131 d
	7	reducida	29,39 ± 0,72 d	0,1655 ± 0,00088 h	21,68 ± 0,71 c	0,2188 ± 0,0006 h
		normal	36,58 ± 0,77 e	0,1603 ± 0,0025 gh	21,95 ± 1,18 c	0,1846 ± 0,0061 ef
	5	reducida	25,65 ± 0,72 c	0,1649 ± 0,0013 h	21,95 ± 0,72 c	0,2175 ± 0,0009 h
		normal	34,49 ± 1,20 e	0,1527 ± 0,0075 f	22,27 ± 1,07 c	0,1686 ± 0,0050 e
0,93	9	reducida	76,77 ± 5,97 i	0,0528 ± 0,0016 a	63,11 ± 0,72 gh	0,0861 ± 0,0011 ab
		normal	81,90 ± 3,05 j	0,0546 ± 0,0011 a	65,65 ± 3,65 h	0,0826 ± 0,0051 a
	7	reducida	66,11 ± 2,45 h	0,0649 ± 0,0007 b	61,90 ± 0,83 g	0,0968 ± 0,00045 ab
		normal	78,23 ± 2,45 i	0,058 ± 0,0026 a	60,36 ± 0,76 g	0,0873 ± 0,0030 ab
	5	reducida	57,04 ± 1,90 g	0,0728 ± 0,0021 c	46,95 ± 0,58 e	0,1212 ± 0,0024 cd
		normal	58,47 ± 2,79 g	0,092 ± 0,0088 d	53,79 ± 1,23 f	0,1073 ± 0,0049 bc

Valores correspondientes a la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al Test LSD de Fisher ($p < 0,05$). a_w : actividad de agua. T°O₂: tensión de oxígeno. DS: Desvío estándar. El análisis estadístico debe leerse por columna independientemente para cada cepa.



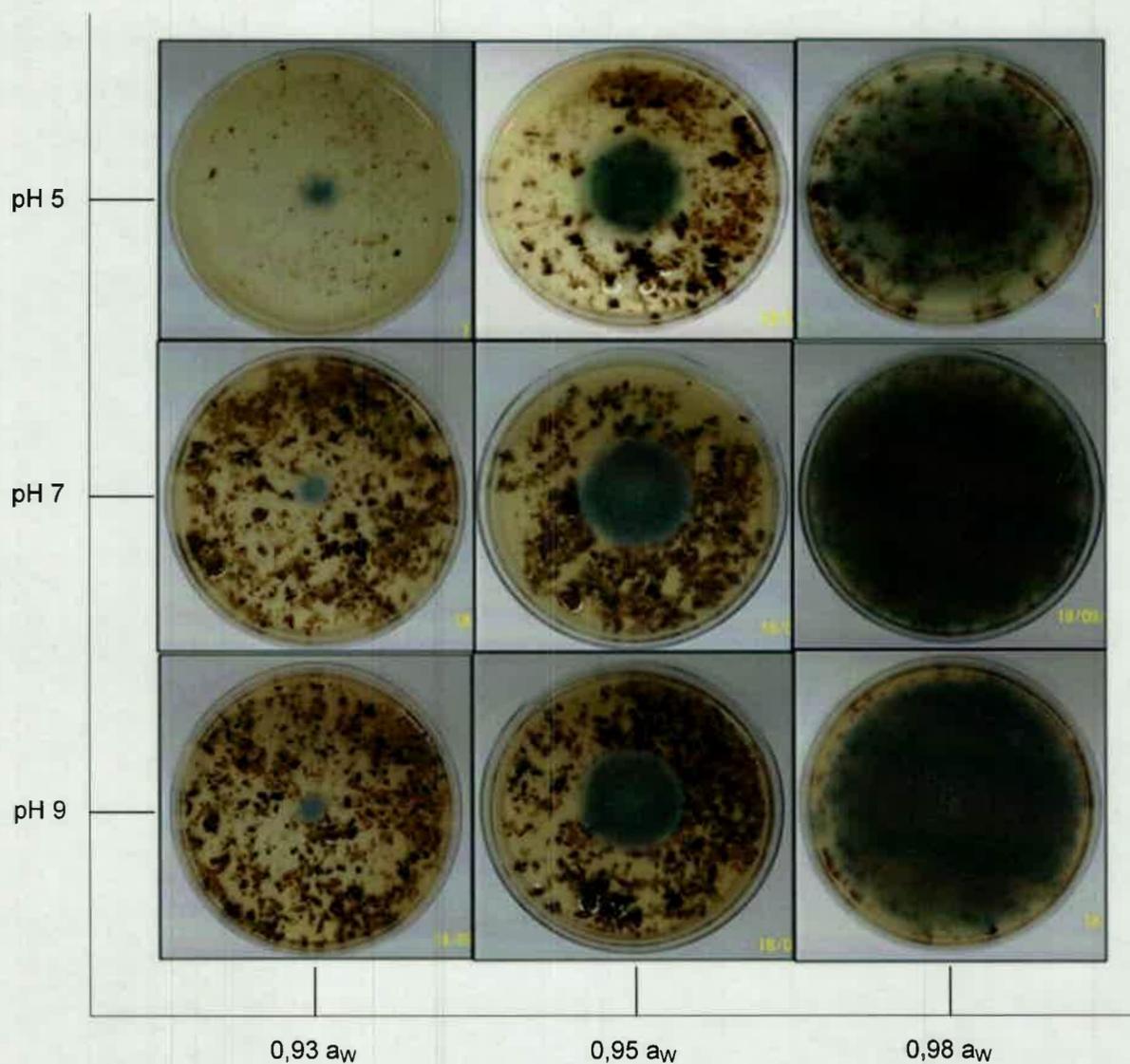


Figura 23. Efecto de diferentes niveles de pH y a_w sobre el crecimiento de la cepa Af16, aislada de ensilaje de maíz, a los 5 días de incubación bajo atmósfera reducida de oxígeno y 37 °C.

Las cepas estudiadas fueron capaces de crecer bajo atmósfera reducida de oxígeno y 37 °C, en general con velocidades de crecimiento mayores a las observadas a esta misma temperatura y a tensión normal de oxígeno. Similar comportamiento fue observado por Hall y Denning (1994) y Willger y col. (2009), quienes estudiaron el efecto de bajas tensiones de oxígeno sobre el crecimiento de 24 cepas de *Aspergillus* spp. entre éstas 10 de *A. fumigatus*. Ellos probaron diferentes tensiones de oxígeno (0, 0,025, 0,1, 0,5 y 2,5%) y observaron que todos los aislados de *A. fumigatus* fueron capaces de crecer a bajas tensiones parciales (mínimo 0,1%) pero no en ausencia de oxígeno. En este trabajo, independientemente de la tensión de oxígeno considerada, las fases de latencia se incrementaron y las velocidades de crecimiento se redujeron a medida que disminuyó la a_w .

Las condiciones de elevada temperatura y a_w y condiciones de microaerofilia prevalecen en alimentos fermentados destinados a animales tales como ensilaje de maíz y residuo de la industria cervecera. Las cepas estudiadas aquí, fueron capaces de crecer bajo estas condiciones, con fases de latencia más extensas que a tensión normal de oxígeno pero a velocidades de crecimiento mayores, a los niveles más elevados de temperatura y a_w ensayados. **La velocidad de crecimiento de *A. fumigatus* parece ser un importante parámetro que ejerce influencia en su patogénesis, debido a que éste es uno de los patógenos fúngicos más frecuentes.** Paisley y col. (2005) propusieron un método cinético de microcultivo en caldo para la determinación del crecimiento de cepas clínicas de *A. fumigatus* mediante espectrofotometría. Ellos compararon el crecimiento y los valores de DL90 de los aislados y afirmaron que existió correlación entre estos dos parámetros. Sin embargo, estos autores no determinaron fases de latencia y velocidades de crecimiento que permitan establecer comparaciones, pero encontraron que aquellas cepas que eran capaces de desarrollar más rápidamente fueron las que presentaron los valores de DL90 más elevados. No obstante, la asociación entre la velocidad de crecimiento y la virulencia de las cepas requiere aún mayor investigación.

1.3- Efecto de la interacción de los diferentes factores de crecimiento sobre la producción de gliotoxina

Se investigaron los niveles de gliotoxina producidos por las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 a los 3, 7 y 14 días de incubación, bajo la influencia de la interacción entre la temperatura, a_w y pH a tensión normal de oxígeno, y de la interacción entre la a_w y pH a tensión reducida de oxígeno y 37 °C. El análisis de la varianza del efecto de los factores individuales (cepa, días de incubación, temperatura, a_w y pH) y las interacciones de dos, tres, cuatro y cinco vías a tensión normal de oxígeno, mostró que todos ellos ejercieron influencia estadísticamente significativa sobre la producción de gliotoxina ($p < 0,0001$) (Tabla 18). Nuevamente, con el objetivo de determinar el efecto de la interacción entre la a_w , pH y tensión de oxígeno sobre la producción de gliotoxina por ambas cepas a 37 °C, los datos obtenidos del análisis de la toxina a esta temperatura y a tensión normal de oxígeno fueron combinados con aquellos obtenidos a tensión reducida de oxígeno. El análisis de la varianza de este conjunto de datos mostró que todos los factores individuales (cepa, días de incubación, tensión de oxígeno, a_w y pH) y las interacciones de dos, tres, cuatro y cinco vías ejercieron influencia significativa sobre la producción de gliotoxina cuando las cepas crecieron a 37 °C ($p < 0,0001$) (Tabla 19). El Test LSD de Fisher de la significancia de cada factor individual a tensión de oxígeno normal y a 37 °C, mostró que todos los parámetros de crecimiento analizados ejercieron influencia significativamente diferente sobre la producción de gliotoxina por ambas cepas ($p \leq 0,05$) (Tablas 5 y 6, Anexo Estadística).

Tabla 18. Significancia estadística de las cepas, días de incubación, temperatura, a_w , pH y sus interacciones sobre la producción de gliotoxina, a tensión de oxígeno normal.

Tratamientos	gl	F	p-valor
Cepa	1	8377,44	<0,0001
Días Incubación	2	121629,69	<0,0001
T	2	101336,68	<0,0001
a_w	2	119231,80	<0,0001
pH	2	53895,02	<0,0001
Cepa*Días Incubación	2	3287,26	<0,0001
Cepa*T	2	19548,20	<0,0001
Cepa* a_w	2	1046,79	<0,0001
Cepa*pH	2	18154,55	<0,0001
Días Incubación*T	4	27932,43	<0,0001
Días Incubación* a_w	4	49525,88	<0,0001
Días Incubación*pH	4	13931,95	<0,0001
T* a_w	4	95561,54	<0,0001
T*pH	4	43452,75	<0,0001
a_w *pH	4	44719,62	<0,0001
Cepa*Días Incubación*T	4	8131,24	<0,0001
Cepa*Días Incubación* a_w	4	2436,23	<0,0001
Cepa*Días Incubación*pH	4	6070,96	<0,0001
Cepa*T* a_w	4	712,47	<0,0001
Cepa*T*pH	4	13453,09	<0,0001
Cepa* a_w *pH	4	10775,96	<0,0001
Días Incubación*T* a_w	8	58411,81	<0,0001
Días Incubación*T*pH	8	12964,76	<0,0001
Días Incubación* a_w *pH	8	20445,41	<0,0001
T* a_w *pH	8	20456,36	<0,0001
Cepa*Días Incubación*T* a_w	8	3483,46	<0,0001
Cepa*Días Incubación*T*pH	8	6813,31	<0,0001
Cepa*Días Incubación* a_w *pH	8	6789,88	<0,0001
Cepa*T* a_w *pH	8	6127,56	<0,0001
Días Incubación*T* a_w *pH	16	19783,26	<0,0001
Cepa*Días Incubación*T* a_w *pH	16	7145,36	<0,0001

Nota: gl: grados de libertad, F: valor F de Fisher. T: temperatura.

Tabla 19. Significancia estadística de las cepas, tensión de oxígeno, días de incubación, a_w , pH y sus interacciones sobre la producción de gliotoxina, a 37 °C.

Tratamientos	gl	F	p-valor
Cepa	1	49022,72	<0,0001
T°O ₂	1	9747,22	<0,0001
Días Incubación	2	68568,23	<0,0001
a_w	2	473931,27	<0,0001
pH	2	51205,75	<0,0001
Cepa*T°O ₂	1	36417,20	<0,0001
Cepa*Días Incubación	2	2141,96	<0,0001
Cepa* a_w	2	26507,20	<0,0001
Cepa*pH	2	4686,12	<0,0001
T°O ₂ *Días Incubación	2	31681,77	<0,0001
T°O ₂ * a_w	2	27359,29	<0,0001
T°O ₂ *pH	2	41926,67	<0,0001
Días Incubación* a_w	4	85065,54	<0,0001
Días Incubación*pH	4	14503,30	<0,0001
a_w *pH	4	64313,01	<0,0001
Cepa*T°O ₂ *Días Incubación	2	4318,44	<0,0001
Cepa*T°O ₂ * a_w	2	17734,44	<0,0001
Cepa*T°O ₂ *pH	2	4749,84	<0,0001
Cepa*Días Incubación* a_w	4	786,06	<0,0001
Cepa*Días Incubación*pH	4	7297,91	<0,0001
Cepa* a_w *pH	4	10334,24	<0,0001
T°O ₂ *Días Incubación* a_w	4	26112,02	<0,0001
T°O ₂ *Días Incubación*pH	4	13129,15	<0,0001
T°O ₂ * a_w *pH	4	32420,65	<0,0001
Días Incubación* a_w *pH	8	11865,60	<0,0001
Cepa*T°O ₂ *Días Incubación* a_w	4	1612,23	<0,0001
Cepa*T°O ₂ *Días Incubación*pH	4	6688,98	<0,0001
Cepa*T°O ₂ * a_w *pH	4	10586,96	<0,0001
Cepa*Días Incubación* a_w *pH	8	10356,13	<0,0001
T°O ₂ *Días Incubación* a_w *pH	8	26296,85	<0,0001
Cepa*T°O ₂ *Días Incubación* a_w *pH	8	10218,77	<0,0001

Nota: gl: grados de libertad, F: valor F de Fisher. T°O₂: tensión de oxígeno.

Las concentraciones de gliotoxina detectadas en los extractos fúngicos de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 a las diferentes temperaturas, a_w , pH y días de incubación analizados a tensión normal de oxígeno, se observan en la **Tabla 20**. En general, la producción de gliotoxina no mostró un patrón de comportamiento similar al encontrado al

analizar el crecimiento de ambas cepas. El efecto de la interacción de todos los factores ambientales fue variable y la gliotoxina fue detectada en unas pocas condiciones, pero en algunas de éstas, la toxina fue producida en niveles mayores a los detectados sobre el medio sintético YES. A los 3 días de incubación no se detectó gliotoxina en ninguna de las interacciones ensayadas a tensión de oxígeno normal. Ninguna de las cepas fue capaz de crecer durante dicho periodo de incubación a 25 y 18 °C. El mismo comportamiento se observó cuando se determinó la interacción de éstos factores a tensión reducida de oxígeno y 37 °C de incubación (datos no mostrados). No obstante, a los 7 y 14 días de incubación la gliotoxina fue detectada principalmente a 37 y 25 °C y a_w 0,93 cuando las dos cepas crecieron bajo atmósfera normal de oxígeno ($p \leq 0,05$). Esta toxina fue detectada también en otras condiciones aunque en niveles menores (Tabla 20). A 37 °C y a_w 0,93 para las dos cepas evaluadas, pH 7 fue el nivel de pH más adecuado para la producción de gliotoxina.

La **Tabla 21** muestra los niveles de esta toxina detectados en los extractos fúngicos de las dos cepas estudiadas a diferentes pH, tensión de oxígeno y días de incubación, a 37 °C y a_w 0,93. Nuevamente, la producción de la toxina no mostró un patrón de comportamiento similar al observado al analizar el crecimiento de ambas cepas y en general, ocurrió al menor nivel de a_w analizado (0,93 a_w) y a los 7 y 14 días de incubación. El nivel más elevado de gliotoxina detectado en condiciones de atmósfera reducida de oxígeno, 37 °C y a_w 0,93 fue producido por la cepa *A. fumigatus* RC2108, a los 7 días de incubación a pH 7 ($p \leq 0,05$). Las demás interacciones a_w x pH x días de incubación a a_w 0,98 y 0,95, no permitieron la producción de esta toxina a 37 °C y tensión reducida de oxígeno (datos no mostrados). Por otro lado, se encontró que **el factor pH influyó significativamente en las concentraciones de gliotoxina producidas bajo las dos atmósferas de oxígeno evaluadas**. Si bien las cepas fueron capaces de producir gliotoxina bajo atmósfera reducida de oxígeno en determinadas interacciones de factores, los niveles detectados en las mismas condiciones a tensión normal de oxígeno fueron significativamente mayores ($p \leq 0,05$) (Tabla 21).

El nivel más elevado de gliotoxina, considerando todo el ensayo, fue detectado en los extractos fúngicos de la cepa Af16 luego de 14 días de incubación a tensión normal de oxígeno, 25 °C, a_w 0,93 y pH 9 ($p \leq 0,05$).

Tabla 20. Niveles de gliotoxina producidos por las cepas de *A. fumigatus* sensu stricto bajo las diferentes condiciones de temperatura, a_w , pH y días de incubación, a tensión normal de oxígeno.

T (°C)	a_w	pH	Af16			<i>A. fumigatus</i> RC2108		
			Gliotoxina (ng/g)					
			Días de Incubación					
			3	7	14	3	7	14
37	0,98	9	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s
		7	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s
		5	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s
	0,95	9	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s
		7	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s
		5	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s
	0,93	9	ND ^s	420,9 ⁱ	140,2 ^k	ND ^s	1404,9 ^{†d}	217,8 ^j
		7	ND ^s	1820,5 ^{†c}	958,4 ^e	ND ^s	2377,7 ^{†b}	944,2 ^o
		5	ND ^s	ND ^s	ND ^s	ND ^s	D* ^s	ND ^s
25	0,98	9	NC ^s	513,5 ^g	45,1 ⁱ	NC ^s	ND ^s	ND ^s
		7	NC ^s	ND ^s	13,7 ^p	NC ^s	ND ^s	ND ^s
		5	NC ^s	ND ^s	ND ^s	NC ^s	677,8 ^f	ND ^s
	0,95	9	NC ^s	692,2 ^{†f}	ND ^s	NC ^s	40,9 ^m	ND ^s
		7	NC ^s	23,6 ^o	ND ^s	NC ^s	ND ^s	ND ^s
		5	NC ^s	ND ^s	12 ^q	NC ^s	ND ^s	ND ^s
	0,93	9	NC ^s	NC ^s	4583,4 ^{†a}	NC ^s	NC ^s	688,1 ^f
		7	NC ^s	NC ^s	450,6 ^h	NC ^s	NC ^s	ND ^s
		5	NC ^s	NC ^s	ND ^s	NC ^s	NC ^s	10,1 ^r
18	0,98	9	NC ^s	NC ^s	ND ^s	NC ^s	NC ^s	ND ^s
		7	NC ^s	NC ^s	ND ^s	NC ^s	NC ^s	D* ^s
		5	NC ^s	NC ^s	ND ^s	NC ^s	NC ^s	29,3 ⁿ
	0,95	9	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s
		7	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s
		5	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s
	0,93	9	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s
		7	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s
		5	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s	NC ^s

Nota: ND: No detectado en base a las dos metodologías de detección. NC: no hubo crecimiento. *Valores por debajo del LOQ determinado por la metodología de HPLC-MS/MS, LOD: 4,3 ng/g y LOQ: 9,9 ng/g. †Concentraciones detectadas mediante la metodología de HPLC-UV, LOD: 234,2 ng/g, LOQ: 546,4 ng/g. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabla 21. Niveles de gliotoxina producidos por las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 bajo diferentes pH y días de incubación, a a_w 0,93 y 37 °C.

pH	T°O ₂	Af16			<i>A. fumigatus</i> RC2108		
		Gliotoxina (ng/g)					
		Días de incubación					
		3	7	14	3	7	14
9	reducida	ND ^q	25,3 ⁿ	ND ^q	45,9 ^k	117,6 ^l	ND ^q
	normal	ND ^q	420,9 ^f	140,2 ^h	ND ^q	1.404,9 ^c	217,8 ^g
7	reducida	ND ^q	ND ^q	ND ^q	39,6 ^l	699,8 ^e	31,7 ^m
	normal	ND ^q	1820,5 ^b	958,4 ^d	ND ^q	2377,7 ^a	944,2 ^d
5	reducida	ND ^q	61,4 ^j	ND ^q	ND ^q	ND ^q	220,3 ^g
	normal	ND ^q	ND ^q	ND ^q	ND ^q	ND ^q	ND ^q

Nota: ND: No detectado en base a la metodología de detección por HPLC-MS/MS, LOD: 4,3 ng/g y LOQ: 9,9 ng/g. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En este trabajo, las cepas de *A. fumigatus* sensu stricto evaluadas crecieron en general, más rápidamente a tensión reducida de oxígeno (0,4%) que bajo la condición normal, sin embargo el nivel más elevado de gliotoxina fue detectado a tensión normal de oxígeno en los extractos fúngicos de la cepa Af16. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Watanabe y col. (2004), quienes al estudiar el efecto de la concentración de oxígeno en el medio de cultivo sobre la producción de gliotoxina, encontraron que las cepas (clínicas) de *A. fumigatus* la producían a concentración normal de oxígeno en su atmósfera de crecimiento. Sin embargo, los resultados contrastan con estos autores con respecto al período de incubación, ya que ellos encontraron niveles elevados de gliotoxina a las 15 y 24 h de incubación. Estas diferencias probablemente sean debidas a que estos autores utilizaron medios sintéticos y condiciones de cultivo diferentes. En el presente trabajo, la producción de gliotoxina bajo tensión normal de oxígeno y a 37 °C ocurrió principalmente a la menor a_w evaluada. Este comportamiento podría deberse a que el hongo se

encuentra desarrollando bajo condiciones que no son las óptimas para su crecimiento, generándose por lo tanto, una situación de estrés que desencadena una alta producción de la toxina.

Por otra parte, en general a los 37 °C de incubación, se observó que cuando las cepas produjeron la toxina a los 7 días, su concentración se redujo significativamente a los 14 días de incubación ($p \leq 0,05$). El mismo comportamiento se observó a 25 °C bajo a_w 0,98 y 0,95 para las dos cepas estudiadas. Mientras que a esta temperatura y a la menor a_w evaluada (0,93) las cepas que fueron capaces de producir gliotoxina, lo hicieron a los 14 días de incubación, sin haberse detectado la toxina a los 7 días anteriores. Probablemente las condiciones en las cuales el metabolismo fúngico es más activo (elevadas temperaturas o a_w) permiten la producción más rápida de gliotoxina por *A. fumigatus* (sensu stricto), aunque no siempre en los niveles más elevados. La disminución en las concentraciones de gliotoxina detectadas entre los 7 y 14 días de incubación, podría ser explicada por el consumo de la misma por parte del hongo, el cual posiblemente utilice su molécula como fuente de carbono. A lo largo de los años, varios autores han informado comportamientos similares en otras especies de *Aspergillus* (Varga y col., 2000c; Abrunhosa y col., 2002; Leong y col., 2006).

Desde un punto de vista epidemiológico, la ubiquidad y adaptabilidad de A. fumigatus sensu stricto para crecer en variadas condiciones es relevante, ya que se encontrará siempre presente en el ambiente animal, aunque las condiciones de almacenamiento de los alimentos sean diferentes. Por otra parte, la capacidad de producción de gliotoxina reviste gran importancia ya que condiciones estresantes en el organismo animal (similares a las reproducidas en este trabajo) podrían desencadenar su producción en niveles elevados. Actualmente, existe poca información acerca de los parámetros de crecimiento de cepas de *A. fumigatus* sensu stricto, especialmente de aquellas aisladas de alimentos para animales y no hay trabajos disponibles que evalúen la influencia de parámetros ambientales interactuantes sobre la fase de latencia, velocidad de crecimiento y producción de gliotoxina por este importante patógeno oportunista.

2- Identificación a nivel de especie de las cepas incluidas en los estudios ecofisiológicos mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina

La caracterización molecular de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 (A89) realizada mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina (*benA*), permitió determinar el estado taxonómico de dichas cepas y confirmar que pertenecen a la especie *A. fumigatus* sensu stricto (Fig. 24, 25 y 26). El gen de la β -tubulina es una herramienta que ha sido ampliamente utilizada para la identificación de las especies de *Aspergillus* sección *Fumigati* (Hong y col., 2005, 2008, 2010; Varga y col., 2000a, 2000b).

Se obtuvieron secuencias parciales de 477 y 509 pb correspondientes a las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108, respectivamente. Estas secuencias fueron comparadas con otras disponibles en la base de datos del GenBank, mediante un BLAST. Los alineamientos correspondientes a las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 arrojaron un 98 y 99% de similitud con otras secuencias β -tubulina de cepas *A. fumigatus* sensu stricto disponibles en la base de datos, respectivamente (Fig. 24 y 25). En todos los casos, el valor del estadístico *e* fue igual a 0, lo cual significa que la probabilidad de que ese alineamiento haya ocurrido al azar es despreciable.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF669845.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate NRRL 5109 beta-tubulin gene, par	881	881	100%	0.0	98%
HQ285593.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain KCCM60331 beta-tubulin gene, pai	876	876	100%	0.0	98%
HQ285510.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain SN-A4 beta-tubulin gene, partial s	876	876	100%	0.0	98%
FR775354.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> partial <i>benA</i> gene for beta-1 and beta-2	876	876	100%	0.0	98%
GQ221161.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain FSU6264 beta-tubulin gene, parbia	876	876	100%	0.0	98%
FM36789.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate AF8 beta-tubulin gene, partial cd:	876	876	100%	0.0	98%
GQ376141.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate UOA/HCPF 8375 beta-tubulin (tub	876	876	100%	0.0	98%
GQ376140.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate UOA/HCPF 7510 beta-tubulin (tub	876	876	100%	0.0	98%
FM609209.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain IHEM 9945 beta-tubulin gene, part	876	876	100%	0.0	98%
DQ534076.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain CBS 121.53 beta-tubulin gene, pai	876	876	100%	0.0	98%
DQ534077.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain CBS 315.60 beta-tubulin gene, pai	876	876	100%	0.0	98%
AY048754.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> beta-tubulin (TUB1) gene, partial cds	876	876	100%	0.0	98%
FR775352.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> partial <i>benA</i> gene for beta-1 and beta-2	870	870	99%	0.0	98%
HQ285501.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain JL-A2 beta-tubulin gene, partial se	867	867	100%	0.0	98%
DQ534078.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain CBS 520.62 beta-tubulin gene, par	848	848	93%	0.0	99%
HQ588163.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i> isolate FC049 beta-tubulin	826	826	93%	0.0	98%
HQ588162.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> var. <i>ellipticus</i> isolate FC045 beta-tubulin	826	826	93%	0.0	98%
DQ534079.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> strain CBS 511.64 beta-tubulin gene, pai	824	824	94%	0.0	98%
HQ588166.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate FC025 beta-tubulin (<i>benA</i>) gene,	821	821	93%	0.0	98%
HQ588165.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate FC020 beta-tubulin (<i>benA</i>) gene,	821	821	93%	0.0	98%
HQ127253.1	<i>Aspergillus fumigatus</i> isolate GM02/29 beta-tubulin (<i>benA</i>) gen	821	821	93%	0.0	98%

Figura 24. Resultado del BLAST correspondiente a la cepa Af16, aislada de ensilaje de maíz para vacas lecheras.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E-value	Max ident
HQ285593.1	Aspergillus fumigatus strain KCCM60331 beta-tubulin gene, par	929	929	100%	0.0	99%
HQ285510.1	Aspergillus fumigatus strain SN-A4 beta-tubulin gene, partial s	929	929	100%	0.0	99%
FR775354.1	Aspergillus fumigatus partial benA gene for beta-1 and beta-2	929	929	100%	0.0	99%
FR775352.1	Aspergillus fumigatus partial benA gene for beta-1 and beta-2	929	929	100%	0.0	99%
GQ221161.1	Aspergillus fumigatus strain FSU6264 beta-tubulin gene, partia	929	929	100%	0.0	99%
F2436789.1	Aspergillus fumigatus isolate AF8 beta-tubulin gene, partial cd	929	929	100%	0.0	99%
GQ376141.1	Aspergillus fumigatus isolate UOA/HCPF 8375 beta-tubulin (tub	929	929	100%	0.0	99%
GQ376140.1	Aspergillus fumigatus isolate UOA/HCPF 7510 beta-tubulin (tub	929	929	100%	0.0	99%
AY048754.1	Aspergillus fumigatus beta-tubulin (TUB1) gene, partial cds	929	929	100%	0.0	99%
HQ285501.1	Aspergillus fumigatus strain JL-A2 beta-tubulin gene, partial se	920	920	100%	0.0	99%
F3609209.1	Aspergillus fumigatus strain JHEM 9945 beta-tubulin gene, part	920	920	99%	0.0	99%
DQ534076.1	Aspergillus fumigatus strain CBS 121.53 beta-tubulin gene, par	920	920	99%	0.0	99%
DQ534077.1	Aspergillus fumigatus strain CBS 315.60 beta-tubulin gene, par	920	920	99%	0.0	99%
FF669845.1	Aspergillus fumigatus isolate NRRL 5109 beta-tubulin gene, par	915	915	99%	0.0	99%
HO588166.1	Aspergillus fumigatus isolate FC025 beta-tubulin (benA) gene,	889	889	95%	0.0	100%
HO588165.1	Aspergillus fumigatus isolate FC020 beta-tubulin (benA) gene,	889	889	95%	0.0	100%
HO127245.1	Aspergillus fumigatus isolate GM01/31 beta-tubulin (benA) gen	889	889	95%	0.0	100%
HO127246.1	Aspergillus fumigatus isolate GM01/36 beta-tubulin (benA) gen	889	889	95%	0.0	100%
DQ438524.1	Aspergillus fumigatus isolate FH34 beta-tubulin gene, partial s	889	889	95%	0.0	100%
DQ438522.1	Aspergillus fumigatus isolate FH32 beta-tubulin gene, partial s	889	889	95%	0.0	100%

Figura 25. Resultado del BLAST correspondiente a la cepa *A. fumigatus* RC2108, aislada de residuo de la industria cervecera para cerdos.

Por último, para observar el agrupamiento de estas dos cepas, identificadas finalmente como *A. fumigatus* sensu stricto, con especies de la sección *Fumigati* disponibles en la base de datos se aplicó el método de agrupamiento Neighbor-Joining (las secuencias utilizadas en este análisis se muestran en la Tabla 11, apartado “Materiales y Métodos”). Las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 (A89) fueron agrupadas con cepas de *A. fumigatus* sensu stricto (DQ534076, DQ534077, DQ534078, DQ534079, Hong y col., 2005) con valores de bootstrap de 100% (Fig. 26).

La cepa Af16 fue incorporada a la Colección Micológica de la UNRC y registrada como *A. fumigatus* RC2063. Finalmente, las secuencias parciales β -tubulina de las dos cepas *A. fumigatus* sensu stricto evaluadas durante estos ensayos fueron depositadas en la base de datos de GenBank (*A. fumigatus* RC2063: número de acceso: JX277549 y *A. fumigatus* RC2108: número de acceso: JX277548).

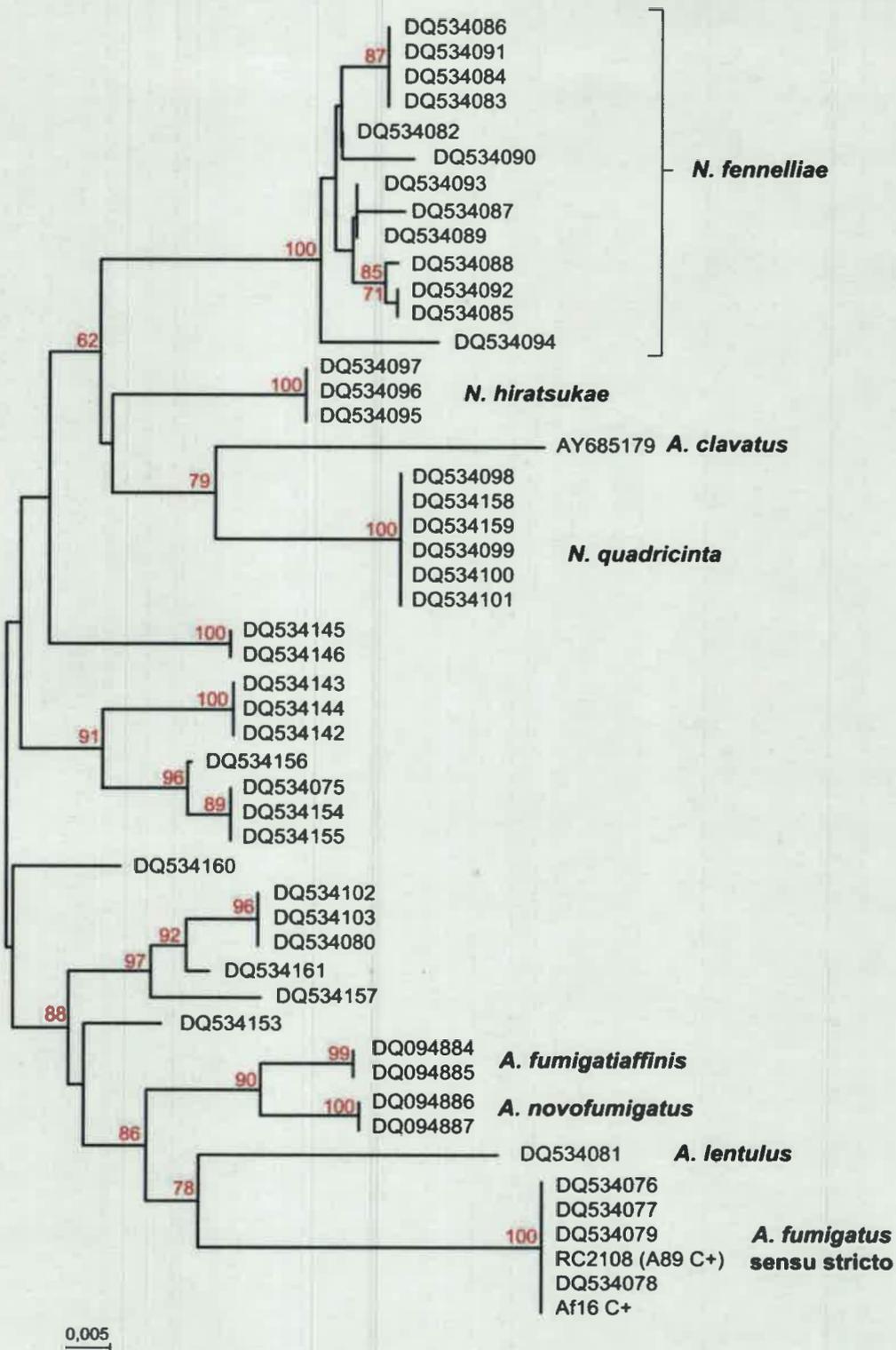


Figura 26. Agrupamiento de las cepas en estudio inferido por el análisis de Neighbor-Joining de secuencias parciales del gen de la β -tubulina. Los números encima de los nodos representan valores de bootstrap mayores al 60% (1000 replicaciones de bootstrap). El número de cambios nucleotídicos es representado por la longitud de las ramas.

SECCIÓN III

**Estudios genotípicos y fenotípicos de cepas de
Aspergillus sección *Fumigati***

Materiales y Métodos

1- Caracterización fenotípica de *Aspergillus* sección *Fumigati*

1.1- Análisis estadístico multivariado

Los datos recopilados durante la caracterización de las cepas a través de caracteres morfológicos según la clave taxonómica de Samson y col. (2007) fueron sometidos a un análisis estadístico multivariado. Previamente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,0001$) para detectar diferencias significativas entre las variables, utilizando el software InfoStat versión 2008. Se consideraron las **variables morfométricas** diámetro de las colonias (medidos en mm) en las condiciones de cultivo: CYA25°C, CYA37°C, MEA25°C, CZA25°C, OA25°C, YES25°C y CREA25°C (variables **macromorfométricas**), y largo y ancho del estipe y ancho de la vesícula (en μm) (variables **micromorfométricas**). Mientras que el color de las colonias en CYA37°C a los 3 días de incubación, la conidiación en MEA, producción de ácidos en CREA y la producción de gliotoxina conformaron **variables de clasificación**. Los resultados obtenidos de todas las variables medidas (morfométricas y de clasificación) fueron organizados en forma de matriz con n filas (casos o individuos) conteniendo las p características (variables) registradas sobre un mismo individuo (cepa). Con dichos datos, se realizaron diferentes **análisis de componentes principales** (ACP) los cuales facilitaron la detección de asociaciones más complejas entre los individuos en un escenario multidimensional y **análisis de conglomerados**, en los cuales se utilizó la distancia Euclídea para estimar las diferencias entre estos individuos. Como resultado del análisis de conglomerados se construyeron dendrogramas para la apropiada visualización de los "clusters" o grupos. Finalmente, se realizó un **análisis de correlación de Pearson** para demostrar las correlaciones presentes entre las variables estudiadas. Todos estos análisis fueron llevados a cabo utilizando el software estadístico InfoStat versión 2008 (Argentina).

2- Marcadores moleculares para la caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*

2.1- Materiales

2.1.1- Medio de cultivo

- *Medio líquido Wickerham*: glucosa 40 g, peptona 5 g, extracto de levadura (Britania) 3 g, extracto de malta (Britania) 3 g, agua destilada 1000 ml (Mulé y col., 2006).

2.1.2- Soluciones y reactivos

2.1.2.1- Soluciones y reactivos utilizados para la extracción del ADN

- Buffer CTAB al 2%: 2% CTAB, 100 mM Tris-ClH (pH 8), 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl.
- Buffer TE 1X: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA, pH 8
- Cloroformo- alcohol isoamílico (24:1, v/v)
- Etanol al 70%
- 2- mercaptoetanol
- Isopropanol (2-propanol)
- Acetato de amonio 7,5 M (pH 8).

2.1.2.2- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa

- Buffer TAE (50X): 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial; 0,5 M EDTA (pH 8).
- Bromuro de Etidio: se agrega 1 µl de una solución stock (10 mg/ml) cada 20 ml de agarosa fundida y templada a 45 °C.
- Marcador de peso molecular: ADN del bacteriófago λ digerido con HindIII (rango de los fragmentos: 125 bp - 23.1 kb) (Life technologies, USA).

2.1.2.3- Soluciones y reactivos utilizados para la obtención de los marcadores moleculares PCR-RFLP

2.1.2.3.1- Reactivos utilizados para la amplificación del gen de la β -tubulina

- Buffer PCR 10X: 200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl. (10X Taq DNA Polymerase (Brasil)[®] Reaction Buffer, Invitrogen by Life Technologies).
- $MgCl_2$: 50 mM (Invitrogen by Life Technologies).
- dNTPs: Stock 2 mM (100 μ l): se prepara mezclando 2 μ l de cada dNTP (GTP, CTP, ATP y TTP, 100 mM, Invitrogen) en 92 μ l de agua bidestilada estéril calidad biología molecular.
- Taq DNA polimerasa: (5 U/ μ l Invitrogen by Life Technologies).
- Cebadores Bt2a/Bt2b: stock 10 μ M: se prepara por disolución del cebador seco (Invitrogen) en el volumen apropiado de agua bidestilada estéril calidad biología molecular.

2.1.2.3.2- Reactivos utilizados para la digestión del amplicón β -tubulina con la enzima de restricción *BccI*

- Enzima de restricción *BccI*: 10 U/ μ l (BioLabs Inc. New England, número de catálogo: R0704S).
- Buffer de la enzima *BccI*: 10X NEBuffer 1 (BioLabs Inc. New England).
- Albúmina sérica bovina (BSA): 100 mg/ml (New England BioLabs Inc.).

2.1.2.3.3- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa

- Buffer TAE (50X): 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial; 0,5 M EDTA (pH 8).
- Bromuro de etidio: se agrega 1 μ l de una solución stock (10 mg/ml) cada 20 ml de agarosa fundida y templada a 45 °C.
- Marcador de peso molecular de 100 pb (100-bp Ladder, Invitrogen).

2.1.2.4- Soluciones y reactivos utilizados para la obtención de los marcadores moleculares RAPD

2.1.2.4.1- Reactivos utilizados para la reacción de PCR

- Buffer PCR (10X), MgCl₂ (50 mM), dNTPs y *Taq* DNA polimerasa: mencionados en el punto 2.1.2.3.1.
- Cebadores: Se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando los cebadores: PELF o URP1F (Kang y col., 2002).

2.1.2.4.2- Soluciones y reactivos utilizados para la visualización del ADN por electroforesis en gel de agarosa

Se utilizaron las soluciones y reactivos descritos en el punto 2.1.2.3.3.

2.2- Métodos

2.2.1- Caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante marcadores moleculares generados por el **polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto** de amplificación de β -tubulina.

Para la caracterización de las cepas seleccionadas de *Aspergillus* sección *Fumigati* utilizando los marcadores moleculares PCR-RFLP, se siguió el esquema de identificación descrito por Staab y col. (2009) que permite la rápida identificación ("screening") de morfotipos similares en la sección *Fumigati*.

2.2.1.1- Cepas

Se utilizaron para el análisis las 35 cepas que fueron caracterizadas fenotípicamente y cuyos caracteres morfométricos y de clasificación fueron evaluados y comparados mediante los análisis estadísticos multivariados descritos en el punto 1. (Tabla 22).

Además, se incluyeron en el análisis los controles positivos de *A. fumigatus* sensu stricto: *A. fumigatus* RC2063 (Af16, N° de acceso GenBank: JX277549) y *A. fumigatus* RC2108 (A89, N° de acceso GenBank: JX277548).

2.2.1.2- Producción de la biomasa fúngica

A partir de cada cepa desarrollada en MEA a 28 °C durante 7 días se realizó una suspensión de esporas en agar semisólido que se transfirió a frascos Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio Wickerham. Los medios así inoculados se incubaron a 28 °C durante 2 a 3 días en un agitador rotatorio (150 rpm). El micelio se cosechó por filtración bajo presión negativa creada por vacío, se lavó con agua destilada estéril y se secó entre papel absorbente. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de realizar la extracción del ADN.

Tabla 22. Cepas analizadas mediante la aplicación de los marcadores PCR-RFLP.

Cepas	Cantidad*	Origen de aislamiento
E1-E3, E5-E6, Af1	6	alimento para caballos
Af2, A21	2	alimento para pollos
Af3, Af6, Af7, Af11 MA3, MA159, MA199, Af42	8	alimento para perros
AS32, AS19, Ach2 FA15, AS43	5	alimento para chinchillas
Af13, Af14, Af25, Af16, B61	5	ensilaje para vacas
A105, A109, A118, A152 A193, A198, A114, A70, A89	9	alimento para cerdos [†]

* Número de cepas analizadas por origen de aislamiento. [†] Residuo de la industria cervecera.

2.2.1.3- Extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

Se pulverizó el micelio congelado en morteros utilizando nitrógeno líquido para lograr la ruptura mecánica de las células y se distribuyó en microtubos Eppendorf de 1,5 ml estériles que fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para extraer el ADN, se utilizó el buffer CTAB siguiendo la metodología propuesta por Leslie y Summerell (2006), con algunas modificaciones. Al micelio congelado (aproximadamente 1,5 a 2 g) se le adicionó 700 μl de buffer CTAB al 2% (previamente calentado a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$) y 15 μl de 2-mercaptoetanol, se agitó la mezcla durante 2 min en agitador Vórtex y se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Luego del tiempo de incubación los tubos fueron nuevamente agitados por 2 min e incubados a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. Se agregó 500 μl de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v), se agitó la mezcla durante 1 min y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se tomó aproximadamente 600 μl de la fase acuosa y se la transfirió a un microtubo Eppendorf estéril. Se agregó igual volumen de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos y mitad del volumen de acetato de amonio 7,5 M, mezclando por inversión. Luego se centrifugó la mezcla a 10000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El "pellet" fue lavado 2 veces con 500 μl de etanol frío al 70% (v/v) y se secó a temperatura ambiente durante 2 a 3 min invirtiendo los tubos sobre papel absorbente. Por último, los "pellets" fueron resuspendidos en 100 μl de buffer TE 1X para conservarlos hasta su posterior análisis.

El ADN genómico se cuantificó por comparación visual usando ADN del bacteriófago λ digerido con HindIII como ADN testigo, teñidos con bromuro de Etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las muestras se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en buffer TAE 1X. El voltaje y tiempo de la separación electroforética fue dependiente de la cuba de electroforesis utilizada. Se realizaron las diluciones correspondientes de cada muestra de ADN en buffer TE 1X hasta obtener una concentración aproximada de 5 - 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

2.2.1.4- Obtención de los marcadores moleculares PCR-RFLP

2.2.1.4.1- *In silico* PCR-RFLP

Previo a la obtención de los marcadores moleculares RFLP, se realizaron análisis *in silico* para la obtención de mapas de restricción teóricos con diferentes enzimas utilizando la herramienta on-line NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Durante este



análisis, se investigaron los fragmentos producidos por enzimas de restricción disponibles en NEBcutter, sobre secuencias parciales de β -tubulina obtenidas de GenBank de *A. fumigatus* sensu stricto, *A. lentulus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. novofumigatus*, *A. fumisynnematus*, *A. viridinutans* y *Neosartorya udagawae*. Estas secuencias se alinearon aplicando el algoritmo ClustaW en BioEdit v7.0.9.0 software (Thompson y col. 1994) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>) y luego fueron evaluadas con cada enzima de restricción. Este análisis se realizó para seleccionar una enzima para ser utilizada en el ensayo de PCR-RFLP *in situ*.

2.2.1.4.2- *In situ* PCR-RFLP

2.2.1.4.2.1- Amplificación de gen de la β -tubulina (*benA*)

Para la amplificación del gen (parcial) de la β -tubulina (*benA*), se utilizaron los cebadores Bt2a/Bt2b (Glass y Donaldson, 1995) (Tabla 23), siguiendo la metodología propuesta por Samson y col. (2004b), con algunas modificaciones.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) en las condiciones que se muestran en la Tabla 24. La mezcla de reacción para el par de cebadores, consistió en un cebador direccionado en "forward" (Bt2a) y otro direccionado en "reverse" (Bt2b). Un control negativo que no contenía ADN templado se incluyó en el experimento a fin de corroborar posibles contaminaciones de los reactivos. Se utilizó el siguiente programa de PCR: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 1 min. Se realizó además, una extensión final a 72 °C durante 7 min. Finalmente, la reacción se mantuvo a 4 °C durante 10 min.

Se examinaron los productos de amplificación (5 μ l) a través de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) utilizando como buffer de corrida al buffer Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1X, pH 8. El gel se visualizó por medio de un transiluminador UV a 302 nm y el tamaño del fragmento obtenido (aproximadamente 550 pb) se estimó por comparación visual con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 - 2072 pb.

Tabla 23. Secuencias y temperaturas de melting (T_m) de los cebadores β -tubulina utilizados.

Cebador	Secuencia 5'-3'	T_m (°C) [†]
Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	72
Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	76

[†] Calculadas según la ecuación: $T_m = 2(AT) + 4(CG)$.

2.2.1.4.2.2- Digestión de los amplicones de β -tubulina con *BccI*

Para la digestión enzimática del amplicón β -tubulina con *BccI*, se preparó la mezcla de reacción que se describe en la **Tabla 25**. Esta se llevó a incubar a 37 °C durante 2 h en baño de agua, según recomendaciones del fabricante. Finalmente, se transfirió a estufa a 65 °C durante 20 min para inhibir la reacción enzimática. Los fragmentos obtenidos por el clivaje de *BccI* (10 μ l) se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) utilizando como buffer de corrida al buffer Tris-ácido acético-EDTA (TAE) 1X pH 8, y fueron fotografiados utilizando un digitalizador de imágenes (MiniBIS Pro, DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con las bandas de referencia (100 - 2072 pb) del ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder).

2.2.1.4.2.3- Análisis de los resultados

Se comparó el patrón de bandas obtenido de las cepas estudiadas con aquel resultante de los RFLP de la región *benA* de los controles positivos. Además, se corroboró que el tamaño de las bandas obtenidas fuera concordante con el tamaño de los fragmentos generados en los mapas teóricos de restricción.

Tabla 24. Mezcla de reacción para la amplificación del gen de la β -tubulina.

Componentes	1 reacción
ADN molde (aprox. 5 ng/ μ l)	2 μ l
Buffer de reacción 10X	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2 μ l
dNTPs (2 mM)	5 μ l
Cebador "forward" 10 μ M	2 μ l
Cebador "reverse" 10 μ M	2 μ l
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/ μ l)	0,25 μ l
H ₂ O bidestilada estéril	31,75 μ l
<u>Volumen final:</u>	50 μ l

Tabla 25. Mezcla de reacción para la digestión de los amplicones β -tubulina con *BccI*.

Componentes	1 reacción
ADN (amplicón β -tubulina)	10 μ l
NEBuffer 1, 10X	1,5 μ l
BSA 10 mg/ml	0,15 μ l
Enzima <i>BccI</i> (10 U/ μ l)	0,1 μ l
H ₂ O bidestilada estéril	3,25 μ l
<u>Volumen final:</u>	15 μ l

2.2.2- Caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante **amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)**.

Para la identificación a nivel de especie y estimación de la variabilidad genética de un grupo de cepas seleccionadas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante el uso de los marcadores genéticos RAPD, se tomó como referencia la metodología propuesta por Hong y col. (2005).

2.2.2.1- **Determinación de la repetitividad y reproducibilidad de la técnica utilizando los cebadores PELF y URP1F**

2.2.2.1.1- **Cepas**

Se utilizaron 7 cepas anteriormente identificadas por caracteres morfológicos y las cepas *A. fumigatus* RC2063 (Af16, N° de acceso GenBank: JX277549) y *A. fumigatus* RC2108 (A89, N° de acceso GenBank: JX277548) identificadas por secuenciación del gen parcial de la β -tubulina para evaluar la repetitividad y reproducibilidad de los marcadores genéticos generados por RAPD en el protocolo descrito por Hong y col. (2005). En la selección de las cepas se tuvo en cuenta la presencia de al menos una por sustrato y su producción de gliotoxina (elevada: determinada por HPLC-UV y nd (no detectable): determinada por HPLC-MS/MS).

Además, se evaluó la reproducibilidad del protocolo con las cepas de referencia *A. fumigatus* CBS 127801, *A. fumigatus* CBS 127278, *A. lentulus* CBS 117267, *A. novofumigatus* CBS 117519 y *A. novofumigatus* DTO 249-H5; *A. udagawae* CBS 114217 y *A. udagawae* CBS 114218 (gentilmente cedidas por el Prof. Dr. Robert A. Samson, del CBS-KNAW FUNGAL BIODIVERSITY CENTRE, Holanda).

2.2.2.1.2- **Producción de la biomasa fúngica, extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico**

Para la obtención de la biomasa fúngica y para la extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico de las cepas incluidas en este análisis se siguieron las metodologías previamente descritas en los puntos 2.2.1.2 y 2.2.1.3, respectivamente.

2.2.2.1.3- Reacción de amplificación

Se utilizaron los cebadores PELF y URP1F (Tabla 26) previamente seleccionados por Hong y col. (2005) por su habilidad de producir numerosas bandas polimórficas. La concentración de ADN templado fue de 25 ng en un volumen final de 25 µl y las cepas se analizaron por duplicado a fin de corroborar la reproducibilidad de las bandas. Un control negativo que no contenía ADN templado se incluyó en cada experimento y cada reacción se realizó al menos dos veces. Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron en un termociclador MJ Research PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, MA) en las condiciones que se muestran en la Tabla 27.

El programa de PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min. Se realizó además, una extensión final a 72 °C durante 8 min. Finalmente, la reacción se mantuvo a 4 °C durante 10 min.

Los productos de amplificación se examinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio y fueron fotografiados usando un digitalizador de imágenes (MiniBIS Pro, DNR). El tamaño de los fragmentos obtenidos se estimó por comparación visual con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 - 2072 pb. De acuerdo a los resultados obtenidos, se evaluó el número e intensidad de las bandas y la habilidad de cada cebador en amplificar consistentemente los mismos fragmentos dado el mismo aislado. Se comparó el perfil de bandas obtenido y su tamaño molecular con los patrones informados en el protocolo de referencia (Hong y col., 2005).

Tabla 26. Secuencia y Tm (°C) de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Tm (°C) [†]
PELF	ATATCATCGAAGCCGC	48
URP1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC	62

[†] Calculadas según la ecuación: $T_m = 2(AT) + 4(CG)$.

Tabla 27. Mezcla de reacción optimizada para la generación de los RAPDs.

Volumen final: 25 µl.

Componente	1 reacción
ADN molde	2,5 µl
Buffer de reacción 10X	2,5 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl
Cebador 10 µM*	2 µl
Taq DNA polimerasa (5 U/µL)	0,3 µl
H ₂ O bidestilada estéril	13,95 µl

*Reacción para un único cebador, ya sea PELF o URP1F.

2.2.2.1.4- Análisis de los resultados

Para analizar los perfiles RAPD obtenidos, se determinó la presencia o ausencia de las bandas por comparación visual en cada una de las cepas evaluadas. Se consideró que las bandas del mismo tamaño molecular en las diferentes cepas representan el mismo alelo y cada banda se trató como un único locus independiente con dos alelos. Cada fragmento amplificado fue considerado como un carácter y cada carácter con dos posibles estados, presencia (1) y ausencia (0). Así, se construyó una matriz binaria para cada cebador y luego una matriz conjunta para ambos cebadores. La distancia genética entre los individuos se calculó teniendo en cuenta todos los pares de las cepas ensayadas de acuerdo al coeficiente de similitud ($S_d = 2 N_{xy} / (N_x + N_y)$) donde, N_x y N_y representan los números de fragmentos amplificados en la cepa X e Y, respectivamente y, N_{xy} representa el número de fragmentos amplificados compartidos por ambas cepas (Dice, 1945). La **distancia genética (D)** se derivó del coeficiente de similitud de la siguiente manera:

$$D = 1 - S$$

Los dendogramas de similitud genética resultantes fueron realizados utilizando el algoritmo UPGMA (función SAHN) del programa NTSYS 2.01e (Numerical Taxonomy

System; Applied Biostatistics Inc., New York, USA) (Rohlf, 1990). Los valores de bootstraps se determinaron usando el programa PAUP versión 4.0 (Swofford 2001).

2.2.2.2- Generación de los marcadores RAPD para la caracterización genética de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*

Una vez evaluada la repetitividad y reproducibilidad de la técnica para cada cebador con cepas de referencia de *Aspergillus* sección *Fumigati* y con aquellas seleccionadas de los diferentes sustratos (punto 2.2.2.1.1), se aplicó esta metodología de un conjunto mayor de cepas para su identificación a nivel de especie y estimación de variabilidad genética.

2.2.2.2.1- Cepas

Se seleccionaron 70 cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Fumigati* obtenidas de los diferentes sustratos para su caracterización mediante el uso de marcadores moleculares RAPD. Este grupo incluyó las 35 cepas caracterizadas fenotípicamente y a través de PCR-RFLP (punto 1.2.1.3), 18 cepas seleccionadas aleatoriamente de cada sustrato y 17 cepas clínicas (humanas y animales) y aisladas de alimentos para animales y procedentes de Brasil (Tabla 28). Se incluyeron en el análisis las cepas de referencia *A. fumigatus* CBS 127801, *A. fumigatus* CBS 127278, *A. lentulus* CBS 117267, *A. novofumigatus* CBS 117519 y *A. novofumigatus* DTO 249-H5; *A. udagawae* CBS 114217 y *A. udagawae* CBS 114218.

La obtención de la biomasa fúngica, extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico, las reacciones de amplificación y el análisis de los resultados obtenidos se llevaron a cabo siguiendo las metodologías detalladas en los puntos anteriores (2.2.2.1.2, 2.2.2.1.3 y 2.2.2.1.4, respectivamente).

Tabla 28. Cepas caracterizadas a través de los marcadores genéticos RAPD.

Cepas	Cantidad	Origen de aislamiento	Región geográfica
cepas descritas en la Tabla 22 (punto 2.2.1.1)	35	alimentos para animales (punto 2.2.1.1)	
MA1, MNI59, AF43, MA196	18	alimento para perros	Argentina
A99, A185, A241, A26		alimento para cerdos*	
B63, AF18, Af21, B76		ensilaje para vacas	
Af55, Af57, Af59		alimento para pollos	
Af49, Af53, A7		alimento para chinchillas	
AF89c, AF92c, AF122c	17	mastitis vacuna	Brasil
AF10c, AF17c, AF23c, AF32c, AF94c		alimento para pollos	
AF01c, AF04c		alimento para cerdos	
AF108c, AF123c		ensilaje de maíz para vacas	
AF105c, AF120c, AF133c		ensilaje de sorgo para vacas	
AF166c, AF117c		aspergilosis humana	
TOTAL	70		

* Residuo de la industria cervecera para cerdos.

3- Identificación a nivel de especie de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante el secuenciamiento del gen de la β -tubulina

3.1- Materiales

3.1.1. Soluciones y reactivos

Se utilizaron las soluciones y reactivos listadas en los puntos 2.1.2.1, 2.1.2.2 y 2.1.2.3.1 para la extracción del ADN, su visualización por electroforesis en gel de agarosa y para la amplificación del gen de la β -tubulina.

3.2- Métodos

3.2.1- Cepas

Se llevó a cabo el secuenciamiento del gen (parcial) de la β -tubulina de cepas caracterizadas mediante los marcadores moleculares PCR-RFLP y RAPD, con el objetivo de confirmar su identificación a nivel de especie. Para ello, se eligió un total de 14 cepas. Este grupo incluyó 9 cepas que fueron seleccionadas en base a la diversidad encontrada durante la aplicación de los marcadores genéticos RAPD (cepas obtenidas en el presente trabajo originarias de Argentina) y 5 cepas procedentes de Brasil, seleccionadas representativamente de cada origen de aislamiento (véase apartado "Resultados y discusión", sección III).

3.2.2- Producción de la biomasa fúngica, extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico

Para la obtención de la biomasa fúngica y para la extracción, purificación y cuantificación del ADN genómico de las cepas incluidas en este análisis se siguieron las metodologías previamente descritas en los puntos 2.2.1.2 y 2.2.1.3, respectivamente.

3.2.3- Amplificación de gen de la β -tubulina (*benA*)

Las condiciones de reacción, cebadores utilizados y demás procedimientos para la amplificación por PCR del gen de la β -tubulina corresponden a las descritas en el punto 2.2.1.3.2.1.

Luego de la reacción de amplificación, se examinaron los productos de PCR (5 μ l) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). El gel se visualizó por medio de un transiluminador UV a 302 nm y el tamaño del fragmento obtenido (aproximadamente 550 pb) se estimó por comparación visual con ADN testigo (Invitrogen, 100-bp Ladder) con bandas de referencia que oscilan entre 100 - 2072 pb. Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando columnas de purificación de ADN (DNA Wizard DNA Clean-Up Kit, Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se secuenciaron ambas cadenas de ADN en un secuenciador Applied Biosystem ABI 3730 sequencer (Applied Biosystem) mediante el método enzimático de terminación de cadena de Sanger (1977) utilizando el par de cebadores Bt2a/Bt2b.

3.2.4- Análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas

Las secuencias parciales β -tubulina de ambas cadenas de ADN se alinearon usando el programa informático BioEdit versión 7.0.9.0 (Thompson y col. 1994) (<http://www.mbio.ncsu.edu/RNasaP/info/programs/BIOEDIT/bioedit.html>), y en caso de ser necesario se realizaron algunos ajustes manuales. Las secuencias obtenidas (490-550 pb) se compararon con otras disponibles en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar su homología. Para ello, se realizó un alineamiento básico local entre las secuencias (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), lo cual permitió determinar el porcentaje de máxima identidad de las secuencias estudiadas con aquellas publicadas en la base de datos. Además, con el objetivo de observar el agrupamiento de las cepas secuenciadas con otras especies de la sección *Fumigati*, se aplicó el método de análisis de máxima parsimonia utilizando el programa on-line TNT (Goloboff y col., 2008, http://www.phylogeny.fr/version2cgi/one_task.cgi?task_type=tnt). Se consideró un bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985) para corroborar la certeza estadística



de las ramas generadas. Previo a este análisis, el set de secuencias se alineó a través del algoritmo CRUSTALW usando el programa on-line MAFFT versión 7 (Kato y Standley, 2013, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Las secuencias de las especies de la sección *Fumigati* que se usaron para estos análisis fueron seleccionadas de la base de datos GenBank y se muestran en la **Tabla 29**. *Aspergillus clavatus* (n° de acceso: AF057312.1) se utilizó como grupo externo.

4- Mantenimiento de las cepas

Las cepas fueron mantenidas en glicerol al 15% a -80 °C, a fin de evitar mutaciones o cambios en las características fisiológicas de las mismas.

Tabla 29. Secuencias y cepas usadas en el análisis preliminar de parsimonia.

Cepa β -tubulina	Especie	Origen	N° de acceso al GenBank	Autor
KACC 42090	<i>Aspergillus</i> sp.	desconocido	DQ534142	Hong y col. (2008)
KACC 42091	<i>Aspergillus</i> sp.	desconocido	DQ534143	
CBS 153.89	<i>Aspergillus</i> sp.	desconocido	AY685175	Hong y col. (2004)*
AS24	<i>A. fumigatus</i>	Costa marina, Malasia	JX545087	Teh y Latiffah (2012)*
CBS 121.53	<i>A. fumigatus</i>	Desconocido, Holanda	DQ534076	Hong y col. (2005)
CBS 315.60	<i>A. fumigatus</i>	Secreción pulmonar humana, Holanda	DQ534077	
CBS 520.62	<i>A. fumigatus</i>	esputo humano, Holanda	DQ534078	
CBS 511.64	<i>A. fumigatus</i>	Suelo, Holanda	DQ534079	
NRRL 5109	<i>A. fumigatus</i>	desconocido	EF669845	
HCPF 8375	<i>A. fumigatus</i>	desconocido	GQ376141	Peterson (2008)
HCPF 7510	<i>A. fumigatus</i>	Aspergillosis humana, Grecia	GQ376140	Arabatzis y Velegraki (2009)*
CBS 612.97	<i>A. lentulus</i>	desconocido	DQ534081	Balajee y col. (2005b)
FH 5	<i>A. lentulus</i>	Clínico, USA	AY738513	
IBT13131	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Mejilla de ratón, USA	DQ094884	Hong y col. (2005)
IBT12703	<i>A. fumigatiaffinis</i>	Suelo, USA	DQ094885	
IBT16806	<i>A. novofumigatus</i>	Suelo, Ecuador	DQ094886	
IBT16755	<i>A. novofumigatus</i>	Suelo, Ecuador	DQ094887	
90-BP-70	<i>A. fumisynnematus</i>	Clínico, Japón	AB248077	Yaguchi y col. (2007)
IFM 42277	<i>A. fumisynnematus</i>	Suelo, China	AB248076	
90-BP-177	<i>A. fumisynnematus</i>	Clínico, Japón	AB248078	
CBS 458.75	<i>A. viridinutans</i>	Suelo, India	AY685178	Hong y col. (2005)
IMI367415	<i>A. viridinutans</i>	Desconocido	DQ534153	Hong y col. (2006b)*
IMI280490	<i>A. viridinutans</i>	Suelo, Zambia	AF134780	Varga y col. (1999)*
IMI182127	<i>A. viridinutans</i>	<i>Pinus caribea</i> , (Pino de México)	AF134777	
CBS 154.89	<i>N. udagawae</i>	Suelo de cítricos, USA	DQ534080	Hong y col. (2005)
IBT 23363	<i>N. udagawae</i>	desconocido	DQ534161	Hong y col. (2006b)*
KACC F3759	<i>N. udagawae</i>	Suelo, Korea	DQ534103	
IBT16763	<i>N. galapensis</i>	Suelo, Ecuador	DQ534146	Hong y col. (2006a)*
KACC41675	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534082	
KACC 41677	<i>N. fennelliae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534084	Hong y col. (2004)*
KACC 41659	<i>N. coreana</i>	desconocido	AY870758	
IBT 22051	<i>N. coreana</i>	desconocido	AY870757	
KACC 41647	<i>N. spinosa</i>	desconocido	AY870760	
CBM-FA 0690	<i>N. spinosa</i>	desconocido	AY870764	
KACC 41668	<i>N. fischeri</i>	desconocido	AY870730	
KACC 41664	<i>N. fischeri</i>	desconocido	AY870733	
IBT 6472	<i>N. pseudofischeri</i>	desconocido	AY870745	
KACC 41661	<i>N. pseudofischeri</i>	desconocido	AY870741	
KACC 41689	<i>N. hiratsukae</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534096	Hong y col. (2006a)*
KACC F3749	<i>N. quadricincta</i>	Suelo cultivado, Corea	DQ534098	
KACC 41181	<i>N. aureola</i>	Desconocido	DQ534157	
KACC 41666	<i>N. tatenoi</i>	Desconocido	DQ534160	

* Secuencias no publicadas en trabajos científicos.

Resultados y Discusión

1- Caracterización fenotípica de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*

El resultado de los análisis estadísticos univariados realizados en función de variables macromorfológicas, micromorfológicas, fisiológicas y de clasificación determinadas al conjunto de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* estudiadas, se muestran en las Tablas 30, 31 y 32.

Al evaluar la macromorfología de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*, se observó que si bien existieron diferencias significativas entre los distintos orígenes de aislamiento cuando las cepas crecieron en los diferentes medios de cultivo evaluados ($p \leq 0,05$) (Tabla 30), no se observó un patrón de comportamiento semejante para todas las variables estudiadas, por lo tanto la diferenciación por orígenes es dependiente de la variable considerada. En la Tabla 31 se muestran las variables micromorfológicas y fisiológicas determinadas a las cepas en estudio. Se observó que la variable "largo de estipe" fue la única para la cual los orígenes de las cepas no presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$). En general, se observó el mismo comportamiento que para las variables macromorfológicas estudiadas. Cuando se analizaron las variables de clasificación "producción de ácidos en CREA", "color de la colonia en CYA37°C a los 3 días de incubación" y "conidiación" según los diferentes orígenes, se observó que si bien existieron diferencias significativas entre éstos, no fue posible evidenciar un patrón de comportamiento que asociara uno o más orígenes determinados a una o más variables analizadas ($p \leq 0,05$) (Tabla 32).

Tabla 30. Macromorfología de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* en diferentes medios de cultivo, según el origen de aislamiento.

Origen	Variables macromorfométricas en diferentes medios de cultivo (mm) (media ± EE)						
	MEA	CYA 25°C	CYA 37°C	OA	CZA	CREA	YES
1	49,3 ± 0,2 ^a	42,8 ± 0,5 ^{ab}	51,1 ± 0,6 ^b	39,8 ± 0,7 ^a	34,1 ± 0,7 ^a	31,1 ± 1,0 ^b	48,1 ± 0,92 ^b
2	52,8 ± 0,2 ^{cd}	48,1 ± 0,5 ^d	47,8 ± 0,5 ^b	43,9 ± 0,6 ^{bc}	40,9 ± 0,7 ^c	31,8 ± 0,9 ^b	53,0 ± 0,86 ^{de}
3	49,9 ± 0,3 ^b	41,7 ± 0,6 ^a	49,1 ± 0,6 ^a	39,5 ± 0,8 ^a	36,2 ± 0,9 ^{ab}	28,8 ± 1,1 ^b	45,2 ± 1,09 ^a
4	53,9 ± 0,4 ^d	46,8 ± 1,1 ^{cd}	50,3 ± 1,1 ^a	42,6 ± 1,3 ^{abc}	43,7 ± 1,4 ^c	32,6 ± 1,8 ^b	56,6 ± 1,72 ^e
5	52,4 ± 0,2 ^c	45,8 ± 0,6 ^c	50,8 ± 0,6 ^a	45,3 ± 0,8 ^c	38,6 ± 0,8 ^b	25,3 ± 1,1 ^a	49,4 ± 1,00 ^b
6	52,3 ± 0,2 ^c	44,4 ± 0,5 ^{bc}	50,6 ± 0,7 ^a	42,2 ± 0,7 ^{ab}	38,1 ± 0,7 ^b	28,9 ± 1,1 ^b	51,3 ± 0,92 ^{cd}

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al Test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Origen: 1: alimento terminado para perros, 2: residuo de cervecería para cerdos, 3: ensilaje de maíz para vacas, 4: alimento terminado para pollos, 5: alimento terminado para caballos, 6: alimento terminado para chinchillas. MEA: agar extracto de malta, CYA: agar Czapek extracto de levadura, OA: agar harina de avena, CREA: agar creatinina sacarosa, YES: agar extracto de levadura sacarosa.

Tabla 31. Micromorfología y fisiología (producción de gliotoxina) de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* en diferentes medios de cultivo, según el origen de aislamiento.

Origen	Variables micromorfométricas medidas (mm) y fisiología (ng/g) (media ± EE)			
	Largo estipe	Ancho estipe	Diámetro vesícula	Gliotoxina
1	253,6 ± 7,7 ^a	6,8 ± 0,24 ^b	17,7 ± 0,4 ^b	302,2 ± 91,97 ^a
2	241,5 ± 7,2 ^a	6,3 ± 0,23 ^{ab}	16,0 ± 0,4 ^a	289,9 ± 86,03 ^a
3	239,9 ± 9,2 ^a	6,1 ± 0,29 ^a	17,9 ± 0,5 ^b	883,0 ± 108,83 ^b
4	255,1 ± 14,5 ^a	6,7 ± 0,45 ^{ab}	16,8 ± 0,9 ^{ab}	10,3 ± 172,07 ^a
5	250,6 ± 8,4 ^a	5,8 ± 0,26 ^a	17,6 ± 0,5 ^b	22,1 ± 99,34 ^a
6	250,2 ± 7,7 ^a	6,7 ± 0,24 ^{ab}	18,2 ± 0,4 ^b	88,5 ± 91,97 ^a

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al Test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Origen: 1: alimento terminado para perros, 2: residuo de cervecera para cerdos, 3: ensilaje de maíz para vacas, 4: alimento terminado para pollos, 5: alimento terminado para caballos, 6: alimento terminado para chinchillas. MEA: agar extracto de malta, CYA: agar Czapek extracto de levadura, OA: agar harina de avena, CREA: agar creatinina sacarosa, YES: agar extracto de levadura sacarosa.

Tabla 32. Variables de clasificación determinadas a las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* en función del origen de aislamiento.

Origen	Variables de clasificación		
	Test LSD		
	Ácidos en CREA	Color de la colonia	Conidiación
1	a	a	bc
2	b	bc	b
3	ab	ab	c
4	b	bc	a
5	c	c	b
6	b	a	a

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo al Test LSD de Fisher ($p \leq 0,05$). Origen: 1: alimento terminado para perros, 2: residuo de cervecera para cerdos, 3: ensilaje de maíz para vacas, 4: alimento terminado para pollos, 5: alimento terminado para caballos, 6: alimento terminado para chinchillas. CREA: agar creatinina sacarosa.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió realizar un estudio multivariado que permitiera evidenciar las relaciones entre las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* en estudio, sus orígenes y las diferentes variables en conjunto.

Se realizó, en primer lugar un análisis de componentes principales (ACP) y gráficos Biplot, los cuales son técnicas de reducción de dimensión, es decir técnicas que permiten examinar todos los datos en un espacio de menor dimensión que el espacio original de las variables. Se logró así, analizarlas como componentes para la explicación de un todo, donde pudo expresarse la variabilidad existente en el conjunto de los datos. La Fig. 27 muestra el gráfico Biplot obtenido del ACP de variables macromorfométricas según el origen de aislamiento de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* en estudio. Gran parte de la variabilidad total fue explicada por las dos componentes principales, de las cuales la componente principal 1 representó el 61,5% de la variabilidad total y la componente principal 2 el 21,6%. Conjuntamente ambas componentes explicaron el 83,1% de variabilidad observada, lo cual se considera un porcentaje adecuado para la

representación de la variabilidad de los datos. Los diferentes medios de cultivo están marcadamente asociados entre sí y de éstos YES y CZA podrían estar explicando la variabilidad observada en las cepas aisladas de residuo de la industria cervecera para cerdos y las de alimentos terminados para pollos.

En el ACP de variables micromorfométricas y el origen de aislamiento de las cepas, los dos componentes principales explicaron el 77,9% de la variabilidad total (**Fig. 28**). Como se observa en el Biplot, las variables "conidiación" y "gliotoxina" estuvieron más asociadas al origen de aislamiento "ensilaje", la variable "diámetro de vesícula" al origen de aislamiento "perros" (origen de aislamiento: alimento terminado para perros), mientras que las cepas aisladas de alimentos terminados para caballos ("equinos") estuvieron más asociadas a las variables "producción de ácidos en CREA" y "color de la colonia en CYA37°C a los 3 días de incubación". Las cepas aisladas de alimentos terminados para pollos y de residuo de la industria cervecera no presentaron asociación con ninguna de las variables analizadas.

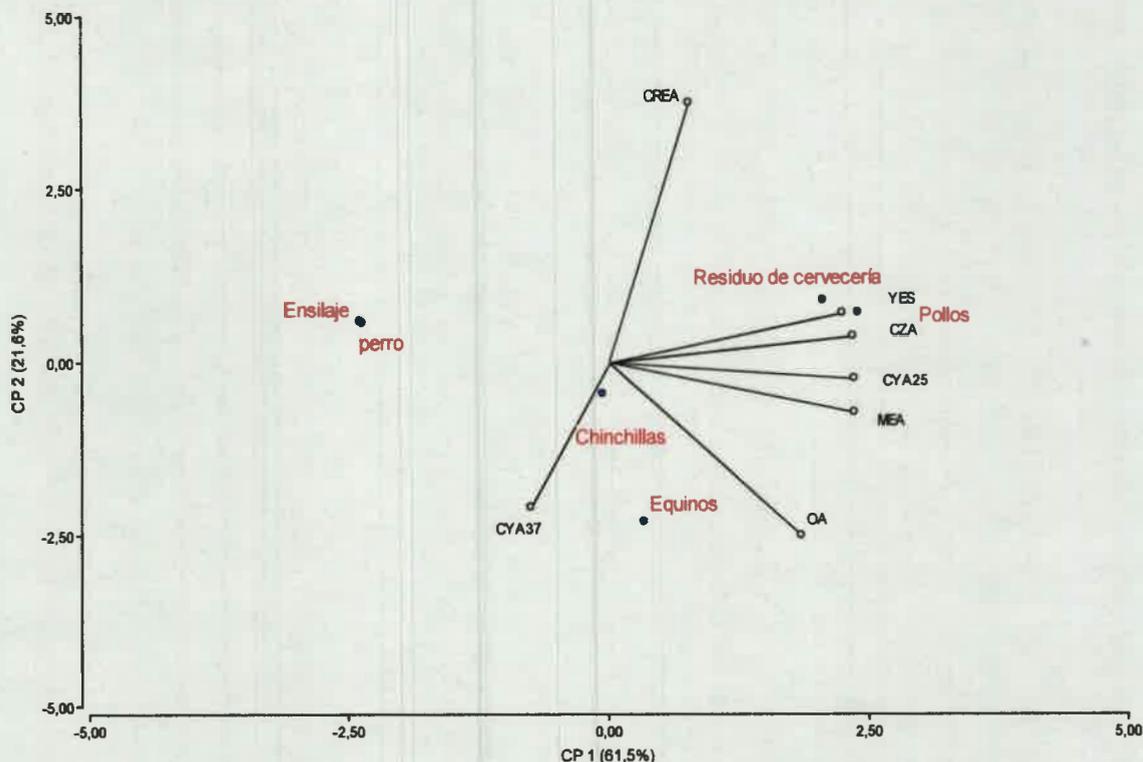


Figura 27. Biplot resultado del ACP de las variables macromorfométricas según el origen de aislamiento de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*.

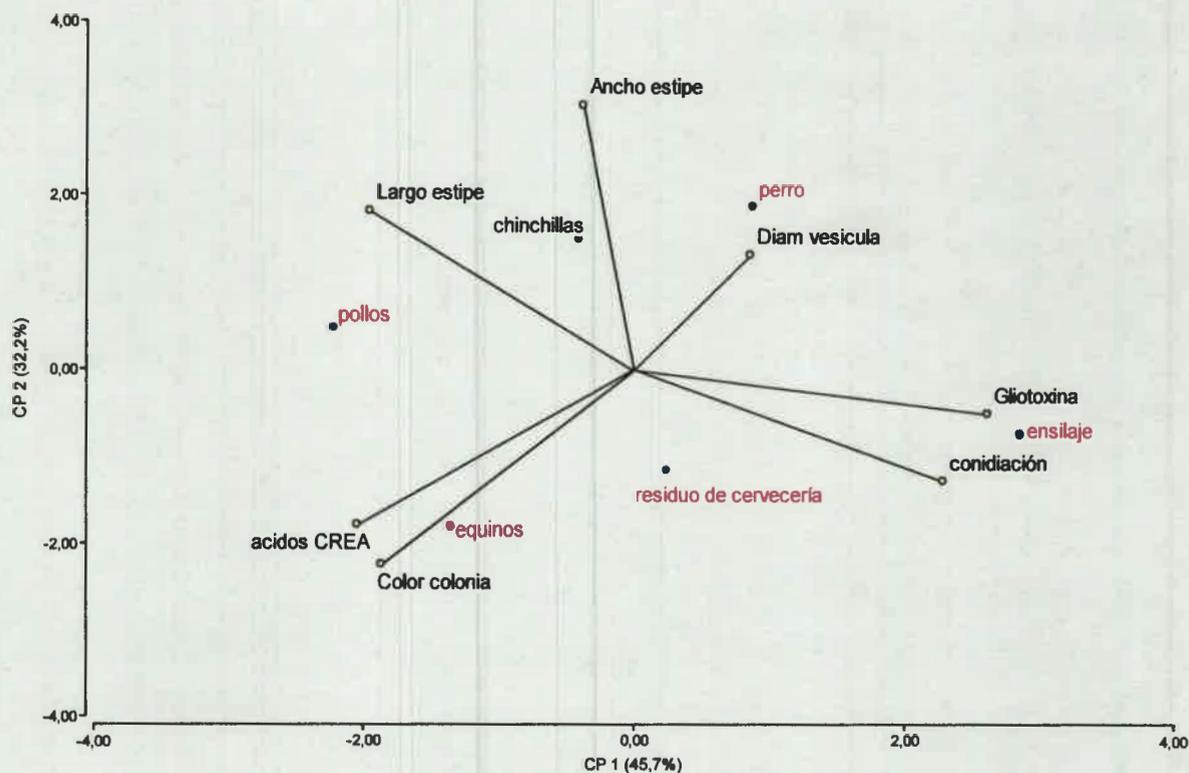


Figura 28. Biplot resultado del ACP de las variables micromorfométricas, fisiológicas y de clasificación según el origen de aislamiento de las cepas.

El resultado del ACP de las variables macromorfométricas en función de las diferentes cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* estudiadas se muestra en la Fig. 29. Se observó un comportamiento similar a cuando se realizó el ACP de variables macromorfométricas según el origen de aislamiento. La mayoría de las cepas estuvieron asociadas a todos los medios de cultivo, sin observarse una asociación marcada con ninguno de ellos en particular.

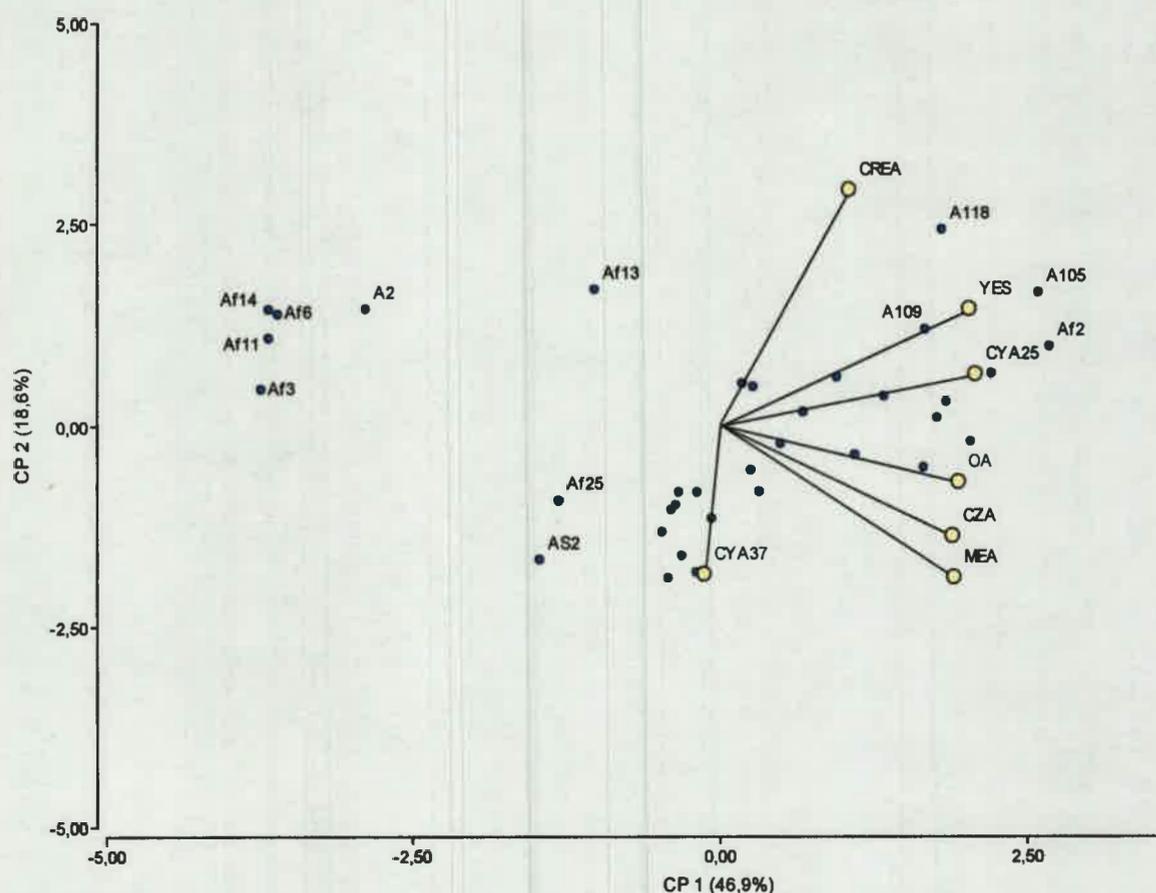


Figura 29. Biplot resultado del ACP de las variables macromorfológicas analizadas según las diferentes cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* estudiadas.

En el Biplot obtenido mediante el ACP de las variables micromorfológicas, fisiológicas y de clasificación en relación a las diferentes cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*, se encontró que las cepas MA199 y Ach2 (que pertenecen a orígenes diferentes, véase *Anexo Cepas*), estuvieron más asociadas a la variable “ancho de estipe”, mientras que las cepas A2, Af3, Af11, Af13 y Af14, lo estuvieron a las variables “gliotoxina” y “conidiación”. El resto de las cepas no mostró una asociación evidente con ninguna variable en estudio (Fig. 30).

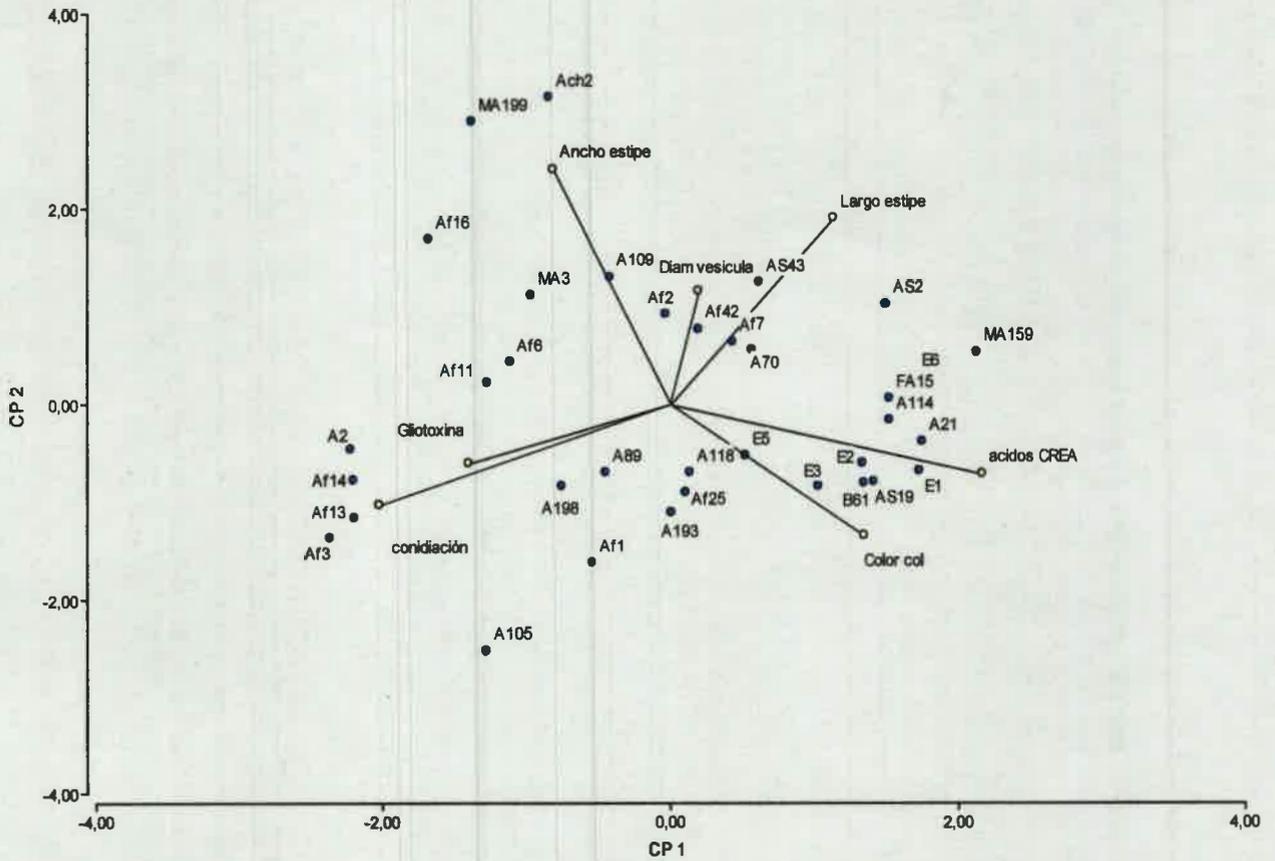


Figura 30. Biplot resultado del ACP de las variables micromorfom3tricas, fisiol3gicas y de clasificaci3n, seg3n las cepas en estudio.

El an3lisis de conglomerados se aplic3 para determinar asociaciones por similitud entre las cepas de *Aspergillus* secci3n *Fumigati* y sus or3genes de aislamiento (Fig. 31). El dendrograma obtenido permiti3 la diferenciaci3n de cuatro grupos formados por cepas de diferentes or3genes, al considerar una distancia Euclidea de 5,41 aproximadamente. El primer conglomerado, incluy3 a la cepa Af13 (aislada de ensilaje de ma3 para vacas), el segundo a cepas aisladas de alimentos terminados para perros, chinchillas y ensilaje de ma3, el tercero a cepas aisladas de residuo de la industria cervecera para cerdos y de alimentos terminados para pollos, mientras que el cuarto conglomerado agrup3 a cepas de los seis or3genes de aislamiento.

La Fig. 32 muestra el análisis de conglomerados de las variables en estudio analizadas en forma conjunta. Como se aprecia en el dendrograma, se formaron cuatro grupos o conglomerados. El primero incluyó a la variable “gliotoxina”, el segundo a “largo de estipe”, el tercero a todos los medios de cultivo excepto el medio CREA y el cuarto grupo quedó conformado por este último, las variables de clasificación, el origen de aislamiento y las variables micromorfométricas “ancho de vesícula” y “ancho de estipe”.

Estos resultados sustentan lo observado en los gráficos Biplot del ACP anteriormente presentados, en los cuales no se observó asociación por orígenes de aislamiento de las cepas; sin embargo analizándolas de forma individual, algunas de ellas mostraron asociación a ciertas variables y algunas de estas variables también estuvieron relacionadas entre sí. ***Es decir que el análisis de conglomerados fue capaz de evidenciar de manera más clara que si bien no existió asociación entre las cepas en estudio y su origen de aislamiento, existió variabilidad entre las mismas.*** Esto fue observado debido a la formación de clusters que agruparon cepas de diferentes orígenes. Por otra parte, ***el análisis de conglomerados de las variables permitió determinar que, al igual que en el ACP, ciertas variables como “gliotoxina” y “largo de estipe” podrían ser utilizadas para discriminar entre cepas de Aspergillus sección Fumigati.***

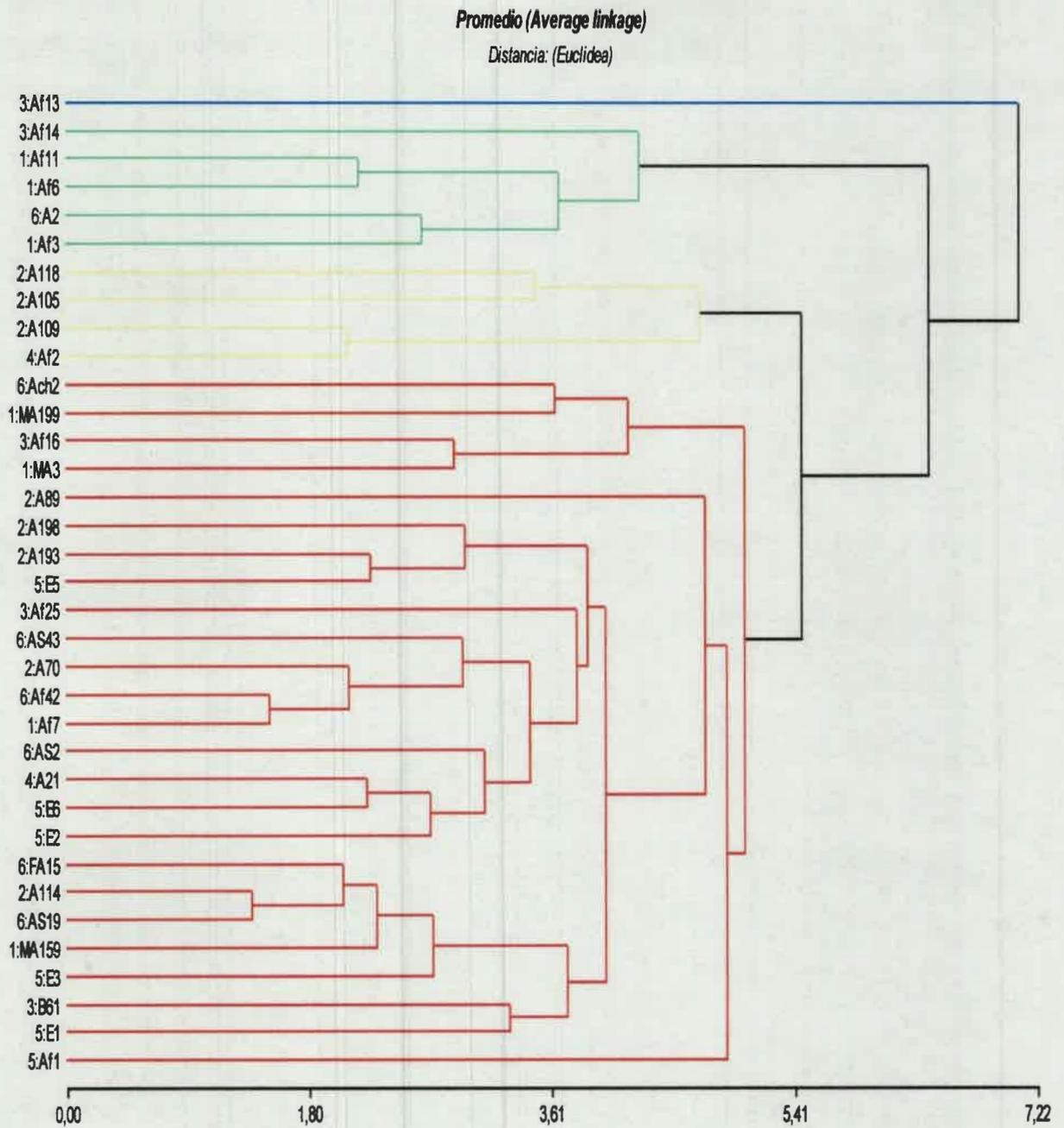


Figura 31. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados de las diferentes cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* y sus orígenes de aislamiento.

1: alimento terminado para perros, 2: residuo de cervecería para cerdos, 3: ensilaje de maíz para vacas, 4: alimento terminado para pollos, 5: alimento terminado para caballos, 6: alimento terminado para chinchillas. Análisis de clusters UPGMA, distancia: Euclídea, Correlación cofenética= 0,861. Variables estandarizadas.

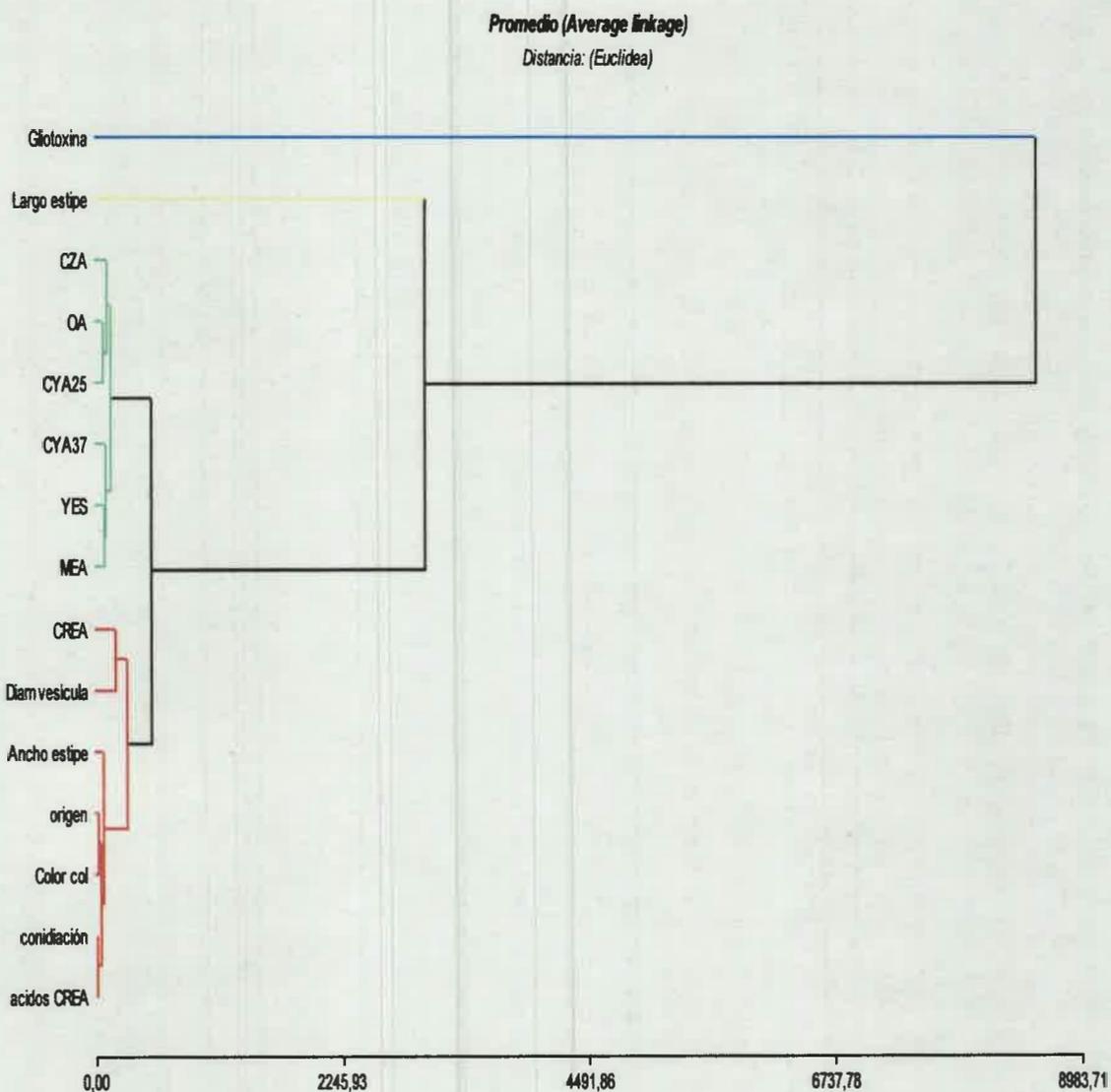


Figura 32. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados de las diferentes variables morfométricas, fisiológicas y de clasificación estudiadas en conjunto. Promedio (Average linkage), análisis de clusters UPGMA, distancia: Euclídea, Correlación cofenética= 0,999. Variables estandarizadas.

La **Tabla 33** muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre variables macromorfológicas, micromorfológicas, fisiológicas y de clasificación de las cepas estudiadas. Las variables macromorfológicas (medios de cultivo) presentaron en general una elevada correlación positiva entre ellas excepto para los medios de cultivo CREA y CYA37. En general, las variables micromorfológicas no presentaron correlación entre ellas, mientras que la producción de gliotoxina presentó una correlación altamente significativa con los medios OA, CZA y MEA. Este estudio de correlaciones entre las variables, permitió determinar la importancia de cada una de ellas en la caracterización fenotípica de las cepas en estudio. Las variables "medios de cultivo", excepto CREA y CYA37, correlacionaron positivamente entre ellas y tuvieron una influencia semejante en la caracterización de las cepas. Este mismo comportamiento se pudo observar en el ACP y en el análisis de conglomerados, donde las variables "medios de cultivo" estuvieron estrechamente relacionadas y permitieron caracterizar un conjunto determinado de cepas. Las variables micromorfológicas (largo de estipe, diámetro de vesícula, ancho de estipe) además de la producción de gliotoxina y las variables de clasificación (conidiación, producción de ácidos y color) generalmente no correlacionaron con las demás variables en estudio y permitieron caracterizar otros conjuntos de cepas semejantes.

Tabla 33. Análisis de correlación entre las variables estudiadas.

Variables	CYA	CYA37	OA	CZA	CREA	YES	Producción de ácidos
MEA	0,44682	-0,07118	0,50683	0,60192	-0,15048	0,41024	0,30776
	0,0001	0,5124	0,0001	0,0001	0,1642	0,0001	0,0037
CYA	1,00000	-0,10660	0,44249	0,54791	0,16739	0,60108	0,01666
	0,0	0,3257	0,0001	0,0001	0,1212	0,0001	0,8783
CYA 37		1,00000	0,08826	0,01385	-0,17173	-0,17692	0,01983
		0,0	0,4162	0,8987	0,1117	0,1011	0,8554
OA			1,00000	0,41150	0,19201	0,56476	0,50946
			0,0	0,0001	0,0748	0,0001	0,0001
CZA				1,00000	0,13316	0,33356	0,06422
				0,0	0,2189	0,0016	0,5546
CREA					1,00000	0,19934	0,22980
					0,0	0,0642	0,0323
YES						1,00000	0,07180
						0,0	0,5087
Producción de ácidos							1,00000
							0,0
Color	-0,1318	-0,02020	-0,41172	-0,52417	-0,17019	-0,43409	-0,22799
	0,2234	0,8526	0,0001	0,0001	0,1150	0,0001	0,0337
Conidiación	0,13211	-0,02150	0,29525	0,13008	-0,19773	0,23264	0,10921
	0,2225	0,8433	0,0055	0,2298	0,0664	0,0301	0,3140
Largo estipe	0,03101	-0,04702	-0,17507	0,09818	-0,10140	-0,02992	-0,30836
	0,7756	0,6654	0,1048	0,3656	0,3500	0,7832	0,0037
Ancho estipe	-0,0922	0,22646	0,08597	-0,02854	-0,07663	0,01676	0,03808
	0,3954	0,0349	0,4285	0,7930	0,4805	0,8776	0,7262
Diámetro de vesícula	-0,1389	-0,2778	-0,2118	-0,2962	-0,1371	-0,1027	-0,1880
	0,1994	0,0092	0,0488	0,0053	0,2053	0,3436	0,0812
Producción de gliotoxina	0,39958	0,07100	0,50472	0,63866	-0,0548	0,33640	0,29742
	0,0001	0,5135	0,0001	0,0001	0,6141	0,0014	0,0051

Continuación Tabla 33.

<i>Variables</i>	CREA	Color	Conidiación	Largo estipe	Ancho estipe	Diámetro de vesícula	Producción de gliotoxina
CREA	1,00000 0,0						
Color		1,00000 0,0	-0,15191 0,1601	-0,08883 0,4132	-0,06383 0,5570	0,36669 0,0005	-0,46083 0,0001
Conidiación			1,00000 0,0	0,02990 0,7834	0,09478 0,3826	0,09738 0,3696	0,32899 0,0019
Largo estipe				1,00000 0,0	-0,08256 0,4471	-0,13480 0,2132	-0,03367 0,7569
Ancho estipe					1,00000 0,0	-0,06717 0,5365	0,00350 0,9743
Diámetro de vesícula						1,00000 0,0	-0,19604 0,0688
Producción de gliotoxina							1,00000 0,0

Nota: Se muestra el valor de la correlación obtenida para cada interacción de variables (arriba) con su valor de p (debajo).

Los análisis estadísticos multivariados realizados evidenciaron claramente la existencia de variabilidad entre las cepas pertenecientes al mismo origen, por lo tanto no hay asociación entre las cepas de *Aspergillus sección Fumigati* según su origen de aislamiento.

La caracterización fenotípica de las cepas en estudio no fue diferente a lo informado en las claves taxonómicas para la especie *A. fumigatus*; sin embargo, pequeñas variaciones pudieron ser observadas entre las mismas, lo cual fue puesto en evidencia mediante los análisis multivariados realizados. Frías-De León y col. (2011), demostraron que las cepas estudiadas fueron asociadas significativamente a su origen geográfico de aislamiento, mientras que todas las cepas analizadas en este estudio fueron aisladas en Argentina y se consideró *origen de aislamiento* al alimento del cual provenían. Probablemente esta sea la razón por la que dichos autores encontraron diferenciación de las cepas por su



origen de aislamiento (geográfico). Es importante destacar que a pesar de que las características fenotípicas por sí solas no permiten diferenciar especies estrechamente relacionadas en la sección *Fumigati*, éstas pueden contribuir a la identificación de nuevas especies tal como fue el caso de *A. lentulus*, quien mostraba diferencias en el grado de esporulación y el tamaño de las cabezas conidiales (Balajee y col., 2005b). En el presente trabajo, las variables estudiadas demostraron que no existió asociación entre las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* analizadas y su origen de aislamiento, sin embargo es importante destacar que el color de la colonia y la conidiación estuvieron estrechamente relacionados a éste. **La variable conidiación permitió la asociación entre los alimentos destinados a animales y su estrategia de almacenamiento; aquellas cepas que se aislaron a partir de alimentos expuestos al medio ambiente, presentaron mayor conidiación que aquellas aisladas a partir de alimentos mejor conservados. En este sentido, la conidiación está relacionada con la presencia de micotoxinas en los conidios, lo cual aumenta el riesgo de exposición a micotoxinas tanto para los animales como para los trabajadores rurales que manipulan estos alimentos.**

2- Caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante la aplicación de marcadores moleculares neutros

2.1- PCR-RFLPs

2.1.1- *In silico* PCR-RFLP

Los perfiles de restricción teóricos de *A. fumigatus* sensu stricto y especies relacionadas en la sección *Fumigati* generados por diferentes enzimas, fueron estudiados mediante un análisis *in silico* utilizando la herramienta NEBcutter. Como resultado del mismo, se seleccionó la enzima de restricción *Bccl* debido a su capacidad para diferenciar morfotipos similares en esta sección. En la **Tabla 34**, se muestra el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos por la restricción teórica del gen de la β -tubulina (*benA*) de secuencias de 492, 493 y 494 pb de *A. fumigatus* FC025, *N. udagawae* GM02/58 y *A. lentulus* GM02/57 con *Bccl*, *MspI* y *Sau3 AI*, respectivamente. Las enzimas evaluadas en este análisis fueron seleccionadas al azar entre aquellas disponibles en NEBcutter.

Tabla 34. Ejemplos de los patrones de restricción teóricos resultantes del análisis *in silico*.

N° acceso GenBank	Especies	Tamaño de los fragmentos de restricción(pb)		
		<i>Bccl</i>	<i>MspI</i>	<i>Sau3 AI</i>
HQ588166.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99, 144, 249	35, 457	57, 70, 86, 222
HQ127276.1	<i>Neosartorya udagawae</i>	39, 46, 60, 346	24, 35,432	57, 70, 85, 279
HQ127275.1	<i>Aspergillus lentulus</i>	39, 105, 348	24, 35,433	70, 144, 278

La digestión de los amplicones *benA* con *Bccl* permitió llevar a cabo un "screening", logrando la rápida separación de *A. fumigatus* sensu stricto, *A. lentulus* y *N. udagawae*. No se obtuvieron bandas polimórficas que resultaran en un patrón distintivo entre las demás especies relacionadas a *A. fumigatus* sensu stricto (*A. fumigattiafinis*, *A. novofumigatus*, *A. viridinutans* y *A. fumisynnematus*). La enzima *Bccl* fue seleccionada

además por la existencia del protocolo de Staab y col. (2009) que se utilizó como referencia para el análisis. Estos autores, desarrollaron y validaron un esquema de identificación de especies de la sección *Fumigati* mediante PCR-RFLP utilizando esta enzima.

2.1.2- *In situ* PCR-RFLP

Los productos de amplificación del gen *benA* se observan en la Fig. 33. Los cebadores utilizados (Bt2a y Bt2b) fueron capaces de amplificar un fragmento de aproximadamente 550 pb, que fue luego utilizado como ADN molde en la reacción de restricción. La digestión de los amplicones *benA* con *BccI* del conjunto de cepas incluidas en el análisis, mostró un 100% de concordancia con los resultados obtenidos del clivaje teórico durante el análisis *in silico* realizado previamente. Los perfiles RFLP de algunas de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* aisladas de alimentos para caballos, pollos, cerdos, chichillas y perros se muestran en la Fig. 34. Todas las cepas analizadas (35), mostraron el mismo perfil de bandas. Se originaron tres fragmentos de aproximadamente 100, 150 y 250 pb en todas las cepas ensayadas, siendo el patrón genético obtenido, el característico de *A. fumigatus* (*sensu stricto*) FC025 (análisis *in silico*). Además, no hubo diferencias entre los RFLP de las cepas analizadas y los de las cepas *A. fumigatus sensu stricto* utilizadas como controles positivos (*A. fumigatus* RC2108 -A89- y *A. fumigatus* RC2063 -Af16-), cuya estado taxonómico a nivel de especie fue confirmado mediante el secuenciamiento del gen *benA* (véase sección II).

Por lo tanto, **todas estas cepas identificadas por criterios morfológicos y fisiológicos (capacidad de producción de gliotoxina) como *A. fumigatus*, fueron confirmadas por PCR-RFLP, obteniéndose el mismo patrón genético que aquellos correspondientes a *A. fumigatus sensu stricto*** (controles positivos y perfil teórico). Estas cepas fueron denominadas durante todo el desarrollo de la tesis como *Aspergillus* sección *Fumigati* ya que no habían sido caracterizadas a nivel genético hasta este momento.



Figura 33. Gel de agarosa del producto de amplificación de la β -tubulina (líneas 1-8 y 10-14). Líneas 9 y 16: marcador de peso molecular (100pb DNA Ladder Invitrogen). Línea 15: control negativo sin ADN.

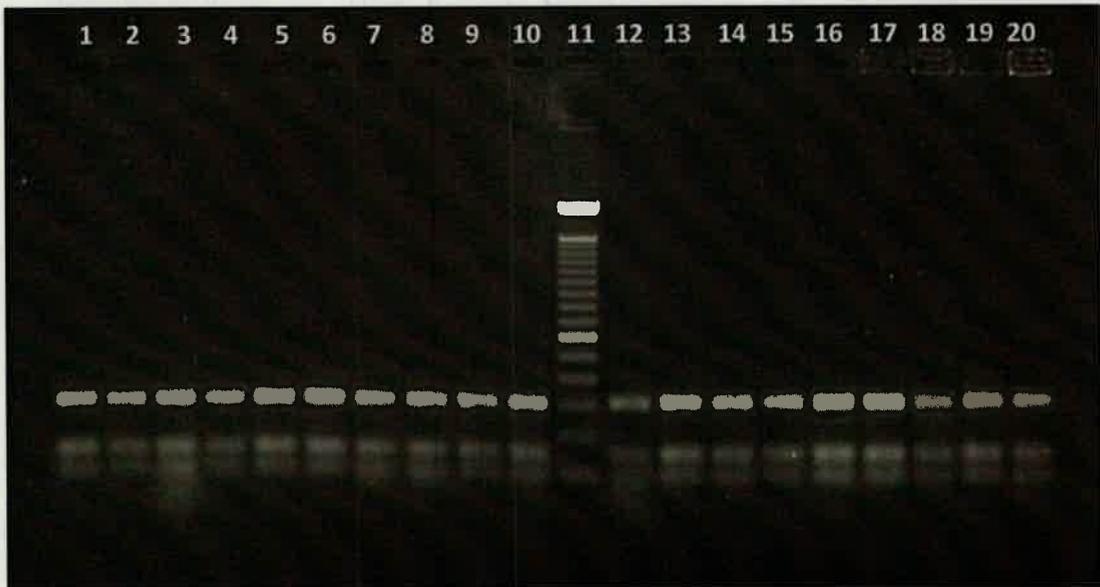


Figura 34. Gel de agarosa de los RFLP obtenidos luego de la digestión de los amplicones *benA* con *BccI*. Nótese los fragmentos de aproximadamente 100, 150 y 250 pb, con respecto al marcador de peso molecular (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen) (línea 11). Líneas 1-4: cepas aisladas de alimentos para caballos, 5-8: de alimentos para pollos, 9-10 y 12-13: de alimentos para cerdos, 14-16: de alimentos para chinchillas, 17-18: alimentos para perros. Las líneas 19 y 20, corresponden a los controles positivos *A. fumigatus* sensu stricto: A89 (residuo de cervecería para cerdos) y Af16 (ensilaje de maíz para vacas).



Staab y col. (2009) afirmaron que este esquema de identificación PCR-(*benA*)-RFLP constituye una herramienta de utilidad para distinguir los miembros más importantes de la sección *Fumigati* incluyendo a *A. fumigatus*, *A. lentulus* y *N. udagawae*. La discriminación de estas especies resulta de gran importancia a nivel clínico, ya que poseen diferentes perfiles de susceptibilidad a antifúngicos. Por otra parte, variantes de la técnica de RFLP han sido ampliamente utilizadas para la tipificación de cepas de *A. fumigatus* clínicas (asiladas de patologías) y ambientales (ambiente clínico) (Denning y col., 1990, 1991; Lin y col., 1995; Verweij y col., 1996; Semighini y col., 2001; Staab y col., 2009), pero no se habían tipificado por esta metodología cepas obtenidas del ambiente animal hasta el desarrollo de esta tesis.

2.2- RAPDs

2.2.1- Determinación de la repetitividad y reproducibilidad de la técnica utilizando los cebadores PELF y URP1F

Los cebadores PELF y URP1F fueron evaluados por su capacidad de producir patrones de bandas polimórficas y reproducibles entre los aislados de *Aspergillus* sección *Fumigati*. La reproducibilidad de las bandas amplificadas fue confirmada al menos dos veces obteniéndose idénticos resultados en todas las experiencias. En las Fig. 35 y 36 se observan los resultados obtenidos con los cebadores PELF y URP1F, respectivamente, cuando se ensayó la reproducibilidad de las bandas con 7 cepas seleccionadas del conjunto en estudio. Dichos ensayos también fueron llevados a cabo con las cepas de referencia mencionadas en el punto 2.2.2.1.1, apartado "Materiales y Métodos".

Los marcadores RAPD han sido ampliamente utilizados para la caracterización de cepas de *A. fumigatus* y en estudios de variabilidad genética y estructura de población (Rinyu y col., 1995; Latgé y col., 2000; Varga y Tóht, 2003). A pesar de ello, en los últimos años han comenzado a reemplazarse por otros, debido a su calificación de marcadores de baja reproducibilidad. Sin embargo, Hong y col. (2005, 2010) afirmaron que la utilización de la técnica de RAPD con los cebadores PELF y URP1F puede considerarse un método rápido y confiable para la identificación de *A. fumigatus* (sensu stricto) y *A. lentulus*. Con estos cebadores arbitrarios que permiten trabajar a temperaturas de

annealing de 58 °C (lo cual aumenta la especificidad de la reacción) y la utilización de una mezcla de reacción optimizada, se obtienen bandas reproducibles y constantes, independientemente de la cantidad de veces que se repita el proceso.

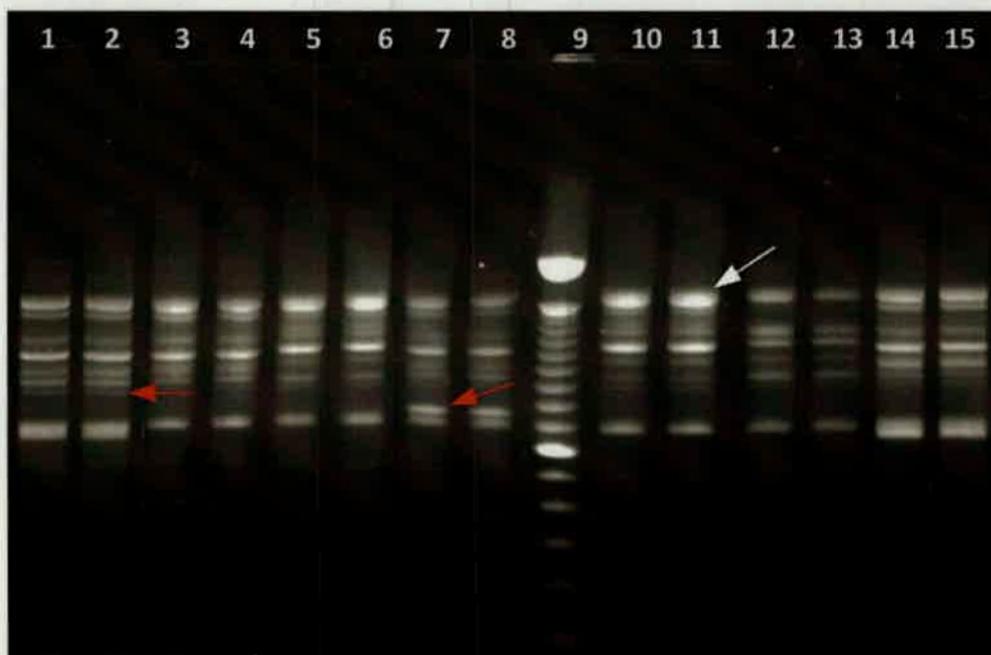


Figura 35. Perfiles RAPD con primer PELF de 7 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* analizadas. Líneas 1-2: cepa **Af13** (ensilaje de maíz, 3430,5 ppb gliotoxina), 3-4: cepa **Ach1** (alimento para chinchillas, 344,73 ppb gliotoxina), 5-6: cepa **Af1** (alimento para caballos, gliotoxina ND), 7-8: cepa **Af44** (alimento para perros, 1156,1 ppb gliotoxina), 9- **Marcador de PM** (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen), 10-11: cepa **AS32** (alimento para chinchillas, gliotoxina ND), 12-13: cepa **Af61** (alimento para pollos, gliotoxina ND), 14-15: cepa **Af16**, *A. fumigatus* sensu stricto, control positivo (722,8 ppb gliotoxina). Las fechas indicadas en rojo señalan bandas polimórficas, y la fecha blanca bandas monomórficas.

Nota: ppb: partes por billón. ND: no detectado en base a la metodología de HPLC-MS/MS.

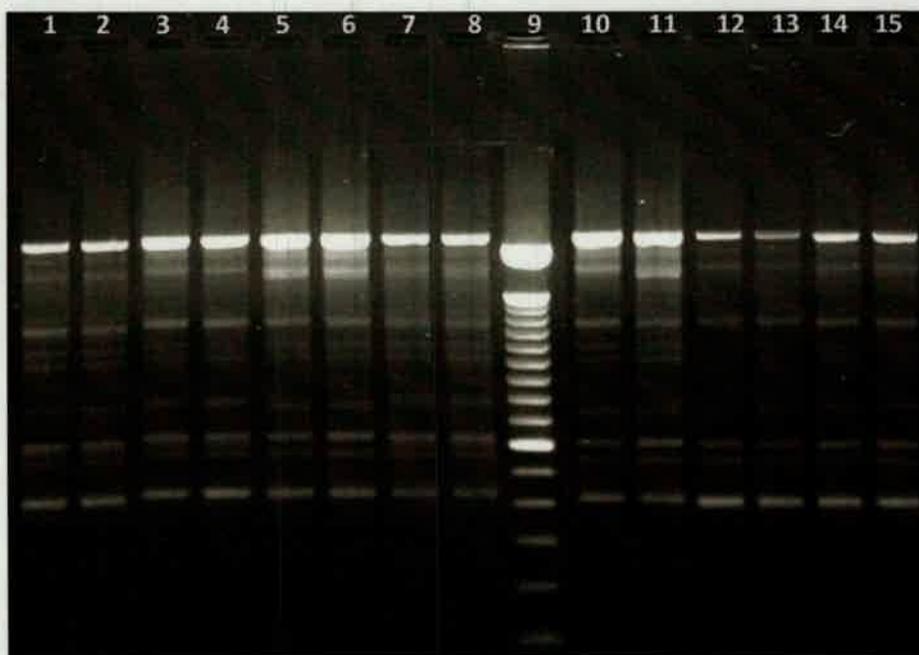


Figura 36. Perfiles RAPD con primer URP1F de 7 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* analizadas. Líneas 1-2: cepa **Af13** (ensilaje de maíz, 3430,5 ppb gliotoxina), 3-4: cepa **Ach1** (alimento para chinchillas, 344,73 ppb gliotoxina), 5-6: cepa **Af1** (alimento para caballos, gliotoxina ND), 7-8: cepa **Af44** (alimento para perros, 1156,1 ppb gliotoxina), 9- **Marcador de PM** (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen), 10-11: cepa **AS32** (alimento para chinchillas, gliotoxina ND), 12-13: cepa **Af61** (alimento para pollos, gliotoxina ND), 14-15: cepa **Af16**, *A. fumigatus* sensu stricto, control positivo (722,8 ppb gliotoxina).

Nota: ppb: partes por billón. ND: no detectado en base a la metodología de HPLC-MS/MS.

Como se observa en las Fig. 36 y 37, se obtuvo muy buena reproducibilidad de las bandas lo cual hizo posible que esta técnica fuese utilizada para confirmar la caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* aisladas de los diferentes alimentos para animales. El polimorfismo generado por el cebador PELF fue mayor al generado por URP1F. No obstante, cuando se analizaron las cepas referencia, se evidenció un mayor número de bandas polimórficas con ambos. Con el objetivo de determinar si estos cebadores tenían la capacidad de delimitar especies relacionadas en la sección *Fumigati*, se construyó el dendrograma (a partir de las matrices combinadas de cada cebador) que se observa en la Fig. 37.

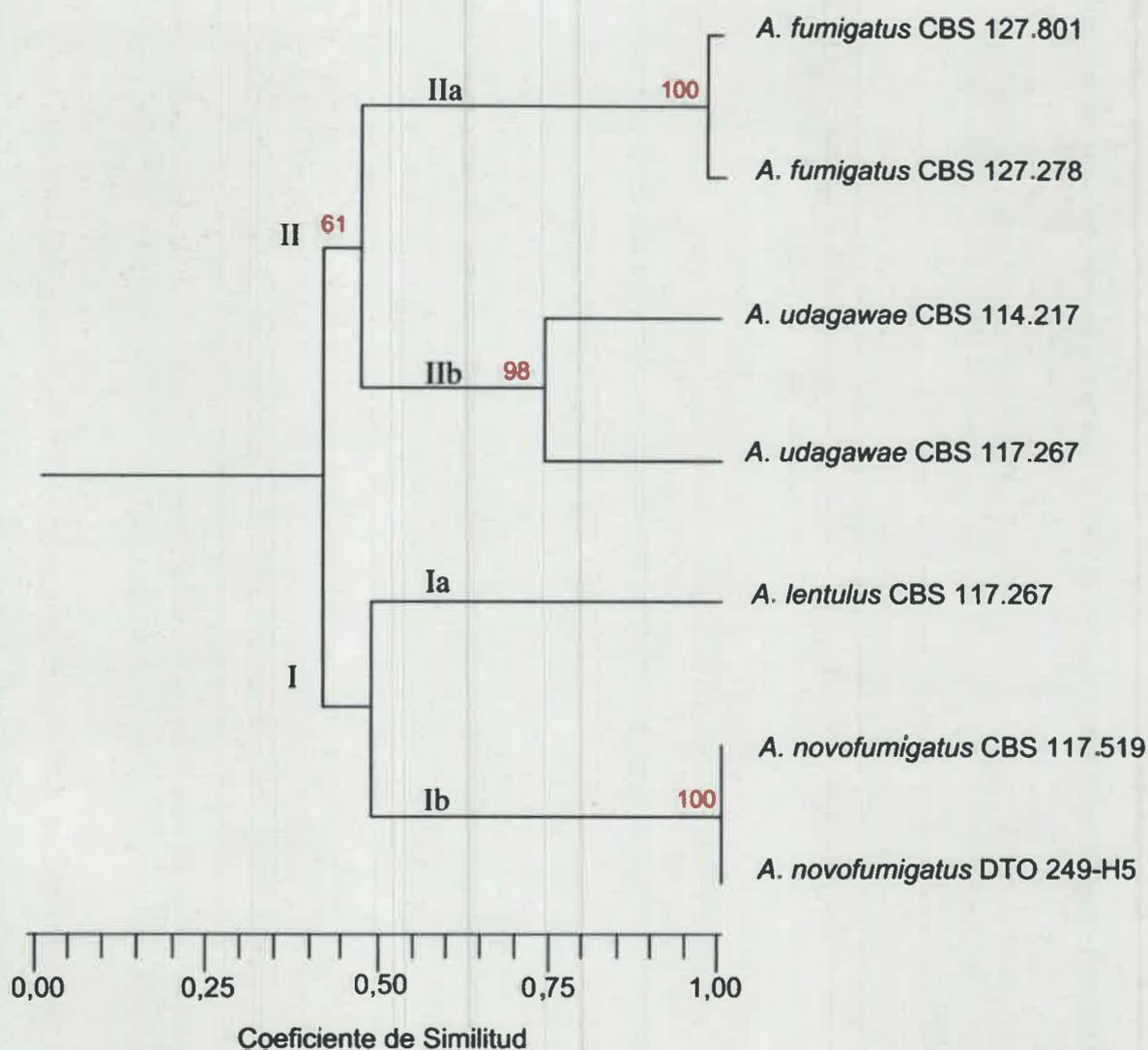


Figura 37. Dendrograma de las cepas de referencia de *Aspergillus* sección *Fumigati* generados por el software NTSYS utilizando el análisis de cluster UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de bootstrap mayores al 60% se muestran en la parte superior de las ramas.

En general, los cebadores PELF y URP1F fueron capaces de separar las cuatro especies de referencia, que se agruparon en dos grupos o clusters principales (I y II) (Fig. 38). El cluster I incluyó *A. lentulus* CBS 117.267 y *A. novofumigatus* (cepas CBS 117.519 y DTO 249-H5) y el II *A. udagawae* (cepas CBS 114.217 y CBS 114.218) y *A. fumigatus* sensu stricto (cepas CBS 127.801 y 127.278). El cluster I, se subdividió en dos grupos (Ia y Ib) (55% de soporte) que estuvieron formados por *A. lentulus* CBS 117.267 (Ia) y las

dos cepas de *A. novofumigatus* (Ib). El cluster II fue resuelto en dos subgrupos (IIa y IIb) (61% de soporte) separando a *A. fumigatus* sensu stricto de *A. udagawae*. Las dos cepas de cada una de estas especies fueron agrupadas con altos valores de soporte (bootstrap de 100 y 98%, respectivamente) presentando una elevada similitud genética entre ellas (100% para *A. fumigatus* y 75% para *A. udagawae*). (Fig. 38).

Los subgrupos Ia y Ib presentaron un 48% de similitud genética entre ellos y un 41% de similitud con el cluster II. Mientras que las especies agrupadas en el cluster II presentaron un 46% de similitud entre ellas.

2.2.2- Generación de los marcadores RAPD para la caracterización genética de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*

Una vez evaluada la repetitividad y reproducibilidad de la técnica, se aplicó la metodología para la estimación de la identidad a nivel de especie y de la variabilidad genética de un conjunto mayor de cepas (70). De este conjunto, 35 cepas fueron caracterizadas mediante la técnica de PCR-RFLP (punto 2.1.2) y previamente mediante caracteres morfológicos y fisiológicos. Del análisis de los resultados con ambos cebadores, se observó por lo general, un patrón de bandas similar entre todos los aislados de *Aspergillus* sección *Fumigati* de diferentes orígenes de aislamiento. En la Fig. 38 se muestran los RAPD generados con el cebador PELF de cepas aisladas de diferentes alimentos para animales (Argentina).

En cuanto a los perfiles RAPD de las cepas procedentes de Brasil clínicas (humanas y animales) y de alimentos para animales obtenidos con ambos cebadores, se observó el mismo comportamiento que el anterior; estas cepas presentaron patrones de bandas similares independientemente de su origen de aislamiento (Fig. 39). Además, al comparar estos perfiles con aquellos obtenidos de las cepas de los diferentes alimentos para animales del presente estudio (Argentina) se observó, por lo general, que patrón genético fue similar.

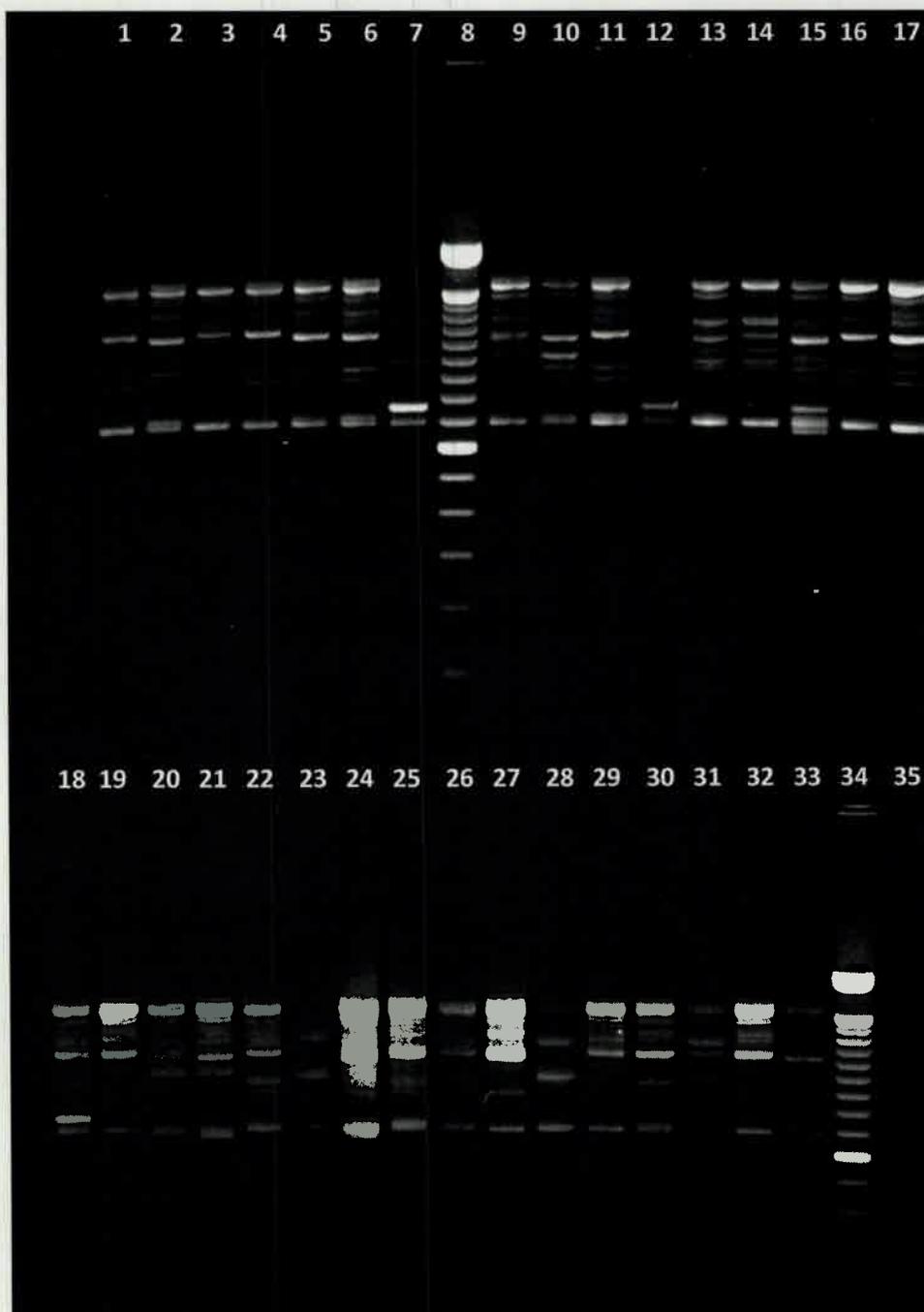


Figura 38. Perfiles RAPD con el cebador PELF de 34 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* analizadas. Líneas 1-5: cepas aisladas de alimentos para caballos, 6-7: de alimentos para pollos, 8 y 35: Marcador de PM (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen), 9-16: cepas aisladas de alimentos para perros, 17-20: de alimentos para chinchillas, 21-24: de ensilaje de maíz para vacas, 25-32: de residuo de la industria cervecera para cerdos, 33: cepa A89 *A. fumigatus* sensu stricto, control positivo, 34: cepa Af16 *A. fumigatus* sensu stricto, control positivo, 36: control negativo sin ADN.

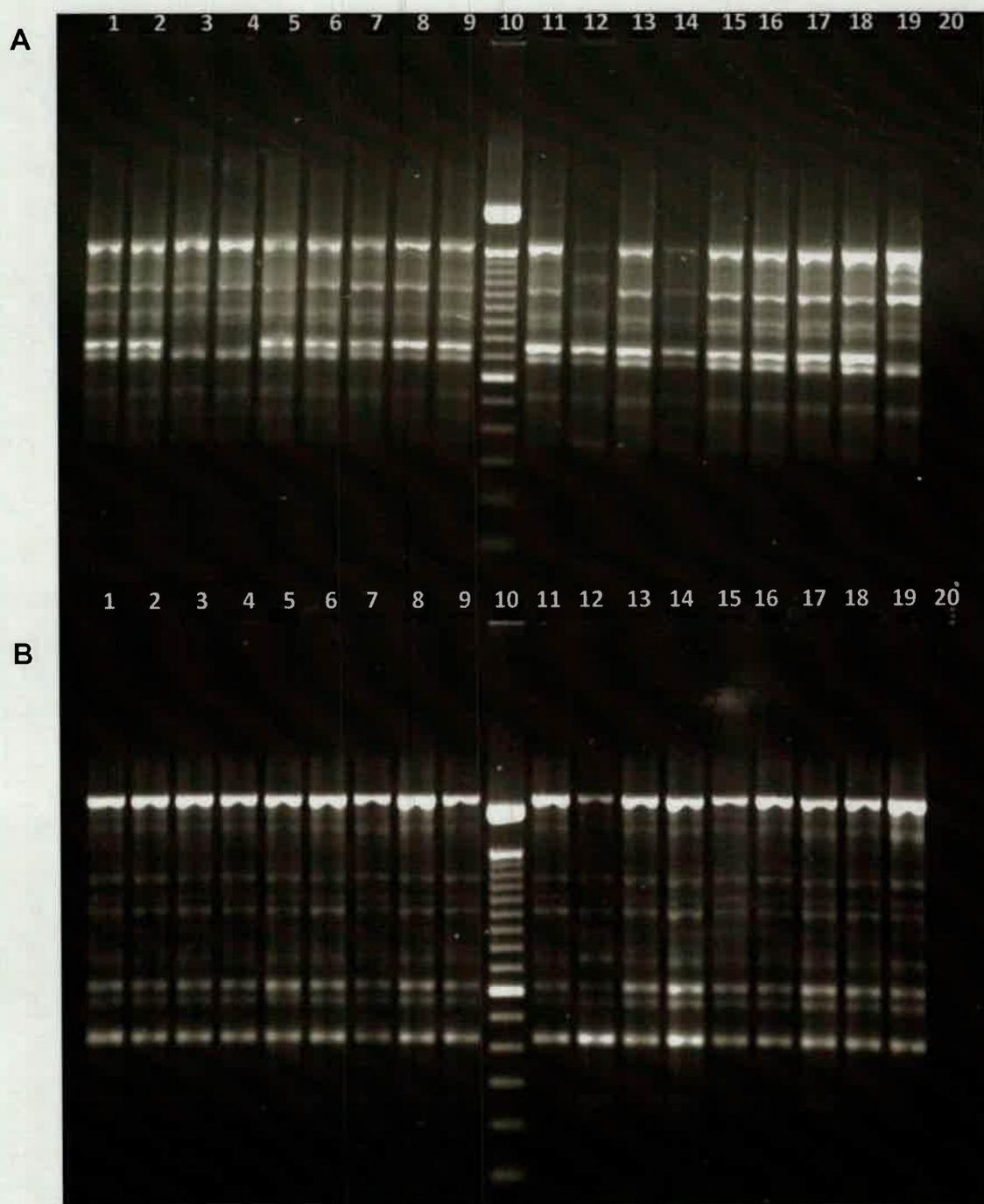


Figura 39. Perfiles RAPD con los cebadores PELF (A) y URP1F (B) de las 17 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* procedentes de Brasil (líneas 1-9 y 11-18) y de una cepa (AS19) aislada de alimento para chinchillas (Argentina). En **A** y **B**: Líneas 1,7 y 15: cepas asociadas a mastitis, 2 y 14: cepas aisladas de alimentos para cerdos, 3, 9, 13 y 17-18: de alimentos para pollos, 4 y 11: de ensilaje de maíz, 5, 12 y 16: de ensilaje de sorgo, 6 y 8: cepas asociadas a aspergillosis humana. Línea 10: Marcador de PM (Marcador 100pb DNA Ladder Invitrogen), 19: cepa AS19, 20: control negativo sin ADN.

En la **Fig. 40**, se muestra el dendrograma obtenido luego del análisis de los 47 caracteres (bandas) que se obtuvieron cuando se combinaron los resultados de ambos cebadores para las 70 cepas analizadas. Al igual que lo observado durante los ensayos de repetitividad y reproducibilidad de la metodología, los cebadores PELF y URP1F fueron capaces de separar las cuatro especies, que se agruparon en dos grupos o clusters principales (I y II) (Fig. 40). El cluster I incluyó a *A. lentulus* CBS 117.267 y el II incluyó a todas las demás cepas, pero se subdividió en dos grupos (IIa y IIb) (soporte de 55%). El cluster IIa incluyó a *A. novofumigatus* DTO 249-H5 y el IIb a *A. udagawae* CBS 114.218, a todas las cepas incluidas en el análisis y *A. fumigatus* sensu stricto (cepas CBS 127.801 y 127.278) (soporte de 70%). Este cluster a su vez se subdividió en dos grupos más (IIb1 y IIb2). El cluster IIb1 incluyó a la cepa de referencia *A. udagawae* CBS 114.218 y el IIb2 a *A. fumigatus* (cepas CBS 127.801 y 127.278) y todas las cepas analizadas en este estudio, anteriormente denominadas *Aspergillus* sección *Fumigati* (soporte del 99%) (Fig. 40). Por lo tanto, todas las cepas analizadas por esta metodología (70) fueron agrupadas con elevado valor de soporte estadístico (99%) con las cepas de referencia *A. fumigatus* CBS 127.801 y *A. fumigatus* CBS 127.278, independientemente de su origen de aislamiento y región geográfica (Argentina o Brasil). Las cepas incluidas en este último cluster (IIb2) presentaron una similitud genética entre ellas del 78%, evidenciando que si bien fue posible detectar variabilidad genética entre ellas a través de los marcadores RAPD con PELF y URP1F como cebadores, ésta fue baja, sugiriendo que el conjunto de cepas analizadas (*A. fumigatus* sensu stricto, según los perfiles RAPD) constituiría un grupo homogéneo. Resultados similares, fueron encontrados por Hong y col. (2010) quienes re-identificaron un conjunto de 146 cepas de *A. fumigatus* sensu lato (es decir, identificadas únicamente en base a marcadores morfológicos), de las cuales el 96% pudo ser confirmado como *A. fumigatus* sensu stricto, mientras que el 4% restante resultaron ser *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *Neosartorya udagawae* y *N. cf. nishimurae*. Estos autores, no lograron discriminar cepas de *A. fumigatus* sensu stricto en base su origen saprófito (cepas ambientales) o patogénico (cepas clínicas). Por lo tanto, **el nicho ecológico natural de las cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*, en especial de *A. fumigatus* sensu stricto, que causan aspergillosis en humanos y animales es el ambiente. Sus esporas se encuentran continuamente dispersas en el aire y pueden tornarse patógenas si encuentran el huésped apropiado.**

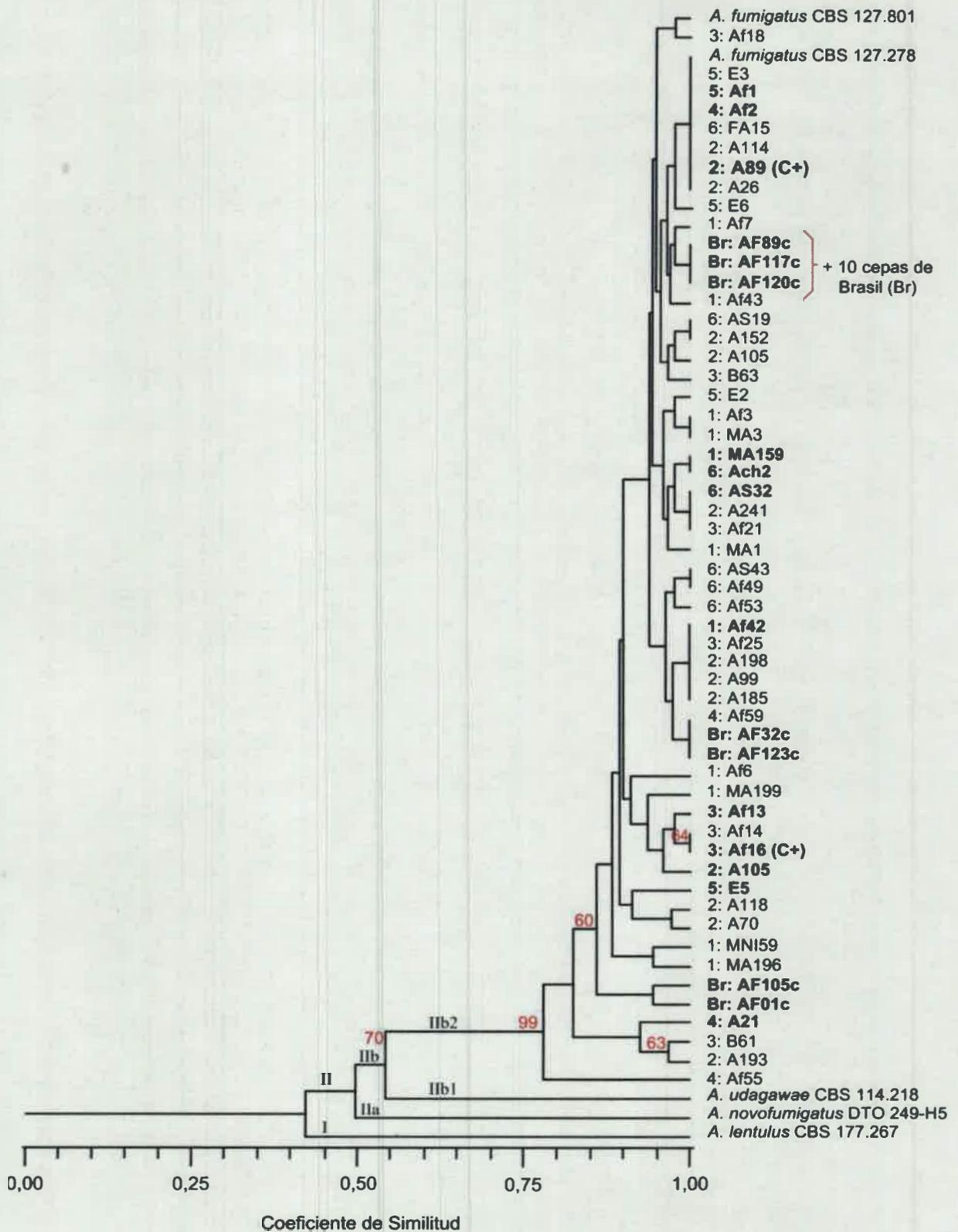


Figura 40. Dendrograma de 70 cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* y de las cepas de referencia (color azul) generados por el software NTSYS utilizando análisis de clusters UPGMA con el índice de similitud Dice. Los valores de bootstrap mayores al 60% se muestran en la parte superior de las ramas

3- Confirmación del estado taxonómico a nivel de especie de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* mediante el secuenciamiento del gen parcial de la β -tubulina

Para la confirmación definitiva de los resultados obtenidos mediante los marcadores moleculares RFLP y RAPD, se llevó a cabo el secuenciamiento del gen de la β -tubulina de cepas seleccionadas de acuerdo a su posición en el dendrograma mostrado en la Fig. 40, es decir, en base a la diversidad genética encontrada durante su aplicación. Los alineamientos básicos locales de estas cepas mostraron un 99-100% de máxima identidad con aquellas cepas de *A. fumigatus* sensu stricto publicadas en la base datos de GenBank (Tabla 35). En todos los casos se obtuvo un valor del estadístico $e=0$, lo cual significa que la probabilidad de que ese alineamiento haya ocurrido al azar es despreciable.

Finalmente, estos resultados fueron confirmados por medio de un análisis preliminar de máxima parsimonia a fin de evaluar las relaciones evolutivas de dichas cepas con respecto a los diferentes miembros de la sección *Fumigati* (Fig. 41). *Aspergillus clavatus*, una especie de la sección *Clavati* fue seleccionado como grupo externo debido a sus diferencias con los miembros de la sección *Fumigati*, confirmadas por análisis morfológicos y filogenéticos (Geiser y col., 1998). Estos resultados corroboran definitivamente el estado taxonómico de estas cepas y confirman, por lo tanto, los resultados obtenidos con los marcadores moleculares RFLP y RAPD. En consecuencia, de acuerdo a la ubicación de las cepas secuenciadas en el dendrograma RAPD (resaltadas en negrita) en la Fig. 40, se podrían inferir casi inequívocamente que el grupo de cepas evaluadas pertenece a la especie *A. fumigatus* sensu stricto.

En este estudio, se obtuvo que todas las cepas analizadas independientemente de su origen de aislamiento o región geográfica fueron agrupadas con las cepas de referencia *A. fumigatus* CBS 127.801 y *A. fumigatus* CBS 127.278. Además, cepas representativas fueron secuenciadas y evaluadas por análisis preliminar de máxima parsimonia para determinar su agrupamiento con especies de la sección *Fumigati*, y se obtuvo que éstas fueron agrupadas con *A. fumigatus* sensu stricto (de la base de datos) con un soporte estadístico del 100% (Fig. 42). Los resultados obtenidos, constituyen un aporte importante para la caracterización de *A. fumigatus*, en especial de aquellas cepas obtenidas del ambiente animal, donde tanto los animales que consumen los alimentos contaminados

como el hombre que los manipula, están expuestos a este hongo. Esta especie, como fue mencionado anteriormente, es el principal miembro de la sección *Fumigati* responsable de enfermedades respiratorias en humanos y animales, entre ellas la AI. Además, la mayoría de las cepas de *A. fumigatus* producen gliotoxina, su principal y más potente micotoxina de importancia toxicológica en los animales (Dos Santos y col., 2002; Kwon-Chung y Surgui, 2009). Los resultados encontrados en el presente trabajo coinciden con aquellos obtenidos por Hong y col. (2005, 2010) y Debeaupuis y col. (1997) quienes sugieren que *A. fumigatus* (sensu stricto) es una especie genéticamente homogénea, independientemente de su origen de aislamiento y que la discriminación genética en base al origen saprofítico o patogénico de los aislados no es posible en esta especie por los métodos utilizados.

El conjunto de cepas estudiadas constituyó un grupo homogéneo a nivel genético, no obstante se observó variabilidad fenotípica cuando se aplicaron los análisis estadísticos multivariados. Es posible afirmar entonces, al igual que lo sugieren otros investigadores como Hong y col. (2005), que los miembros de la sección *Fumigati* deben ser siempre clasificados en análisis con enfoque polifásico combinando métodos morfológicos, fisiológicos y genotípicos para obtener una descripción acertada de las especies.

Tabla 35. Resultados obtenidos mediante BLAST.

Cepa	Origen de aislamiento	Región geográfica	Identificación morfológica	Resultado BLAST*
A21	Alimento para pollos	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D49 GenBank: JX545087
A105	Residuo de cervecería para cerdos	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> KCCM60331 GenBank: HQ285593
Af1	Alimento para caballos	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D49 GenBank: JX545087
Af2	Alimento para pollos	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S3 GenBank: JX501424
Af13	Ensilaje de maíz para vacas	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> KCCM60331 GenBank: HQ285593
AS32	Alimento para chinchillas	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D49 GenBank: JX545087
E5	Alimento para caballos	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> CBS 121.53 GenBank: DQ534076
MA159	Alimento para perros	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> CBS 315.60 GenBank: DQ534077
Af42	Alimento para perros	Argentina	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> KCCM60331 GenBank: HQ285593
AF117c	Asociada a aspergillosis humana	Brasil	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D49 GenBank: JX545087
AF105c	Ensilaje de sorgo para vacas	Brasil	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> KCCM60331 GenBank: HQ285593
AF01c	Alimento para cerdos	Brasil	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D54 GenBank: JX501423
AF89c	mastitis	Brasil	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D49 GenBank: JX545087
AF123c	Ensilaje de maíz para vacas	Brasil	<i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i> A2S4 D49 GenBank: JX545087

*Cepas con las que se obtuvieron las mayores puntuaciones (scores) en los alineamientos.

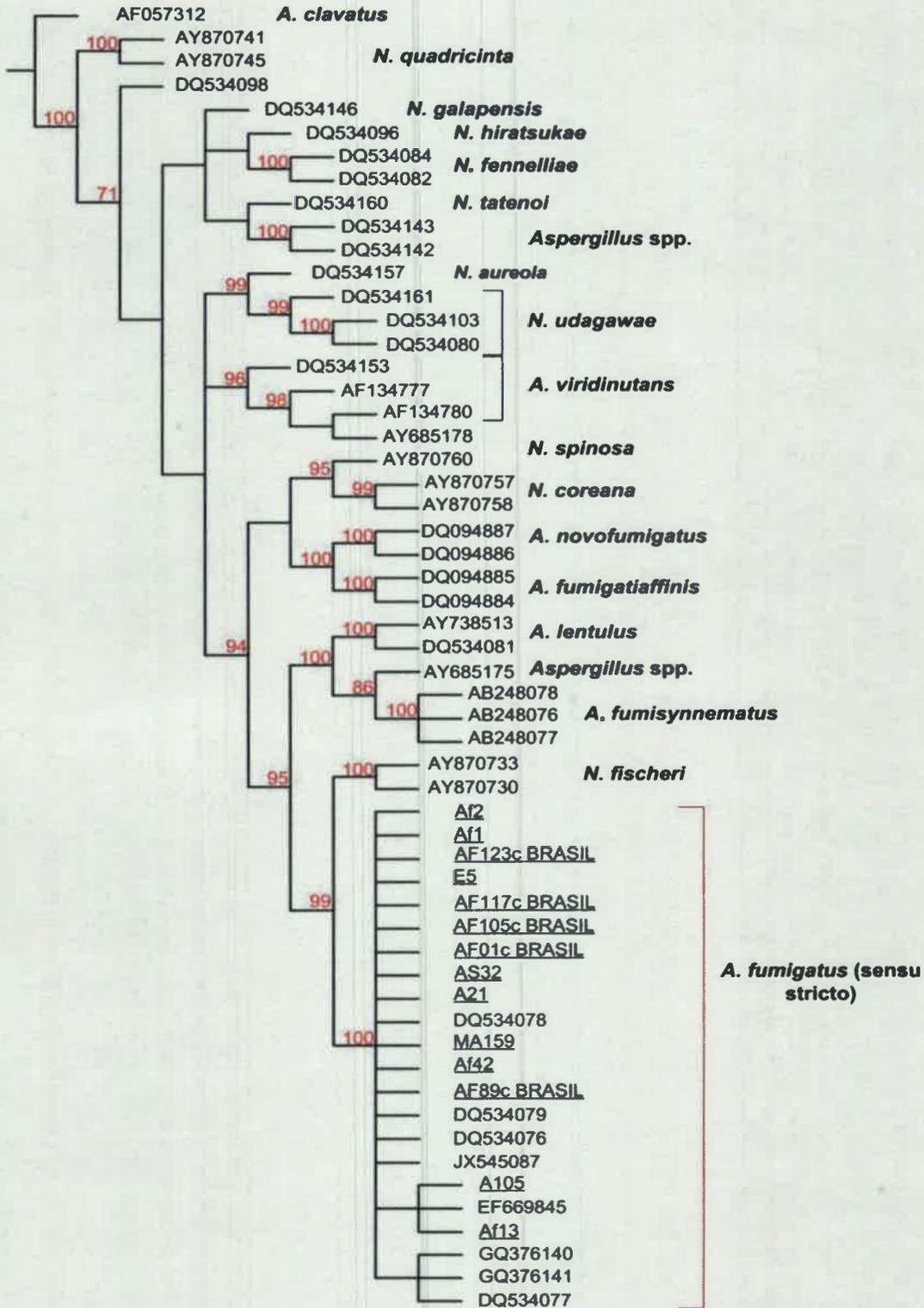


Figura 41. Uno de los árboles más parsimoniosos generados a partir de los datos combinados de secuencias *benA* de las 14 cepas secuenciadas en este estudio (subrayadas) y de 42 secuencias *benA* disponibles en GenBank. *Aspergillus clavatus* (GenBank: AF057312) se usó como grupo externo. Los valores de bootstrap mayores al 70% se muestran en la parte superior de las ramas.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- ✚ La mayoría de las muestras de alimentos destinados a la alimentación animal (ensilaje de maíz y alimentos terminados) mostraron inadecuada calidad higiénica y presentaron contaminación con los principales géneros toxicogénicos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Además, las levaduras se aislaron en elevada frecuencia; no se ha determinado con certeza su rol en los mismos.
- ✚ En todos los tipos de alimentos analizados, excepto de las muestras de alimento terminado para cerdos se aislaron cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati*.
- ✚ El estudio de la capacidad gliotoxicogénica de las cepas de *Aspergillus* de la sección *Fumigati* mostró que el 61% de éstas fueron capaces de producir la toxina en amplios rangos de valores.
- ✚ Los factores ecofisiológicos que ejercieron mayor influencia en la fase de latencia y velocidad de crecimiento fueron la temperatura y la a_w , bajo condiciones de incubación a tensión normal de oxígeno. Mientras que a tensión reducida de oxígeno y 37 °C, el parámetro ambiental más influyente fue la a_w .
- ✚ La producción de gliotoxina no mostró un patrón de comportamiento similar al encontrado al analizar el crecimiento de las cepas. El efecto de la interacción de todos los factores fue variable y la concentración más elevada la toxina se obtuvo bajo condiciones de incubación a tensión normal de oxígeno por una cepa aislada de ensilaje de maíz.
- ✚ El secuenciamiento del gen *benA* de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108 permitió corroborar su estado taxonómico y concluir que pertenecen a la especie *A. fumigatus* sensu stricto. Además estas cepas fueron agrupadas, con elevados valores de bootstrap, con cepas de *A. fumigatus* sensu stricto procedentes de la base de datos del GenBank.

- ✦ Los análisis de PCR-RFLP *in silico* de obtención de mapas de restricción teóricos, permitieron evaluar diferentes enzimas de restricción en base a su capacidad de distinguir especies estrechamente relacionadas en la sección *Fumigati*. Se seleccionó la enzima *Bccl* ya que permitió la rápida identificación de *A. fumigatus* sensu stricto, *A. lentulus* y *N. udagawae*.
- ✦ La aplicación del marcador molecular PCR-RFLP, basado en la restricción con la enzima *Bccl* del producto de amplificación del gen de la β -tubulina, permitió un rápido "screening" del conjunto de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* analizadas. Todas presentaron perfiles RFLP concordantes con los resultados del análisis *in silico* y correspondientes a *A. fumigatus* sensu stricto, y el mismo patrón de bandas que los controles positivos.
- ✦ Los ensayos de repetitividad y reproducibilidad de las bandas RAPD con los cebadores PELF y URP1F permitieron obtener bandas reproducibles y polimórficas en todas las experiencias. La aplicación del marcador RAPD para la caracterización de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* procedentes de Brasil (casos clínicos y de alimentos para animales), permitió su agrupación con las cepas de referencia *A. fumigatus* CBS 127.801 y *A. fumigatus* CBS 127.278 (*A. fumigatus* sensu stricto) sugiriendo que pertenecen a esta especie.
- ✦ Los marcadores RAPD evidenciaron variabilidad genética intra-específica entre las cepas estudiadas. El conjunto de cepas caracterizadas como *A. fumigatus* sensu stricto, en base a los resultados de los RAPD, constituyó un grupo genéticamente homogéneo ya que éstas presentaron una similitud genética del 78%.
- ✦ El secuenciamiento del gen de la β -tubulina de las cepas seleccionadas en base a los resultados obtenidos de los RAPD, permitió la confirmación de estos resultados.

- ✚ Los estudios estadísticos multivariados si bien evidenciaron variabilidad fenotípica entre las cepas estudiadas, no demostraron asociación de las cepas según su origen de aislamiento. Mientras que la aplicación de los marcadores moleculares PCR-RFLP y RAPD demostraron baja variabilidad genética y evidenciaron que el conjunto de cepas estudiadas fue genéticamente homogéneo, sin mostrar nuevamente la separación en base al origen de aislamiento o geográfico de las mismas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan datos útiles respecto a la caracterización genética y fisiológica de especies epidemiológicamente importantes como *A. fumigatus* y especies relacionadas que colonizan los alimentos para animales en Argentina. La identificación de *A. fumigatus* sensu stricto en los diferentes alimentos para animales es relevante debido a que esta especie es el principal patógeno oportunista de la sección *Fumigati*. Los trabajadores rurales y los animales estarían constantemente expuestos, ya que su nicho ecológico natural es el ambiente.

PERSPECTIVAS

FUTURAS

Las perspectivas futuras que se desprenden del presente trabajo de tesis estarán orientadas al:

- Estudio de la sucesión ecológica de cepas de *A. fumigatus* sensu stricto y especies relacionadas en el ambiente animal y estimación de su invasividad a través de la evaluación de la actividad *in vitro* de la enzima elastasa de cepas de *Aspergillus* sección *Fumigati* obtenidas del ambiente animal.
- Estudio de cepas de otras fuentes del ambiente animal (alimentos, agua de bebederos, aire y camas) para profundizar los estudios sobre la variabilidad genética y diversidad de especies de *Aspergillus* sección *Fumigati* procedentes del ambiente animal en Argentina.
- Estudios toxicológicos relacionados con la concentración de gliotoxina mínima presente en un alimento contaminado para provocar efectos indeseados en animales de producción, y evaluación de la capacidad de adsorción de gliotoxina por levaduras que se encuentren también presentes en estos alimentos.

Los resultados de estas experiencias permitirán obtener más información acerca de la peligrosidad de este patógeno oportunista para animales domésticos y mascotas con la finalidad de la elaboración de estrategias para su control.



BIBLIOGRAFÍA

- Abad A., Fernández-Molina J.V., Bikandi J., Ramírez A., Margareto J., Sendino J. y col. (2010). What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 27(4): 155-82.
- Abarca M.L., Bragulat M.R., Castellá G. y Cabañes F.J. (1994). Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied Environ Microbiol.* 60: 2650-2652.
- Abrunhosa L., Serra R. y Venancio A. (2002). Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. *J. Agric. Food Chem.* 50(25): 7493-6.
- Ainsworth G.C. y Austwick P.K.C., (1973). Fungal diseases of animals. Farnham Royal, Slough, England, Commonwealth Agricultural Bureaux.
- Alcazar-Fuoli L., Mellado E., Alastruey-Izquierdo A., Cuenca-Estrella M. y Rodriguez-Tudela J.L. (2008). *Aspergillus* Section *Fumigati*: Antifungal Susceptibility Patterns and Sequence-Based Identification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(4): 1244-1251.
- Alhambra A., Moreno J.M., Moragues D.M., Brena S., Quindós G., Pontón J. y del Palacio A. (2006). Aislamiento de *Aspergillus lentulus* en un enfermo crítico con EPOC y aspergilosis invasora. VIII Congreso Nacional Micología, Barcelona, España, D14.
- Aller Gancedo J.M., Fregeneda Grandes J.M. y Fernández Díez M. (2000). Mastitis por *Aspergillus fumigatus* en Ganado ovino. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 13-17.
- Aller J.M., Fregeneda J.M. y Fernández M. (1996). Aspergilosis mamaria en un rebaño ovino. Tercer Congreso Nacional de Micología, SEM and AEM. Peñíscola, España, p. 66.
- Alonso V.A., Pereyra C.M., Keller L.A.M., Dalcero A.M., Rosa C.A.R., Chiacchiera S.M. y Cavaglieri L.R. (2013). Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *J. Appl. Microbiol.* 115(3): 637-43.
- Alvarez-Pérez S., García M.E., Bouza E., Pelaez T. y Blanco J. (2009). Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness. *Med. Mycol.* 47: 601-608.
- Alvarez-Pérez S., Mateos A., Dominguez L., Martinez-Nevado E., Blanco J.L. y García M.E. (2010). Polyclonal *Aspergillus fumigatus* infection in captive penguins. *Vet. Microbiol.* 144(3-4): 444-9.
- Amitani R., Taylor G, Elezis E., Llewellyn-Jones C., Mitchell J., Kuze F., Cole P. y Wilson R. (1995) Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect Immun.* 63: 3266-71.
- Arabatzi, M., Kambouris, M., Kyprianou, M., Chrysaiki, A., Foustoukou, M y col. (2011). Polyphasic identification and susceptibility to seven antifungals of 102 *Aspergillus* isolates recovered from immunocompromised hosts in Greece. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(6), 3025-3030.

- Arné P., Thierry S., Wang D. y col. (2011). "Aspergillus fumigatus in Poultry," *Int. J. Microbiol.* Article ID 746356, 14 pages. doi:10.1155/2011/746356.
- Askew D.S. (2008). *Aspergillus fumigatus*: virulence genes in a street-smart mold. *Curr. Opin Microbiol.* 11: 331-7.
- Astoreca A., Barberis C., Magnoli C., Combina M. y Dalcerro A. (2009). Ecophysiological factor effect on growth rate, lag phase and ochratoxin A production by *Aspergillus niger aggregate* strains on irradiated peanut sedes. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 131-135.
- Backeljau T., De Brun L., De Wolf H., Jordaens K., Dongen S., Verhagen R. y Winnepeninckx B. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* 11: 119-130.
- Balajee S.A., Gribskov J.L., Hanley E., Nickle D. y Marr K.A. (2005b). *Aspergillus lentulus* sp nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 4: 625-632.
- Balajee S.A., Lindsley M.D., Iqbal N., Ito J., Pappas P.G. y Brandt M.E. (2007). A non- sporulating clinical isolate identified as *Petromyces alliaceus* (anamorph *Aspergillus alliaceus*) by morphological and sequence based methods. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2701-2703.
- Balajee S.A., Nickle D., Varga J. y Marr K.A. (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell* 5: 1705-1712.
- Balajee, S.A., Gribskov J., Brandt M., Ito J., Fothergill A. y Marr K.A. (2005a). Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 5996-5999.
- Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Casanoves F., Di Renzo J.A., Robledo C.W. (2008). *Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Barberis C.L. (2009). Estrategias de control del crecimiento y producción de ocratoxina A por *Aspergillus* de la sección *Nigri* en maní. Río Cuarto, Córdoba, 2009. 244 p. Presentada en la Universidad Nacional de Río Cuarto para obtención del grado de Doctora en Ciencias Biológicas.
- Barker B.M., Kroll K., Vödisch M., Mazurie A., Kniemeyer O. y Cramer R.A. (2012). Transcriptomic and proteomic analyses of the *Aspergillus fumigatus* hypoxia response using an oxygen-controlled fermenter. *BMC Genomics* 13: 62.
- Bauer J., Gareis M., Bott A. y Gedek B. (1989). Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Vet. Mycol.* 27: 45-50.
- Belli N., Marín S., Sanchis V. y Ramos A.J. (2004). Influence of water activity and temperature on growth of isolated of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. *Int. J. Food Microbiol.* 96: 19-27.
- Bennett J.W. y Klich M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 497-516.

- Berbee M.L. y Taylor J.W. (2001). Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. In: McLaughlin, D., McLaughlin, E., Lemke, P. (eds). *The Mycota: systematics and evolution*. Berlin, Springer-Verlag, pp: 229-245.
- Bertling A., Niemann S., Uekötter A., Fegeler W., Lass-Flörl C., von Eiff C. y Kehrel B.E. (2010). *Candida albicans* and its metabolite gliotoxin inhibit platelet function via interaction with thiols. *Thromb. Haemost.* 104(2): 270-8.
- Bíro D., Juracek M., Kacaniova M., Simko M., Galik B., Michalkova J. y Gyongyova E. (2009). Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.* 16: 227-232.
- Boudra H. y Morgavi D.P. (2005). Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Animal Feed Sci. Technol.* 120: 113-123.
- Bragulat M.R., Abarca M.L., Castella O. y Cabañes J. (1995). Mycological survey on mixed poultry feeds and mixed rabbit feeds. *J. Sci. Food Agric.* 67: 215-220.
- Casadevall A. (2005). Fungal virulence, vertebrate endothermy, and dinosaur extinction: is there a connection? *Fungal Genet. Biol.* 42: 98-106.
- Casadevall A., Steenbergen J.N. y Nosanchuk J.D. (2003). "Ready made" virulence and "dual use" virulence factors in pathogenic environmental fungi - the *Cryptococcus neoformans* paradigm. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 332-337.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology), (2003). *Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems*. Task Force Report N°139. USA: Ames, Iowa.
- Cavaglieri L.R., González Pereyra M.L., Pereira C.M., Magnoli C.E., Chulze S.N. y Dalcerro A.M. (2005). Fungal and mycotoxin contamination of cow feedingstuffs in Argentina. Presentado al Congreso Reducing impact of mycotoxins in Tropical Agriculture. Ghana, Africa.
- CEN (European Committee for Standardisation) (1999). *Food analysis - Biotoxins - Criteria of analytical methods of mycotoxins*. CEN Report CR 13505.
- Chanteperdrix V., Bourgerette E., Gantier J.C., de Faverges G., Herman D. y Lauby M. (2008). Mycological examination of a non-uniseriate *Fumigati* section's *Aspergillus*. *Ann Biol. Clin.* 66: 581-583, Paris.
- Chulze S.N., Ramirez M.L., Farnochi, M.C., Pascale M., Visconti A., March G. (1996). *Fusarium* and fumonisins occurrence in Argentina corn at different ear maturity stages. *J. Agricult. Food Chem.* 44: 2797-2801.
- Commission Decision No. 2002/657/EC of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results- consolidated version 10 Jan 2004. Disponible en internet: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002D0657:20040110:EN:PDF>. Accessed 31 December 2012.

- Crow Santos P.V. (2002). "Aplicación de métodos estadísticos multivariados en el estudio de calidad de enmiendas orgánicas sólidas y líquidas preparadas en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro". Tesis de grado. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/5761>.
- Dalcero A., Magnoli C., Luna M., Ancasi G., Reynoso M., Chiacchiera S., Miazzo R. y Palacio G. (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 141: 37-43.
- Dallyn H. y Fox A. (1980). Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi, p 129-139. En: Gould GH, Corry EL, (ed). Microbial growth and survival in extreme environments. Academic Press: London and New York.
- Daly P. y Kavanagh K. (2001). Pulmonary Aspergillosis: clinical presentation, diagnosis and therapy. *Br. J. Biomed. Sci.* 58, 197.
- Daly P. y Kavanagh K. (2002). Immobilization of *Aspergillus fumigatus* colonies in a soft agar matrix allows visualization of A549 cell detachment and death. *Med. Mycol.* 40: 27-33.
- De Vries R.P., Jansen J., Aguilar G., Parenicova L., Joosten V., Wulfert F., Benen J.A. y Visser J. (2002). Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. *FEBS Letters*, 530: 41-47.
- Debeaupuis J.P., Sarfati J., Chazalet V. y Latgé J.P. (1997). Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 65: 3080-3085.
- Denning D.W., Clemons K.V., Hanson L.H. y Stevens D.A. (1990). Restriction endonuclease analysis of total cellular DNA of *Aspergillus fumigatus* isolates of geographically and epidemiologically diverse origin. *J. Infect. Dis.* 162: 1151-1158.
- Denning D.W., Shankland G.S. y Stevens D.A. (1991). DNA fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with aspergilloma. *J. Med. Vet. Mycol.* 29: 339-342.
- Denning D.W. (1998). Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26: 781-803.
- Dice L.R. (1945). Measures of amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 379-393.
- Domijan A.M., Peraica M., Vrdoljak A.L., Radic B., Zlender V. y Fuchs R. (2007). The involvement of oxidative stress in ochratoxin A and fumonisin B1 toxicity in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1147-1151.
- Dos Santos V.M., Dörner J.W. y Carreira F. (2002). Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia* 156: 133-138.
- Eichner R.D., Al Salami M., Wood P.R. y Mullbacher A. (1986). The effect of gliotoxin up on macrophage function. *Int. J. Immunopharmacol.* 8:789-797.

- El-Shanawany A., Eman A., Mostafa M. y Barakat A. (2005). Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. *Mycopathologia* 159: 281-289.
- FAO, 2004. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feeds in 2003. Food and Nutrition Paper 81. FAO Organization of the United Nations, Roma.
- Faryal R., Lodhi A. y Hameed A. (2006). Isolation, characterization and biosorption of Zinc by indigenous fungal strains *Aspergillus fumigatus* RH05 and *Aspergillus flavus* RH07. *Pakistan J. Bot.* 38(4): 817-832.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fernández Juri, M.G., Bressán F., Astoreca A.L., Barberis C.L., Cavaglieri L.R., Dalcerro A.M. y Magnoli C.E. (2009). Aflatoxins, Fumonisin and toxigenic fungi in raw. *Rev. Bras. Med. Vet.* 31: 109-117.
- Ferreira M.E. y Grattapaglia D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. pp 220.
- Fischer G., Thißen R., Schmitz C. y Dott W., (2006). Relevance of microfungi and their secondary metabolites (mycotoxins) for indoor hygiene. *Proc. Healthy Build* 1: 189-194.
- Flores Mengual M.P. y Rodríguez Ventura M. Tema 1: La alimentación animal. En: *Nutrición animal*. Publicación del Departamento de Nutrición animal, Facultad de veterinaria, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, España. En línea (citado en Marzo de 2014). Disponible en internet: <http://www.webs.ulpgc.es/nutranim/tema1.htm>
- Fraser R.S. (1993). Pulmonary aspergillosis: pathologic and pathogenetic features. *Pathol. Annu.* 28: 231.
- Frías-De León M.G., Zavala-Ramírez M., Córdoba S., Zúñiga G., Duarte-Escalante E., Pérez-Torres A., Zepeda-Rodríguez A., López-Martínez I., Buitrago M.J. y Reyes-Montes M.R. (2011). Phenotypic characteristics of isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* from different geographic origins and their relationships with genotypic characteristics. *BMC Infect. Dis.* 11: 116.
- Fridkin S.H. y Jarvis W.R. (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 499-511.
- Frisvad J.C. (1987). High-performance liquid chromatographic determination of profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. *J. Chromatogr. A.* 392: 333-347.
- Frisvad J.C. (1989). The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. *Bot. J. Linnean Soc.* 99: 81-95.

- Frisvad J., Thrane U. y Samson R. (2007). Mycotoxin producers. In: Dijksterhuis J, Samson R, (eds). *Food Mycol*. CRC Press, Boca Raton, pp 135-159.
- Frisvad J.C., Rank C., Nielsen K. y Larsen T.O. (2009). Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 47 (S1): 53-71.
- Gabriel K.R. (1971). Biplot display of multivariate matrices with application to principal components analysis. *Biometrika*, 58: 453-467.
- Gardiner D.M. y Howlett B.J. (2005). Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248: 241-8.
- Garon D., Richard E., Sage L., Bouchart V., Pottier D. y Lebaill P. (2006). Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3479-3484.
- Gedek B., Bauer J. y Schreiber H. (1981). Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *Wien. Tierarztl. Mschr.* 68: 299-301.
- Geisen R. (1996). Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *J. Appl Microbiol.* 19: 388-392.
- Geiser D.M., Frisvad J.C. y Taylor J.W. (1998). Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial β -tubulin and hydrophobin DNA sequences. *Mycologia* 90: 831-845.
- Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Varga J. y Samson R.A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 59: 1-10.
- Gerbaldo G.A. (2013). Estudio in vitro de la actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas aisladas de la flora autóctona de cereales fermentados sobre hongos productores de aflatoxina B₁. Río Cuarto, Córdoba, 2013. 202 p. Presentada en la Universidad Nacional de Río Cuarto para obtención del grado de Doctora en Ciencias Biológicas.
- Girardin, H., Sarfati, J., Traore, F., Dupouy, C., Derouin, F. y Latge, J.P. (1994) Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 684-690.
- Glass N.L. y Donaldson G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 61: 1323-1330.
- GMP (Good Manufacturing Practices) (2008). Certification Scheme Animal Feed Sector 2006, Including Residue Standards (Version 28 March 2008).
- Goloboff P.A., James S. Farris J.S. y Nixon K.C (2008). TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- González J F, Heras M, García de Jalón J A, Bárcena C (1993). Aspergilosis pulmonar en corderos jóvenes. *Rev. Iberoam. Micol.* 10: 98-99.
- González Pereyra M.L., Alonso V.A., Sager R., Morlaco M.B., Magnoli C.E., Astoreca A.L., Rosa C.A.R., Chiacchiera S.M., Dalcero A.M. y Cavaglieri L.R. (2008a). Fungi and selected

- mycotoxins from pre- and post- fermented corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 104(4), 1034-1041.
- González Pereyra M.L., Pereyra C., Ramírez M.L., Rosa C.A.R., Dalcero A. y Cavaglieri L., (2008b). Determination of mycobiota and mycotoxin in pig feed in Central Argentina. *Letf. Appl. Microbiol.* 46(5): 555-561.
- González Pereyra M.L., Tissera J., Mantefía C., Cavaglieri L.R., Keller K.M., Rosa C.A.R., Magnoli C. y Dalcero A., (2008c). Mycotoxicological quality of equine feed in Argentina. 10th International Congress of the World Equine veterinary Association, Moscu, Rusia.
- Gonzalez Pereyra M.L., Chiacchiera S.M., Rosa C.A.R., Sager R., Dalcero A.M. y Cavaglieri L. (2011). Comparative analysis of mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *J. Sci. Food Agric.* 91:1474-1481.
- Gordon K.E., Masotti R.E. y Waddell W.R. (1993). Tremorgenic encephalopathy: a role of mycotoxins in the production of CNS disease in humans. *Can. J. Neurol. Sci.* 20: 237-239.
- Gourreau J.M., Laval A. y Badinand F. (1988). Les aspergilloses des bovins. *Point Vét.* 20: 589-608.
- Guarro J., Gené J. y Stchigel A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 454-500.
- Guida N., Mesplet M., Di Gennaro E., Digilio P. y Vicente Moras E. (2005) Presencia de *Aspergillus fumigatus* en la cavidad nasofaríngea de equinos. *Rev. Iberoam. Micol.* 2005; 22: 160-162.
- Hall L.A. y Denning D.W. (1994). Oxygen requirements of *Aspergillus* species. *J Med. Microbiol.* 41(5): 311-5.
- Hey J. (2001). The mind of the species problem. *Trends Ecol. Evol.* 16: 326-329.
- Hocking A.D, Pitt J.I., Samson R.A. y Trhane U. (2006). Avances in Food Mycology. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*, volume 571. Springer press, USA.
- Hof H. y Kupfahl C. (2009). Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: an example that mycotoxins are potential virulence factors. *Mycotox. Res.* 25: 123-131.
- Hong S.B., Go S.J., Shin H.D., Frisvad J.C. y Samson R.A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia* 97: 1316-1329.
- Hong S.B., Cho H.S., Shin H.D., Frisvad J.C. y Samson R.A. (2006). Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 477-486.
- Hong S.B., Shin H.D., Hong J.B., Frisvad J.C., Nielsen P.V., Varga J. y Samson R.A. (2008). New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie van Leeuwenhoek* 93(1-2): 87-98.

- Hong S.B., Kim D.H., Park I.C., Choi Y.J., Shin H.D. y Samson R.A. (2010). Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato based on a New Concept of Species Delimitation. *The Journal of Microbiology* 48(5): 607-615.
- Hotelling H. (1936). Relations Between Two Sets of Variables. *Biometrika* 28: 321-377.
- Ingber D., Fujita T., Kishimoto S., Sudo K., Kanamaru T., Brem H. y Folkman J. (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348: 555-557.
- Jarv H., Lehtmaa J., Summerbell R.C., Hoekstra E.S., Samson R.A. y Naaber P. (2004). Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 42: 925-928.
- Kale S. y Bennet J.W. (1992). Strain instability in filamentous fungi. In: Handbook of Applied mycology Volume 5: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar, D.; Lillehoj, E.B.; Arora, D.K., Eds. Marcell dekker, Inc., New York. USA. Pp. 311-331.
- Kamalzadeh A., Hosseini A. y Moradi S. (2009). Effects of yeast glucomannan on performance of broiler chickens. *Int. J. Agric. Biol.* 11: 49-53.
- Kang H.W., Park D.S., Go S.J., Eun M.Y. (2002). Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. *Mol Cells* 13: 281-287.
- Karl S.A. y Avise C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in oysters, implications from nuclear RFLP's. *Science* 256: 100-1001.
- Katoh y Standley (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. (outlines version 7). *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Katz M.E., Dougall A.M., Weeks K. y Cheetham B.F. (2005). Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 43: 551-555.
- Keller L.A.M., Keller K.M., Monge M.P., Pereyra C.M., Alonso V.A., Cavaglieri L.R., Chiacchiera S.M. y Rosa C.A.R. (2012). Gliotoxin contamination in pre-and post fermented corn, sorghum and wet brewer's grains silage in Sao Paulo and Rio de Janeiro State, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 112, 865-873.
- Khan Z.K., Chowdhary L., Gyanchandani A., Goswami M., Farooqui N. y Ranade S.A. (1998). *Aspergillus fumigatus* strains recovered from immunocompromised patients (ICP): subtyping of strains by RAPD analysis. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 537-548.
- Khosravi A.R., Dakhili M. y Shokri H. (2008). A mycological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom Province, Iran Pakistan *J. Nutr.* 7: 31-34.
- Klich M.A. y Pitt J. (2002). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO, Division of food Research Sydney. Academic Press. Australia.

- Kosalec I., Pepeljnjak S. y Jandriæ M. (2005). Influence of Media and Temperature on Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* strains. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 56: 269-273.
- Kupfahl C., Michalka A., Lass-Flör I.C., Fischer G., Haase G., Ruppert T., Geginat G. y Hof H. (2008). Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 319-327.
- Kwon-Chung K.J. y Sugui J.A. (2009). What do we know now about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Med. Mycol.* 47 (Suppl1): S97-103.
- Lacey J. (1991). Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops. pp. 363-397. En: Smith JE, Henderson RS, eds. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press.
- Lair-Fuller S., Guillot J., Desterke C., Seguin D., Warin S., Bezille A., Chermette R. y Bretagne S. (2003). Differentiation between Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Breeding Turkeys and Their Environment by Genotyping with Microsatellite Markers. *J. Clin. Microbiol.* 41(4): 1798-1800.
- Land C.J., Hult K., Fuchs R., Hagelberg S. y Lundstrom H. (1987). Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus fumigatus* as a possible occupational health problem in sawmills. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 787-790.
- Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E. y Frisvad J.C. (2005). Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 22: 672-693.
- Latgé J.P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 310-350.
- Latgé J.P., Verweij P.E. y Bretagne S. (2000). Molecular typing of *Aspergillus fumigatus*. pp. 471-482. In R.A. Samson and J.I. Pitt (eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. Harwood Academic publisher, Amsterdam, the Netherlands.
- Latgé J.P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9, 382-389.
- Leong S.L., Hocking A.D. y Scott E.S. (2006). Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *Int. J. Food Microbiol.* 110(3): 209-16.
- Leslie C.E., Flannigan B., Milne L.J. (1988). Morphological studies on clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Vet. Mycol.* 26: 335-341.
- Leslie J.F. y Summerell B.A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Blackwell, Ames.
- Lewis R.E., Wiederhold N.P., Chi J., Han X.Y., Komanduri K.V., Kontoyiannis D.P. y col. (2005). Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect. Immun.* 73: 635-7.
- Lillehoj E.S. y Elling F. (1983). Environmental conditions that facilitate ochratoxin contamination of agricultural commodities. *Acta Agricola Scandinavica*, 33: 113-128.

- Lin D.M., Lehmann P.F., Hamory B.H., Padhye A.A., Durry E., Pinner R.W., Lasker B.A. (1995). Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1596-1601.
- Magan N., Hope R., Cairns V. y Aldred D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 723-730.
- Magnoli C., Dalcero A., Chiacchiera S.M., Miazzo R. y Sáenz M. (1998). Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia* 142: 27-32.
- Magnoli C., Chiacchiera S. M., Miazzo R., Palacio G., Angeletti A., Hallak C. y Dalcero A., (2002). The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Cordoba, Argentina. *Mycotoxin Res.* 18: 7-22.
- Magnoli C., Hallak C., Astoreca A., Ponsone L., Chiacchiera S.M., Palacio G y Dalcero A. (2005). Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin A in feedstuffs from Córdoba Province, Argentina. *Vet Res Commun.* 29(5): 431-45.
- Magnoli C.E., Cavaglieri L.R., Rosa C.A.R y Dalcero A.M. (2010). Mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed in South American countries. *En: Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons* (Eds). India. pp. 229-250.
- Malloch D. y Cain R.F. (1972). The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Can. J. Bot.* 50: 2613-2628.
- Marr K.A., Patterson T. y Denning D. (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 16: 875-894.
- Martínez W.O. (1995). Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. *Agronomía Colombiana*. Volumen XII, n° 1 p. 66-71.
- Martins M.L., Martins H.M. y Bernardo F. (2003). Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias*, 98: 179-183.
- Matsuda H, Kohno S., Maesaki S., Yamada H., Koga H., Tamura M., Kuraishi H. y Sugiyama J. (1992). Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1999-2005.
- Merry R.J., Lowes K.F. y Winters A. (1997). Current and future approaches to biocontrol in silage. *En: Jambor y col.* 1997, p. 17-27.
- Ministerio de Industria Presidencia de la Nación (2012). Capítulo II. "Cadena de valor de alimentos". Cadena de valor avícola. Cadena de valor láctea. Cadena de valor porcina. Publicación entera, imprenta 2012 pp. 47-105.

- Montenegro G., Sánchez Puch S., Jewtuchowicz, V.M., Pinoni, M.V., Reloso, S. y col. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *J. Med. Microbiol.* 58: 391-395.
- Morgavi D.P., Boudra H., Jouany J.P y Michalet-Doreau B. (2004). Effect and stability of gliotoxina, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on *in vitro* rumen fermentation. *Food Addit. Contam.* 21: 871-878.
- Moss M.O. (1991). Mycology of cereal grain and cereal products. En: Cereal grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and storage. Chelkowski J., (ed.). Elsevier, Amsterdam.
- Mulé G., Susca A., Logrieco A., Stea G. y Visconti A. (2006). Development of a quantitative real-time PCR assay for the detection of *Aspergillus carbonarius* in grapes. *Int J Food Microbiol* 111: 28-34.
- Murayama T., Amitani R., Ikegami Y., Nawada R., Lee W.J. y Kuze F. (1996). Suppressive effects of *Aspergillus fumigatus* culture filtrates on human alveolar macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *Eur. Respir. J.* 9:293-300.
- Nicolas J.A., Loubet R., Pestre-Alexandre M. y col. (1985) Les pneumopathies à *Aspergillus fumigatus* chez le mouton, synthèse d'observations. *Point Vét.* 17: 180-182.
- Nieminen S., Maki-Paakkanen J., Hirvonen M., Roponen M., y Von Wright A. (2002). Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in: a battery of short-term test systems. *Mutat. Res.* 520:161-170.
- Nwagu T.N. y Okolo B.N. (2011). Growth profile and amylolytic activity of a thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus* isolated from soil. *Asian J. Biotechnol.* 3(1): 46-57.
- Oshero N. (2007). The virulence of *Aspergillus fumigatus*. In: Kavanagh K, editor. New insights in medical mycology. Springer: 185-212.
- Osuna O. (1989). Control de las micotoxicosis en el campo avícola. Memorias "Curso de Actualización sobre Micotoxicosis Aviar", ANECA, México. pp. 82-89.
- Otero A.A., De la Cruz M. y Oyama K. (1997). El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 60: 85-117.
- Oude Elferink S.J.W.H., Driehuis F., Gottschal J.C.y Spoelstra S.F. (2001). Los procesos de fermentación del ensilaje y su manipulación. En: L.'t Mannetje. Uso del Ensilaje en el Trópico Privilegiando Opciones para Pequeños Campesinos. Memorias de la Conferencia Electrónica de la FAO sobre el Ensilaje en los Trópicos 1999.
- Oxilia H.G., Oxilia R.G. y Falco F. (2007). Aspergilosis: puesta al día de una patología a considerar. Anuario Fundación Dr. J.R. Villavicencio 2007, N° XV, pp. 240-245.
- Pahl H., Kraub B., Schulze-Osthoff K., Decker T., Traenckner E.B.M., Vogt M., Myers C. y col. (1996). The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF- κ B. *J. Exp. Med.* 183: 1829-1840.

- Paisley D., Robson G.D. y Denning D.W. (2005). Correlation between in vitro growth rate and in vivo virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 43: 397-401.
- Pardo E., Marín S., Sanchis V. y Ramos A.J. (2005). Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiol.* 22: 383-389.
- Parker P.G., Snow A.A., Schug M.D., Booton G.C. y Fuerst P.A. (1998). What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79:361-382.
- Patterson R.R.M. y Damoglou A.P. (1986). The effect of water activity and pH on the production of mycotoxins by fungi growing on bread analogue. *Lett. Appl. Microbiol.* 3: 123-125.
- Pellegrino M., Alonso V., Vissio C., Larriestra A., Chiacchiera S.M., Bogni C. and Cavaglieri L. (2013). Gliotoxinogenic *Aspergillus fumigatus* in the dairy herd environment. *Mycotoxin Res.* 29(2): 71-8.
- Pena G.A., Pereyra C.M., Armando M.R., Chiacchiera S.M., Magnoli C.E., Orlando J.L., Dalcero A.M., Rosa C.A.R. y Cavaglieri L.R. (2010). *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feed stuff for domestic animals and pets in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 77-81.
- Pepin G.A. (1988). Udder infections in cattle and goats caused by filamentous fungi. En: Torres-Rodriguez J.M. (Ed.) *Proceedings of the X Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*. Barcelona, *J.R. Prous Science* pp.313-317.
- Pereyra C.M., Alonso V.A., Fernández-Juri M.G., Gonzalez Pereyra M.L., Chiacchiera S.M., Rosa C.A.R., Dalcero A.M. y Cavaglieri L.R. (2007). Monitoreo de *Aspergillus fumigatus* y sus metabolitos tóxicos en alimentos destinados a animales de producción y mascotas. *Revista Higiene Alimentar*, volumen 21- nº 150. ISSN0101-9171.
- Pereyra C., Pena G., Cavaglieri L., Alonso V., Chiacchiera S. y Dalcero A. (2008a). Influencia del procesamiento de alimento balanceado destinado a producción avícola sobre la microbiota e incidencia de ocratoxina A. *Rev. Cién. Vida. Seropédica*, RJ, EDUR, v. 28, 123-125.
- Pereyra C.M., Alonso V.A., Rosa C.A.R., Chiacchiera S.M., Dalcero A.M. y Cavaglieri L.R. (2008b). Gliotoxin natural incidence of *Aspergillus fumigatus* isolated from corn silage and ready dairy cattle feed. *World Mycotoxin J.* 1(4), 457-462.
- Pérez V., Corpa J.M., García-Marín J.F., Adúriz J.J. y Jensen H.E. (1998). Mammary and systemic aspergillosis in dairy sheep. *Vet. Pathol.* 35: 235-240.
- Peterson S.W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia* 100(2): 205-226.
- Peterson S.W., Varga J., Frisvad J.C. y Samson R.A. (2008). Phylogeny and subgeneric taxonomy of *Aspergillus*. En: Varga J. y Samson R.A. (eds). *Aspergillus in the Genomic Era*. Wageningen, Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, pp. 33-56.

- Pinto de Almeida Castro, A. Generalidades de la Producción Lechera en Argentina. En: *Introducción a la producción agropecuaria/Documentos/2012*. Publicación de la Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad Nacional del centro de la Provincia de Buenos Aires (en línea) 2012, (citado en Marzo de 2014). Disponible en internet: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Introduccion%20a%20la%20produccion%20agropecuaria/Documentos/2012/Produccion%20Bovinos%20de%20Leche%20Resumen.pdf>
- Pitt J.I. (1979). The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromices*. London, UK; Academic Press.
- Pitt J.I. (1994). The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *Med. Mycol.* 32: 17-32.
- Pitt J.I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.* 38:(Suppl. 1): 17-22.
- Pitt J.I. (2002). Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species, in: *Mycotoxins and Food Safety*. J. W. DeVries, M. W. Trucksess, and L. S. Jackson., eds, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, pp. 29-41.
- Pitt J.I. y Hocking A.D. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic Press, London. 2nd edition.
- Ramírez M.L., Pascale M., Chulze S., Reynoso M.M., March G., Visconti A. (1996). Natural occurrence of fumonisins and their correlation to *Fusarium* contamination in commercial corn hybrids growth in Argentina. *Mycopathologia* 135: 29-34.
- Raper K.B. y Fennell D.I. (1965). The Genus *Aspergillus*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Rath P.M., Ratjen F. y Ansorg R. (1997). Genetic diversity among isolates of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *Zentralbl. Bakteriol.* 285: 450-455.
- Reddy A.R., Reddy V.R., Rao P.V. y Yadagri B. (1982). Effect of experimentally induced aflatoxicosis on the performance of commercial broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 52: 405-410.
- Reeves E., Messina C., Doyle S. y Kavanagh K. (2004). Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* en *Galleria mellonella*. *Mycopathologia* 158: 73-79.
- Reiter R.S., Rafalski J.A., Tingey S.V. y Scolnick P.A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 1477-1481.
- Reyes-Velázquez W.P., Espinoza V.H.I., Rojo F., Jiménez C., de Lucas E., Hernández, J. y Ramírez-Álvarez A. (2008). Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 182-185.
- Rhodes J.C. (2006). *Aspergillus fumigatus*: growth and virulence. *Med. Mycol.* 44 (1): S77-81.
- Richard E., Heutte N., Sage L., Pottier D., Bouchart V., Lebailly P. y Garon D. (2007). Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food Chem. Toxicol.* 45: 2420-2425.

- Richard J.L., Dvorak T.J. y Ross P.F. (1996). Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Mycopathologia*. 134: 167-70.
- Rinyu E., Varga J. y Ferenczy L. (1995) Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2567-2575.
- Rohlf F.J. (1990). Fitting curves to outlines. In: F. J. Rohlf y F. L. Bookstein (eds), Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Spec. Publ. No. 2. University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, pp. 167-177.
- Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz B.G., Jahoor A., Powell W. y Waugh R. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
- Sabater-Vilar M., Nijmeijer S. y Fink-Gremmels J. (2003). Genotoxicity assessment of five tremorgenic mycotoxins (fumitremorgen B, paxilline, penitrem A, verruculogen, and verrucosidin) produced by molds isolated from fermented meats. *J. Food Protect.* 66: 2123-2129.
- SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación) (2013a). Boletín Porcino Julio 2013. [http://64.76.123.202/site/ganaderia/porcinos/02-Infornes/archivos/000001-Boletines/000000 Boletín%20Porcino%20\(Agosto%20%202013\).pdf](http://64.76.123.202/site/ganaderia/porcinos/02-Infornes/archivos/000001-Boletines/000000%20Boletin%20Porcino%20(Agosto%20%202013).pdf)
- SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación) (2013b). Subsecretaría de Lechería. Lechería. Estadísticas 2012. http://64.76.123.202/site/subsecretaria_de_lecheria/lecheria/07 Estad%C3%ADsticas/index.php
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (2000). Introduction to Food and Airborne Fungi. The Netherlands: Centralbureau Voorshimmelculturs-Utrecht, Ponson & Looyen, Wageningen Press.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. (eds) (2004a). Introduction to Food and Airborne Fungi. 7th ed. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Samson R.A., Houbraken J.A.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M. y Frisvad J.C. (2004b). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud. Mycol.* 50: 45-61.
- Samson, R.A., Hong S.B., Frisvad J.C., (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Med. Mycol.* 44: 133-148.
- Samson R.A, Hong S., Peterson S.W., Frisvad J.C. y Varga J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud. Mycol.* 59: 147-203.
- Samson R.A. y Varga J. (2009). What is a species in *Aspergillus*?, *Med. Mycol.*, S1-S8, First article.

- Sanger F., Nicklen S., Coulson y A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.
- Scharf D.H., Heinekamp T., Remme N., Hortschansky P., Brakhage A.A. y Hertweck C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 467-472.
- Schmidt A. y Wolff M.H. (1997). Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples. *Mycoses* 40: 347-351.
- Segal B.H. (2009). Aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* 360:1870-84.
- Semighini C.P., Delmas G., Park S., Armstrong D., Perlin D. y Goldman G.H. (2001) New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 31: 15-19.
- Shetty P.H., Hald B. y Jespersen L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 41-46.
- Simpson J. (1997). Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 60: 73-76.
- Smith J.M. (1989). Opportunistic mycoses of man and other animals. Wallingford, Oxon, UK, CAB International Mycological Institute.
- Sociedad Rural de Río Cuarto. La Importancia Agrícola y Ganadera del Departamento Río Cuarto. Publicación de la Sociedad Rural de Río Cuarto (sitio no oficial). En línea (citado en Marzo de 2014). Disponible en internet: http://www.imperiorural.com.ar/imperio/estructura/miriam%20archivos/SRRC/srrc_01.htm#mpoagrigandpto-txt
- Staab J.F., Balajee S.A. y Marr K.A. (2009) *Aspergillus* section *Fumigati* typing by PCR-Restriction Fragment Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2079-2083.
- Stanzani M., Orciuolo E., Lewis R., Kontoyiannis D., Martins S., St. John L., y Komanduri K. (2005). *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood* 105: 2258-2265.
- Sulyok M., Krska R. y Schuhmacher R. (2007). A liquid chromatography/tándem mass spectrometric multimycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal Bioanal Chem.* 389:1505-1523.
- Swofford DL (2001). PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4.0*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Tammer B., Lehmann I., Nieber K., Altenburger R., (2007). Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function. *Toxicol Lett.* 170: 124-133.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

- Tekaia F. y Latgé J.P. (2005). *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 385-392.
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T.J. (1994). Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tibayrenc M. (2006). The species concept in parasites and other pathogens: a pragmatic approach? *Trends Parasitol.* 22: 66-70.
- Upperman J., Pokota D., Zhang X., Wong K., Zamora R. y Ford H. (2003). Mechanism of intestinal-derived fungal sepsis by gliotoxin, a fungal metabolite. *J. Pediatr. Surg.* 38:966-970.
- Valadez E. y Kahl. G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Varga J. y Samson R.A. (eds). (2008). *Aspergillus in the Genomic Era*. Wageningen, Wageningen Academic Publishers.
- Varga J., Toth B., Rigo K., Debets F. y Kozakiewicz Z. (2000a). Genetic variability within the *Aspergillus viridinutans* species. *Folia Microbiol.* 45: 423-428.
- Varga J., Vida Z., Toth B., Debets F. y Horie Y. (2000b). Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 235-239.
- Varga J., Kevei F., Hamari Z., Tóth B., Téren J. y col. (2000c). Genotypic and phenotypic variability among black *Aspergilli*. En: *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (Samson R.A., Pitt J.I., Eds.). Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 397-411.
- Varga J. y Tóth B. Genetic variability and reproductive mode of *Aspergillus fumigatus* (2003). *Infect Genet Evol.* 3(1): 3-17.
- Verweij P.E., Meis J.F.G.M., Sarfati J., Hoogkamp-Korstanje J.A.A., Latgé J.-P. y Melchers W. (1996) Genotypic characterization of sequential *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2595-2597.
- Vinh D.C., Shea Y.R., Sugui J.A., Parrilla-Castellar E.R., Freeman A.F., Campbell J.W., y col. (2009a). Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clin. Infect. Dis.* 49(1): 102-11.
- Wangikar P.B., Dwivedi P., Sinha N., Sharma A.K., Telang A.G. (2005). Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1 with special reference to microscopic effects. *Toxicology* 215: 37-47.
- Waring P., Eichner R., Mullbacher A. y Sjaarda A. (1988). Gliotoxin induces apoptosis in macrophages unrelated to its antiphagocytic properties. *J. Biol. Chem.* 263:18493-18499.

- Watanabe A., Kamei K., Sekine T., Waku M., Nishilura K., Miyaji M. y Kuriyama T. (2003). Immunosuppressive substances in *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *J. Infect. Chemother.* 9: 114-121.
- Watanabe A, Kamei K, Sekine T, Waku M, Nishimura K, Miyaji M, Tatsumi K, Kuriyama T (2004). Effect of aeration on gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate. *Mycopathologia* 157: 245-254.
- Weinberg Z.G. y Muck R.E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 53-68.
- Whitkus R., Doebley J. y Wendel J.F. (1994). Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: Phillips R.L. y J.K. Vasil (ed.). DNA-based markers in plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 116-141.
- Willger S.D., Grahl N. y Cramer Jr. R.A. (2009). *Aspergillus fumigatus* metabolism: clues to mechanisms of in vivo fungal growth and virulence. *Med Mycol.* 47(Suppl1): S72-9.
- Williams J.G.K., Kubelik A.E., Levak K.J., Rafalski J.A. y Tingey S.C. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6335.
- Wilson D. (1995). Management of Mycotoxins in Peanut. Department of Plant Pathology. University of Georgia, Tifton, USA.
- Wilson D.M., Mubatanhema W. y Jurjevic Z. (2002). Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol.* 504: 3-17.
- Woo Bok J., Woon Chung D., Arunmozhi Balajee S., Marr A., Andes D., Nielsen K., Frisvad J., Kirby K. y Keller N. (2006). GliZ, a Transcriptional Regulator of Gliotoxin Biosynthesis, Contributes to *Aspergillus fumigatus* Virulence. *Infect. Immun.* 74(12): 6761-6768.
- Wood E. (1992). Mycotoxins in food and feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* 70: 3941-3949.
- Yaguchi T., Horie Y., Tanaka R., Matsuzawa T., Ito J. y Nishimura K. (2007). Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Jns. J. Med. Mycol.* 48: 37-46.
- Yamada A., Kataoka T. y Nagai K. (2000). The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol. Lett.* 71: 27-32.

ANEXO

ESTADÍSTICA

Tabla 1. Análisis de la varianza de la variable cepa.

<i>Variable Cepa</i>		Significancia estadística
Ensayo tensión de O ₂ normal	Fase de latencia	***
Ensayo tensión de O ₂ normal	Velocidad de crecimiento	*
37 °C	Fase de latencia	***
37 °C	Velocidad de crecimiento	**

*Valor $p < 0,05$. **valor $p < 0,01$. ***valor $p < 0,0001$.

Tabla 2. Test LSD de Fisher de los significancia individual de los diferentes parámetros de crecimiento sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de las cepas Af16 y *A. fumigatus* RC2108.

Tratamientos	Af16		<i>A. fumigatus</i> RC2108		
	Fase de latencia (h)	Velocidad de crecimiento (mm/h)	Fase de latencia (h)	Velocidad de crecimiento (mm/h)	
T	37	a	c	a	c
	25	b	b	b	b
	18	c	a	c	a
a _w	0,98	a	c	b	c
	0,95	b	b	c	b
	0,93	c	a	a	a
pH	9	a	a	a	a
	7	b	b	a	b
	5	c	b	b	a

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T: temperatura.

Tabla 3. Efecto de la interacción entre la temperatura, a_w y pH sobre la velocidad de crecimiento radial de las cepas *A. fumigatus* sensu stricto en estudio.

T (°C)	a_w	pH	Af16	<i>A. fumigatus</i> RC2108
			Velocidad de crecimiento (mm/h)	
			Media ± DS	Media ± DS
37	0,98	9	0,23 ± 0,003 n	0,21 ± 0,009 p
		7	0,24 ± 0,001 o	0,23 ± 0,004 q
		5	0,22 ± 0,001 m	0,19 ± 0,004 o
	0,95	9	0,12 ± 0,002 j	0,136 ± 0,01 l
		7	0,16 ± 0,002 l	0,18 ± 0,006 n
		5	0,15 ± 0,007 k	0,17 ± 0,005 m
	0,93	9	0,05 ± 0,001 g	0,08 ± 0,005 hi
		7	0,06 ± 0,002 g	0,09 ± 0,003 i
		5	0,09 ± 0,008 h	0,11 ± 0,005 j
25	0,98	9	0,12 ± 0,003 j	0,13 ± 0,006 l
		7	0,12 ± 0,006 j	0,12 ± 0,004 k
		5	0,11 ± 0,007 i	0,11 ± 0,01 j
	0,95	9	0,05 ± 0,002 f	0,06 ± 0,002 f
		7	0,05 ± 0,004 ef	0,07 ± 0 fg
		5	0,06 ± 0,002 g	0,08 ± 0,001 gh
	0,93	9	0,03 ± 0,001 c	0,03 ± 0 de
		7	0,03 ± 0,001 c	0,04 ± 0 e
		5	0,03 ± 0,0005 c	0,03 ± 0,002 cde
18	0,98	9	0,04 ± 0 d	0,04 ± 0 e
		7	0,04 ± 0 de	0,03 ± 0,0006 cd
		5	0,03 ± 0,0005 c	0,02 ± 0,0006 c
	0,95	9	0,01 ± 0,002 b	0,02 ± 0,0006 b
		7	0,01 ± 0,0005 b	0,02 ± 0,002 b
		5	0,01 ± 0 b	0,01 ± 0 b
	0,93	9	0 a	0 a
		7	0 a	0 a
		5	0 a	0 a

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T: temperatura. DS: desvío estándar. El análisis estadístico debe leerse por columna independientemente para cada cepa.

Tabla 4. Test LSD de Fisher de los significancia individual de los parámetros de crecimiento sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento radial de las cepas de *A. fumigatus sensu stricto*, a 37°C.

Tratamientos	Af16		<i>A. fumigatus</i> RC2108		
	Fase de latencia (h)	Velocidad de crecimiento (mm/h)	Fase de latencia (h)	Velocidad de crecimiento (mm/h)	
<i>a_w</i>	0,98	a	c	a	c
	0,95	b	b	b	b
	0,93	c	a	c	a
<i>pH</i>	9	c	a	c	a
	7	b	b	b	b
	5	a	b	a	b
<i>T°O₂</i>	reducida	b	b	a	b
	normal	a	a	a	a

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). *T°O₂*: tensión de oxígeno.

Tabla 5. Test LSD de Fisher de los significancia individual de las cepas y los diferentes parámetros de crecimiento sobre la producción de gliotoxina, a tensión de oxígeno normal.

Tratamientos		Gliotoxina
Cepa	<i>A. fumigatus</i> RC2108	b
	Af16	a
Días de incubación	3	c
	7	b
	14	a
	18	c
T (°C)	25	a
	37	b
	0,93	a
a_w	0,95	c
	0,98	b
	5	c
pH	7	b
	9	a

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T: temperatura.

Tabla 6. Test LSD de Fisher de los significancia individual de las cepas y los diferentes parámetros de crecimiento sobre la producción de gliotoxina a 37°C.

	Tratamientos	Gliotoxina
Cepa	<i>A. fumigatus</i> RC2108	a
	Af16	b
T°O ₂	reducida	b
	normal	a
Días de incubación	3	c
	7	a
	14	b
a _w	0,93	a
	0,95	c
	0,98	b
pH	5	c
	7	a
	9	b

Nota: Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). T°O₂: tensión de oxígeno.

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la fase de latencia de la cepa Af16 durante su desarrollo a tensión normal de oxígeno.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1239678,52	23	53899,07	332,15	<0,0001
Temperatura	720876,58	2	360438,29	2221,20	<0,0001
Actividad de agua	284893,15	2	142446,58	877,83	<0,0001
pH	2547,46	2	1273,73	7,85	0,0011
Temperatura*Actividad de a..	196867,02	3	65622,34	404,40	<0,0001
Temperatura*pH	24888,15	4	6222,04	38,34	<0,0001
Actividad de agua*pH	3276,50	4	819,13	5,05	0,0018
Temperatura*Actividad de a..	6329,66	6	1054,94	6,50	<0,0001
Error	7789,05	48	162,27		
Total	1247467,57	71			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,97088

Error: 162,2718 gl: 48

Temperatura Medias	n	E.E.	
37	40,74	27	2,45 A
25	113,53	27	2,45 B
18	457,75	27	8,84 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,97088

Error: 162,2718 gl: 48

A _w	Medias	n	E.E.	
0,98	70,53	27	2,45 A	
0,95	193,43	27	2,45 B	
0,93	348,05	27	8,84 C	

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=6,97088

Error: 162,2718 gl: 48

pH	Medias	n	E.E.	
9	185,32	27	5,48	A
7	202,75	27	5,48	B
5	223,95	27	5,48	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=20,91265

Error: 162,2718 gl: 48

Temperatura	A _w	pH	Medias	n	E.E.													
37	0,98	5	9,50	3	7,35	A												
37	0,98	9	12,45	3	7,35	A												
37	0,98	7	13,35	3	7,35	A	B											
25	0,98	5	33,95	3	7,35		B	C										
37	0,95	5	34,49	3	7,35			C										
37	0,95	7	36,58	3	7,35			C										
37	0,95	9	41,63	3	7,35			C	D									
25	0,98	9	51,73	3	7,35			C	D									
25	0,98	7	54,42	3	7,35			C	D									
37	0,93	5	58,47	3	7,35				D	E								
37	0,93	7	78,27	3	7,35					E	F							
37	0,93	9	81,90	3	7,35						F							
25	0,95	5	96,33	3	7,35						F							
25	0,95	9	104,02	3	7,35							G						
25	0,95	7	108,51	3	7,35							G						
18	0,98	9	138,65	3	7,35								G					H
18	0,98	7	139,71	3	7,35													H
18	0,98	5	181,06	3	7,35													I
25	0,93	7	182,09	3	7,35													I
25	0,93	5	190,13	3	7,35													I
25	0,93	9	200,60	3	7,35													I
18	0,95	9	366,02	3	7,35													J
18	0,95	7	443,66	3	7,35													K
18	0,95	5	509,59	3	7,35													L
18	0,93	9	670,90	3	43,51													M
18	0,93	7	768,16	3	43,51													N
18	0,93	5	901,97	3	43,51													O

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la velocidad de crecimiento de la cepa Af16 durante su desarrollo a tensión normal de oxígeno.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	26	0,02	1376,87	<0,0001
Temperatura	0,24	2	0,12	10525,07	<0,0001
A _w	0,12	2	0,06	5460,31	<0,0001
pH	4,6E-04	2	2,3E-04	19,98	<0,0001
Temperatura*A _w	0,04	4	0,01	805,63	<0,0001
Temperatura*pH	1,9E-03	4	4,7E-04	41,07	<0,0001
A _w *pH	2,4E-03	4	6,0E-04	52,82	<0,0001
Temperatura* A _w	2,2E-03	8	2,7E-04	23,72	<0,0001
Error	6,2E-04	54	1,1E-05		
Total	0,41	80			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00184

Error: 0,0000 gl: 54

Temperatura Medias	n	E.E.	
18	0,02	27	6,5E-04 A
25	0,06	27	6,5E-04 B
37	0,15	27	6,5E-04 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00184

Error: 0,0000 gl: 54

A _w Medias	n	E.E.	
0,93	0,03	27	6,5E-04 A
0,95	0,07	27	6,5E-04 B
0,98	0,13	27	6,5E-04 C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00184

Error: 0,0000 gl: 54

pH	Medias	n	E.E.	
9	0,07	27	6,5E-04	A
5	0,08	27	6,5E-04	B
7	0,08	27	6,5E-04	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00553

Error: 0,0000 gl: 54

Temperatura	A _w	pH	Medias	n	E.E.						
18	0,93	9	0,00	3	2,0E-03	A					
18	0,93	7	0,00	3	2,0E-03	A					
18	0,93	5	0,00	3	2,0E-03	A					
18	0,95	5	0,01	3	2,0E-03		B				
18	0,95	7	0,01	3	2,0E-03		B				
18	0,95	9	0,01	3	2,0E-03		B				
25	0,93	9	0,03	3	2,0E-03			C			
25	0,93	5	0,03	3	2,0E-03			C			
18	0,98	5	0,03	3	2,0E-03			C			
25	0,93	7	0,03	3	2,0E-03			C			
18	0,98	9	0,04	3	2,0E-03				D		
18	0,98	7	0,04	3	2,0E-03				D	E	
25	0,95	7	0,05	3	2,0E-03					E	
25	0,95	9	0,05	3	2,0E-03						F
37	0,93	9	0,05	3	2,0E-03						F
25	0,95	5	0,06	3	2,0E-03						G
37	0,93	7	0,06	3	2,0E-03						G
37	0,93	5	0,09	3	2,0E-03						G
25	0,98	5	0,11	3	2,0E-03						H
25	0,98	7	0,12	3	2,0E-03						I
37	0,95	9	0,12	3	2,0E-03						J
25	0,98	9	0,12	3	2,0E-03						J
37	0,95	5	0,15	3	2,0E-03						K
37	0,95	7	0,16	3	2,0E-03						L
37	0,98	5	0,22	3	2,0E-03						M
37	0,98	9	0,23	3	2,0E-03						N
37	0,98	7	0,24	3	2,0E-03						O

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la fase de latencia de la cepa *A. fumigatus* RC2108 durante su desarrollo a tensión normal de oxígeno

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	704326,75	26	27089,49	552,51	<0,0001
Temperatura	219110,60	2	109555,30	2234,48	<0,0001
A _w	70053,40	2	35026,70	714,40	<0,0001
pH	892,19	2	446,10	9,10	0,0004
Temperatura* A _w	408555,08	4	102138,77	2083,21	<0,0001
Temperatura*pH	2042,66	4	510,67	10,42	<0,0001
A _w *pH	1047,38	4	261,85	5,34	0,0011
Temperatura* A _w	2625,42	8	328,18	6,69	<0,0001
Error	2647,59	54	49,03		
Total	706974,34	80			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,82076

Error: 49,0294 gl: 54

Temperatura	Medias	n	E.E.	
37	30,15	27	1,35	A
25	94,06	27	1,35	B
18	157,55	27	1,35	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,82076

Error: 49,0294 gl: 54

A _w	Medias	n	E.E.	
0,93	71,20	27	1,35	A
0,98	75,12	27	1,35	B
0,95	135,45	27	1,35	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,82076

Error: 49,0294 gl: 54

pH	Medias	n	E.E.	
9	91,01	27	1,35	A
7	92,19	27	1,35	A
5	98,56	27	1,35	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=11,46228

Error: 49,0294 gl: 54

Temperatura	A _w	pH	Medias	n	E.E									
18	0,93	9	0,00	3	4,04	A								
18	0,93	7	0,00	3	4,04	A								
18	0,93	5	0,00	3	4,04	A								
37	0,98	7	5,25	3	4,04	A								
37	0,98	9	5,75	3	4,04	A								
37	0,98	5	7,57	3	4,04	A								
37	0,95	7	21,95	3	4,04		B							
37	0,95	5	22,27	3	4,04		B							
37	0,95	9	28,77	3	4,04		B							
25	0,98	9	46,63	3	4,04			C						
25	0,98	5	49,38	3	4,04			C	D					
25	0,98	7	49,56	3	4,04			C	D					
37	0,93	5	53,79	3	4,04			C	D					
37	0,93	7	60,36	3	4,04				D					
37	0,93	9	65,65	3	4,04					E				
25	0,95	5	74,13	3	4,04					E	F			
25	0,95	7	81,01	3	4,04						F			
25	0,95	9	84,89	3	4,04							G		
25	0,93	7	141,45	3	4,04								G	
18	0,98	9	144,01	3	4,04									H
25	0,93	9	149,06	3	4,04									H
25	0,93	5	170,46	3	4,04									H
18	0,98	7	170,86	3	4,04									I
18	0,98	5	197,05	3	4,04									I
18	0,95	9	294,31	3	4,04									J
18	0,95	7	299,29	3	4,04									K
18	0,95	5	312,42	3	4,04									K
18	0,95	5	312,42	3	4,04									L

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *A. fumigatus* RC2108 durante su desarrollo a tensión normal de oxígeno

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,38	26	0,01	591,34	<0,0001
Temperatura	0,27	2	0,13	5393,10	<0,0001
A _w	0,09	2	0,04	1737,21	<0,0001
pH	7,6E-04	2	3,8E-04	15,30	<0,0001
Temperatura*A _w	0,02	4	4,9E-03	195,57	<0,0001
Temperatura*pH	2,1E-03	4	5,2E-04	20,77	<0,0001
A _w *pH	3,1E-03	4	7,7E-04	30,80	<0,0001
Temperatura* A _w	2,4E-03	8	3,0E-04	11,87	<0,0001
Error	1,3E-03	54	2,5E-05		
Total	0,38	80			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00273

Error: 0,0000 gl: 54

Temperatura	Medias	n	E.E.	
18	0,02	27	9,6E-04	A
25	0,08	27	9,6E-04	B
37	0,16	27	9,6E-04	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00273

Error: 0,0000 gl: 54

A _w	Medias	n	E.E.	
0,93	0,04	27	9,6E-04	A
0,95	0,08	27	9,6E-04	B
0,98	0,12	27	9,6E-04	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00273

Error: 0,0000 gl: 54

pH	Medias	n	E.E.	
9	0,08	27	9,6E-04	A
5	0,08	27	9,6E-04	A
7	0,09	27	9,6E-04	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00818

Error: 0,0000 gl: 54

Temperatura	A _w	pH	Medias	n	E.E.															
18	0,93	5	0,00	3	2,9E-03	A														
18	0,93	9	0,00	3	2,9E-03	A														
18	0,93	7	0,00	3	2,9E-03	A														
18	0,95	5	0,02	3	2,9E-03	B														
18	0,95	7	0,02	3	2,9E-03	B														
18	0,95	9	0,02	3	2,9E-03	B														
18	0,98	5	0,03	3	2,9E-03		C													
18	0,98	7	0,03	3	2,9E-03		C	D												
25	0,93	5	0,03	3	2,9E-03		C	D	E											
25	0,93	9	0,04	3	2,9E-03			D	E	E										
18	0,98	9	0,04	3	2,9E-03				E	E										
25	0,93	7	0,04	3	2,9E-03				E											
25	0,95	9	0,07	3	2,9E-03					F										
25	0,95	7	0,07	3	2,9E-03					F	G									
25	0,95	5	0,08	3	2,9															
37	0,93	9	0,08	3	2,9E-03													H	I	
37	0,93	7	0,09	3	2,9E-03														I	
37	0,93	5	0,11	3	2,9E-03													J		
25	0,98	5	0,11	3	2,9E-03						J									
25	0,98	7	0,12	3	2,9E-03													K		
25	0,98	9	0,13	3	2,9E-03															L
37	0,95	9	0,14	3	2,9E-03															L
37	0,95	5	0,17	3	2,9E-03															M
37	0,95	7	0,18	3	2,9E-03															N
37	0,98	5	0,19	3	2,9E-03															O
37	0,98	9	0,21	3	2,9E-03															P
37	0,98	7	0,23	3	2,9E-03															Q

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la fase de latencia de la cepa Af16 a 37 °C de incubación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31905,66	17	1876,80	401,39	<0,0001
a _w	29626,20	2	14813,10	3168,07	<0,0001
pH	862,75	2	431,38	92,26	<0,0001
tensión O2	236,86	1	236,86	50,66	<0,0001
a _w *pH	699,08	4	174,77	37,38	<0,0001
a _w *tensión O2	366,45	2	183,23	39,19	<0,0001
pH*tensión O2	40,18	2	20,09	4,30	0,0212
a _w *pH*tensión O2	74,13	4	18,53	3,96	0,0091
Error	168,33	36	4,68		
Total	32073,99	53			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,46181

Error: 4,6757 gl: 36

a _w	Medias	n	E.E.	
1	13,25	18	0,51	A
2	32,92	18	0,51	B
3	69,76	18	0,51	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,46181

Error: 4,6757 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
3	33,26	18	0,51	A
2	39,84	18	0,51	B
1	42,83	18	0,51	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,19357

Error: 4,6757 gl: 36

Tensión O2	Medias	n	E.E.	
1	36,55	27	0,42	A
2	40,74	27	0,42	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,53194

Error: 4,6757 gl: 36

a _w	pH	Medias	n	E.E.					
1	3	11,95	6	0,88	A				
1	1	13,46	6	0,88	A				
1	2	14,34	6	0,88	A				
2	3	30,07	6	0,88		B			
2	2	32,99	6	0,88			C		
2	1	35,70	6	0,88				D	
3	3	57,76	6	0,88					E
3	2	72,19	6	0,88					F
3	1	79,33	6	0,88					G

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,06732

Error: 4,6757 gl: 36

a _w	tensión O2	Medias	n	E.E.					
1	2	11,77	9	0,72	A				
1	1	14,73	9	0,72		B			
2	1	28,27	9	0,72			C		
2	2	37,57	9	0,72				D	
3	1	66,64	9	0,72					E
3	2	72,88	9	0,72					F

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,06732

Error: 4,6757 gl: 36

pH	tensión O2	Medias	n	E.E.					
3	1	32,36	9	0,72	A				
3	2	34,16	9	0,72	A				
2	1	36,95	9	0,72		B			
1	1	40,34	9	0,72			C		
2	2	42,73	9	0,72				D	
1	2	45,32	9	0,72					E

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=3,58070

Error: 4,6757 gl: 36

a _w	pH	tensión O2	Medias	n	E.E.				
1	3	2	9,50	3	1,25	A			
1	1	2	12,45	3	1,25	A	B		
1	2	2	13,35	3	1,25	B			
1	3	1	14,39	3	1,25	B			
1	1	1	14,46	3	1,25	B			
1	2	1	15,34	3	1,25	B			
2	3	1	25,66	3	1,25	C			
2	2	1	29,39	3	1,25	D			
2	1	1	29,77	3	1,25	D			
2	3	2	34,49	3	1,25	E			
2	2	2	36,58	3	1,25	E			
2	1	2	41,63	3	1,25	F			

3	3	1	57,05	3	1,25	G
3	3	2	58,47	3	1,25	G
3	2	1	66,11	3	1,25	H
3	1	1	76,77	3	1,25	I
3	2	2	78,27	3	1,25	I
3	1	2	81,90	3	1,25	J

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la velocidad de crecimiento de la cepa Af16 a 37 °C de incubación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,56	17	0,03	2913,65	<0,0001
A _w	0,48	2	0,24	21111,74	<0,0001
pH	2,3E-03	2	1,1E-03	99,89	<0,0001
tensión O2	0,03	1	0,03	2676,85	<0,0001
A _w *pH	3,1E-03	4	7,8E-04	69,17	<0,0001
A _w *tensión O2	0,05	2	0,02	2007,20	<0,0001
pH*tensión O2	3,4E-04	2	1,7E-04	15,05	<0,0001
A _w *pH*tensión O2	1,3E-03	4	3,1E-04	27,67	<0,0001
Error	4,1E-04	36	1,1E-05		
Total	0,56	53			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00227

Error: 0,0000 gl: 36

A _w	Medias	n	E.E.	
3	0,07	18	7,9E-04	A
2	0,15	18	7,9E-04	B
1	0,29	18	7,9E-04	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00227

Error: 0,0000 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
1	0,16	18	7,9E-04	A
3	0,18	18	7,9E-04	B
2	0,18	18	7,9E-04	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00186

Error: 0,0000 gl: 36

Tensión O2	Medias	n	E.E.	
2	0,15	27	6,5E-04	A
1	0,20	27	6,5E-04	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00394

Error: 0,0000 gl: 36

A _w	pH	Medias	n	E.E.				
3	1	0,05	6	1,4E-03	A			
3	2	0,06	6	1,4E-03		B		
3	3	0,08	6	1,4E-03			C	
2	1	0,14	6	1,4E-03				D
2	3	0,16	6	1,4E-03				E
2	2	0,16	6	1,4E-03				F
1	3	0,29	6	1,4E-03				G
1	1	0,29	6	1,4E-03				H
1	2	0,30	6	1,4E-03				I

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00322

Error: 0,0000 gl: 36

A _w	tensión O2	Medias	n	E.E.				
3	1	0,06	9	1,1E-03	A			
3	2	0,07	9	1,1E-03		B		
2	2	0,14	9	1,1E-03			C	
2	1	0,16	9	1,1E-03				D
1	2	0,23	9	1,1E-03				E
1	1	0,36	9	1,1E-03				F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00322

Error: 0,0000 gl: 36

pH	tensión O2	Medias	n	E.E.				
1	2	0,14	9	1,1E-03	A			
2	2	0,15	9	1,1E-03		B		
3	2	0,15	9	1,1E-03		B		
1	1	0,19	9	1,1E-03			C	
3	1	0,20	9	1,1E-03				D
2	1	0,20	9	1,1E-03				D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00557

Error: 0,0000 gl: 36

A _w	pH	tensión O2	Medias	n	E.E.	
3	1	1	0,05	3	1,9E-03	A
3	1	2	0,05	3	1,9E-03	A
3	2	2	0,06	3	1,9E-03	A
3	2	1	0,06	3	1,9E-03	B

3	3	1	0,07	3	1,9E-03	C
3	3	2	0,09	3	1,9E-03	D
2	1	2	0,12	3	1,9E-03	E
2	3	2	0,15	3	1,9E-03	F
2	1	1	0,16	3	1,9E-03	G
2	2	2	0,16	3	1,9E-03	GH
2	3	1	0,16	3	1,9E-03	H
2	2	1	0,17	3	1,9E-03	H
1	3	2	0,22	3	1,9E-03	J
1	2	2	0,24	3	1,9E-03	K
1	3	1	0,35	3	1,9E-03	L
1	1	1	0,36	3	1,9E-03	L
1	2	1	0,36	3	1,9E-03	M

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la fase de latencia de la cepa *A. fumigatus* RC2108 a 37 °C de incubación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	24137,84	17	1419,87	473,55	<0,0001
a_w	23032,91	2	11516,46	3840,93	<0,0001
pH	246,60	2	123,30	41,12	<0,0001
tensión O2	3,52	1	3,52	1,17	0,2856
a_w *pH	428,62	4	107,16	35,74	<0,0001
a_w *tensión O2	300,00	2	150,00	50,03	<0,0001
pH*tensión O2	50,72	2	25,36	8,46	0,0010
a_w *pH*tensión O2	75,46	4	18,86	6,29	0,0006
Error	107,94	36	3,00		
Total	24245,78	53			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,17060

Error: 2,9984 gl: 36

a_w	Medias	n	E.E.	
1	9,78	18	0,41	A
2	22,81	18	0,41	B
3	58,63	18	0,41	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,17060

Error: 2,9984 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
3	27,61	18	0,41	A
2	30,80	18	0,41	B
1	32,80	18	0,41	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,95579

Error: 2,9984 gl: 36

Tensión O2	Medias	n	E.E.	
2	30,15	27	0,33	A
1	30,66	27	0,33	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,02754

Error: 2,9984 gl: 36

a _w	pH	Medias	n	E.E.					
1	2	9,46	6	0,71	A				
1	1	9,51	6	0,71	A				
1	3	10,36	6	0,71	A				
2	2	21,81	6	0,71		B			
2	3	22,11	6	0,71		B			
2	1	24,52	6	0,71			C		
3	3	50,37	6	0,71				D	
3	2	61,13	6	0,71					E
3	1	64,38	6	0,71					F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,65548

Error: 2,9984 gl: 36

a _w	tensión O2	Medias	n	E.E.					
1	2	6,19	9	0,58	A				
1	1	13,36	9	0,58		B			
2	1	21,30	9	0,58			C		
2	2	24,33	9	0,58				D	
3	1	57,32	9	0,58					E
3	2	59,93	9	0,58					F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,65548

Error: 2,9984 gl: 36

pH	tensión O2	Medias	n	E.E.				
3	1	27,35	9	0,58	A			
3	2	27,88	9	0,58	A	B		
2	2	29,19	9	0,58		B		
1	1	32,22	9	0,58			C	
2	1	32,42	9	0,58			C	
1	2	33,39	9	0,58			C	

Letras distintas indican diferencias significativas ($p <= 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,86737

Error: 2,9984 gl: 36

a _w	pH	tensión O2	Medias	n	E.E.	
1	2	2	5,25	3	1,00	A
1	1	2	5,75	3	1,00	A
1	3	2	7,57	3	1,00	A
1	3	1	13,16	3	1,00	B
1	1	1	13,27	3	1,00	B
1	2	1	13,67	3	1,00	B
2	1	1	20,27	3	1,00	C
2	2	1	21,68	3	1,00	C
2	2	2	21,95	3	1,00	C
2	3	1	21,95	3	1,00	C
2	3	2	22,27	3	1,00	C
2	1	2	28,77	3	1,00	D
3	3	1	46,95	3	1,00	E
3	3	2	53,79	3	1,00	F
3	2	2	60,36	3	1,00	G
3	2	1	61,90	3	1,00	G
3	1	1	63,11	3	1,00	GH
3	1	2	65,65	3	1,00	H

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la velocidad de crecimiento de la cepa *A. fumigatus* RC2108 a 37 °C de incubación

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,54	17	0,03	176,05	<0,0001
a _w	0,38	2	0,19	1041,14	<0,0001
pH	1,3E-03	2	6,7E-04	3,70	0,0346
tensión O2	0,09	1	0,09	496,50	<0,0001
a _w *pH	3,6E-03	4	8,9E-04	4,91	0,0029
a _w *tensión O2	0,07	2	0,03	180,83	<0,0001
pH*tensión O2	1,6E-03	2	8,0E-04	4,41	0,0194
a _w *pH*tensión O2	3,0E-03	4	7,5E-04	4,14	0,0073
Error	0,01	36	1,8E-04		
Total	0,55	53			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00910

Error: 0,0002 gl: 36

a _w	Medias	n	E.E.	
3	0,10	18	3,2E-03	A
2	0,19	18	3,2E-03	B
1	0,30	18	3,2E-03	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00910

Error: 0,0002 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
1	0,19	18	3,2E-03	A
3	0,20	18	3,2E-03	B
2	0,20	18	3,2E-03	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,00743

Error: 0,0002 gl: 36

Tensión O2	Medias	n	E.E.	
2	0,16	27	2,6E-03	A
1	0,24	27	2,6E-03	B

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01576

Error: 0,0002 gl: 36

a _w	pH	Medias	n	E.E.				
3	1	0,08	6	0,01	A			
3	2	0,09	6	0,01	A			
3	3	0,11	6	0,01		B		
2	1	0,19	6	0,01			C	
2	3	0,19	6	0,01			C	D
2	2	0,20	6	0,01				D
1	3	0,29	6	0,01				E
1	1	0,30	6	0,01				E
1	2	0,31	6	0,01				F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01287

Error: 0,0002 gl: 36

a _w	tensión O2	Medias	n	E.E.				
3	2	0,09	9	4,5E-03	A			
3	1	0,10	9	4,5E-03	A			
2	2	0,16	9	4,5E-03			B	
1	2	0,21	9	4,5E-03				C
2	1	0,22	9	4,5E-03				C
1	1	0,39	9	4,5E-03				D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,01287

Error: 0,0002 gl: 36

pH	tensión O2	Medias	n	E.E.				
1	2	0,14	9	4,5E-03	A			
3	2	0,16	9	4,5E-03	A		B	
2	2	0,17	9	4,5E-03			B	
2	1	0,24	9	4,5E-03				C
1	1	0,24	9	4,5E-03				C
3	1	0,24	9	4,5E-03				C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,02229

Error: 0,0002 gl: 36

a _w	pH	tensión O ₂	Medias	n	E.E.	
3	1	2	0,08	3	0,01	A
3	1	1	0,09	3	0,01	A B
3	2	2	0,09	3	0,01	A B
3	2	1	0,10	3	0,01	A B
3	3	2	0,11	3	0,01	B C
3	3	1	0,12	3	0,01	C D
2	1	2	0,14	3	0,01	D
2	3	2	0,17	3	0,01	E
2	2	2	0,18	3	0,01	E F
1	3	2	0,19	3	0,01	F G
1	1	2	0,21	3	0,01	G H
2	3	1	0,22	3	0,01	H
2	2	1	0,22	3	0,01	H
1	2	2	0,23	3	0,01	H
2	1	1	0,23	3	0,01	H
1	1	1	0,39	3	0,01	I
1	3	1	0,39	3	0,01	I
1	2	1	0,39	3	0,01	I

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la producción de gliotoxina por ambas cepas a tensión normal de oxígeno

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	322	483480.77	<0.0001
Cepa	1	322	8377.44	<0.0001
Dias.incub	2	322	121629.69	<0.0001
T	2	322	101336.68	<0.0001
a _w	2	322	119231.80	<0.0001
pH	2	322	53895.02	<0.0001
Cepa:Dias.incub	2	322	3287.26	<0.0001
Cepa:T	2	322	19548.20	<0.0001
Cepa:a _w	2	322	1046.79	<0.0001
Cepa:pH	2	322	18154.55	<0.0001
Dias.incub:T	4	322	27932.43	<0.0001
Dias.incub:a _w	4	322	49525.88	<0.0001
Dias.incub:pH	4	322	13931.95	<0.0001
T:a _w	4	322	95561.54	<0.0001
T:pH	4	322	43452.75	<0.0001
a _w :pH	4	322	44719.62	<0.0001
Cepa:Dias.incub:T	4	322	8131.24	<0.0001
Cepa:Dias.incub:a _w	4	322	2436.23	<0.0001
Cepa:Dias.incub:pH	4	322	6070.96	<0.0001
Cepa:T:a _w	4	322	712.47	<0.0001
Cepa:T:pH	4	322	13453.09	<0.0001

Cepa:aW:pH	4	322	10775.96	<0.0001
Dias.incub:T:aW	8	322	58411.81	<0.0001
Dias.incub:T:pH	8	322	12964.76	<0.0001
Dias.incub:aW:pH	8	322	20445.41	<0.0001
T:aW:pH	8	322	20456.36	<0.0001
Cepa:Dias.incub:T:aW	8	322	3483.46	<0.0001
Cepa:Dias.incub:T:pH	8	322	6813.31	<0.0001
Cepa:Dias.incub:aW:pH	8	322	6789.88	<0.0001
Cepa:T:aW:pH	8	322	6127.56	<0.0001
Dias.incub:T:aW:pH	16	322	19783.26	<0.0001
Cepa:Dias.incub:T:aW:pH	16	322	7145.36	<0.0001

Medias ajustadas y errores estándares para Cepa

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Cepa Medias E.E.

2 0.35 6.3E-04 A

1 0.27 6.3E-04 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para Días de incubación

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Dias.incub Medias E.E.

1 0.48 7.7E-04 A

2 0.44 7.7E-04 B

3 0.00 7.7E-04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para T

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

T Medias E.E.

2 0.47 7.7E-04 A

1 0.42 7.7E-04 B

3 0.03 7.7E-04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para a_w

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

a_w Medias E.E.

3 0.61 7.7E-04 A

1 0.18 7.7E-04 B

2 0.13 7.7E-04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para pH

LSD Fisher (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

pH Medias E.E.

1 0.47 7.7E-04 A

2 0.33 7.7E-04 B

3 0.12 7.7E-04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Cepa	D.	Incub	T	a _w	pH	log ₁₀ gliotoxina
1	2	3	3	1	0.00	S
1	2	1	2	1	0.00	S
1	3	3	2	2	0.00	S
1	2	1	1	1	0.00	S
1	1	3	2	2	0.00	S
1	2	2	3	3	0.00	S
1	3	1	2	3	0.00	S
1	3	2	1	2	0.00	S
1	3	3	3	3	0.00	S
1	3	3	2	3	0.00	S
1	2	3	1	1	0.00	S
1	3	3	1	3	0.00	S
1	2	3	3	3	0.00	S
1	1	1	3	3	0.00	S
1	2	1	3	3	0.00	S
1	2	3	1	3	0.00	S
1	1	3	2	3	0.00	S
1	1	2	1	2	0.00	S
1	1	2	1	1	0.00	S
1	1	1	1	3	0.00	S
1	3	2	3	2	0.00	S
1	3	3	1	2	0.00	S
1	3	1	3	1	0.00	S
1	1	1	2	2	0.00	S
1	3	2	1	1	0.00	S
1	3	2	2	3	0.00	S
1	1	1	1	1	0.00	S
1	1	2	3	2	0.00	S
1	3	3	1	1	0.00	S
1	2	3	2	2	0.00	S
1	1	1	1	2	0.00	S
1	3	2	1	3	0.00	S
1	1	2	2	3	0.00	S
1	1	3	1	1	0.00	S
1	2	3	2	3	0.00	S
1	1	3	1	2	0.00	S
1	2	3	2	1	0.00	S
1	3	1	1	1	0.00	S
1	1	2	1	3	0.00	S
1	2	1	2	3	0.00	S
1	1	2	2	1	0.00	S
1	1	3	2	1	0.00	S
1	2	1	1	3	0.00	S
1	1	1	2	3	0.00	S
1	3	1	2	2	0.00	S
1	1	2	2	2	0.00	S

1	2	1	2	2	0.00	S
1	1	2	3	3	1.05	R
1	3	3	3	1	0.00	S
1	1	3	1	3	1.48	N
1	2	2	2	1	1.62	M
1	1	1	2	1	0.00	S
1	2	2	3	2	0.00	S
1	2	2	3	1	0.00	S
1	2	2	1	2	0.00	S
1	3	2	2	1	0.00	S
1	1	3	3	1	0.00	S
1	1	1	3	1	2.34	J
1	3	3	3	2	0.00	S
1	2	1	3	1	3.15	D
1	3	1	3	2	0.00	S
1	2	1	3	2	3.37	B
1	3	2	3	3	2.00	R
1	1	3	3	3	0.00	S
1	2	2	1	3	2.83	F
1	3	1	2	1	0.00	S
1	1	2	3	1	2.84	F
1	1	1	3	2	2.98	E
1	3	2	2	2	0.00	S
1	2	3	1	2	0.00	S
1	2	3	3	2	0.00	S
1	2	1	1	2	0.00	S
1	2	2	2	2	0.00	S
1	2	2	1	1	0.00	S
1	3	1	1	3	0.00	S
1	3	1	1	2	0.00	S
1	3	2	3	1	0.00	S
1	3	3	2	1	0.00	S
1	2	2	2	3	0.00	S
1	3	1	3	3	0.00	S
1	3	3	3	3	0.00	S
1	2	1	3	2	0.00	S
2	1	3	3	1	0.00	S
2	3	2	2	2	0.00	S
2	1	1	3	3	0.00	S
2	3	2	1	2	0.00	S
2	1	3	1	2	0.00	S
2	1	1	1	1	0.00	S
2	1	1	1	3	0.00	S
2	3	2	2	2	0.00	S
2	2	3	3	3	0.00	S
2	1	3	2	3	0.00	S
2	1	1	1	2	0.00	S
2	3	2	3	3	0.00	S
2	1	1	2	1	0.00	S
2	2	1	2	1	0.00	S
2	3	1	3	1	0.00	S
2	1	3	2	2	0.00	S
2	2	1	3	3	0.00	S
2	3	1	3	3	0.00	S
2	2	2	2	3	0.00	S
2	3	1	1	3	0.00	S

2	3	2	3	2	0.00	S
2	1	3	2	1	0.00	S
2	3	2	1	3	0.00	S
2	3	2	1	1	0.00	S
2	2	3	2	2	0.00	S
2	2	1	1	1	0.00	S
2	2	2	3	2	0.00	S
2	2	3	1	2	0.00	S
2	2	1	1	3	0.00	S
2	2	3	1	3	0.00	S
2	3	3	2	3	0.00	S
2	3	3	1	3	0.00	S
2	1	2	3	3	0.00	S
2	3	1	2	3	0.00	S
2	2	2	1	2	0.00	S
2	2	2	1	3	0.00	S
2	2	3	1	1	0.00	S
2	2	2	1	1	2.71	G
2	1	2	3	2	2.65	H
2	2	1	3	1	2.63	I
2	2	2	2	1	2.84	F
2	1	2	3	1	3.66	A
2	2	1	3	2	3.26	C
2	1	1	3	2	2.98	E
2	1	2	2	3	1.11	Q
2	2	1	1	2	0.00	S
2	3	2	3	1	0.00	S
2	1	2	1	2	1.17	P
2	1	1	3	1	2.15	K
2	1	2	1	1	1.66	L
2	2	2	2	2	1.39	O
2	3	3	2	2	0.00	S
2	1	3	1	1	0.00	S
2	3	3	1	1	0.00	S
2	3	1	1	2	0.00	S
2	1	1	2	3	0.00	S
2	2	2	3	3	0.00	S
2	2	3	2	3	0.00	S
2	1	2	1	3	0.00	S
2	2	3	3	1	0.00	S
2	3	3	3	1	0.00	S
2	3	3	2	1	0.00	S
2	1	2	2	1	0.00	S
2	3	1	1	3	0.00	S
2	2	3	3	2	0.00	S
2	3	1	2	1	0.00	S
2	3	1	3	2	0.00	S
2	3	3	1	2	0.00	S
2	1	2	2	2	0.00	S
2	2	2	3	1	0.00	S
2	2	3	2	1	0.00	S
2	3	3	3	3	0.00	S
2	1	3	3	3	0.00	S
2	1	1	1	3	0.00	S
2	3	1	2	2	0.00	S
2	2	1	2	2	0.00	S
2	2	1	2	3	0.00	S

2	1	3	3	3	0.00	S
2	2	1	2	2	0.00	S
2	3	3	3	2	0.00	S
2	3	2	2	1	0.00	S

Referencias:

Cepas:

A. fumigatus RC2108	1
Af16	2

Días de incubación:

14	1
7	2
3	3

Temperatura (T)(° C):

37	1
25	2
18	3

a_w:

0,98	1
0,95	2
0,93	3

pH:

9	1
7	2
5	3

Análisis de la varianza y Test LSD de Fischer de los diferentes parámetros de crecimiento evaluados sobre la producción de gliotoxina por ambas cepas a 37 °C

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	562720.92	<0.0001
Cepa	1	49022.72	<0.0001
tension.O2	1	9747.22	<0.0001
Dias.incub	2	68568.23	<0.0001
aW	2	473931.27	<0.0001
pH	2	51205.75	<0.0001
Cepa:tension.O2	1	36417.20	<0.0001
Cepa:Dias.incub	2	2141.96	<0.0001
Cepa:aW	2	26507.20	<0.0001
Cepa:pH	2	4686.12	<0.0001
tension.O2:Dias.incub	2	31681.77	<0.0001
tension.O2:aW	2	27359.29	<0.0001
tension.O2:pH	2	41926.67	<0.0001
Dias.incub:aW	4	85065.54	<0.0001
Dias.incub:pH	4	14503.30	<0.0001
aW:pH	4	64313.01	<0.0001

Cepa:tension.O2:Dias.incub..	2	4318.44	<0.0001
Cepa:tension.O2:aW	2	17734.44	<0.0001
Cepa:tension.O2:pH	2	4749.84	<0.0001
Cepa:Dias.incub:aW	4	786.06	<0.0001
Cepa:Dias.incub:pH	4	7297.91	<0.0001
Cepa:aW:pH	4	10334.24	<0.0001
tension.O2:Dias.incub:aW	4	26112.02	<0.0001
tension.O2:Dias.incub:pH	4	13129.15	<0.0001
tension.O2:aW:pH	4	32420.65	<0.0001
Dias.incub:aW:pH	8	11865.60	<0.0001
Cepa:tension.O2:Dias.incub..	4	1612.23	<0.0001
Cepa:tension.O2:Dias.incub..	4	6688.98	<0.0001
Cepa:tension.O2:aW:pH	4	10586.96	<0.0001
Cepa:Dias.incub:aW:pH	8	10356.13	<0.0001
tension.O2:Dias.incub:aW:p..	8	26296.85	<0.0001
Cepa:tension.O2:Dias.incub..	8	10218.77	<0.0001

Medias ajustadas y errores estándares para Cepa

DGC (Alfa=0.05)

Cepa	Medias	E.E.	
1	0.48	7.1E-04	A
2	0.26	7.1E-04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para tension.O2

DGC (Alfa=0.05)

tension.O2	Medias	E.E.	
2	0.42	7.1E-04	A
1	0.32	7.1E-04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para Días de incubación

DGC (Alfa=0.05)

Diasdeincub	Medias	E.E.	
2	0.57	8.6E-04	A
1	0.42	8.6E-04	B
3	0.13	8.6E-04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para aW

DGC (Alfa=0.05)

a _w	Medias	E.E.	
3	1.06	8.6E-04	A
1	0.06	8.6E-04	B
2	0.00	8.6E-04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Medias ajustadas y errores estándares para pH

DGC (Alfa=0.05)

pH	Medias	E.E.	
2	0.52	8.6E-04	A
1	0.46	8.6E-04	B
3	0.15	8.6E-04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

Cepa T°O₂ Días Incub a_w pH log₁₀ gliotoxina E.E

1.00	2.00	2.00	3.00	2.00	3.37	0.01	A
2.00	2.00	2.00	3.00	2.00	3.26	0.01	B
1.00	2.00	2.00	3.00	1.00	3.15	0.01	C
2.00	2.00	1.00	3.00	2.00	2.98	0.01	D
1.00	2.00	1.00	3.00	2.00	2.98	0.01	D
1.00	1.00	2.00	3.00	2.00	2.85	0.01	E
2.00	2.00	2.00	3.00	1.00	2.63	0.01	F
1.00	1.00	1.00	3.00	3.00	2.35	0.01	G
1.00	2.00	1.00	3.00	1.00	2.34	0.01	G
2.00	2.00	1.00	3.00	1.00	2.15	0.01	H
1.00	1.00	2.00	3.00	1.00	2.07	0.01	I
2.00	1.00	2.00	3.00	3.00	1.80	0.01	J
1.00	1.00	3.00	3.00	1.00	1.67	0.01	K
1.00	1.00	3.00	3.00	2.00	1.61	0.01	L6
1.00	1.00	1.00	3.00	2.00	1.52	0.01	M
2.00	1.00	2.00	3.00	1.00	1.42	0.01	N
1.00	1.00	3.00	1.00	3.00	1.29	0.01	O
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.96	0.01	P
1.00	1.00	2.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	2.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	3.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	2.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	1.00	3.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	1.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	3.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	2.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	1.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	2.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	3.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	1.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	3.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q

1.00	1.00	3.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	3.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	3.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	3.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	2.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	1.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	3.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	3.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	2.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	3.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	3.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	2.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	2.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	1.00	3.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	3.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	2.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	1.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	3.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	1.00	2.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	2.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	1.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	2.00	1.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q

2.00	2.00	3.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	2.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	1.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	3.00	2.00	2.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	1.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	1.00	3.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
2.00	2.00	2.00	3.00	3.00	0.00	0.01	Q
1.00	2.00	3.00	2.00	3.00	0.00	0.01	Q

Referencias:

Cepas:

A. fumigatus RC2108	1
Af16	2

Tensión de oxígeno:

Reducido	1
Normal	2

Días de incubación:

14	1
7	2
3	3

aw:

0,98	1
0,95	2
0,93	3

pH:

9	1
7	2
5	3

ANEXO CEPAS

Cepa (nombre común)	Origen de aislamiento	Denominación Colección Micológica UNRC
MA1	Alimento para perros	RC2073
MA2	Alimento para perros	RC2074
MA3	Alimento para perros	RC2075
MA159	Alimento para perros	RC2076
MA168	Alimento para perros	RC2077
MA196	Alimento para perros	RC2078
MA199	Alimento para perros	RC2079
MA258(2)	Alimento para perros	RC2080
MP50	Alimento para perros	RC2081
MNI59	Alimento para perros	RC2082
Af3 *	Alimento para perros	RC2167
Af9 *	Alimento para perros	RC2168
Af5 *	Alimento para perros	RC2169
Af11 *	Alimento para perros	RC2170
Af6 *	Alimento para perros	RC2171
Af7 *	Alimento para perros	RC2172
Af8 *	Alimento para perros	RC2173
Af10 *	Alimento para perros	RC2174
Af4 *	Alimento para perros	RC2175
Af12 *	Alimento para perros	RC2176
Af28 *	Alimento para perros	RC2177
Af29 *	Alimento para perros	RC2178
Af30 *	Alimento para perros	RC2179
Af31 *	Alimento para perros	RC2180
Af32	Alimento para perros	RC2083
Af33	Alimento para perros	RC2084
Af34	Alimento para perros	RC2085
Af35	Alimento para perros	RC2086

Af36	Alimento para perros	RC2087
Af37	Alimento para perros	RC2088
Af38	Alimento para perros	RC2089
Af39	Alimento para perros	RC2090
Af40	Alimento para perros	RC2091
Af41	Alimento para perros	RC2092
Af42	Alimento para perros	RC2093
Af43	Alimento para perros	RC2094
Af44	Alimento para perros	RC2095
Af45	Alimento para perros	RC2096
Af46	Alimento para perros	RC2097
Af47	Alimento para perros	RC2098
Af48	Alimento para perros	RC2099
CA5	Residuo de cervecería	RC2100
A24	Residuo de cervecería	RC2101
A26	Residuo de cervecería	RC2102
A38	Residuo de cervecería	RC2103
A44	Residuo de cervecería	RC2104
A53	Residuo de cervecería	RC2105
A63	Residuo de cervecería	RC2106
A70	Residuo de cervecería	RC2107
A89	Residuo de cervecería	RC2108
A93	Residuo de cervecería	RC2109
A 97	Residuo de cervecería	RC2110
A99	Residuo de cervecería	RC2111
A100	Residuo de cervecería	RC2112
A105	Residuo de cervecería	RC2067
A109	Residuo de cervecería	RC2113
A114	Residuo de cervecería	RC2114

A116	Residuo de cervecería	RC2115
A118	Residuo de cervecería	RC2068
A128	Residuo de cervecería	RC2116
A144	Residuo de cervecería	RC2117
A148	Residuo de cervecería	RC2118
A152	Residuo de cervecería	RC2119
A163	Residuo de cervecería	RC2120
A183	Residuo de cervecería	RC2121
A185	Residuo de cervecería	RC2122
A187	Residuo de cervecería	RC2123
A193	Residuo de cervecería	RC2124
A198	Residuo de cervecería	RC2125
A200	Residuo de cervecería	RC2126
A203	Residuo de cervecería	RC2127
A205	Residuo de cervecería	RC2128
A208	Residuo de cervecería	RC2129
A210	Residuo de cervecería	RC2130
A231	Residuo de cervecería	RC2131
A237	Residuo de cervecería	RC2132
A239	Residuo de cervecería	RC2133
A241	Residuo de cervecería	RC2134
A252	Residuo de cervecería	RC2135
A246	Residuo de cervecería	RC2136
B61	ensilaje de maíz para vacas	RC2137
B63	ensilaje de maíz para vacas	RC2138
B64	ensilaje de maíz para vacas	RC2139
B66	ensilaje de maíz para vacas	RC2140
B70	ensilaje de maíz para vacas	RC2141
B74	ensilaje de maíz para vacas	RC2142

B75	ensilaje de maíz para vacas	RC2143
B76	ensilaje de maíz para vacas	RC2144
B77	ensilaje de maíz para vacas	RC2145
B78	ensilaje de maíz para vacas	RC2146
B79	ensilaje de maíz para vacas	RC2147
16)9007C	ensilaje de maíz para vacas	RC2148
21)9507	ensilaje de maíz para vacas	RC2149
Af13 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2181
Af14 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2182
Af15 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2183
Af16 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2184
Af17 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2185
Af18 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2186
Af19 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2187
Af20 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2188
Af21 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2189
Af22 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2190
Af23 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2191
Af24 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2192
Af25 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2193
Af26 *	ensilaje de maíz para vacas	RC2194
A21	Alimento para pollos	RC2150
Af2 *	Alimento para pollos	RC2195
Af54	Alimento para pollos	RC2196
Af55	Alimento para pollos	RC2197
Af56	Alimento para pollos	RC2198
Af57	Alimento para pollos	RC2199
Af58	Alimento para pollos	RC2200
Af59	Alimento para pollos	RC2201

Af60	Alimento para pollos	RC2202
Af61	Alimento para pollos	RC2203
E1	Alimento para caballos	RC2071
E2	Alimento para caballos	RC2072
E3	Alimento para caballos	RC2151
E5	Alimento para caballos	RC2152
E6	Alimento para caballos	RC2153
Af1 *	Alimento para caballos	RC2204
Ach1	Alimento para chinchillas	RC2154
Ach2	Alimento para chinchillas	RC2069
Ach3	Alimento para chinchillas	RC2155
Ach4	Alimento para chinchillas	RC2156
A2	Alimento para chinchillas	RC2157
A7	Alimento para chinchillas	RC2158
A15	Alimento para chinchillas	RC2159
AS2	Alimento para chinchillas	RC2160
AS19	Alimento para chinchillas	RC2161
AS32	Alimento para chinchillas	RC2162
AS33	Alimento para chinchillas	RC2163
AS43	Alimento para chinchillas	RC2070
IA5	Alimento para chinchillas	RC2164
IA67	Alimento para chinchillas	RC2165
FA15	Alimento para chinchillas	RC2166
Af49	Alimento para chinchillas	RC2205
Af50	Alimento para chinchillas	RC2206
Af51	Alimento para chinchillas	RC2207
Af52	Alimento para chinchillas	RC2208
Af53	Alimento para chinchillas	RC2209

13970

17