

**Área de Micología**

**Departamento de Microbiología e Inmunología.**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químico y Naturales.**

**Universidad Nacional de Río Cuarto**



**Efecto de plaguicidas sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas B<sub>1</sub> en cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de suelos agrícolas del sur de la provincia de Córdoba.**

Trabajo Final para optar el título de Microbióloga

**Karen Magnoli**

Director: Dra. Carina Magnoli

Co-director: Dra. Carla Barberis

**Noviembre 2017**



## **Agradecimientos**

A mi mamá y a mi papá, por ser mi principal sostén, mis ejemplos y mi guía en todo momento. Por acompañarme siempre, en cada paso que doy tanto los buenos, como en aquellos que se tornan difíciles. Por apoyarme en cada decisión, y por ayudarme a tomarlas. Por enseñarme entre tantos valores, el valor del esfuerzo, la voluntad, la humildad y sobre todo la gratitud. Por enseñarme también el valor de las cosas y entre ellas el valor del estudio y lo importante que es aspirar a un futuro. Por enseñarme a dar y a recibir. Por el esfuerzo que siempre hicieron y hacen para lograr lo que hoy puedo llegar a ser, por eso lo que hoy soy es tanto de Uds. como mío. Porque sin Uds. nada podría ser igual. Son lo mejor que tengo, los amo mucho.

A mis hermanas, Pamela y Yésica, principalmente por ser un gran pedazo de mí, porque aparte de hermanas, son grandes amigas. Por ser parte de mis días, por todo lo que me dan y por todo lo que son. Por caminar conmigo día a día y por estar ahí cada vez que las necesito. Por estar a mi lado durante estos años y por aguantarme en cada locura y nerviosismo de final. Por cada risa y alegría. Por enseñarme, desde siempre el valor de la compañía y el valor de compartir. Por enseñarme lo que es estar juntas siempre. Por eso lo que hoy logro les pertenece tanto como a mí.

A mis cuatro abuelos, por ser una de las cosas más importantes que tengo. Por siempre ser incondicionales, unos de mis pilares. Por estar apoyándome en todo momento, todos los días. Por estar cada vez que los necesito. Por ser mi guía y otro de mis ejemplos a seguir, por brindarme todo su amor. Por dejarme compartir con ustedes éstos cinco años, de alegrías y a veces de tristezas; porque cada vez que les contaba alguna noticia ya sea buena o mala, la vivían de la misma manera que la viví yo. Por dejarme contarles siempre mis anécdotas y por escucharme tantas veces con cada cosa "rara" que aprendía. No saben la felicidad que es para mí hoy poder regalarles mi gran logro y saber que están para compartirlo conmigo. ¡Los adoro, siempre!

A mi Tata, mi segunda mamá por estar seguramente hoy presente. Por todos los años que formaste y vas a seguir formando parte de mí y de mis hermanas. Por darme tu amor de mamá desde siempre. Por enseñarme desde chica buenos valores. Por dejarme compartir este momento único para mí con vos.

A Ana, por ser una de las personas que me enseñó lo lindo que es la Microbiología, y por transmitirme el amor y la pasión por esta profesión. Por formar parte de esto y por estar siempre cada vez que la necesito.

A Augusto, por ser parte de mi vida y por haber sido parte de estos cinco años. Por acompañarme en todo momento y en cada paso que doy. Por su incondicionalidad. Por apoyarme en cada decisión tomada. Por estar siempre dispuesto a todo conmigo. Por dejarme compartir cada alegría y tristeza, como así también los nervios cada vez que rendía un final. Por ser otra de las personas que escucha siempre cada una de mis cosas aprendidas. Por dejarme formar parte de él. Por ser la persona que es conmigo. A su familia, por dejarme ser una más de ellos.

A mis amigas, las de siempre, las de mi infancia, con las que siempre comparto todo y espero seguir compartiendo. Por su incondicionalidad. Por enseñarme el valor de la amistad, porque Uds. más que nadie sabe lo que son para mí mis amigas. Por estar siempre presente, porque de alguna manera u otra hicieron esto posible. Gracias por dejarme compartir este logro con Uds. Porque mi vida sin "Las Queriditas", no sería lo mismo. ¡Las adoro!

A cuatro personas que la vida me puso en el camino y agradezco eso: Dari, Juampa, Sofi y Luzo. Porque los amigos de la universidad son los que quedan para siempre y espero que así sea. Por enseñarme lo importante del trabajo en equipo, porque no hay mejor palabra que nos describa, siempre haciendo todo juntos y por seguir inculcando en mí el valor de la amistad. Por cada informe, por cada seminario, por cada práctico. Por estar siempre dispuestos a ayudar, y a ser en parte mis profes. Por dejarme ser parte de sus días enteros. Por todas esas risas y alegrías compartidas durante estos cinco años. Por cada siesta en el pasto, por cada noche de peña y por cada mate. Porque llegar cada mañana a la uni y no haberlos tenido no hubiera sido lo mismo. Si tendría que volver a elegir un grupo de amigos, sin duda los elegiría a Uds. Fueron lo mejor que me dio la vida universitaria. Gracias, y mil gracias. ¡Por siempre, nuestro chi chi chi!

A Anita, Ro, Aldi, Juli, Chor, Maru, Cindy y Efrén, por formar parte de mi vida en la universidad. Por dejarme compartir con ellos cada día y cada momento y por estar siempre. Por ser una más de las personas que me llevo para siempre.

A Carina Magnoli y Carla Barberis, en primer lugar, por dejarme ser parte de su grupo de trabajo. Por transmitirme sus conocimientos, y dedicar parte de su tiempo en mí.

Por guiarme en mi última etapa y por depositar su confianza en mí. Por toda la ayuda que me brindan y brindaron durante estos dos años, porque no hay cosa en la que no me ayudaron. Realmente valoro mucho todo lo que hicieron y hacen por mí, y espero que este trabajo sea una de las formas de demostrar tanto valor y gratitud.

A Carla, por su gran ayuda y tiempo dedicado dentro del laboratorio. Por haberme dado su confianza. Por lo que fue y es conmigo, por su buena onda siempre. Por responder a cada una de mis preguntas, por haber sido mi compañía y profe durante este tramo final. Porque para mí siempre va a ser un gusto aprender de ella.

A los chicos del grupo: Ceci, Meli y Nico por integrarme de buena manera en él y por dejarme ser una más de Uds durante este tiempo. Son un gran grupo, no solamente en cuanto a trabajo, voluntad y responsabilidad, sino que también tienen grandes valores en cuanto a compañerismo y persona. ¡Muchas gracias!

Al jurado evaluador, por dedicar parte de su tiempo en leer, corregir y escuchar mi trabajo. Porque siempre sus correcciones y consejos son bienvenidos, forman parte de mi enseñanza.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por brindarme su espacio, docentes y herramientas necesarias para poder formarme como Microbióloga.

El trabajo se realizó en el marco de una beca de ayudantía de Investigación otorgada por SECYT-UNRC.

## RESUMEN

Argentina es actualmente el segundo exportador mundial de maíz (*Zea mays*), la producción en el país representa en la actualidad el 25% de los cultivos principales y tuvo un desarrollo sostenido en la última década. En nuestra región, ciertos plaguicidas tales como el insecticida clorpirifós y el herbicida glifosato, son de vital importancia durante el desarrollo de cultivos extensivos de maíz, los cuales, no dejan dudas sobre el posible riesgo de contaminación de agua, suelo, granos de maíz y soja. Por ende, existe en la actualidad una gran preocupación, no sólo en el ámbito científico sino también en la población en general, vinculada a los riesgos toxicológicos sobre animales, humanos y el medio ambiente. El metabolismo microbiano es probablemente el proceso más importante implicado en la degradación de plaguicidas en los suelos, siendo, los hongos filamentosos una poderosa herramienta biotecnológica en la biorremediación del suelo. Por todo esto, es importante determinar el impacto que estos plaguicidas ejercen sobre la microbiota de suelos cultivables, especialmente en hongos toxicogénicos, y sobre la posterior producción de sus micotoxinas. Considerando estos antecedentes, se plantean las siguientes hipótesis: las especies potencialmente toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* contaminan los suelos destinados al cultivo de maíz. El crecimiento de estos hongos y la producción de sus micotoxinas están afectados por la exposición a diferentes dosis de clorpirifós y glifosato. Los objetivos desarrollados fueron los siguientes: a) Aislar e identificar cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos destinados al cultivo de maíz expuestos a la aplicación de clorpirifós y glifosato, b) caracterizar el perfil toxicogénico de las cepas aisladas evaluando la capacidad de producir aflatoxinas (AFs), y c) determinar la influencia de diferentes dosis de clorpirifós y glifosato, sobre el crecimiento y la producción de AFs de cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura a través de ensayos *in vitro* e *in situ*. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las especies aisladas con mayor frecuencia en suelos agrícolas fueron *Aspergillus flavus* seguido por *Aspergillus parasiticus*, siendo la mayoría de las cepas capaces de producir AFB<sub>1</sub>. Ambos plaguicidas provocan diferencias en cepas toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi*. Respecto a clorpirifós, se observó que no provoca efectos inhibitorios sobre el crecimiento y producción de AFB<sub>1</sub>, ya sea en concentraciones regularmente usadas a campo (0.06-0.14 mM) como 100 veces mayores a éstas. En algunos casos este insecticida fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento de las cepas en condiciones marginales de  $a_w$  (0.93 y 0.95) con altas concentraciones de clorpirifós y sólo a 37 °C. Al analizar los resultados obtenidos en los ensayos con glifosato se observó que este herbicida afecta negativamente el crecimiento y la producción de AFs de las cepas analizadas. Así tanto en los ensayos *in vitro* como *in situ*, a medida que las concentraciones utilizadas aumentaron

tanto en el crecimiento fúngico como en la producción de toxinas se observó una disminución de significativa. Estos resultados indican que la presencia del herbicida glifosato y del insecticida clorpirifós afectan el desarrollo y la producción de AFs en cepas de *Aspergillus flavus*, constituyendo un factor más de riesgo si estas especies están expuestas a estos compuestos organofosforados en los sistemas productivos.

## ÍNDICE:

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
I.1. Hongos filamentosos y micotoxinas.....	1
I.1.1. Generalidades.....	1
I.1.2. Factores que influyen en la producción de micotoxinas.....	3
I.1.2.1. Factores ambientales:.....	3
I.1.2.2. Factores biológicos:.....	4
I.1.2.3. Factores químicos:.....	5
I.2. Género <i>Aspergillus</i> .....	6
I.2.1. Generalidades.....	6
I.2.2. Taxonomía e identificación de especies del género <i>Aspergillus</i> .....	7
I.2.3. Aflatoxinas.....	9
I.3. Principales cultivos en Argentina.....	11
I.3.1. La importancia del maíz en Argentina.....	12
I.3.2. Poblaciones de <i>Aspergillus</i> spp. en semillas de maíz y otros cultivos en Argentina.....	13
I.4. Fitosanitarios.....	14
I.4.1. Principales plaguicidas utilizados en Argentina.....	15
I.4.1.1. Glifosato.....	15
I.4.1.1.1. Efectos del glifosato en el ambiente.....	16
I.4.1.2. Clorpirifós.....	17
I.4.1.2.1. Efectos del clorpirifós en el ambiente.....	18
<b>II. HIPOTESIS</b> .....	<b>20</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>21</b>
IV.1. Materiales:.....	21
IV.1.1. Medios de cultivo.....	21
IV.1.2. Plaguicidas:.....	21
IV.1.3. Soluciones:.....	21
IV.2. Métodos:.....	22
IV.2.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> de suelos agrícolas expuestos a la aplicación de los plaguicidas clorpirifós y glifosato. ....	22
IV.2.1.1. Muestreo de suelo.....	22
IV.2.1.2. Aislamiento y enumeración de especies de la sección <i>Flavi</i> .....	23
IV.2.1.3. Caracterización morfológica de las cepas de <i>Aspergillus</i> .....	23
IV.2.2. Caracterización de los perfiles toxicogénicos de las cepas.....	23
IV.2.2.1. Medios de cultivo e incubación. ....	23

IV.2.2.2. Extracción, detección y cuantificación de AFs. ....	23
IV.2.3. Evaluación del efecto de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB <sub>1</sub> por especies toxicogénicas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperaturas. ....	24
IV.2.3.1. Evaluación in vitro. ....	24
IV.2.3.1.1. Microorganismos. ....	24
IV.2.3.1.2. Medios de cultivo. ....	24
IV.2.3.1.3. Plaguicidas. ....	25
IV.2.3.1.4. Inoculación e incubación. ....	25
IV.2.3.1.5. Medición de los parámetros de crecimiento. ....	25
IV.2.3.1.6. Determinación de AFB <sub>1</sub> . ....	25
IV.2.3.2. Ensayo in situ. ....	26
IV.2.3.2.1. Microorganismos. ....	26
IV.2.3.2.2. Plaguicidas. ....	26
IV.2.3.2.3. Acondicionamiento de los granos de maíz. ....	26
IV.2.3.2.4. Distribución de los granos de maíz. ....	27
IV.2.3.2.5. Inoculación e incubación. ....	27
IV.2.3.2.6. Medición de los parámetros de crecimiento. ....	27
IV.2.3.2.7. Determinación de AFB <sub>1</sub> . ....	27
IV.2.4. Análisis estadístico. ....	28
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
V.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> de suelos agrícolas expuestos a la aplicación de los plaguicidas clorpirifós y glifosato. ....	29
V.2. Caracterización de los perfiles toxicogénicos de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> . ....	35
V.3. Ensayos <i>In vitro</i> : Evaluación del efecto de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB <sub>1</sub> por cepas toxicogénicas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura. ....	37
V.3.1. Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de temperatura y a <sub>w</sub> . ....	37
V.3.2. Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de temperatura y a <sub>w</sub> . ....	43
V.3.3. Efectos de clorpirifós sobre la producción de AFB <sub>1</sub> bajo diferentes condiciones de temperatura y a <sub>w</sub> . ....	50
V.3.4. Efectos de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de temperatura y a <sub>w</sub> . ....	57
V.3.5. Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de temperatura y a <sub>w</sub> . ....	63

V.3.6. Efecto del glifosato sobre la producción de AFB <sub>1</sub> bajo diferentes condiciones de temperatura y a <sub>w</sub> .....	69
V.4. Ensayos <i>In situ</i> : Evaluación sobre sustrato natural de los parámetros de crecimiento y producción de AFB <sub>1</sub> en especies de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> en presencia de clorpirifós y glifosato.....	75
V.4.1. Efecto de clorpirifós sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de a <sub>w</sub> y a 25°C.....	75
V.4.2. Efecto de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de a <sub>w</sub> y a 25°C.....	77
V.4.3. Efecto de clorpirifós sobre la producción de AFB <sub>1</sub> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de a <sub>w</sub> y a 25°C.....	80
V.4.4. Efecto de glifosato sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de a <sub>w</sub> y a 25°C.....	84
V.4.5. Efecto de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de a <sub>w</sub> y a 25°C.....	86
V.4.6. Efecto de glifosato sobre la producción de AFB <sub>1</sub> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de a <sub>w</sub> y a 25°C.....	88
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>92</b>
VI.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> de suelos agrícolas expuestos a la aplicación de los plaguicidas clorpirifós y glifosato. ....	92
VI.2. Evaluación del efecto de clorpirifós sobre el crecimiento y la producción de AFB <sub>1</sub> por especies toxicogénicas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura. ....	93
VI.3. Evaluación del efecto de glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB <sub>1</sub> por especies toxicogénicas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura. ....	97
VI.4. Evaluación sobre sustrato natural del efecto de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB <sub>1</sub> por especies toxicogénicas de <i>Aspergillus</i> sección <i>Flavi</i> bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura. ....	99
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>	<b>103</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>104</b>
<b>IX. ANEXOS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>114</b>
<b>X. ANEXO DE TABLAS.....</b>	<b>124</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

- AFS: Aflatoxinas
- AOAC: Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
- $a_w$ : Actividad acuosa
- CY20: agar czapeck-extracto de levadura 20% sacarosa
- CYS: agar czapeck dox modificado
- D.E: desvío estándar
- DRBG: Agar Dichlorán Rosa de Bengala Cloranfenicol
- EPA: Agencia de Protección Ambiental, ("United States Environmental Agency", por sus siglas en inglés.
- $FeSO_4$ : sulfato de sodio
- G25N: agar nitrato glicerol 25%
- $H_2O$ : agua
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- $KH_2PO_4$ : fosfato de potasio monobásico
- LSD: mínima diferencia significativa, ("Least Significant Difference", por sus siglas en inglés)
- MEA: agar extracto de malta
- $MgSO_4$ : sulfato de magnesio
- mM: milimoles
- $NaNO_3$ : nitrato de sodio
- OTA: Ocratoxina A
- SAGPyA: Secretaría Argentina de Ganadería, Pesca y Agricultura.
- SECyT: Secretaría de Ciencia y Técnica
- TLC: cromatografía en capa fina
- UFC: Unidades Formadoras de Colonias
- UNRC: Universidad Nacional de Río Cuarto

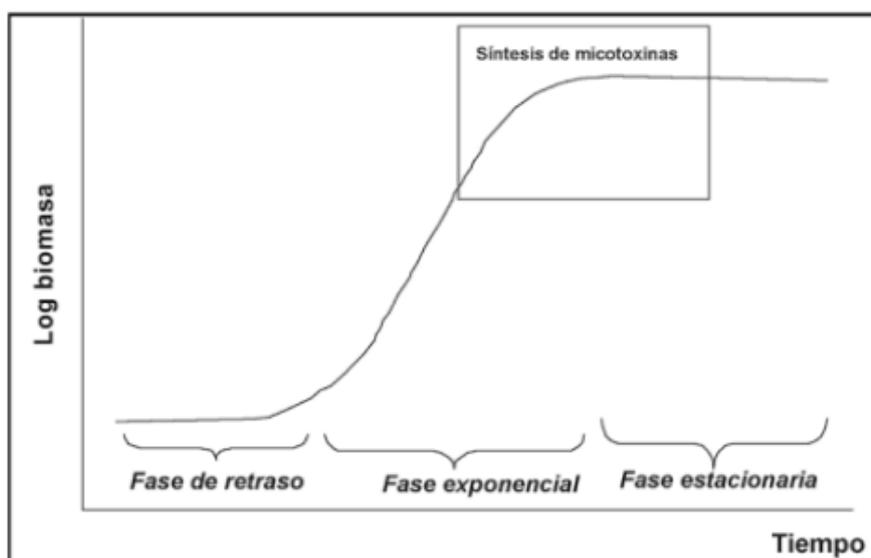
## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Hongos filamentosos y micotoxinas

#### I.1.1. Generalidades

El reino *Fungi*, comprende un grupo de microorganismos eucariotas quimioheterótrofos, ubicuos, que se encuentran distribuidos en el ambiente como parásitos, saprófitos simbiotes de otros seres vivos como plantas y/o animal. Los hongos parásitos se alimentan de formas vivas, mientras que los saprófitos de materia orgánica en descomposición o muerta (Soriano del Castillo, 2007).

Los hongos filamentosos han evolucionado para utilizar en forma más eficiente los sustratos sólidos, creciendo sobre su superficie y penetrando en sus matrices. Debido a su metabolismo primario, estos organismos son capaces de secretar enzimas que transforman macromoléculas complejas en compuestos menores para luego utilizarlos en su crecimiento y metabolismo. El uso de estos compuestos se asocia con la fase exponencial del crecimiento fúngico. Por otro lado, los hongos pueden absorber nutrientes de bajo peso molecular y, en muchos casos, también producir y secretar otro tipo de compuestos (metabolitos secundarios) que no tienen un rol directo con su crecimiento y reproducción, siendo por lo tanto, prescindible para su supervivencia. Estos metabolitos se producen al final de la fase exponencial o periodos iniciales de la fase estacionaria de crecimiento, asociándose a menudo a los procesos de esporulación y diferenciación (Soriano del Castillo, 2007) (Figura 1).



**Figura 1. Fases de crecimiento fúngico (Fuente: Soriano del Castillo, 2007).**

Dentro de los metabolitos fúngicos secundarios se encuentran las micotoxinas y todos aquellos hongos con capacidad de producirlas se denominan toxicogénicos. Las especies fúngicas toxicogénicas constituyen un grupo importante dentro del reino *Fungi* con aproximadamente 64.000 especies. La característica principal de estas especies es la capacidad de formar ciertas estructuras que contienen a las esporas sexuales, llamadas ascos, por lo que dichas esporas son conocidas como ascosporas. Sin embargo, algunas especies no tienen fase sexual conocida y no forman ascos, ni tampoco ascosporas. En este caso, estos hongos desarrollan una reproducción exclusivamente asexual, formando estructuras muy diversas conocidas como conidióforos que contienen las esporas asexuales o conidiosporas. Algunos autores engloban las especies cuya fase sexual no es conocida dentro de los Deuteromicetos u hongos imperfectos. Actualmente, teniendo en cuenta estudios morfológicos, fisiológicos y genéticos, la tendencia es clasificar los ascomicetos asexuales (o anamorfos) junto con los hongos que sí tienen fase sexual conocida y producen ascos (o teleomorfos) (Morales, 2011).

Las micotoxinas son compuestos de bajo peso molecular (PM<700 Da.), no son volátiles a temperatura ambiente, y son secretados por los hongos durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos. Las micotoxinas que representan un riesgo potencial para la salud del hombre y de los animales debidos a su toxicidad son las aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), fumonisinas, patulina, zearalenona y tricotecenos; los principales hongos productores pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* (Aubert y col., 2010). (Tabla 1)

**Tabla 1. Micotoxinas y principales hongos productores (Fuente: Aubert y col., 2010)**

MICOTOXINAS	HONGOS
Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> )
Ocratoxina A	<i>Aspergillus</i> ( <i>A. ochraceus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. niger</i> ), <i>Penicillium verrucosum</i>
Fumorisinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub>	<i>Fusarium</i> ( <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> )
Patulina	<i>Penicillium</i> ( <i>P. patulum</i> , <i>P. expansum</i> ), <i>Aspergillus</i> ( <i>A. clavatus</i> , <i>A. terreus</i> )
Zearalenona	<i>Fusarium</i> ( <i>F. complejo graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. esquiseti</i> )
Tricotecenos	<i>Complejo Fusarium graminearum</i> , <i>Trichoderma spp.</i> , <i>Memnoniella spp.</i> , <i>Trichothecum spp.</i>

Estos metabolitos constituyen un conjunto de compuestos tóxicos químicamente heterogéneo. La exposición a estos metabolitos puede generar carcinogénesis, teratogénesis, inmunosupresión y cuadros clínicos de neurotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, mielotoxicidad, toxicidad pulmonar y endocrina; siendo los mecanismos más importantes para la aparición de tales manifestaciones el estrés oxidativo y la genotoxicidad inducida por micotoxinas (Serrano-Coll y Cardona-Castro, 2015).

Las micotoxinas contaminan productos agrícolas como granos de cereales y frutos oleaginosos (antes, durante y después de la cosecha o durante su almacenamiento), alimentos y/o animales, originando un grupo de enfermedades denominadas micotoxicosis. Un alimento puede estar contaminado con una o más micotoxinas diferentes, lo que puede provocar un efecto sinérgico en su acción sobre el organismo aumentando así la toxicidad de las mismas (Soriano del Castillo, 2007)

Una misma especie fúngica puede producir distintas micotoxinas, así como una micotoxina puede ser producida por distintas especies. Además, la presencia de hongos en un sustrato no está directamente asociada a la presencia de las mismas. Asimismo, una vez producidas, las micotoxinas pueden persistir por largo tiempo y estar presentes incluso en ausencia ya de la cepa fúngica que las produjo (Cleveland y col., 2003).

### **I.1.2. Factores que influyen en la producción de micotoxinas**

Existen diversos factores que influyen de manera positiva o negativa sobre el crecimiento fúngico y en la producción de sus micotoxinas en los sustratos, entre ellos se encuentran los factores ambientales, biológicos y químicos.

#### **I.1.2.1. Factores ambientales:**

*Actividad de agua ( $a_w$ ):* La  $a_w$  indica la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez que se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento/medio ambiente. La  $a_w$  se expresa como la relación existente entre la tensión de vapor de agua en el sustrato ( $P$ ) y la del agua pura ( $P_o$ ), a la misma temperatura, ( $a_w = P/P_o$ ). El agua pura tiene una  $a_w$ : 1. En los alimentos, la  $a_w$  será siempre inferior a 1. La mayor parte de los hongos que contaminan cereales, por ejemplo, necesitan valores superiores a 0.7 para su desarrollo. La disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes que afecta tanto el crecimiento fúngico como así también la consecuente producción de sus micotoxinas. En general, la  $a_w$  óptima para la producción de micotoxinas es superior a 0.9 (Pitt y Hocking, 2009).

*Temperatura:* los hongos son capaces de sobrevivir bajo un amplio rango de temperaturas. Los valores generalmente informados para el crecimiento de hongos varían desde los 10°C a los 35°C, con solo algunas especies capaces de crecer en temperaturas por encima o por debajo de las descritas. La temperatura, al igual que la disponibilidad de agua también es un factor importante que afecta el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas; por lo tanto también es considerada una variable efectiva para controlar la producción de estos metabolitos en alimentos. El aspecto más importante de la contaminación de alimentos y piensos es la producción de micotoxinas, las cuales pueden resultar perjudiciales para el hombre y animales, cuyas condiciones óptimas para la producción de las mismas son 25°C y una humedad relativa del 95% (Pitt y Hocking, 2009).

*Niveles de oxígeno y dióxido de carbono:* el nivel de oxígeno es sumamente importante, tanto para la producción de las micotoxinas como para el crecimiento fúngico, ya que ambos constituyen procesos aeróbicos. Los hongos filamentosos son microorganismos que requieren altos niveles de oxígeno para su desarrollo. La concentración de oxígeno disuelto en el sustrato tiene una influencia mucho mayor en el crecimiento fúngico que la tensión atmosférica de oxígeno. Los hongos que requieren niveles más elevados de oxígeno colonizarán la superficie de los alimentos, mientras que los menos exigentes podrían encontrarse dentro de los mismos. Se ha demostrado que niveles por encima del 20% de dióxido de carbono inhiben gradualmente la producción de algunas toxinas, como por ejemplo las AFs (Pitt y Hocking, 2009).

#### I.1.2.2. Factores biológicos:

*Variabilidad de cepas:* la producción de micotoxinas está influenciada tanto por el genotipo del organismo como por el ambiente fisicoquímico en el cual crece, es decir, del sustrato que colonizan. La producción de una determinada micotoxina depende de la cepa y no solo de la especie (Mühlencoert y col., 2004)

*Sustrato:* los hongos toxicogénicos son capaces de crecer en una gran variedad de sustratos, tales como numerosos alimentos y piensos, especialmente semillas oleaginosas, nueces y cereales (mani, trigo). Estos, a su vez difieren en la capacidad que tienen de resistir la producción de micotoxinas, afectando tanto la naturaleza como la cantidad de metabolitos tóxicos producidos. Las diferencias en el crecimiento fúngico y en la cantidad de toxina producida pueden ser atribuidas a las diferencias físicas y químicas que existen en los sustratos en los cuales el hongo se desarrolla. Los parámetros físicos del sustrato,  $a_w$ , disponibilidad de oxígeno y temperatura, desempeñan un rol muy importante en la

producción de toxinas. Ciertos parámetros químicos, tales como el contenido de aminoácidos, minerales traza, ácidos grasos y proteínas, también influyen en la producción de micotoxinas, pero de un modo menos determinante (Madhyastha, 1990).

*Interacciones microbianas:* la presencia de otros microorganismos, tales como bacterias u otras especies fúngicas, pueden alterar el crecimiento del hongo como así también la producción de sus micotoxinas. Esto es debido, a que se genera una competencia entre microorganismos por los nutrientes disponibles en los sustratos (Miller y Trenholm, 1994).

#### I.1.2.3. Factores químicos:

*Factores nutricionales:* todas las formas de vida, incluidos los hongos, requieren de materiales exógenos para el desarrollo de su biomasa. Como heterótrofos, los hongos requieren compuestos orgánicos tanto para la síntesis de su biomasa (metabolismo anabólico), como para la producción de energía que conducen reacciones de metabolismo catabólico. Los hongos pueden usar un gran número de diferentes fuentes de carbono para la síntesis de carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. De igual modo, la oxidación de diversos compuestos orgánicos como azúcares simples y complejos, alcoholes, proteínas y lípidos puede proveer la fuente de energía. Otra de las necesidades son las fuentes nitrogenadas para la síntesis de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, quitina y varias vitaminas. Dependiendo del hongo, el nitrógeno puede ser obtenido a partir de nitrato, nitrito o amonio. Por todo esto, la disponibilidad y el tipo de factores nutricionales como las fuentes de carbono y de nitrógeno pueden afectar tanto la producción de micotoxinas como la diferenciación morfológica (Smith y Moss, 1985).

*Agentes antifúngicos:* un amplio rango de agentes antifúngicos son usados en la prevención del biodeterioro de alimentos y de enfermedad fúngicas en plantas (fungicidas). Los agentes antifúngicos, difieren en sus propiedades químicas y naturales; y también en su modo de acción. Se considera a los agentes antifungicos como una manera de controlar el desarrollo de hongos toxicogénicos sobre sustratos y su consecuente producción de micotoxinas (Carlile y Watkinson, 1996) .

## I.2. Género *Aspergillus*

### I.2.1. Generalidades

*Aspergillus* es un hongo filamentoso, saprófito, perteneciente al filo Ascomycota. Su micelio está formado por hifas hialinas, septadas y puede tener reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascos) y asexual (con formación de conidios). Las especies pertenecientes al género *Aspergillus* desempeñan un papel esencial en la degradación de la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo, donde sobreviven y se desarrollan sobre materia en descomposición. Este género es uno de los más abundantes en la naturaleza y puede encontrarse en cualquier ambiente (Klich, 2002) y es de particular importancia, debido a que posee varias especies capaces de desarrollar y producir metabolitos a baja  $a_w$  y a altas temperaturas. Poseen gran versatilidad metabólica y habilidad para dispersar sus esporas en el ambiente (Moss, 1991) Algunas de estas especies son consideradas patógenas de insectos, pudiendo controlar las poblaciones de los mismos y han sido considerados agentes potenciales para reemplazar insecticidas químicos (Smith y Weil, 2004). La utilización de cepas no toxicogénicas de *A. flavus* como control biológico de AFs se está desarrollando cada vez más en el campo de la fitopatología (Cleveland y col., 2003; Alaniz Zanon y col., 2013, 2016).

El género *Aspergillus* es de gran importancia económica, por un lado es usado para la síntesis de químicos, transformaciones biotecnológicas y para la producción de enzimas; y por otro lado, son capaces de contaminar alimentos y piensos (granos y cereales) en diferentes etapas incluyendo pre y post cosecha, almacenamiento y manipulación de los mismos (Pitt y Hocking, 2009).

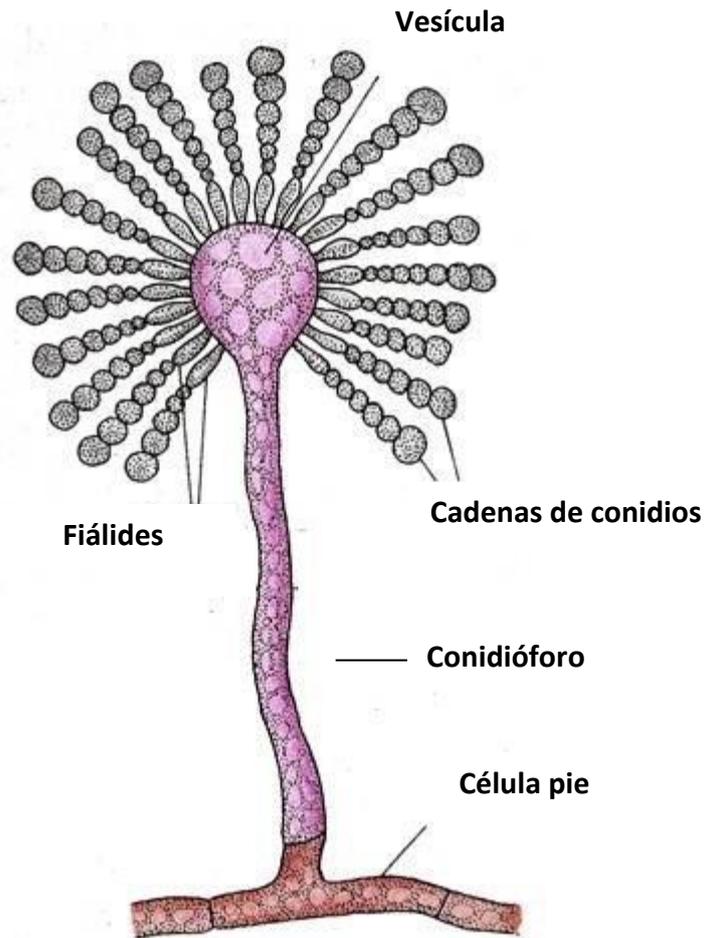
Las micotoxinas más importantes producidas por el género *Aspergillus*. que conllevan consecuencias económicas a nivel mundial son AFs, ocratoxina A (OTA), esterigmatocistina y ácido ciclopiazónico (ACP). En la tabla 2 se mencionan las principales especies toxicogénicas de este género y las micotoxinas asociadas a cereales y oleaginosas (Pitt y Hocking, 2009).

**Tabla 2. Potencial toxicogénico de las principales especies del género *Aspergillus* que contaminan cereales y oleaginosas (Fuente: Pitt y Hocking, 2009).**

<b>Especies de <i>Aspergillus</i></b>	<b>Micotoxinas</b>
<i>A. candidus</i>	Ácido kójico
<i>A. clavatus</i>	Citochalasina E, paulatina, gliantripina, triptoquivalinas
<i>A. carbonarius</i>	Ocratoxina A
<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> y B <sub>2</sub> , ácido ciclopiazónico
<i>A. fumigatus</i>	Fumitremorginas, gliotoxinas, fumigaclavinas, fumagilinas, verruculogen
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxinas, ácido penicílico, emodina
<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> y G <sub>2</sub> , ácido kójico
<i>A. tamarii</i>	Ácido ciclopiazónico, ácido kójico
<i>A. terreus</i>	Territrems
<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina
<i>A. wentii</i>	Emodina

### **1.2.2. Taxonomía e identificación de especies del género *Aspergillus***

*Aspergillus* es un género que se caracteriza por la producción de hifas especializadas denominadas conidióforos, sobre las que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios. El conidióforo característico de *Aspergillus* sp. presenta tres partes bien diferenciadas: una vesícula, un estipe y una célula pie. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, las que habitualmente se denominan fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides, se encuentran otro tipo de células que reciben el nombre de métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan tanto fiálides como métulas toman el nombre de biseriadas (Abarca, 2000a). Es así que estas características estables, combinadas con otras características micro y macroscópicas primarias y secundarias constituyen la base para la taxonomía clásica del género *Aspergillus* (Figura 2)



**Figura 2. Características morfológicas para la clasificación de especies del género *Aspergillus* (Fuente: Sinha, 2013).**

La clasificación del género *Aspergillus* en subgéneros y secciones está basada fundamentalmente en cuatro características: presencia de teleomorfo (forma sexual), presencia o ausencia de métulas, disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula y coloración de las colonias (Abarca, 2000a).

Las diferentes secciones pertenecientes al género *Aspergillus*, se clasifican teniendo en cuenta las características macro y microscópicas de las colonias desarrolladas en los siguientes medios de cultivo: agar extracto de malta (MEA), agar Czapek extracto de levadura (CYA), agar nitrato glicerol al 25% (G25N), agar Czapek extracto de levadura sacarosa al 20% (CY20S) y agar creatina sacarosa (CREA) (Klich y Pitt, 2002; Samson y col., 2010). Todos estos medios son incubados a 28 y/o 37 °C durante 7 días, para permitir el desarrollo de las colonias y luego se procede a la observación de las siguientes características:

*Principales características macroscópicas:*

- Diámetro de las colonias
- Coloración del anverso y del reverso de las colonias
- Presencia de esclerocios
- Presencia de gotas de exudado
- Presencia de pigmento difusible
- Textura de las colonias

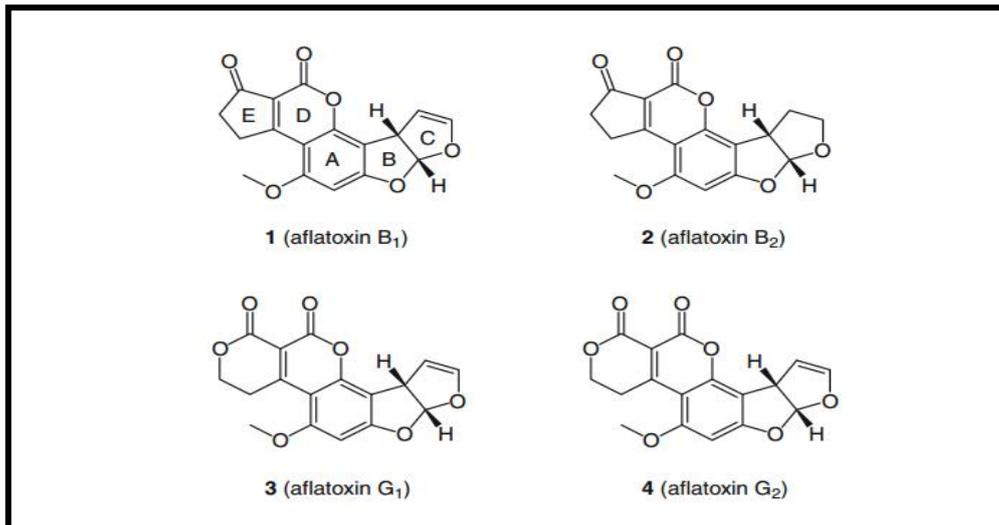
*Principales características microscópicas:*

- Disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula
- Longitud y anchura de los estipes
- Forma y diámetro de las vesículas
- Longitud y anchura de las métulas y fiálides
- Forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios
- Forma, tamaño y color de las células de Hülle
- Forma, tamaño y color de las ascosporas (Abarca, 2000)

### **I.2.3. Aflatoxinas**

Las AFs son las micotoxinas más estudiadas. Fueron descubiertas y aisladas en 1960 luego de la muerte de decenas de aves (patos y pavos) por consumir harina de maíz contaminada con estos compuestos. *A. flavus* fue identificado como el principal contaminante de estas harinas y productor de los metabolitos secundarios tóxicos antes mencionados, razón por la cual fueron denominadas como “aflatoxinas” (Russell- Paterson y Lima, 2015).

Las AFs constituyen un grupo de micotoxinas estructuralmente relacionadas a una difuranocumarina (compuestos orgánicos heterocíclicos), sintetizadas por la vía de los policétidos. En base a su fluorescencia azul (blue) y verde (green) bajo luz UV y su movilidad relativa en cromatografía en capa fina se denominan de grupo B (AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>) y de grupo G (AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>). Estructuralmente, estos compuestos consisten en cinco anillos, que tienen un resto de furofurano (anillos B y C), un anillo aromático de seis miembros (A), un anillo de lactona de seis miembros (D) y una pentanona de cinco miembros, en el caso de las AFs B, o un anillo de seis, en el caso de las AFs G (E) (Brase y col., 2013) (Figura 3). Son producidas principalmente por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* aunque se han reportado otras cepas capaces de producirlas (Arrúa Alvarenga y col., 2013) (Tabla 3).



**Figura 3. Estructura química de las aflatoxinas más importantes en alimentos.**  
(Fuente: Brase y col., 2013).

**Tabla 3: Especies productoras de AFs (Fuente: Arrúa Alvarenga y col., 2013)**

Sección	Especie	Micotoxinas reportadas
Flavi	<i>Aspergillus flavus</i>	AFB <sub>1</sub> ; AFB <sub>2</sub> ; AFG <sub>1</sub> ; AFG <sub>2</sub> ; AFM <sub>1</sub> ;
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	
	<i>Aspergillus nomius</i>	
	<i>Aspergillus arachidicola</i>	AFB <sub>1</sub> ; AFB <sub>2</sub> ; AFG <sub>1</sub> ; AFG <sub>2</sub>
	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>	
	<i>Aspergillus bombycis</i>	AFB <sub>1</sub>
	<i>Aspergillus pseudotamarii</i>	
	<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>	AFB <sub>1</sub> ; AFG <sub>1</sub>
<i>Aspergillus toxicarius</i>		
Ochraceorosei	<i>Aspergillus ochraceoroseus</i>	AFB <sub>1</sub>
	<i>Aspergillus rambellii</i>	
Nidulantes	<i>Emericella venezuelensis</i>	AFB <sub>1</sub>
	<i>Emericella astellata</i>	
	<i>Apergillus zhaoqingensis</i>	

La principal diferencia en la producción de micotoxinas entre *A. flavus* y *A. parasiticus* es que la mayoría de las cepas de *A. parasiticus* producen tanto AFs de grupo G como B en altas concentraciones, mientras que *A. flavus* produce sólo aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Pitt y Hocking, 1999). Las AFs son cancerígenos, inmunotóxicos y genotóxicos que afectan directamente la estructura de ADN (Williams y col., 2004). La AFB<sub>1</sub>, es el carcinógeno natural más potente conocido y es la micotoxina que con mayor frecuencia sintetizan las

cepas toxicogénicas. La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, 1993), ha considerado a esta micotoxina como carcinógeno humano del Grupo 1. Esta toxina puede causar grandes pérdidas económicas y serios riesgos en la salud humana y animal (De Oliveira Rocha y col., 2011).

Las AFs pueden estar presentes en una amplia gama de productos alimenticios, particularmente cereales, oleaginosas, especias y frutos secos. Productos agrícolas como maíz, maní, pistachos, pimienta negra, frutos secos e higos son considerados como alimentos de alto riesgo de contaminación por AFs, pero estas toxinas también han sido detectadas en otros productos. Los niveles más altos se encuentran generalmente en productos provenientes de las regiones más cálidas del mundo donde hay grandes variaciones climáticas, y se registran temperaturas y actividades de agua óptimas para el crecimiento de hongos aflatoxicogénicos (Pitt y Hocking, 2009).

### **I.3. Principales cultivos en Argentina**

La agricultura extensiva argentina está fuertemente identificada con cinco granos: trigo, maíz (cereales), girasol, maní y soja (oleaginosas). Ello se debe tanto a la superficie dedicada a su producción como a los ingresos que generan sus exportaciones. La producción agrícola extensiva argentina está orientada principalmente a los mercados externos. Muchas de las regiones que hoy son casi exclusivamente productoras de grano, hace unos pocos años eran identificadas como mixtas, pues coexistían en ellas la producción de granos y la ganadería, o incluso eran netamente ganaderas. En los últimos 20 años esas tierras experimentaron enormes transformaciones, que se hicieron extensivas a la agricultura argentina en general (Satorre, 2005).

Dentro de los cereales, el trigo y el maíz ocupan un lugar de privilegio en Argentina, ya que son cultivos centenarios y tienen activa participación en el comercio mundial desde comienzos del siglo pasado. Como consecuencia del aumento de su producción, en los últimos años se sumaron a ese destacado grupo el arroz y la cebada. Considerando el último quinquenio, en el caso del maíz y el trigo, se ha producido un considerable crecimiento de la agroindustria elaboradora, que ha derivado en una menor exportación neta de materias primas y un incremento en las exportaciones con valor agregado (SAGPyA, 2010).

Por otro lado, el maní también es un cultivo de gran importancia en la agricultura extensiva del país. Argentina es el mayor exportador mundial de maní manufacturado, y principal proveedor de la Unión Europea. En el 2013 se exportó el 95% de la producción, desplazando a China y Estados Unidos (Cámara Argentina del Maní, 2015). El 95,1% de la

producción nacional de maíz se cultiva en el sur de la provincia de Córdoba (Bolsa y Cámara de Cereales en Córdoba, 2011).

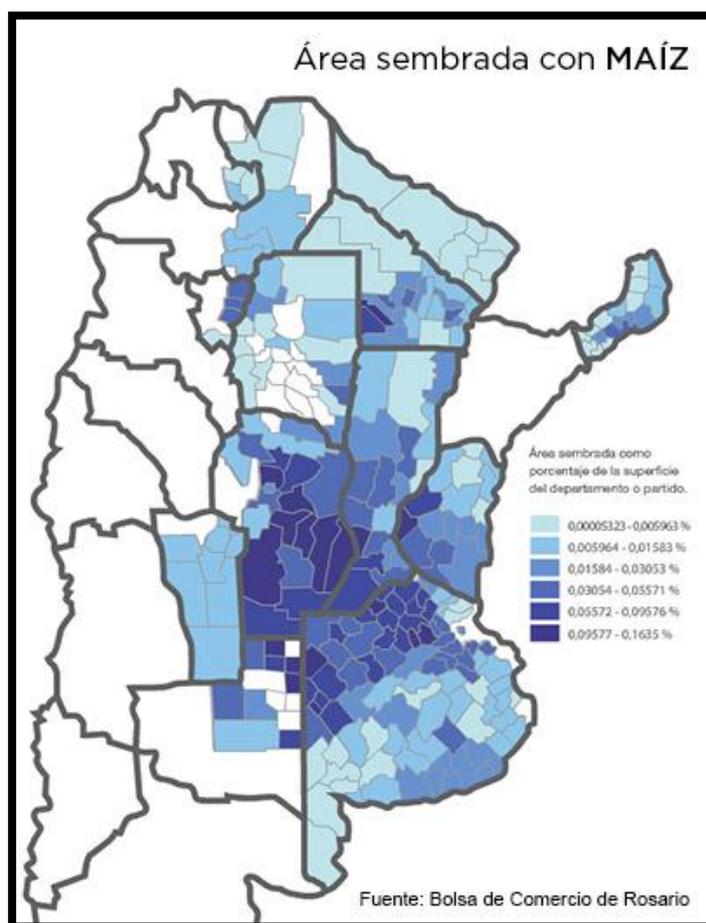
La tendencia de la producción del maíz es creciente, aunque con oscilaciones vinculadas a las condiciones climáticas, cambiarias y de derechos de exportación. En la actualidad, gracias a las nuevas circunstancias económicas, si bien existen condiciones climáticas adversas, se estaría alcanzando un nivel récord que hemos señalado de 130 millones de toneladas, casi un 50% más que las producciones del año pasado. El crecimiento más espectacular es el estimado para el maíz, elevándose a una producción de 48 millones de toneladas, lo que representa un 21% más comparado con la del año pasado. Por su parte, el trigo y girasol también favorecieron las expectativas para este año, mientras que la soja logró una producción igual a la del año pasado que era lo que se esperaba (Ferrerres, 2017)

### **I.3.1. La importancia del maíz en Argentina.**

El maíz es el segundo cultivo más importante en la Argentina luego de la soja, con una participación del 24% de la producción total de granos del país. Es un insumo clave de una gran variedad de industrias, principalmente aquellas destinadas al uso del cereal como forraje para la alimentación de ganado vacuno, avícola y porcino (MAIZAR, 2013).

También tiene una importante participación la molienda húmeda y seca para la producción de distintos derivados para alimentación humana y productos químicos. Así mismo, la exportación es el principal destino del cereal, representando entre el 70 y 75% de la producción (fyo. SA, 2012.)

El área de siembra del cereal en nuestro país es muy dispersa, pero las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires concentran el 70% de la producción con los mejores rendimientos productivos y más oportunidades de destinos de la cosecha (Ministerio de Agroindustria, 2015) (Figura 4).



**Figura 4. Principales áreas sembradas de maíz en Argentina (Fuente: Bolsa de comercio de Rosario, 2015).**

El consumo de maíz viene incrementándose aceleradamente. El rápido crecimiento de la industria de etanol, la recuperación de la industria aviar, los nuevos mercados y el aumento de la población son algunas de las razones que han llevado a que el consumo de maíz crezca más de un 35% durante la última década.

### **I.3.2. Poblaciones de *Aspergillus* spp. en semillas de maíz y otros cultivos en Argentina**

Las semillas de maíz, tanto en la planta como durante el almacenamiento, poseen una microbiota particular asociada a bacterias, hongos e insectos que pueden producir daños tanto al grano como a la planta. El ataque fúngico puede empezar en los tejidos sanos o dañados por agentes biológicos o factores ambientales (Woloshuk y col., 1997). En los campos de cultivos, estas semillas están en contacto directo con comunidades de hongos presentes en el suelo o la vegetación circundante, tales como varios integrantes de los

géneros: *Fusarium.*, *Penicillium.*, *Alternaria.*, *Paecilomyces.*, *Scopulariopsis.* etc., pero en especial por especies de *Aspergillus* y *Penicillium* que bajo condiciones ambientales apropiadas (temperatura y humedad) y por su gran capacidad xerofílica pueden ser los primeros colonizadores del grano en el almacenaje, causando biodeterioro del mismo. Dentro de las actividades biológicas de importancia en el almacenamiento, se destaca la producción de micotoxinas. (Samson y col., 2000).

La presencia de micotoxinas en los alimentos implica riesgos agudos o crónicos en salud pública, con repercusiones nacionales e internacionales en el ámbito del control sanitario y por consiguiente en la comercialización de estos granos (Van Egmond, 1989).

Las especies de *Aspergillus* sección *Flavi*, se han estudiado en maíz en muchas partes del mundo. Argentina, aporta abundante información al respecto, especialmente en la provincia de Santa Fe, que produce casi el 30% de la cosecha nacional de maíz (Nepote y col. 1994; 1997; Resnik, 1996; Chulze y col. 1989; Etcheverry y col., 1999; Picco y col., 2000; Nesci y Etcheverry, 2002; Alaniz Zanon y col., 2013; Camilleti y col., 2017), pero también cultiva en otros cultivos, como maní, sorgo, algodón, trigo, etc. (Barros y col., 2003; Pildain y col., 2004).

Argentina tiene una amplia zona de cultivo de maíz, que presentan distintos tipos de climas (cálidos y húmedos) y suelos que afectan en cierta medida la ecología y distribución de los hongos en general y las especies de *Aspergillus*. en particular). El conocer la distribución de las especies toxicogénicas de *Aspergillus*, permite desarrollar en los países productores programas de control dirigidos a las probables áreas de riesgo mediante la adecuada rotación de cultivos y el manejo de los rastrojos, fuente primaria de estos hongos (Sepúlveda y Piontelli, 2005).

#### **I.4. Fitosanitarios**

Los productos fitosanitarios, también llamados agroquímicos, plaguicidas o plaguicidas, son sustancias químicas o mezclas de sustancias destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas. Dentro de estas se incluyen a insectos, hierbas, pájaros, mamíferos, moluscos, peces, nemátodos o microbios que compiten con los humanos para conseguir alimentos. Son destructores, propagan enfermedades o son vectores de éstas, o causan molestias. Los plaguicidas en la actualidad son necesarios para porteger la sanidad de las plantas, y con ello nuestros alimentos. Pueden ser de origen biológico o de síntesis química. Permiten minimizar o impedir el daño que las plagas pueden causar a los cultivos, y, por lo tanto, afectar el rendimiento y la calidad de la producción de los alimentos. No son necesariamente venenos, pero pueden

ser tóxicos para el ambiente y seres vivos (EPA, 2007). Los plaguicidas se pueden clasificar según la familia química a la que pertenezcan. Las más importantes son: organofosforados, organoclorados, carbamatos y triazinas (CASAFE, 2012).

La agricultura es uno de los pilares fundamentales de la economía argentina, lo que trae aparejado la aplicación de significativas cantidades de plaguicidas que impactan sobre la calidad del ambiente. En nuestro país desde los años 70, se registran datos sobre el impacto ambiental de los plaguicidas en los alimentos y en la salud humana (Villaamil Lepori, 2013).

Desde la década del 40 hasta los años 70, los plaguicidas organoclorados (POC) fueron ampliamente utilizados en Argentina al igual que en el resto del mundo. En la misma época, irrumpieron en el mercado los plaguicidas organofosforados (POF) y los carbámicos (PCar). El organismo responsable del registro de agroquímicos en Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad Vegetal y Calidad Agroalimentaria (SENASA), mediante diferentes resoluciones fue restringiendo y prohibiendo el uso de los POC y ciertos POF y PCar, debido a sus conocidos efectos adversos sobre la salud humana y el ambiente, así como por su elevada persistencia en el ambiente (Villaamil Lepori, 2013).

A partir de los años 70, la producción y el consumo de los agroquímicos aumentó, especialmente en los países productores de granos, acrecentándose los riesgos de efectos adversos a largo plazo en la población en general, en los trabajadores y en el ambiente (Brunstein y col. 2009).

#### **I.4.1. Principales plaguicidas utilizados en Argentina**

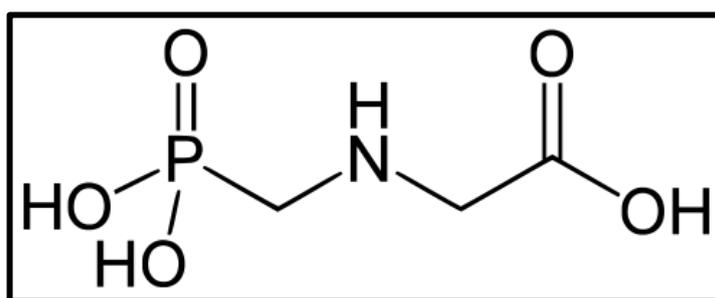
Actualmente, los principales agroquímicos utilizados en Argentina son los herbicidas, de los cuales los compuestos más utilizados son el glifosato y la atrazina, seguidos de los insecticidas cipermetrina, clorpirifós y lambdacialotrina. A pesar de haber disminuido el empleo de piretroides, respecto al año 2010, el principal insecticida aplicado actualmente es el clorpirifós. También, hubo desarrollo de insecticidas como el rynaxypyr (diamidasantranílicas) y fipronil (fenilpirazol), seguido del uso de fungicidas; con un registro menor se ubicaron los curasemillas y acaricidas (Villaamil Lepori, 2013).

##### **I.4.1.1. Glifosato**

El glifosato (Figura 5), técnicamente N-fosfonometilglicina,  $C_3H_8NO_5P$ ; es el principio activo de varios herbicidas comerciales, que se formulan junto a un surfactante. Este herbicida es de amplio espectro, no selectivo y de uso habitual en Argentina y en el resto del

mundo para eliminar malezas indeseables en ambientes agrícolas (como cultivos de maíz y soja) y no agrícolas (CASAFE, 2005). Según su riesgo toxicológico es clasificado como un plaguicida de clase III (producto poco peligroso, banda verde) (OMS; 2009) Su modo de acción es la inhibición de la síntesis de aminoácidos esenciales produciendo un bloqueo metabólico que induce clorosis y necrosis total sobre el tejido tratado (Nufarm, 2015).

En la actualidad se aplican anualmente 160.000 toneladas de glifosato para controlar las malezas en los cultivos de soja y maíz. La tasa de aplicación recomendada varía de 2 a 4 L/ha, sin embargo, dosis más altas o aplicaciones repetidas en la pre-cosecha o aplicación post cosecha en sistemas de siembra directa son comunes. El glifosato en sí es un ácido, pero se usa comúnmente en forma de sal, la más común es la sal de isopropilamina. Es una sustancia altamente soluble en agua que puede formar complejos fácilmente (Nufarm, 2015).



**Figura 5. Estructura química de glifosato.**

#### *1.4.1.1.1. Efectos del glifosato en el ambiente*

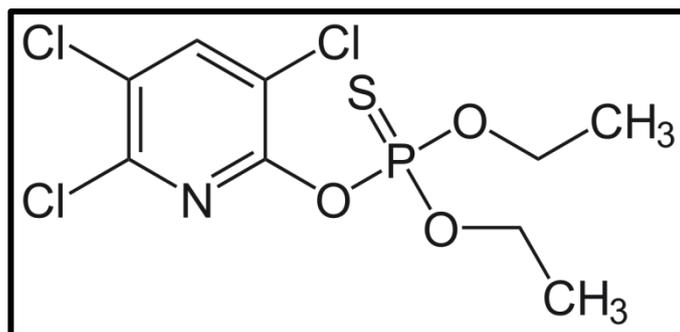
La aplicación excesiva y repetida de plaguicidas puede dar como resultado un alto nivel de residuos acumulados en los productos vegetales, lo que plantea un potencial riesgo para la salud de los consumidores y el impacto ambiental. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) ha establecido un nivel máximo de contaminantes (MCL) de glifosato en agua potable a 0,7 µg/mL, mientras que el nivel residual máximo (LMR) de glifosato en la mayoría de los cultivos se fija en 0,1 µg/g, por la Unión Europea. Se ha determinado que los principales efectos adversos detectados en el hombre como consecuencia de la exposición accidental a glifosato son gastrointestinales, dérmicos, en vías respiratorias superiores, neurológicos, cardiovasculares, oculares, musculares y/o varios de estos efectos combinados (US-EPA, 2010). Por otro lado, el glifosato puede producir efectos secundarios no deseados sobre los microbios del suelo. Los

hongos pueden utilizar el glifosato como nutriente y también como sustrato energético (Massisha y col., 2011).

La persistencia de este herbicida en suelos es muy variable y depende de múltiples factores. Se une firmemente a las partículas del suelo, alcanzando una persistencia de hasta 170 días con una vida media habitual de unos 45 a 60 días (Vereecken, 2005). Pero durante este periodo es posible que afecte la microbiota del suelo. Algunos estudios han demostrado que la adición de este compuesto puede inhibir el crecimiento de micorrizas fúngicas y por consiguiente pueden estimular el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Fusarium* o *Aspergillus*. También es posible que se produzcan cambios morfológicos en sus esporas y alteraciones en la estructura y coloración de micelio y la consecuente producción de sus micotoxinas, representando así un peligro potencial para suelos agrícolas (Krzysko-Lupicka y Sudol, 2008; Barberis y col., 2013). Otros estudios demuestran que al aplicar glifosato asociado con otros plaguicidas en suelo produce una disminución de la biomasa bacteriana y la inhibición de su actividad enzimática (Tejada, 2009). Además, se ha asociado a este herbicida con una reducción en la diversidad microbiana del suelo, lo que puede provocar alteraciones en la cadena trófica y procesos biológicos en este ecosistema (Lupwayi y col., 2009).

#### I.4.1.2. Clorpirifós

El clorpirifós (Figura 6), técnicamente O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-2-piridil fosforotioato,  $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ ; es un insecticida organofosforado de aplicación foliar y edáfica. Actúa sobre el sistema nervioso de insectos provocando la muerte de los mismos. Según su riesgo toxicológico es clasificado como un plaguicida de clase II (producto moderadamente peligroso, banda amarilla) (OMS; 2009). El clorpirifós y otros plaguicidas organofosforados pueden generar un riesgo potencial para los seres humanos y otros organismos al acumularse en los tejidos vivos (Serrano y col., 1997; Wang y col., 2005). Por esta razón, constituye una amenaza para los sistemas de producción de especies acuáticas si llega a los cuerpos de agua (ATSDR, 2011). El clorpirifós no se disuelve fácilmente en agua; puede adherirse a partículas y sedimentos suspendidos y su vida media en el suelo varía de 10 a 120 días, por lo que es uno de los plaguicidas más frecuentemente detectados en aguas superficiales y subterráneas en el mundo; y una cantidad considerable se acumula en el suelo (USGS, 2000; Domagalski y Munday, 2003). En Argentina, son escasos los estudios sobre la contaminación causada por clorpirifós. El clorpirifós (Jergentz y col., 2004; 2005; Marino y Ronco, 2005).



**Figura 6. Estructura química de clorpirifós.**

#### *1.4.1.2.1. Efectos del clorpirifós en el ambiente*

Los organismos vivos están expuestos a residuos de clorpirifós en el suelo y el agua, lo que resulta un riesgo para el equilibrio ecológico (Kulshrestha y Kumari, 2011). También hay algunos estudios sobre los residuos de clorpirifós en la cadena alimentaria (Aysal y col., 2004; Chandra y col., 2010). Se han observado daños relevantes en el hombre asociados a alteraciones endocrinas, defectos congénitos, bajo peso al nacer, reducción de la circunferencia de la cabeza, trastornos del sistema nervioso y anomalías del sistema inmunológico (Cisar y Snyder, 2000; Furlong y col., 2006; Singt y col., 2009; Rauh y col., 2011). En los animales la exposición a clorpirifós da como resultado estrés oxidativo, cáncer de vejiga y daño cromosómico (Lee y col., 2004; Giordano y col., 2007). Por otro lado, los microorganismos del suelo pueden tener diferentes tipos de respuesta frente a los plaguicidas, el efecto depende de diversos factores incluyendo el mecanismo de acción del plaguicida, su biodisponibilidad y propiedades fisicoquímicas del suelo, de la dosis utilizada, concentración en suelo, etc. Las concentraciones bajas del plaguicida en suelo muy pocas veces afectan a la población microbiana y a sus enzimas. Sin embargo, se ha informado que concentraciones más altas que las recomendadas (dosis > 4L/ha) producen efectos perjudiciales sobre la biomasa microbiana, actividad enzimática, respiración microbiana; siendo las más significantes la reducción de la biomasa (Vischetti y col., 2007) y actividad enzimática y metabólica (Singh y col., 2003a). Luego de tratamientos con clorpirifós, se han informado efectos inhibitorios en la fijación de nitrógeno, en la mineralización de nitrógeno, fósforo y potasio (Martinez-Toledo y col., 1992; Pozo y col., 1995; Sardar y Kole, 2005) y en la amonificación de arginina en microorganismos rizosféricos (Menon y col., 2004).

Es importante conocer el efecto de los plaguicidas, más allá del control de enfermedades severas en las plantas. El uso correcto de estos, como en el caso de los fungicidas, puede conducir a una disminución de la micobiota y seguido a esto una disminución de la cantidad de micotoxinas producida. Algunos estudios muestran que el uso de concentraciones subletales de plaguicidas pueden favorecer la síntesis de micotoxinas (Moss y Frank, 1987). Por otro lado, también se informó que los plaguicidas pueden disminuir la síntesis de micotoxinas sin afectar el crecimiento fúngico (Draughton y Ayres, 1978; 1982).

En las últimas décadas las exigencias internacionales en materia alimentaria son cada vez mayores, las legislaciones de algunos países desarrollados establecen parámetros más estrictos, en procura de ejecutar políticas que aseguren un elevado nivel de protección de la vida y la salud de las personas asegurando el consumo de alimentos de calidad e inocuos. Estas exigencias se basan, principalmente, en factores higiénico-sanitarios, como es el caso de las micotoxinas y de los plaguicidas. La ingestión de alimentos que contengan estas sustancias durante cierto tiempo puede generar diversos efectos adversos sobre la salud humana; dependiendo de las dosis ingeridas y las condiciones propias de los individuos (Antunes y col., 2010).

Bajo el sistema agrícola actual, los plaguicidas son contaminantes habituales del suelo y de muchos alimentos. Esto determina la importancia de evaluar el impacto que estos ejercen sobre la micobiota de los suelos cultivables. Desde la introducción de los plaguicidas organofosforados en los nuevos sistemas de producción, los investigadores se han abocado al empleo de ensayos más elaborados y sensibles para evaluar las diferentes facetas del impacto de los mismos sobre la salud humana y los sistemas ecológicos. Sin embargo, no existe suficiente información científica sobre el impacto de clorpirifós y glifosato sobre la micobiota del suelo, en particular los hongos toxicogénicos, tanto a corto como a mediano plazo. En estudios previos se informó que el suelo constituye la principal fuente de inóculo para especies de *Aspergillus* sección *Flavi* determinando la posterior colonización de los granos de maní o maíz, siendo AFB<sub>1</sub> la micotoxina más frecuente (Barros y col., 2003; 2005; Magnoli y col., 2007; Alaniz-Zanon y col., 2013). Desde el punto de vista reglamentario, las AFs junto a los plaguicidas se consideran actualmente como contaminantes inevitables de los alimentos, dado que no pueden prevenirse ni eliminarse totalmente de las materias primas con las prácticas agrícolas utilizadas en la actualidad. Debido a los cambios en las prácticas agro-culturales resulta importante conocer la influencia de diferentes dosis de agroquímicos utilizados comúnmente en los cultivos regionales, sobre la micobiota potencialmente toxicogénica presente en el suelo y la posterior aparición de micotoxinas asociadas a los granos destinados al consumo tanto humano como animal.

## II. HIPOTESIS

Las especies potencialmente toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* están presentes en suelos agrícolas destinados al cultivo de soja, maíz y maní. El crecimiento de estos hongos y la producción de aflatoxinas están afectados por la exposición a diferentes dosis de clorpirifós y glifosato.

## III. OBJETIVOS

### Objetivo General

Aislar e identificar a las especies toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* en suelos agrícolas expuestos a plaguicidas, y evaluar el efecto *in vitro* e *in situ* de diferentes dosis de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas.

### Objetivos Específicos

- Aislar e identificar cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos destinados al cultivo de soja, maní o maíz expuestos a la aplicación de los plaguicidas.
- Caracterizar el perfil toxicogénico de las cepas aisladas evaluando la capacidad de producir aflatoxinas.
- Determinar la influencia de diferentes dosis de clorpirifós y glifosato, sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura a través de ensayos *in vitro* e *in situ*.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### IV.1. Materiales:

#### IV.1.1. Medios de cultivo

*Agar Dichloran Rosa de Bengala Chloranphenicol (DRBG)*: peptona 5 g, glucosa 10 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5 g,  $KH_2PO_4$  1 g, diclorán 0,002 g, rosa de bengala 0,0025 g, agar-agar 15 g, agua destilada 1000 mL.

*Agar Extracto de Malta (MEA)*: extracto de malta 20 g; glucosa 20 g; peptona 5 g; agar-agar 15 g; agua destilada 1000 mL.

*Agar Harina de Maíz*: maíz molido 30 g; agar-agar 20 g; agua destilada 1000 mL.

*Medio Czapek Dox Modificado (CYS)*: glucosa, 10 g;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,5 g;  $NaNO_3$ , 2 g;  $FeSO_4 \cdot 4H_2O$ , 0,01 g;  $K_2HPO_4$ , 1 g; extracto de levadura, 0,5 g; agua destilada 1000 ml.

*Medio Czapek – extracto de levadura con 20% de sacarosa (CY20S)*:  $K_2HPO_4$  1 g, Czapek concentrado 10 mL, extracto de levadura 5 g, sacarosa 200 g, agar-agar 15 g, agua destilada cnp. 1000 mL.

#### IV.1.2. Plaguicidas:

- Clorpirifós (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridil phosphorothioato), (Chem-Service, USA., 99% de pureza).  
Formulado comercial: de Hor-tal®, línea jardín
- Glifosato (N-phosphomethyl Glycine), (Sigma Chemicals, USA., 99,2% de pureza).  
Formulado comercial: Roundup Ultramax®

#### IV.1.3. Soluciones:

- Solución diluyente de agua peptonada.
- A partir de una solución madre de 10 g/L de Clorpirifós se prepararon las siguientes soluciones de trabajo:

- ✓ Ensayo de crecimiento:
  - 0.06 mM: 2 mL Clorpirifós; 1000 mL agua destilada estéril.
  - 0.14 mM: 5 mL Clorpirifós; 1000 mL agua destilada estéril.
  - 0.3 mM: 10 mL Clorpirifós; 1000 mL agua destilada estéril.
  - 0.6 mM: 20 mL Clorpirifós; 1000 mL agua destilada estéril.
  - 1.4 mM: 50 mL Clorpirifós, 1000 mL agua destilada estéril.

- A partir de una solución madre 2 M de Glifosato se prepararon las siguientes soluciones de trabajo:
  - ✓ Ensayo de crecimiento:
    - 20 mM: 10 mL Glifosato; 1000 mL agua destilada estéril.
    - 50 mM: 25 mL Glifosato; 1000 mL agua destilada estéril.
    - 100 mM: 50 mL Glifosato; 1000 mL agua destilada estéril.
    - 200 mM: 100 mL Glifosato; 1000 mL agua destilada estéril.
    - 500 mM: 250 mL Glifosato, 1000 mL agua destilada estéril.
  
- *Solvente de extracción de AFB<sub>1</sub> de medio de cultivo*: cloroformo: acetona (9:1 v/v)
- *Solvente de extracción de AFB<sub>1</sub> de granos de maíz*: metanol:agua (60:40), hexano, Cloruro de Sodio.
- *Fase móvil para la cuantificación de AFB<sub>1</sub>*: acetonitrilo / metanol / agua (1:1:4 v/ v/ v)

## IV.2. Métodos:

### IV.2.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos agrícolas expuestos a la aplicación de los plaguicidas clorpirifós y glifosato.

#### IV.2.1.1. Muestreo de suelo.

Se realizó un muestreo de suelo agrícola en campos de la región sur de la provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas por más de 10 años. Se analizaron un total de 50 muestras correspondientes a 5 lotes (10 de cada lote). En cada lote se trazó una diagonal y se tomaron las muestras a una distancia de 100 m entre cada una. Las muestras se obtuvieron en el período post-cosecha de los lotes de maíz, momento en el cual ya se hubieron realizado todas las fumigaciones que comúnmente se aplican al cultivo. Se tomaron muestras de 1 Kg de la capa superior del suelo (5 cm de profundidad) con sacabocados. En el laboratorio, las muestras se secaron en estufa de aire forzado durante 1-2 días a 25-30°C y se tamizaron (2 mm de malla) para eliminar restos de vegetales y piedras. Luego se homogeneizaron y se cuartearon hasta lograr una muestra representativa de aproximadamente 500 g para el análisis. Se analizó la microbiota dentro de las 48 h del arribo al laboratorio. El resto de las muestras fueron almacenadas a 4°C para posteriores ensayos.

#### V.2.1.2. Aislamiento y enumeración de especies de la sección *Flavi*.

Se realizó el aislamiento de las cepas por el método de diseminación en superficie (Pitt y Hocking, 2009). Para ello, se homogeneizaron 10 g de muestra en 90 ml de agua peptonada al 0,1% y se realizaron diluciones seriadas factor 10. Se realizó en un medio de cultivo general de recuento de micobiota y de hongos xerofílicos: agar dichloran rosa de bengala chloranphenicol (DRBC). Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 5-7 días, solo aquellas conteniendo entre 10 y 100 colonias se utilizaron para el recuento. Las colonias representativas correspondientes al género *Aspergillus* se subcultivaron en agar extracto de malta (MEA) para su posterior identificación.

#### IV.2.1.3. Caracterización morfológica de las cepas de *Aspergillus*.

La identificación taxonómica de las diferentes cepas de esta sección se realizó mediante la evaluación de caracteres fenotípicos siguiendo el esquema de identificación propuesto por Klich (2002) Samson y col. (2007; 2010).

### **IV.2.2. Caracterización de los perfiles toxicogénicos de las cepas**

#### IV.2.2.1. Medios de cultivo e incubación.

Todas las cepas identificadas como *Aspergillus* de la sección *Flavi* se inocularon en placas de MEA y se incubaron durante 7 días a 25°C.

#### IV.2.2.2. Extracción, detección y cuantificación de AFs.

La extracción de AFs se realizó siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996) con algunas modificaciones. De cada colonia se tomaron por duplicado tres trozos de agar-MEA (1 x 1 cm), se transfirieron a un tubo Eppendorf y se extrajo la toxina con 500 µL de cloroformo. La mezcla se centrifugó por 20 min. a temperatura ambiente a 4.000 rpm, luego el extracto clorofórmico se separó del micelio y se evaporó a sequedad. Para detectar la presencia de AFs en el extracto seco se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC). Uno de los extractos secos se disolvió en 100 µL de cloroformo y se sembró junto a soluciones patrones de AFB<sub>1</sub> sobre una cromatoplaaca de sílica gel sin indicador de fluorescencia (G60, Merck). Como solvente de corrida para la misma se utilizó una mezcla de cloroformo: acetona (9:1 v/v) y la cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente en cuba saturada hasta que el frente del solvente alcanzó una altura de 10 cm a partir de la línea de siembra. La observación de las placas se realizó bajo luz UV a 360 nm. Se determinó cualitativamente la producción de AFs de cada aislante comparando la fluorescencia de las soluciones testigos con cada extracto.

La cuantificación de AFs en el extracto se realizó por HPLC siguiendo la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994). El otro residuo seco se resuspendió en 200  $\mu$ L de cloroformo y se derivatizó con 700  $\mu$ L de una mezcla conteniendo ácido trifluoroacético/ácido acético/agua (20:10:70 v/v/v). Las AFs derivatizadas (50  $\mu$ L) se analizaron usando un equipo HPLC de fase reversa con un sistema de detección de fluorescencia. El sistema de HPLC consistió de una bomba Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectado a un detector de fluorescencia programable Hewlett Packard 1046 y ambos conectados a una estación Hewlett Packard. Las separaciones cromatográficas se desarrollaron en una columna de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5  $\mu$ m, Luna-Phenomenex, Torrance, CA) conectada a una precolumna SecurityGuard KJO-4282 (20 x 4,6 mm i.d., tamaño de partícula 5  $\mu$ m, Phenomenex). La fase móvil empleada fue acetonitrilo/metanol/agua (1:1:4 v/v/v) a una velocidad de flujo de 1,5 mL/min. La longitud de onda de excitación y emisión fue de 360 y 440 nm, respectivamente. Se construyeron curvas de calibración con las soluciones testigo de diferentes concentraciones de AFB<sub>1</sub>. Las AFs presentes en las muestras se cuantificaron por correlación entre la altura de los picos cromatográficos de las muestras y las curvas estándares. Se determinó la concentración de AFs producida por gramo de micelio. El límite de detección del método analítico fue de 1 ng/mL.

#### **IV.2.3. Evaluación del efecto de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB<sub>1</sub> por especies toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperaturas.**

##### IV.2.3.1. *Evaluación in vitro.*

###### IV.2.3.1.1. Microorganismos.

Se seleccionaron aquellas cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* con mayor capacidad de producir AFs: *A. flavus* (AF 56 y AF 63) y *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55).

###### IV.2.3.1.2. Medios de cultivo.

Se prepararon placas de Petri conteniendo agar extracto de maíz (AHM) al 3% p/v (Astoreca y col., 2007; Oviedo y col., 2009) acondicionados a 0.928, 0.955 y 0.982 de  $a_w$  mediante el agregado de diferentes concentraciones de glicerol (Dallyn y Fox, 1980). La

$a_w$  de todos los medios se midió con un Aqualab Series 3 (Labcell Ltd., Basingstoke, Hants, UK).

#### IV.2.3.1.3. Plaguicidas.

Se utilizó clorpirifós (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) y glifosato (N-phosphomethyl glycine) como el correspondiente formulado comercial de cada uno de ellos (clorpirifós de Hor-tal®, línea jardín y glifosato de Roundup Ultramax®). A partir de cada uno de estos plaguicidas se prepararon soluciones de trabajo en agua destilada estéril, las cuales fueron adicionadas a los medios de cultivo a 45-50°C, en concentraciones crecientes de 0.06, 0.14, 0.3, 0.6 y 1.4 mM en el caso de clorpirifós y de 20, 50, 100, 200 y 500 mM para glifosato.

#### IV.2.3.1.4. Inoculación e incubación.

Los medios de cultivo se inocularon con suspensiones de conidios de las cepas en agar semisólido, mediante siembra en punción en la parte central de la placa. Luego fueron incubadas a 18, 28 y 37 °C, durante 21 días en bolsas de polietileno para mantener constante la  $a_w$ .

#### IV.2.3.1.5. Medición de los parámetros de crecimiento.

Se midieron diariamente dos diámetros en dos direcciones en un ángulo de 90° para cada colonia. La velocidad de crecimiento radial (mm/día) se calculó mediante una regresión lineal obtenida al enfrentar el radio de cada colonia versus el tiempo (días). Se determinó la fase de latencia (h) previa al crecimiento y la tasa de crecimiento diamétrico (mm/día) en relación a la cepa, la concentración de plaguicida, la  $a_w$  y la temperatura (Barberis y col., 2009). Para cada tratamiento los ensayos y medidas se llevaron a cabo por duplicado.

#### IV.2.3.1.6. Determinación de AFB<sub>1</sub>.

Se evaluó la producción de AFB<sub>1</sub> para cada cepa a los 7, 14 y 21 días de incubación obtenidas bajo cada condición de  $a_w$ , temperatura y concentración de plaguicida. La extracción de AFs fue realizada siguiendo la metodología propuesta por Geisen (1996) y la cuantificación se determinó por HPLC fase reversa siguiendo la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994), ambas detalladas en el punto 2.2.2. El límite de detección del método analítico fue de 0.7 ng/g.

#### IV.2.3.2. *Ensayo in situ.*

##### IV.2.3.2.1. Microorganismos.

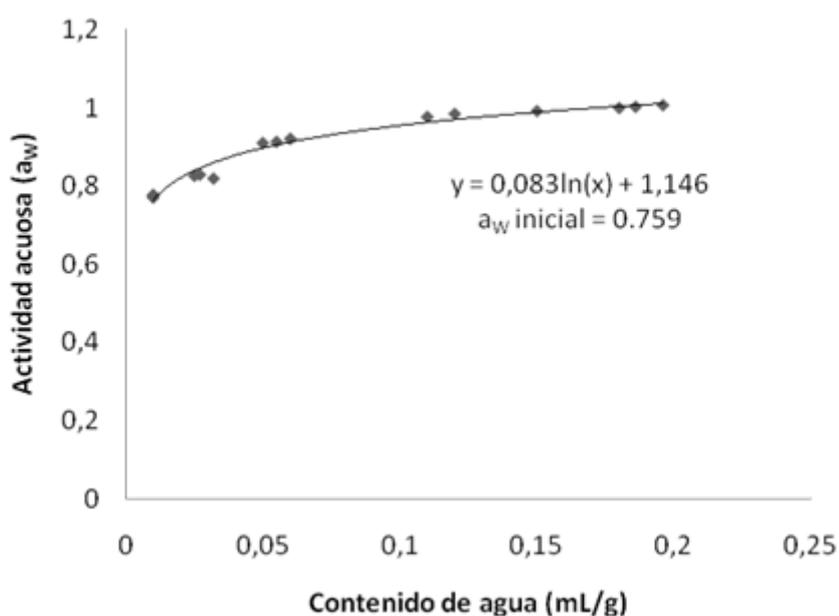
Se utilizaron dos de las cepas aflatoxigénicas de *Aspergillus* sección *Flavi*: *A. flavus* (AF63) y *A. parasiticus* (AP55) seleccionadas en el punto 2.3.1.1 por presentar los mejores parámetros de crecimiento en el medio AHM.

##### IV.2.3.2.2. Plaguicidas.

Se utilizaron los plaguicidas y soluciones de trabajo mencionadas en el punto 2.3.1.3.

##### IV.2.3.2.3. Acondicionamiento de los granos de maíz.

Los granos de maíz se esterilizaron con radiación gamma (10-12 Kgrays) y se conservaron asépticamente a 4°C hasta el momento de su uso. Este tratamiento se realizó para eliminar la microbiota natural del sustrato sin afectar su germinación, viabilidad y valor nutritivo (Etcheverry y col., 1999). Se llevó a cabo una curva de absorción (Figura 7), para lo cual se agregó a una cantidad conocida del sustrato, distintos volúmenes de agua; los granos se mantuvieron en reposo durante 72 horas y finalmente se midieron las  $a_w$  de los mismos para obtener los datos con los cuales se realizó la curva.



**Figura 7. Curva de absorción de granos de maíz a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .**

Para realizar el ensayo se colocó una cantidad conocida de granos de maíz en frascos de vidrio, luego se les adicionó diferentes volúmenes de una solución de clorpirifós o glifosato con la finalidad de obtener diferentes concentraciones 0.06, 0.14, 0.3 0.6 y 1.4 mM y 30, 50, 100, 300 y 500 mM, respectivamente. A los controles se les agregó un volumen de agua equivalente al volumen de la solución de trabajo. Los granos se dejaron estacionar durante un día para favorecer la homogenización de los mismos, período durante el cual se agitaron diariamente. Luego se rehidrataron teniendo en cuenta la curva de absorción anterior en relación a la  $a_w$  inicial de los mismos, para llegar a 0.98, 0.95 y 0.93 de  $a_w$ . Se mantuvieron en reposo durante dos días más y se midieron las distintas  $a_w$  alcanzadas mediante un Aqualab Series 3 (Decagon devices, Inc., WA., USA).

#### IV.2.3.2.4. Distribución de los granos de maíz.

Los granos rehidratados se colocaron en placas de Petri estériles formando una capa fina superficial (aproximadamente 20 g). Se prepararon tres placas para cada una de las condiciones de  $a_w$  y el control.

#### IV.2.3.2.5. Inoculación e incubación.

Los granos de maíz se inocularon con suspensiones de conidios en agar semisólido de las cepas en estudio. Esta inoculación se realizó sobre un grano ubicado en el centro de cada placa. Luego fueron incubadas a 25°C, durante 21 días en bolsas de polietileno para mantener constante la  $a_w$ .

#### IV.2.3.2.6. Medición de los parámetros de crecimiento.

Se midieron diariamente dos diámetros para cada colonia. La velocidad de crecimiento radial y la fase de latencia para cada condición de  $a_w$ , y concentración de plaguicida se determinaron según lo descrito en el punto 2.3.1.5. Para cada tratamiento los ensayos y medidas se llevaron a cabo por triplicado por un período de 21 días.

#### IV.2.3.2.7. Determinación de AFB<sub>1</sub>.

Se evaluó la producción de AFB<sub>1</sub> para cada cepa a los 7, 14 y 21 días de incubación desarrollada bajo cada condición de  $a_w$ , y concentración de plaguicida. Previo a la extracción las placas con los granos se inactivaron en autoclave (120°C durante 15 min.) para minimizar la carga de esporas fúngicas presentes en las mismas. Luego se secaron en estufa de aire forzado a 60°C durante 24 hs y se molieron. Una vez inactivados y molidos los granos, se realizó la extracción de AFs siguiendo la metodología propuesta por AOAC (1995) con modificaciones. La extracción de la toxina se realizó con una mezcla de metanol:agua (60:40 v/v), NaCl y hexano, agitando durante 30 minutos. Se

filtró con papel de filtro (Whatman N° 1) para separar los granos del extracto líquido, se tomó un volumen determinado de esta fase y se lo agitó con cloroformo para extraer la toxina. Por último, se evaporó el extracto clorofórmico a 60°C.

La detección y cuantificación de AFB<sub>1</sub> se determinó por HPLC fase reversa siguiendo la metodología propuesta por Trucksess y col. (1994) detallada en el punto 2.2.2. El límite de detección de la técnica utilizada fue de 2.2 ng/g.

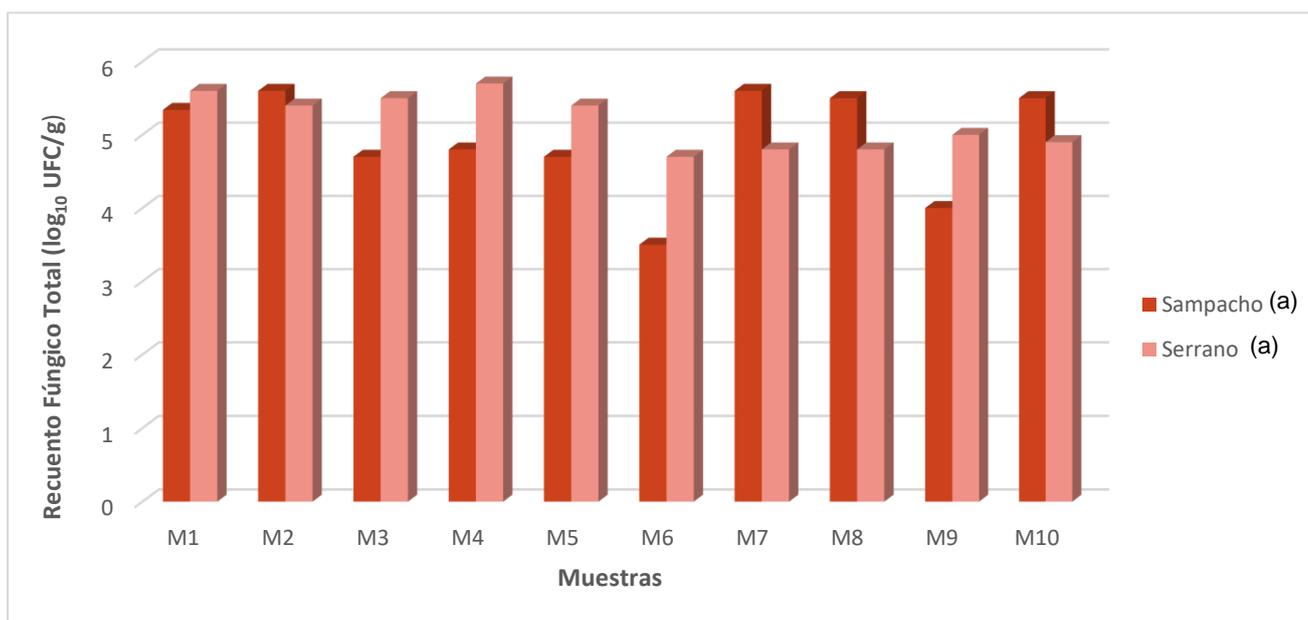
#### **IV.2.4. Análisis estadístico.**

El análisis de todos los datos se realizó mediante análisis de la varianza. Los recuentos de hongos y los datos porcentuales se transformaron usando una función logarítmica  $\log_{10}(x + 1)$  antes de aplicar el análisis de la varianza. Los datos de fase de latencia (hs) y velocidad de crecimiento (mm/d) fueron transformados usando la función logarítmica ( $\log_{10}$ ) para luego ser sometidos al análisis de la varianza para obtener el efecto de dos factores (concentración x  $a_w$ ) y tres factores (temperatura x  $a_w$  x concentración). La prueba de Fisher (LSD) fue utilizada para determinar las diferencias significativas de cada uno de los análisis realizados. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat 2010p de la Universidad Nacional de Córdoba.

## V. RESULTADOS

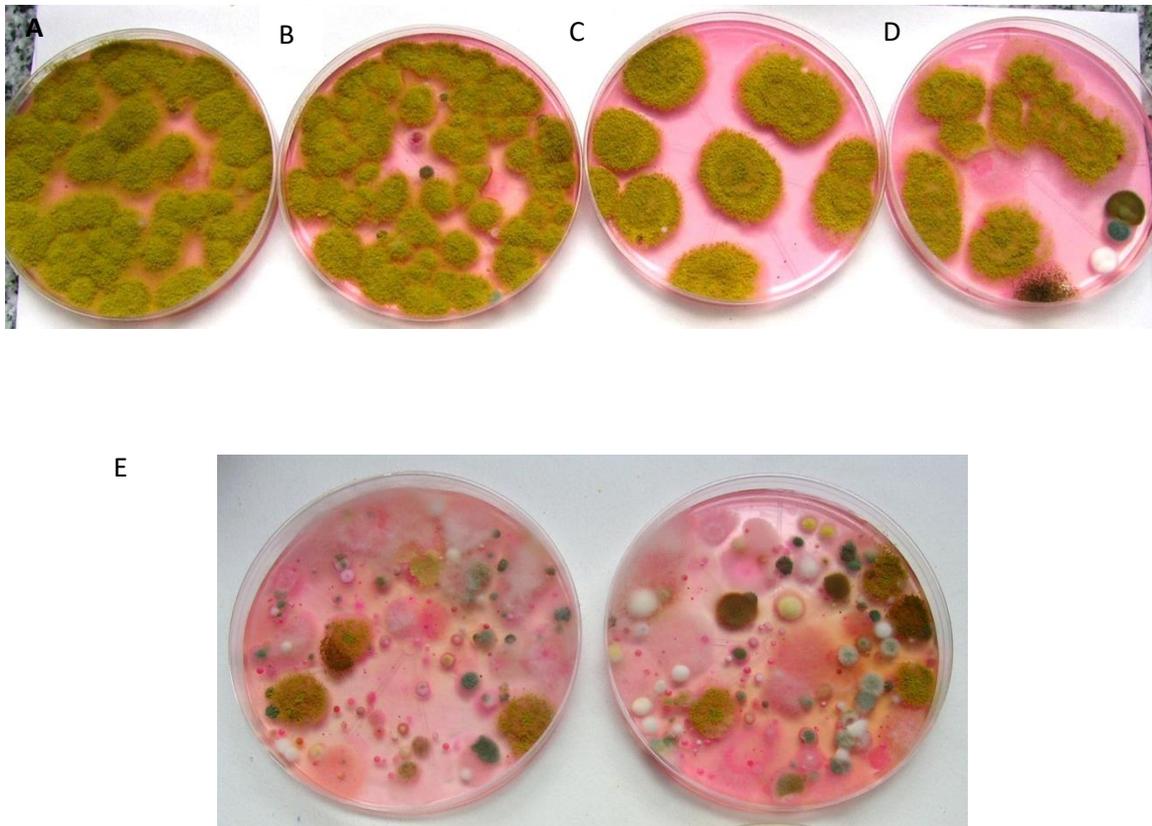
### V.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos agrícolas expuestos a la aplicación de los plaguicidas clorpirifós y glifosato.

La figura 8 muestra los recuentos fúngicos totales en medio DRBC de las muestras de suelo expuestas a plaguicidas tomadas en dos localidades del sur de la provincia de Córdoba. Los recuentos variaron entre 3,5 a 5,5 y 4,7 a 5,6  $\log_{10}$  UFC/g en las muestras de Sampacho y Serrano, respectivamente. Los valores medios en los recuentos fueron de  $5,19 \pm 0,56 \log_{10}$  UFC/g y  $5,05 \pm 0,37 \log_{10}$  UFC/g para cada localidad. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas en el recuento general entre las dos localidades analizadas ( $p > 0,01$ ).



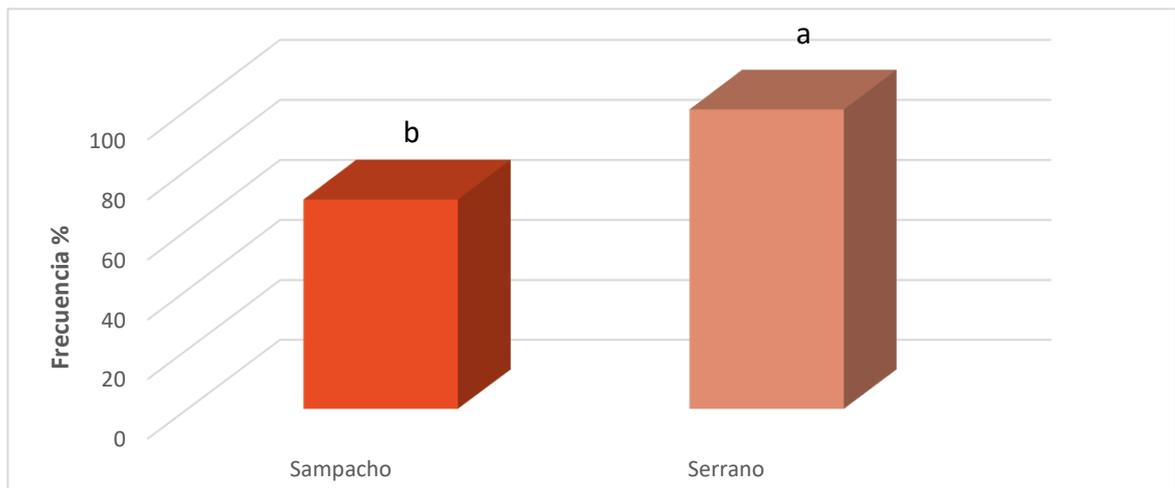
**Figura 8:** Recuento fúngico total ( $\log_{10}$  UFC/g) en muestras de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas de dos localidades de la provincia de Córdoba. El análisis estadístico se realizó para cada localidad. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) de acuerdo con el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD).

En la figura 9 se muestran placas representativas de la microbiota general en el medio DRBC aislada de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas.



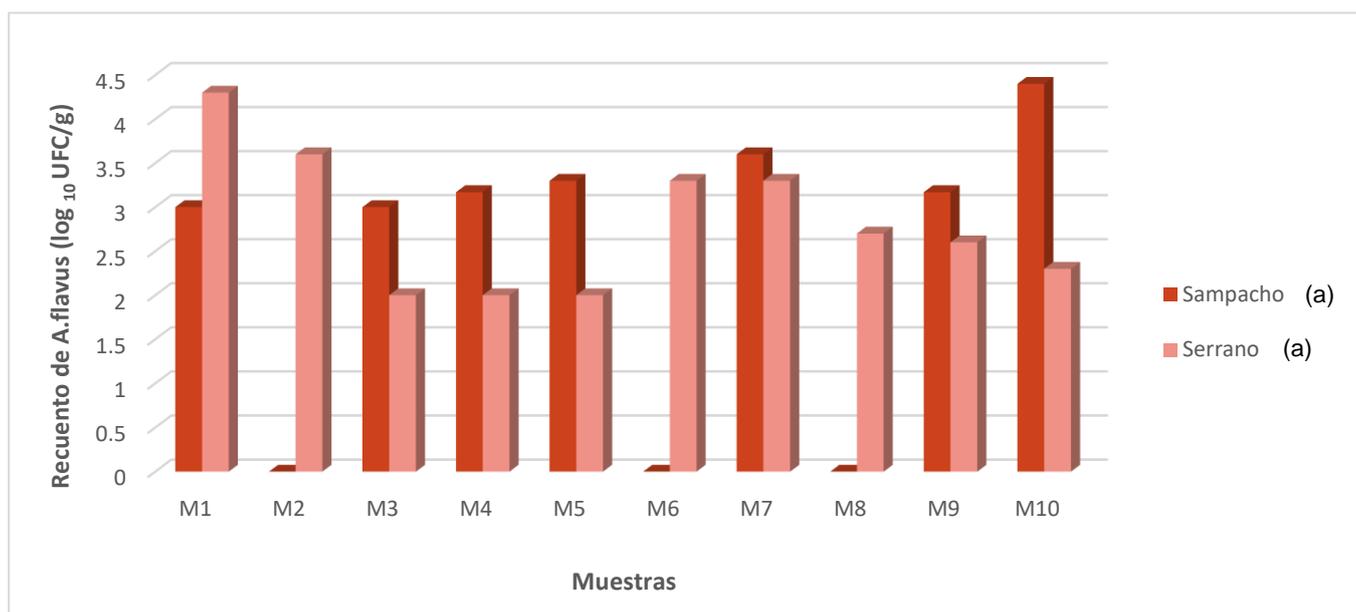
**Figura 9:** Microbiota general en medio DRBC aislada de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas de la localidad de Serrano (A y B. dilución  $10^{-2}$ ; C y D. dilución  $10^{-3}$ , E. dilución  $10^{-2}$ )

Al analizar la frecuencia de muestras de suelo contaminadas con *Aspergillus* sección *Flavi* se observó que todas las muestras de la localidad de Serrano contenían cepas de esta sección, mientras que de la localidad de Sampacho se obtuvo un porcentaje menor de muestras contaminadas ( $p < 0,01$ ) (figura 10).



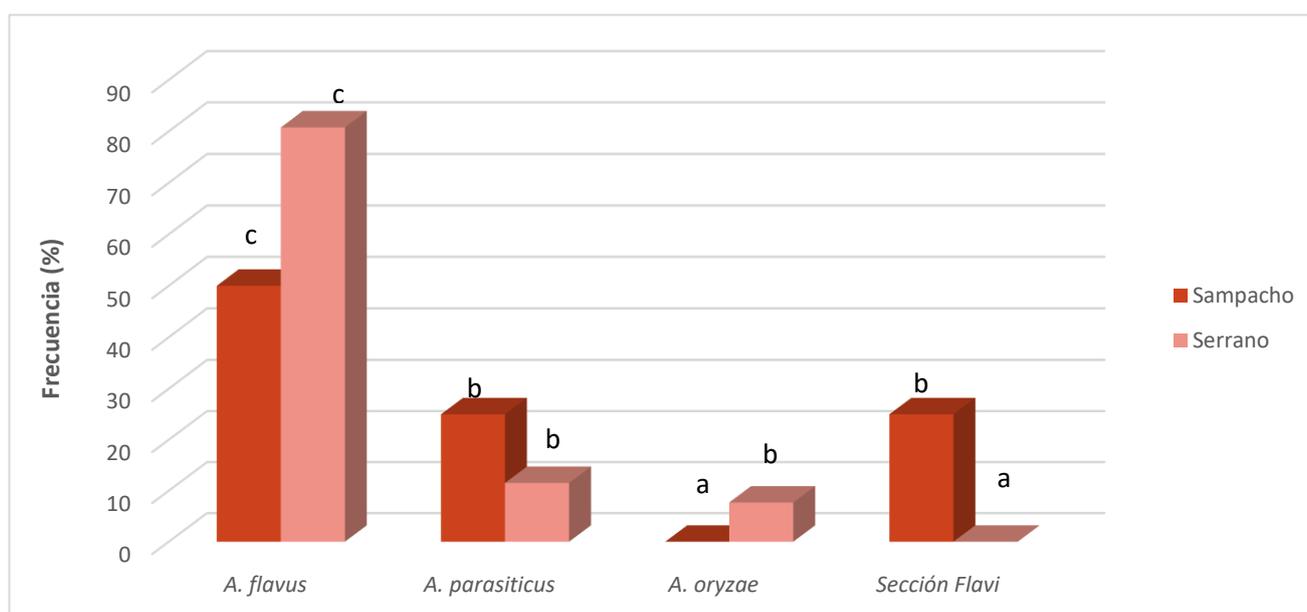
**Figura 10:** Frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas de dos localidades de la provincia de Córdoba. El análisis estadístico se realizó para cada localidad. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) de acuerdo con el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD).

En la figura 11 se muestra el recuento de *Aspergillus* sección *Flavi* en las muestras de suelo de las dos localidades analizadas. Estos resultados muestran que la mayor variabilidad de cepas aisladas se observó en la localidad de Sampacho con un recuento que osciló entre 3 y 4,47  $\log_{10}$  UFC/g (media:  $2,82 \pm 0,8$ ). Por el contrario, en la localidad de Serrano se obtuvo menor variabilidad con recuentos entre 3 y 4,3  $\log_{10}$  UFC/g (media:  $2,37 \pm 1,69$ ). El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas del recuento de *Aspergillus* sección *Flavi* entre las dos localidades analizadas ( $p > 0,01$ ).



**Figura 11:** Recuento de *Aspergillus* sección *Flavi* ( $\log_{10}$  UFC/g) en el medio DRBC de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas de dos localidades de la provincia de Córdoba. El análisis estadístico se realizó para cada localidad. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) de acuerdo con el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD).

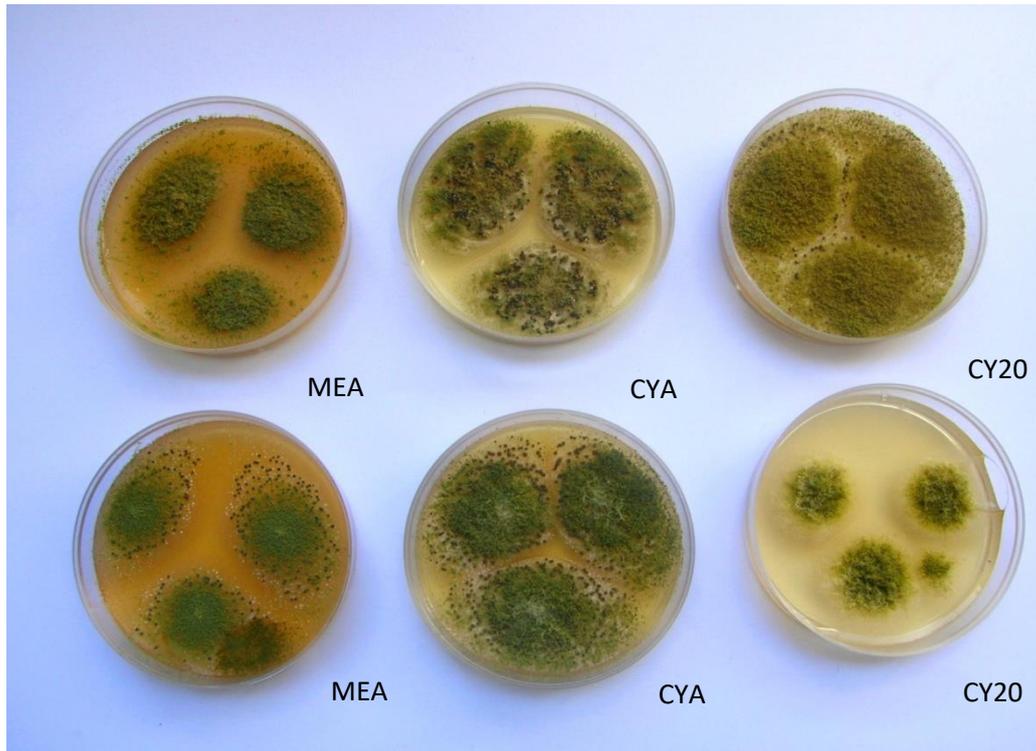
Cuando se evaluó la frecuencia de aislamiento de las diferentes especies de la sección *Flavi* se observó que un 50 y 76% de las muestras de las localidades de Sampacho y Serrano, respectivamente, contenían *A. flavus*. Esta especie aislada en mayor frecuencia fue seguida por *A. parasiticus*, con una frecuencia del 25% para Sampacho y 11,5% para Serrano. Con respecto a las otras dos especies aisladas, *A. oryzae* aisló solo de las muestras de Serrano en un 7,7% y las cepas pertenecientes a la Sección *Flavi* sólo de las muestras de Sampacho en un 25% (figura 12).



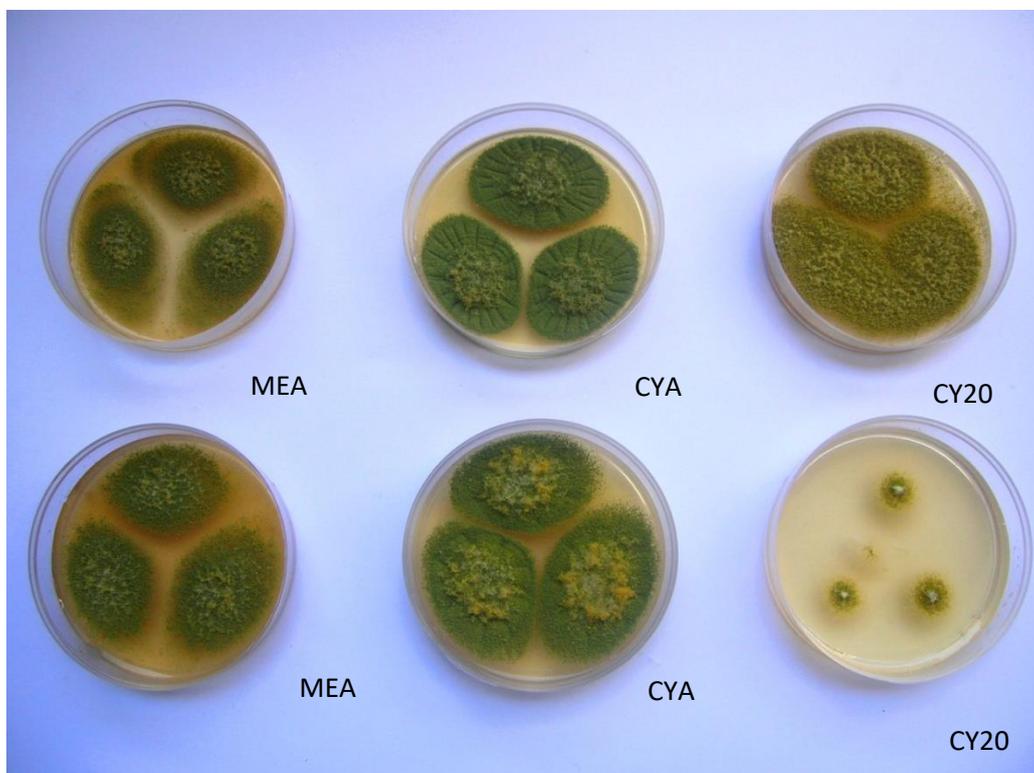
**Figura 12:** Frecuencia de especies de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos agrícolas expuestos a plaguicidas en dos localidades de la provincia de Córdoba. El análisis estadístico se realizó para cada localidad. Los valores con letras distintas son significativamente diferentes ( $p < 0,01$ ) de acuerdo con el Test LSD.

En las figuras 13 y 14 se muestran las colonias típicas de los aislados identificados como *A. flavus* y *A. parasiticus*. Los aislados identificados como *A. flavus* presentaron colonias verde oliva o verde oscuro con presencia de esclerocios negros, y de aspecto velutinoso con áreas centrales flocosas de micelio blanco o hialino. Microscópicamente presentaron micelio hialino, con estipes largos e hialinos que pueden volverse verdosos en la madurez, cabezas conidiales uniseriadas o biseriadas, principalmente radiadas con conidios globosos, lisos y de coloración verde oliva. Los aislados identificados como *A. parasiticus* presentaron colonias verde oliva, sin la presencia de esclerocios, de aspecto velutinoso con áreas centrales flocosas, y de micelio blanco o hialino; mientras que microscópicamente se observó micelio hialino con estipes cortos, hialinos que pueden volverse verdosos,

presentaron cabezas conidiales radiadas uniseriadas o biseriadas con presencia de conidios globosos, rugosos y de coloración verde oliva.



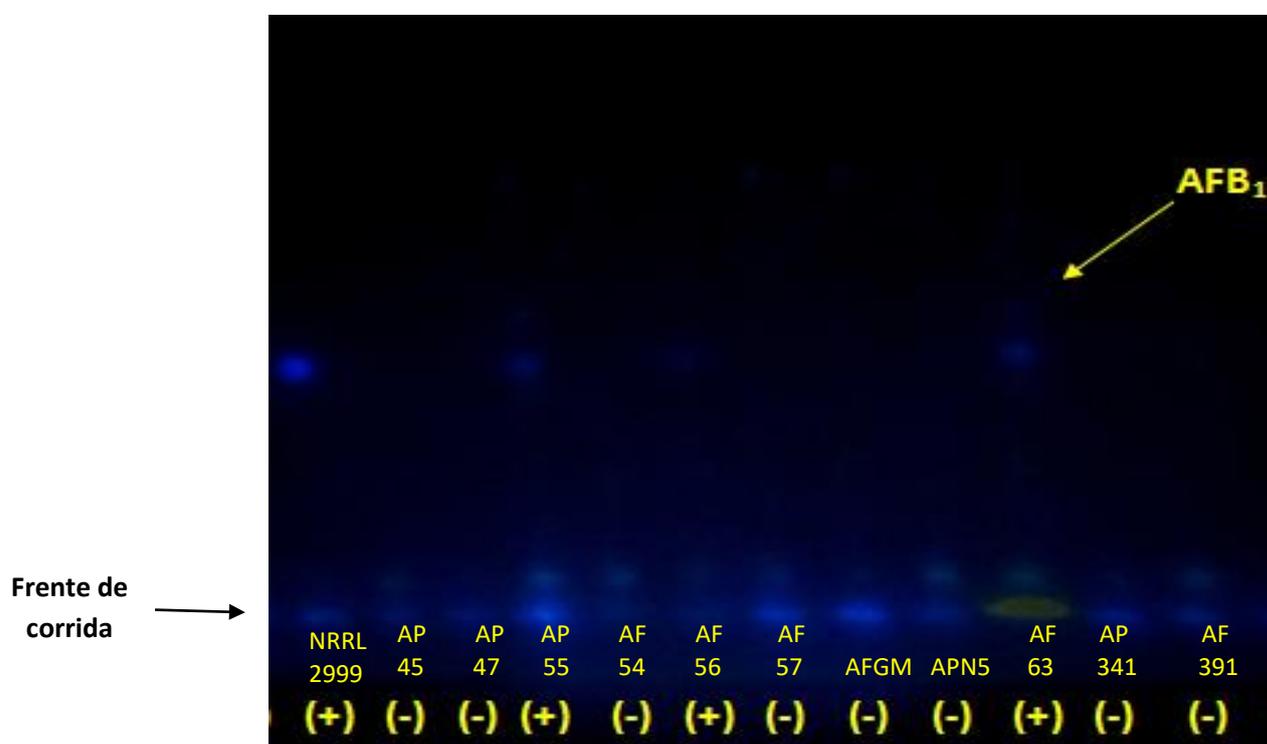
**Figura 13:** Colonias típicas de cepas identificadas como *A. flavus* de suelos agrícolas incubadas a 25°C.



**Figura 14:** Colonias típicas de cepas identificadas como *A. parasiticus* de suelos agrícolas incubadas a 25°C.

## V.2. Caracterización de los perfiles toxicogénicos de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*.

El número total de cepas pertenecientes a *Aspergillus* sección *Flavi* de los suelos agrícolas de ambas localidades fue de 34, de los cuales 25 fueron identificados como *A. flavus*; 5 como *A. parasiticus* mientras que 2 resultaron *A. oryzae*. Las restantes fueron identificadas morfológicamente como *A. tamaritii* pero al ser productoras de AFs pueden identificarse como *A. pseudotamaritii*, por lo que se consideran perteneciente a la sección *Flavi* sin ser identificadas como especie. El 94% de las cepas resultaron toxicogénicas. La caracterización del perfil toxicogénico de las diferentes cepas se realizó cualitativamente mediante TLC, donde los resultados obtenidos se muestran en la figura 15.



**Figura 15:** Fluorescencia típica bajo luz UV (365 nm) de cepas productoras de AFB<sub>1</sub>.  
(+) productoras, (-) no productoras.

El total de cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* y Sección *Flavi* fueron productoras de AFs, con niveles de AFs que oscilaron entre 1,04 y 65,89 ng/g. Sólo *A. oryzae* resultó no productora de AFs. En la tabla 5 se muestra la producción de AFs por las diferentes cepas.

**Tabla 5:** Producción de AFs por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos agrícolas.

Especie	Nomenclatura	Producción de AFs	Niveles medios (ng/g)
<i>A. flavus</i>	AF 165 h2	(+)	8.61
	AF 198 h5	(+)	8.56
	AF 197 h5	(+)	11.34
	AF 160 h1	(+)	8.45
	AF 164 h1	(+)	1.42
	AF 132 h4	(+)	1.46
	AF 29 h2	(+)	1.43
	AF 53 a2	(+)	1.36
	AF 183 h4	(+)	2.92
	AF 113 h1	(+)	51.68
	AF 166 h2	(+)	1.83
	AF 33 h1	(+)	1.33
	AF 189 h5	(+)	1.55
	AF 144 h5	(+)	2.41
	AF 43 a1	(+)	7.74
	AF 200 h6	(+)	1.84
	AF 51 a2	(+)	3.23
	AF 63	(+)	72.35
	AF 56	(+)	54.83
	AF 18	(+)	3.24
	AF 78	(+)	23.39
	AF 79	(+)	32.55
	AF 123	(+)	2.46
AF 23	(+)	3.99	
AF 118	(+)	1.46	
<i>A. parasiticus</i>	AP 55	(+)	65.89
	AP 45	(+)	3.24
	AP 46	(+)	6.98
	AP 53	(+)	13.79
	AP 88	(+)	22.64
Sección <i>Flavi</i>	AT 11	(+)	1.22
	AT 02	(+)	1.04
<i>A. oryzae</i>	AO M1	(-)	ND
	AO M2	(-)	ND

ND: no detectado según la técnica analítica utilizada. Límite de detección del método analítico 1 ng/mL

### **V.3. Ensayos *In vitro*: Evaluación del efecto de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura.**

Acorde a los resultados anteriores, para llevar a cabo este ensayo se eligieron cuatro cepas toxicogénicas con mayor capacidad de producir AFB<sub>1</sub>. De *A. parasiticus* se utilizó la cepa AP 55 y la cepa de referencia NRRL 2999; y de *A. flavus* las cepas AF 56 y AF 63.

#### **V.3.1. Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de temperatura y $a_w$ .**

En las figuras 16, 17, 18 y 19 se muestra el efecto de clorpirifós sobre la fase de latencia de las 4 cepas en estudio. Los resultados obtenidos demostraron que se registró un efecto significativo de los factores por separado y sus interacciones ( $a_w$ , temperatura y concentración) para todas las cepas, excepto para la cepa de referencia donde sólo fue significativa la interacción entre temperatura y concentración de clorpirifós (ANOVA de tres factores). El factor que produjo más efecto sobre el comportamiento de la fase de latencia fue  $a_w$  (tabla 1: anexos estadísticos). En general, se observó que a medida que la  $a_w$  incrementaba, la fase de latencia disminuía en cada uno de los tratamientos controles para todas las cepas ensayadas. A los 37 °C, se observó que la fase de latencia fue siempre menor en las dos  $a_w$  menores, con relación a las obtenidas a los 18 y 28 °C.

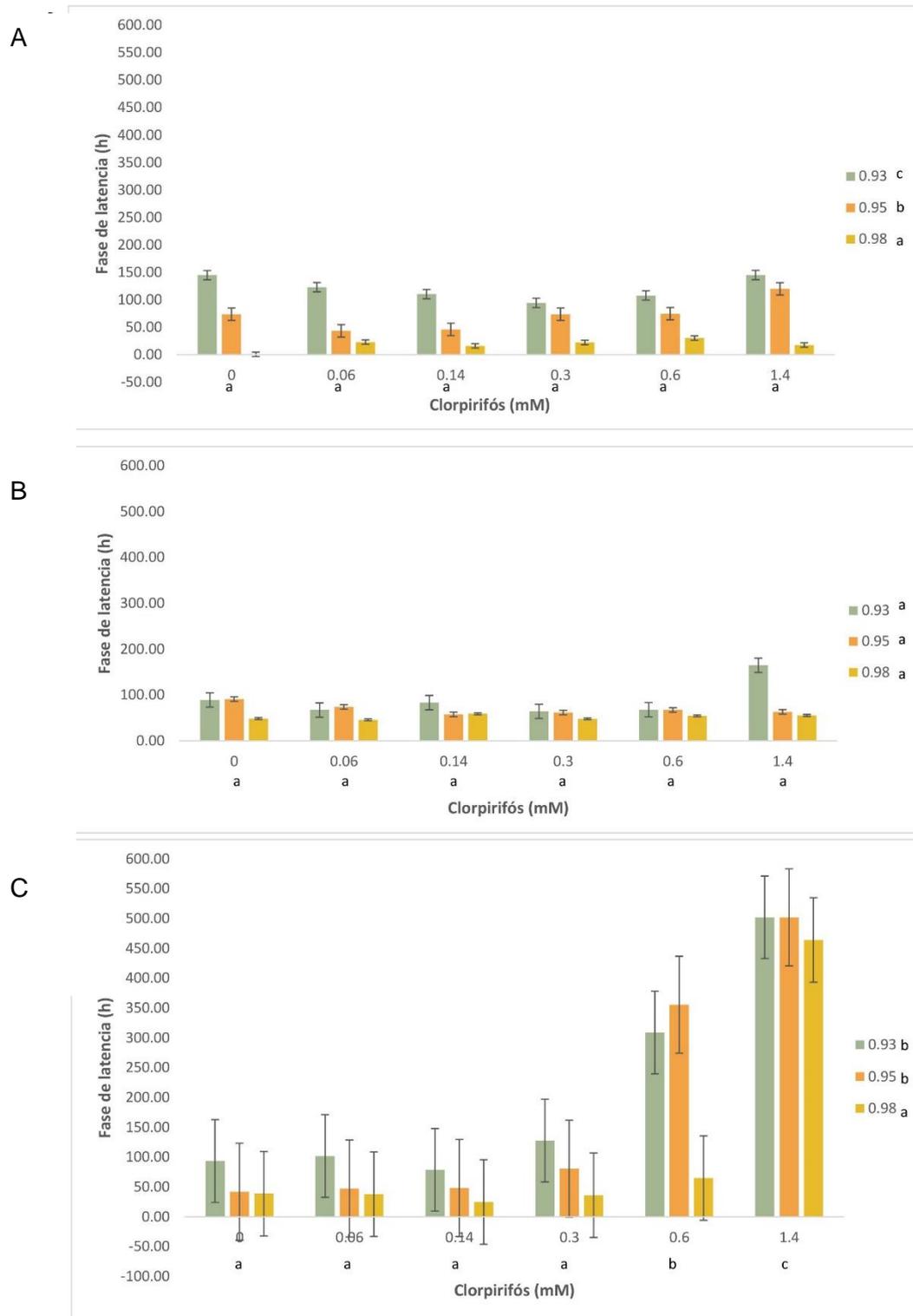
Los resultados de la figura 16 muestran que para la cepa *A. parasiticus* NRRL 2999 a 18 °C se observó que las diferentes concentraciones de clorpirifós no afectaron significativamente la fase de latencia ( $p < 0,01$ ) (figura 16a), observándose un aumento a medida que la  $a_w$  disminuía. A 28 °C bajo las diferentes dosis de clorpirifós y en las tres  $a_w$  este parámetro se mantuvo siempre constante con los tratamientos controles, es decir que no se observaron efectos de los factores ( $p < 0,01$ ) (figura 16b). A 37 °C se observó sólo el efecto de las diferentes concentraciones del insecticida, con 0.06, 0.14 y 0.3 mM la fase de latencia se mantuvo constante con respecto al control, mientras que con 0.6 mM aumentó significativamente. A los 1.4 mM la fase de latencia se extendió por más de 504 hs durante todo el ensayo (figura 16c).

En relación con la cepa AP 55 se observó que a 18 °C y 0.98 de  $a_w$ , independientemente de la dosis de clorpirifós analizada mantuvo siempre valores bajos (entre 6 y 19 h) sin diferencia significativa entre el tratamiento control ( $p < 0,01$ ) Mientras que en todas las concentraciones a 0.93 de  $a_w$  y; en 0.6 y 1.4 mM a 0.95 de  $a_w$  la fase de

latencia fue más larga con respecto a las condiciones mencionadas anteriormente (figura 17a). Es decir, que a bajas  $a_w$  la fase de latencia era significativamente mayor con respecto a altas  $a_w$ . Por otro lado, a 28 °C se observó que a 0.98 la fase de latencia disminuía significativamente con respecto a los valores registrados para 0.93 en todos los tratamientos ensayados. También se observó que con 1.4 mM este parámetro aumentó en comparación al tratamiento control. ( $p < 0,01$ ). Al analizar los datos a 37 °C se observó que la fase de latencia aumentaba a medida que el factor  $a_w$  disminuía. Se vio que a 0.93 de  $a_w$  se registró la mayor fase de latencia ( $p < 0,01$ ). Cuando se analizó por separado el factor concentración se observó que en niveles de  $a_w$  de 0.93 la fase de latencia disminuyó hasta 0.14 mM y a partir de 0.3 la misma comenzó a aumentar. En la  $a_w$  de 0.95 a medida que las concentraciones de clorpirifós iban en aumento la fase de latencia se matuvo con valores similares al tratamiento control, mientras que a 0.98 se registraron solo diferencias significativas a 1.4 mM ( $p < 0,01$ ). A 0.93 de  $a_w$  y 1.4 mM la fase de latencia se extendió por más de 504 hs durante todo el tiempo de incubación. No se observó efecto conjunto significativo de dos factores ( $a_w$  y concentración) (figura 17c).

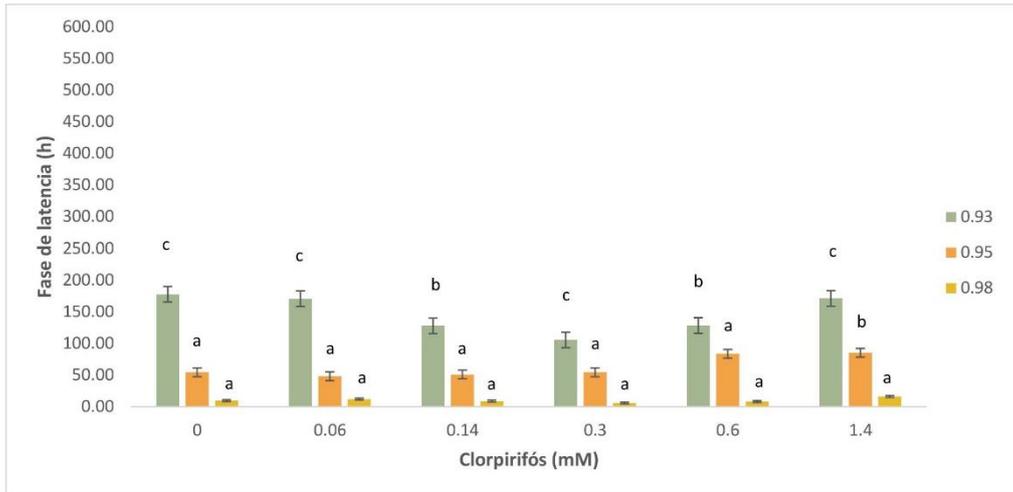
Para la cepa AF 56, a 18 °C y a las  $a_w$  más elevadas los valores en la fase de latencia fueron similares, mientras que a 0.93 de  $a_w$  se registró una fase de latencia mayor en comparación a las  $a_w$  anteriores ( $p < 0,01$ ). No se vio un efecto significativo de las diferentes concentraciones del insecticida con respecto al control. El efecto conjunto de ambos factores ( $a_w$  y concentración) no fue significativo ( $p > 0,01$ ). A 28 °C la fase de latencia fue similar a las  $a_w$  de 0.93 y 0.95, mientras que a 0.98 se registraron los valores significativamente más bajos en este parámetro. Las diferentes concentraciones de clorpirifós ensayadas no afectaron significativamente la fase de latencia, por lo que se mantenía constante en comparación al tratamiento control (figura 18b). A 37 °C, a 0.98 y 0.95 de  $a_w$  se registraron valores similares en la fase de latencia entre los tratamientos y con respecto al control. A 0.93 de  $a_w$  y a concentraciones de 0.6 y 1.4 mM se registraron los valores más altos de esta variable ( $p < 0,01$ ) (figura 18c).

Para la cepa AF 63 a 18 °C se observó un aumento en la fase de latencia a medida que la  $a_w$  disminuía. Con respecto a las diferentes concentraciones de clorpirifós con 0.06, 0.14 y 0.6 mM fue menor con respecto a los tratamientos controles (figura 19a). A 28 °C se pudo apreciar un efecto conjunto de ambos factores ensayados ( $a_w$  y concentración), observándose que a 0.98-0.95 de  $a_w$  y en todas las concentraciones de clorpirifós valores bajos en la fase de latencia, y similares entre los tratamientos y respecto al control. A 0.93 de  $a_w$  y con 0.6 y 1.4 mM se registraron los valores más altos de este parámetro ( $p < 0,01$ ) (figura 19b). A 37 °C se observó un aumento significativo en la fase de latencia a 0.93 de  $a_w$ . Mientras que a 0.95 y 0.98 de  $a_w$  no se registraron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) (figura 19c).

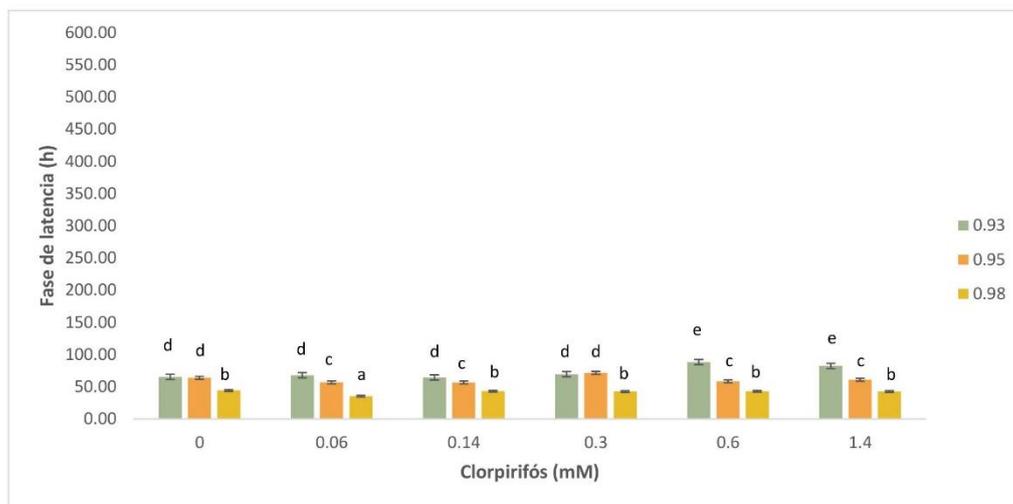


**Figura 16:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. parasiticus* (NRRL 2999) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 2: anexos estadísticos). **A:** 18°; **B:** 28 °C; **C:** 37 °C

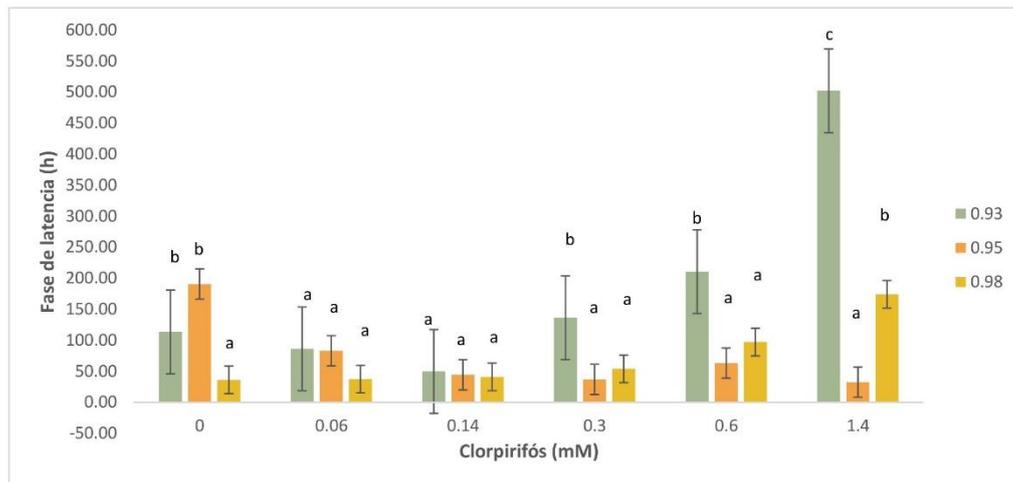
A



B



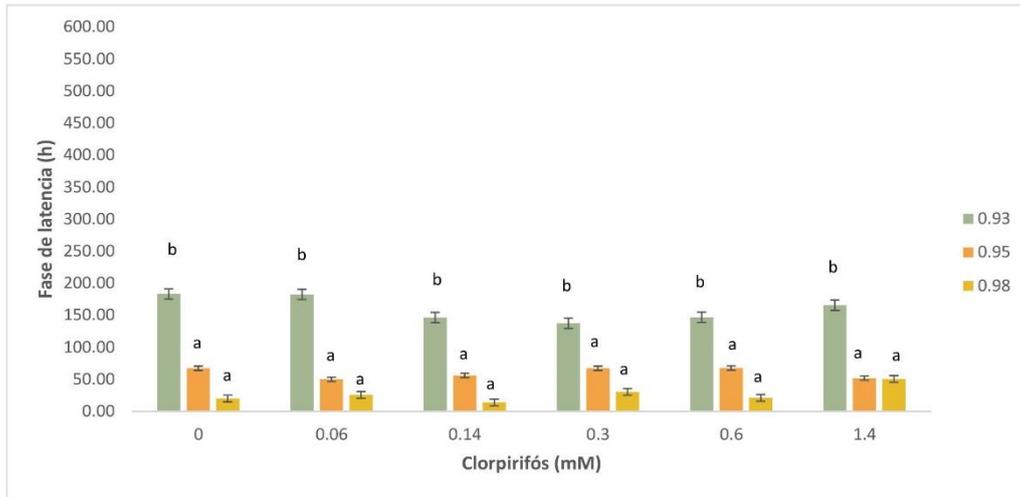
C



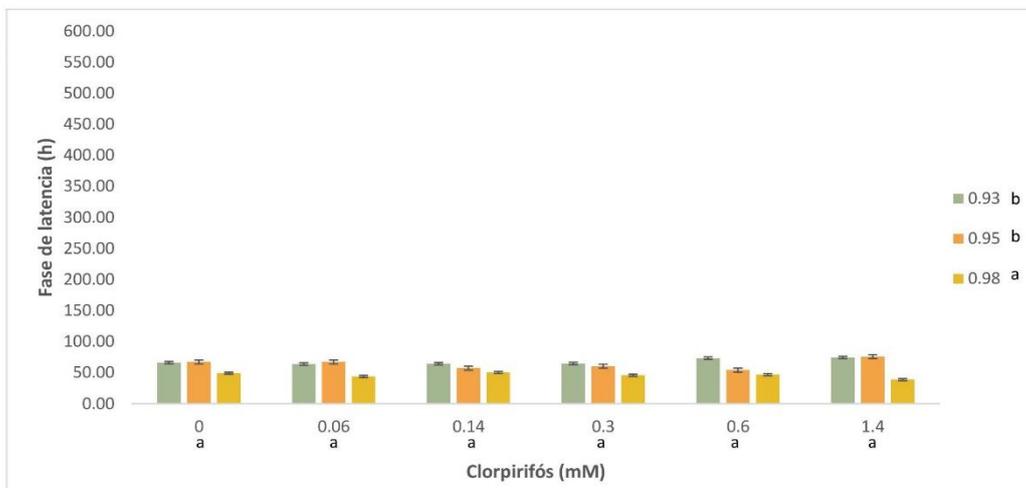
**Figura 17:** Interacción de diferentes aw y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. parasiticus* (AP 55) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 2: anexos estadísticos). **A:** 18°; **B:** 28 °C; **C:** 37

°C

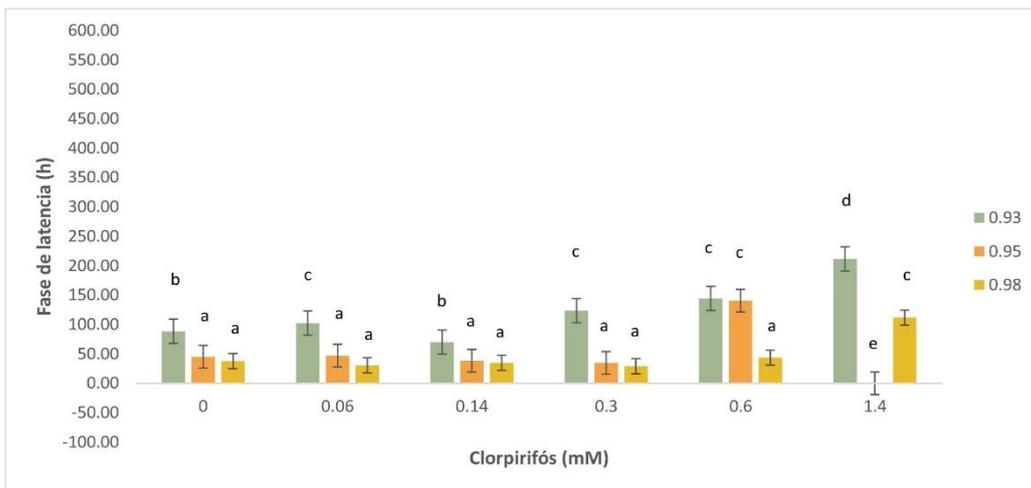
A



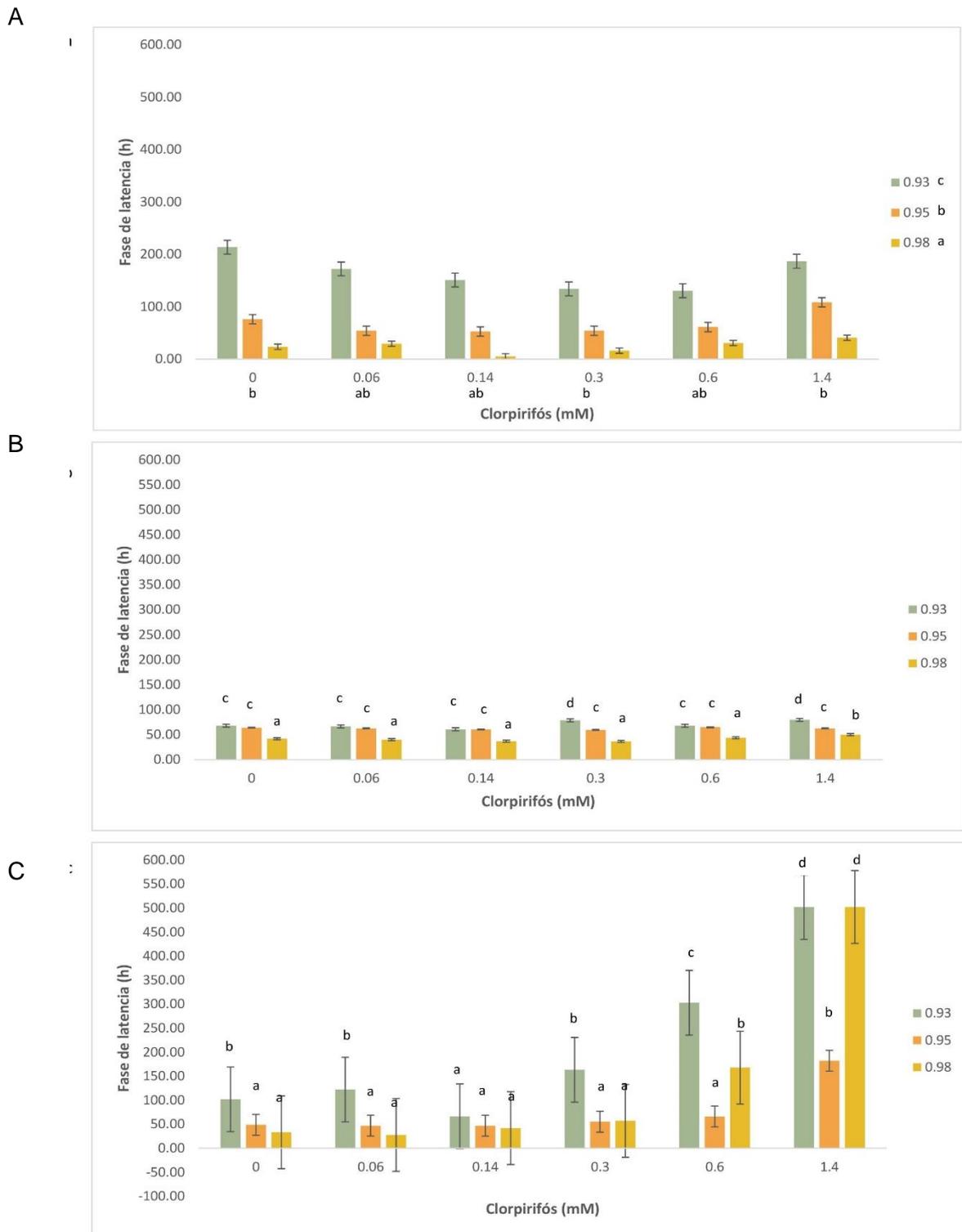
B



C



**Figura 18:** Interacción de diferentes aw y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. flavus* (AF 56) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 3: anexos estadísticos). **A:** 18°; **B:** 28 °C; **C:** 37 °C



**Figura 19:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. flavus* (AF 63) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 3: anexos estadísticos). **A:** 18°; **B:** 28 °C; **C:** 37 °C

### V.3.2. Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de temperatura y $a_w$ .

En las figuras 20, 21, 22 y 23 se muestra el efecto de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial de las 4 cepas en estudio. Los resultados obtenidos demostraron que se registró un efecto significativo de los factores por separado y sus interacciones ( $a_w$ , temperatura y concentración), excepto para la cepa de referencia donde sólo fue significativa la interacción entre temperatura y concentración de clorpirifós (ANOVA de tres factores). El factor que produjo más efecto sobre el comportamiento de la velocidad de crecimiento fue  $a_w$  (tabla 1: anexos estadísticos). En general, se observó que en los tratamientos controles independientemente de la cepa, a medida que aumentó la  $a_w$ , la velocidad de crecimiento también aumentó. A 37 °C, en todas las  $a_w$  y para todas las cepas en estudio, se observó que las velocidades de crecimiento obtenidas fueron mayores con relación a las otras dos temperaturas ensayadas. Lo mismo ocurrió en los tratamientos con clorpirifós, donde las velocidades de crecimiento a 37 °C fueron, en general superiores a las obtenidas a 18 y 28 °C en todas las  $a_w$ .

En los tratamientos controles y en los tratamientos con clorpirifós para la cepa *A. parasiticus* NRRL 2999 a 18 °C, se observó un efecto simple de la  $a_w$ , donde la velocidad de crecimiento fue similar a 0.93 y 0.95, mientras que a 0.98 se observó una velocidad mayor en relación con las otras dos  $a_w$  ensayadas ( $p < 0,01$ ). Con respecto a las diferentes dosis de clorpirifós analizadas, se observó que las velocidades de crecimiento se mantenían constantes con respecto al control, es decir no hubo efectos significativos de este factor, a excepción del tratamiento con 1.4 mM a 0.95 donde la velocidad aumentó significativamente (figura 20a). A 28 °C se observó que con 0.06, 0.14 y 0.3 mM la velocidad de crecimiento aumentó con diferencias significativas respecto al control. Mientras que con 0.6 y 1.4 mM de clorpirifós las velocidades de crecimiento fueron similares al tratamiento control. A los 37 °C se observa que hay efecto conjunto de los factores  $a_w$  y concentración. Con 0.6 y 1.4 mM en las tres  $a_w$  ensayadas, se registró la velocidad de crecimiento más baja. En cuanto a las concentraciones restantes (0.06, 0.14 y 0.3 mM) se observa que a 0.98 y 0.95 de  $a_w$  este parámetro se mantiene constante respecto al control, sin diferencias significativas entre estas dos  $a_w$ . Mientras que a 0.93 de  $a_w$  la velocidad de crecimiento se mantuvo también constante con respecto al control y fue significativamente menor en comparación a las  $a_w$  más altas ( $p < 0,01$ ) (figura 20c).

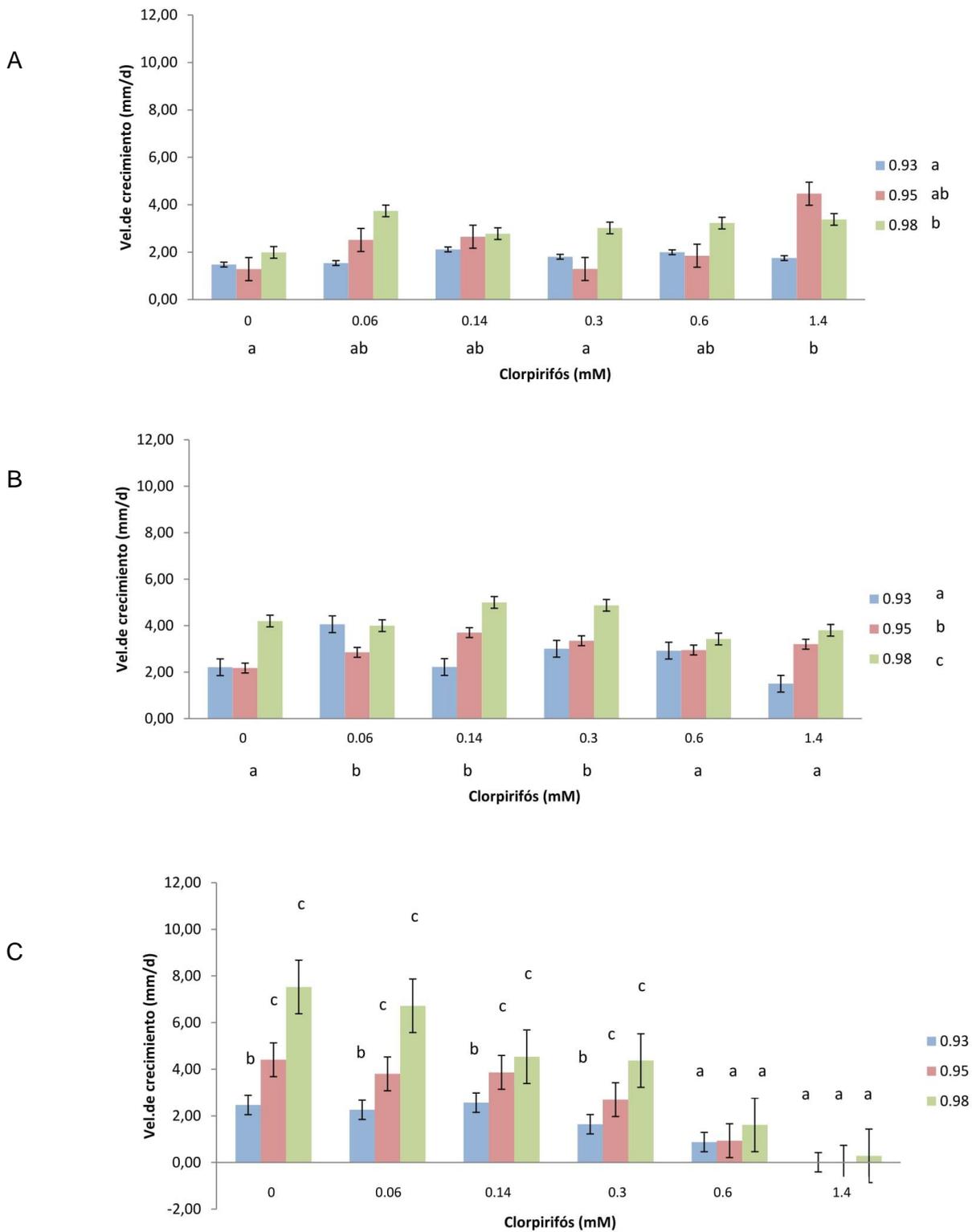
En relación con la cepa *A. parasiticus* AP 55 al realizarse un análisis de interacción doble entre los factores  $a_w$  y concentración no se observó efecto de estos factores sobre la velocidad de crecimiento. A 18 °C, la velocidad de crecimiento tuvo el mismo comportamiento a 0.93 y 0.95 de  $a_w$ , mientras que a 0.98 se registró una velocidad de

crecimiento mayor (figura 21a). El crecimiento fúngico en las diferentes dosis de clorpirifós se mantuvo constante con respecto al control. A 28 °C se observó un efecto único del factor  $a_w$ , con un incremento de la velocidad de crecimiento conforme aumentaba la  $a_w$ . No se registraron diferencias significativas entre las diferentes dosis de clorpirifós en este parámetro ( $p > 0,01$ ) (figura 21b). A 37 °C, con 0.98 de  $a_w$  se observó que la velocidad de crecimiento con concentraciones de 0.06, 0.14 y 0.3 mM no presentó diferencias significativas con respecto al control. Mientras que con 0.6 y 1.4 mM, la velocidad disminuyó. A niveles de 0.95 y 0.93 de  $a_w$  en ninguna de las dosis del insecticida en estudio se observan diferencias significativas con respecto al control en la velocidad de crecimiento ( $p < 0,01$ ).

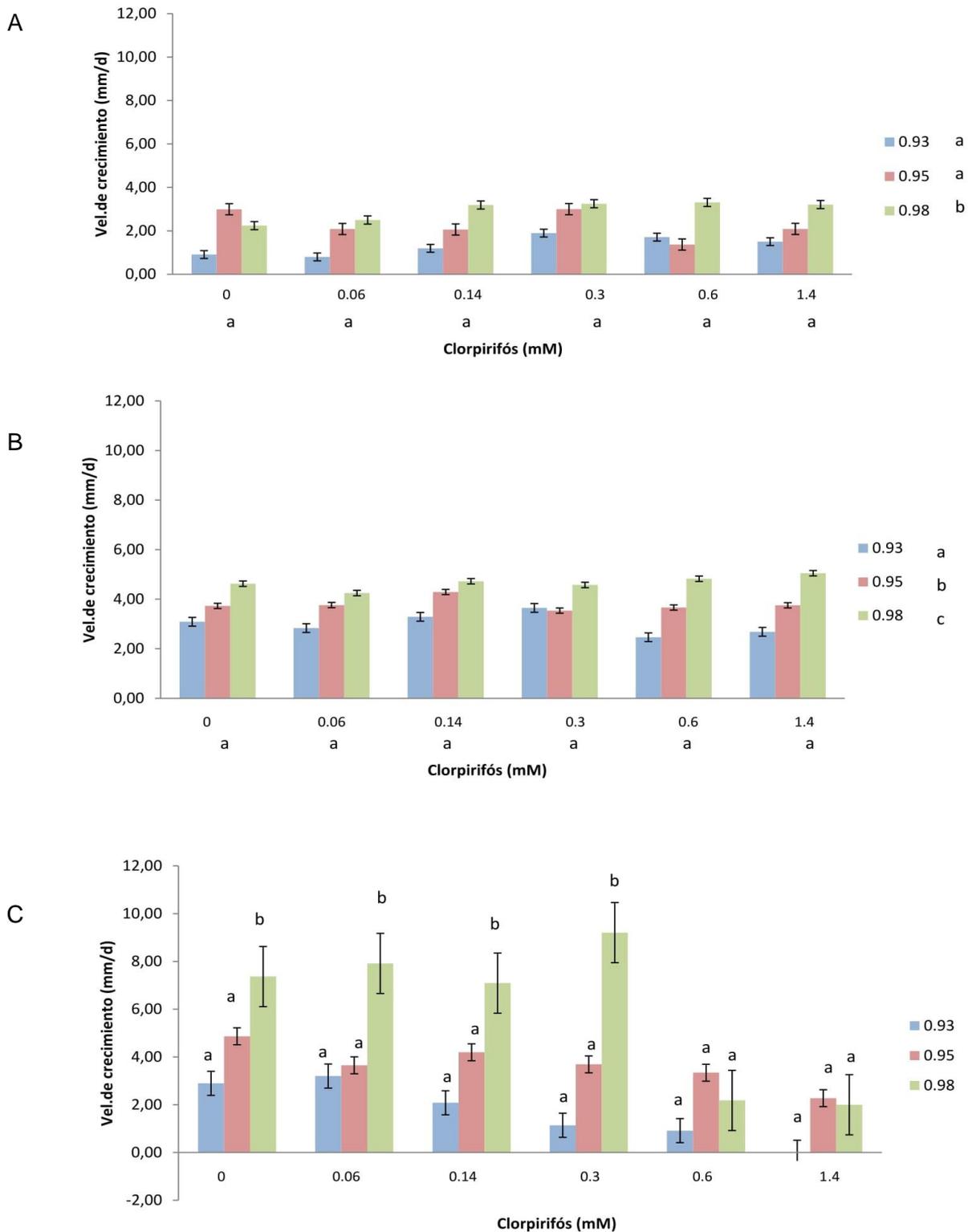
A partir del análisis de la cepa *A. flavus* AF 56 a 18 °C, se observó que no existe efecto conjunto de los factores concentración y  $a_w$  sobre la velocidad de crecimiento. Este parámetro aumentó sólo cuando la  $a_w$  del medio incrementó sin efectos significativos sobre la velocidad de crecimiento bajo las diferentes dosis de clorpirifós ensayadas. A 28 °C tampoco hubo efecto significativo de ninguno de los dos factores ensayados por separado, es decir que la velocidad de crecimiento se mantuvo siempre constante con respecto al control en todas las condiciones, registrándose valores entre 4 y 5 mm/d ( $p > 0,01$ ) (figura 22b). A 37 °C se observó un efecto sinérgico de los factores  $a_w$  y las diferentes dosis del insecticida ensayadas. A 0.98 de  $a_w$  la velocidad de crecimiento con concentraciones de 0.06, 0.14 y 0.3 mM no tuvo diferencias significativas con respecto al control; mientras que con 0.6 y 1.4 mM la misma disminuyó. A 0.93 y 0.95 de  $a_w$  la velocidad obtenida en las diferentes dosis de clorpirifós fue similar a los tratamientos controles sin diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,01$ ) (figura 22c).

Con respecto a la cepa *A. flavus* AF 63 a 18 °C se observó sólo efecto significativo de las tres  $a_w$  ensayadas, en donde la velocidad de crecimiento aumentaba a medida que este factor también aumentaba. La velocidad de crecimiento en las diferentes dosis de clorpirifós no se vio modificada con respecto al control (figura 23a). A 28 °C se observó que las velocidades de crecimiento con las diferentes dosis de clorpirifós y a las tres  $a_w$  ensayadas no registraron cambios con respecto al control, con valores entre 4 y 5 mm/d. A 37 °C se registró un efecto conjunto de los factores  $a_w$  y concentración, en donde se pudo observar que a 0.98 y 0.95 de  $a_w$  en las concentraciones de 0.06 y 0.14 mM la velocidad de crecimiento se mantuvo constante con respecto al control, mientras que a partir de 0.3 mM la misma disminuía a medida que este factor aumentaba. ( $p < 0,01$ ). A 0.93 de  $a_w$ , la velocidad de crecimiento se mantuvo constante en relación con el control en los diferentes niveles del insecticida ensayado, a excepción de 1.4 mM donde se observó una inhibición completa del crecimiento (figura 23c).

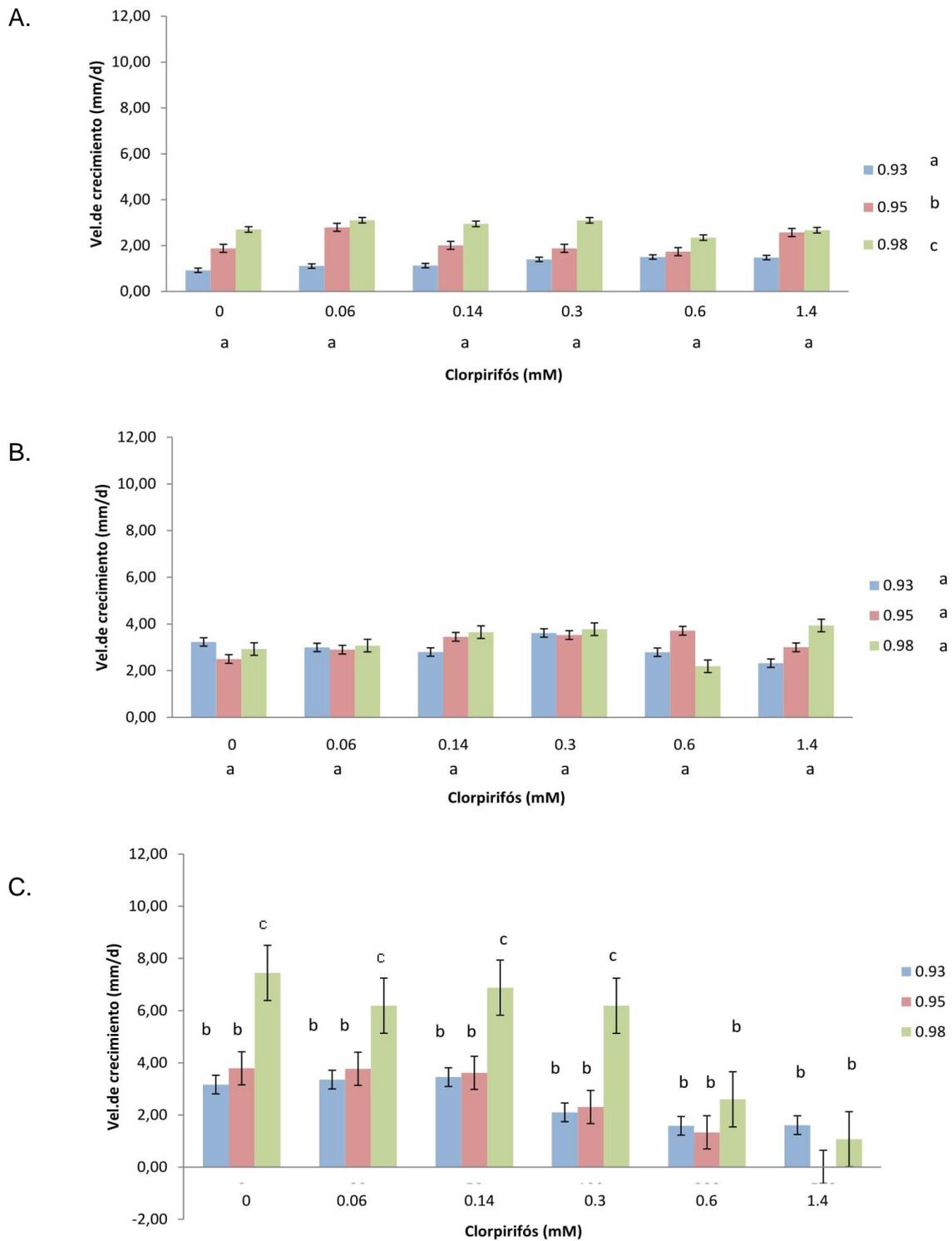
Concluyendo, podemos observar que las velocidades de crecimiento más elevadas se registraron en la cepa AP 55 a 37 °C, 0.98 de  $a_w$  y entre las concentraciones de 0 a 0.3 mM de clorpirifós con valores entre 7 y 10 mm/d. Mientras que la mayor inhibición del crecimiento se obtuvo en la cepa NRRL a 37 °C y 1.4 mM del insecticida en las tres  $a_w$ .



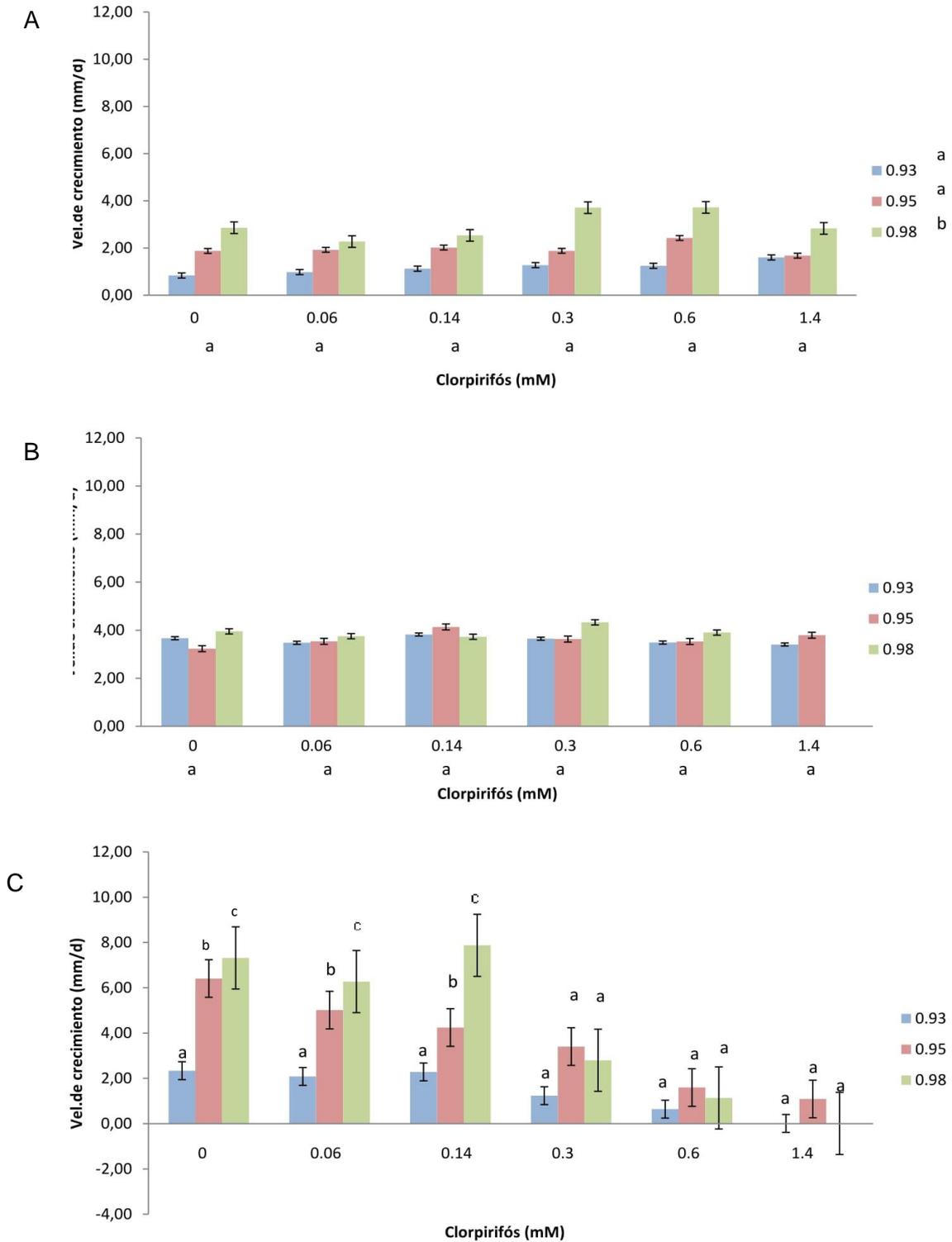
**Figura 20:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento radial (mm/d) de *A. parasiticus* (NRRL 2999) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 2: anexos estadísticos). **A:** 18°; **B:** 28 °C; **C:** 37 °C



**Figura 21:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperatura sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. parasiticus* (AP 55) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 2: anexos estadísticos). **A.**18 °C; **B.**28 °C; **C.**37 °C



**Figura 22:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperatura sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. flavus* (AF 56) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 3: anexos estadísticos). **A.** 18 °C, **B.** 28 °C, **C.** 37 °C.



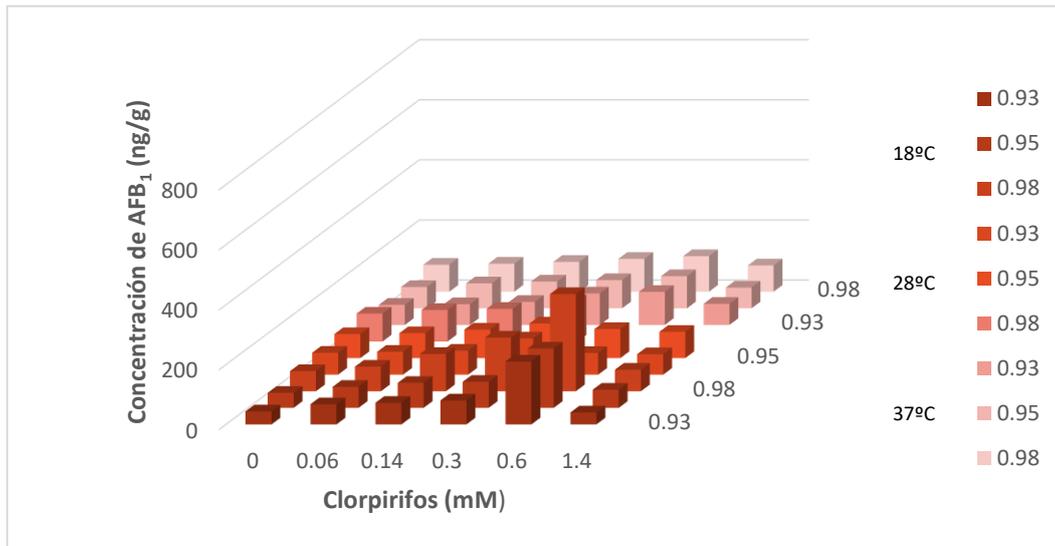
**Figura 23:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperatura sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. flavus* (AF 63) sobre un medio a base de maíz suplementado con clorpirifós. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 3: anexos estadísticos) **A.** 18 °C, **B.** 28 °C, **C.** 37 °C

### V.3.3. Efectos de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> bajo diferentes condiciones de temperatura y a<sub>w</sub>.

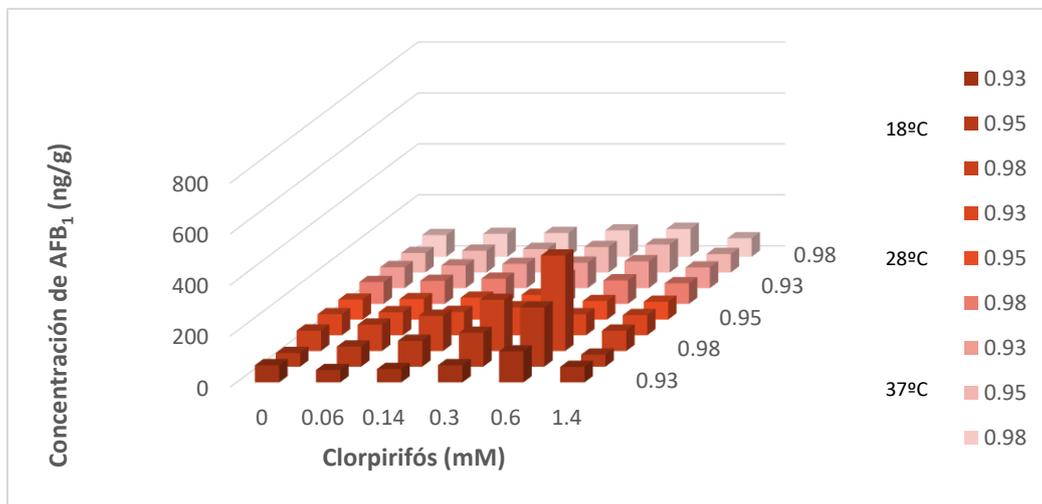
Las figuras 24, 25, 26 y 27 muestran los resultados obtenidos al evaluar el efecto de clorpirifós sobre la producción de toxinas bajo diferentes condiciones ambientales. En general se observó que la producción de toxina tanto en ausencia como en presencia de diferentes dosis del insecticida utilizadas en estos ensayos se estimuló en todas las condiciones ensayadas. Las cuatro cepas en estudio se comportaron de la misma manera frente al factor de actividad de agua observando que, a medida que los niveles de a<sub>w</sub> aumentaron, la concentración de la toxina también se incrementó. Con respecto al comportamiento de las cuatro cepas frente a las diferentes condiciones de temperaturas en fue diferente. Para las cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) los niveles de AFB<sub>1</sub> producidos se mantuvieron constante, mientras que para las cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) a 18 °C la misma aumentó con diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). También se observó que con sólo 7 días de incubación las cepas fueron capaces de producir altas concentraciones de AFB<sub>1</sub>. Para las cepas NRRL 2999 y AP 55 a los 14 días se registraron los mayores valores de toxinas mientras que a los 21 días la misma disminuyó. Por otro lado, para las cepas AF 56 y AF 63 las concentraciones registradas se mantuvieron constantes en los 3 periodos de incubación. La concentración de toxina producidas por parte de las cuatro cepas analizadas mostró un comportamiento paralelo a media que la concentración de clorpirifós aumentó hasta los 0.6 mM, registrándose en esta dosis las mayores concentraciones. En 1.4 mM la producción de toxina disminuyó a valores similares que en los tratamientos controles ( $p < 0,01$ ). El insecticida clorpirifós no produjo efectos inhibitorios sobre este parámetro. Los mayores niveles de AFB<sub>1</sub> producidos fueron por la cepa AF 63 en dosis de 0.6 mM a 18 °C, y a los 7 y 14 días de incubación con valores de 728.9 ng/g y 790.3 ng/g, respectivamente.

Los análisis estadísticos aplicando el test de Análisis de la Varianza para cada factor por separado (concentración, días, temperatura y a<sub>w</sub>) en cada una de las cepas se muestran en las tablas 4 y 5 en la sección anexos estadísticos.

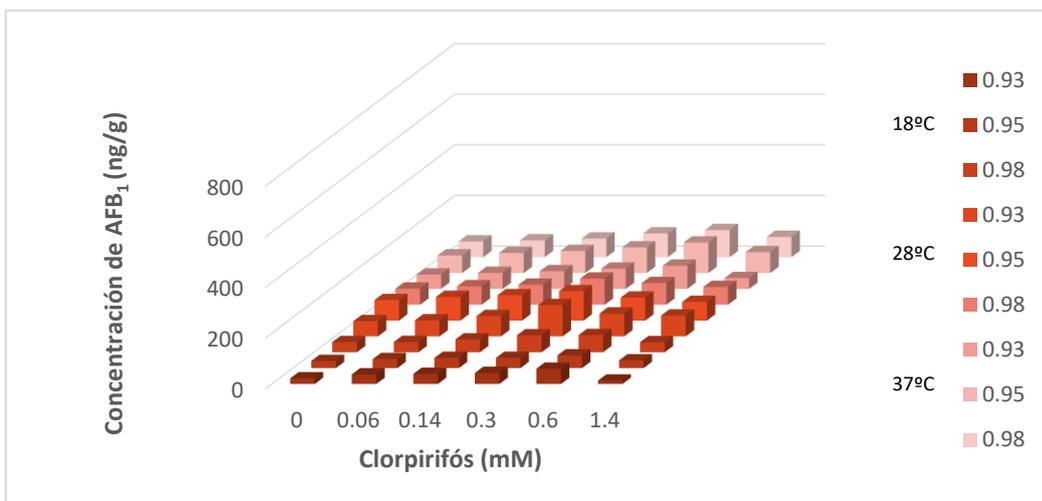
A



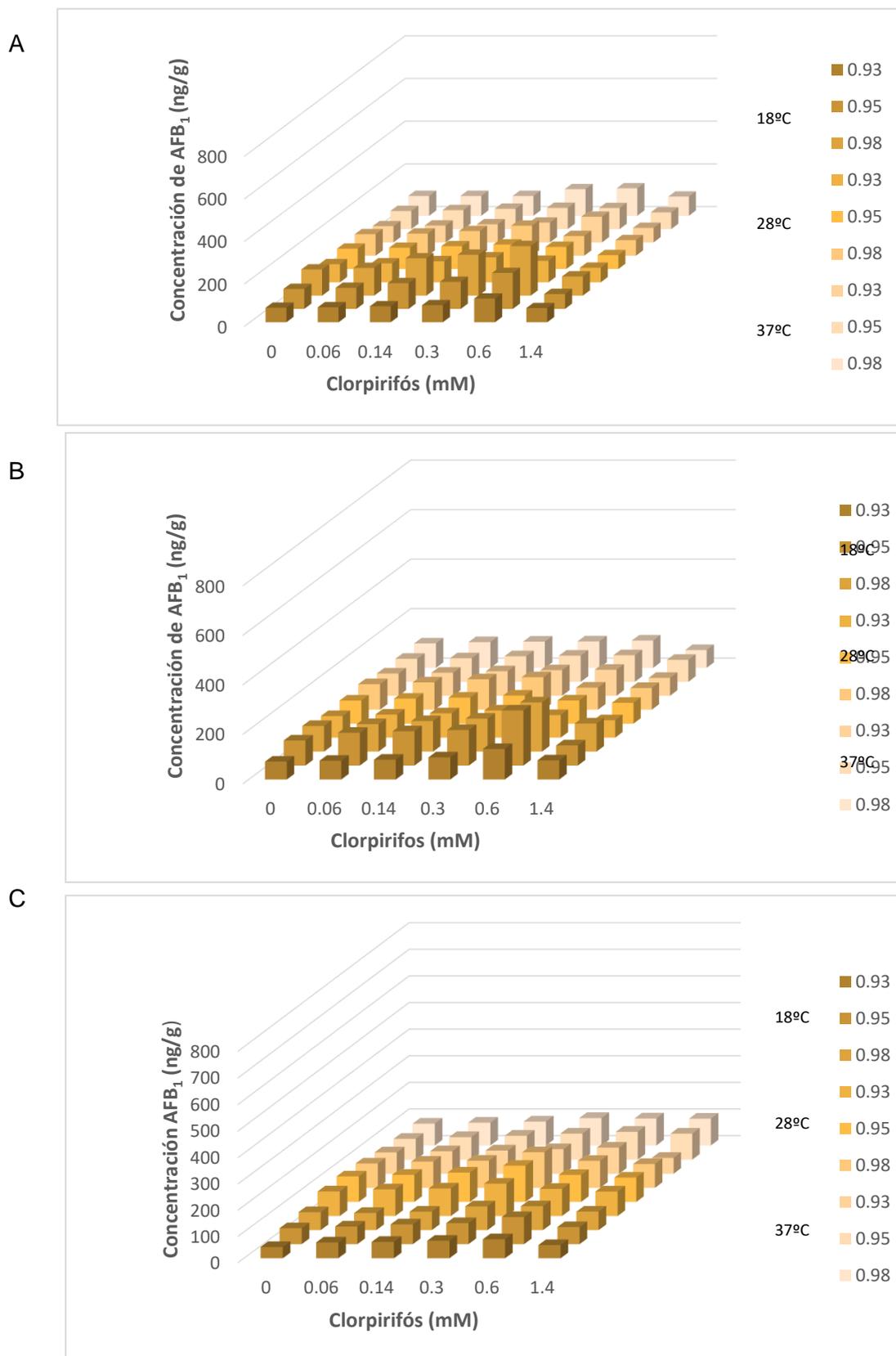
B



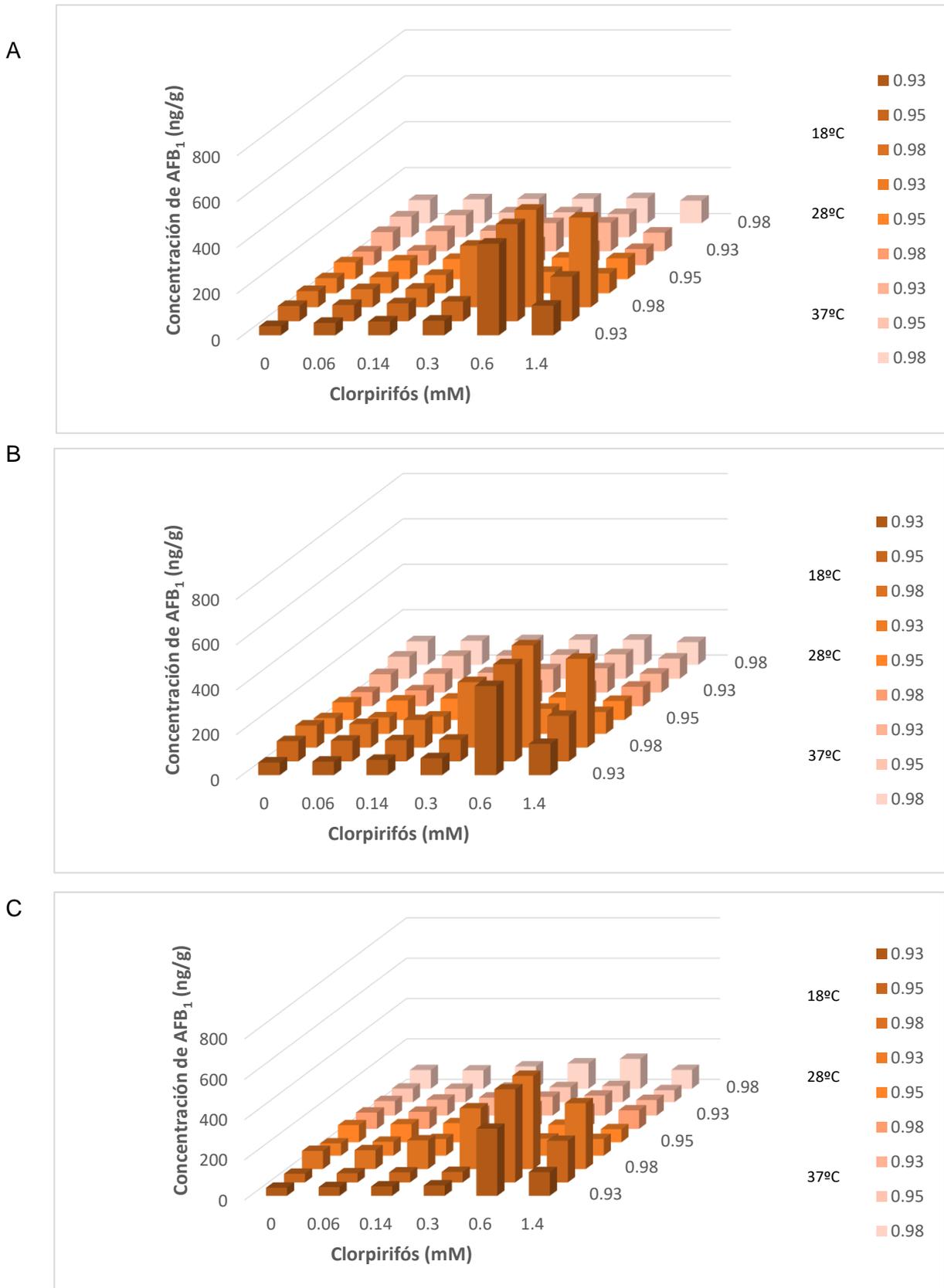
C



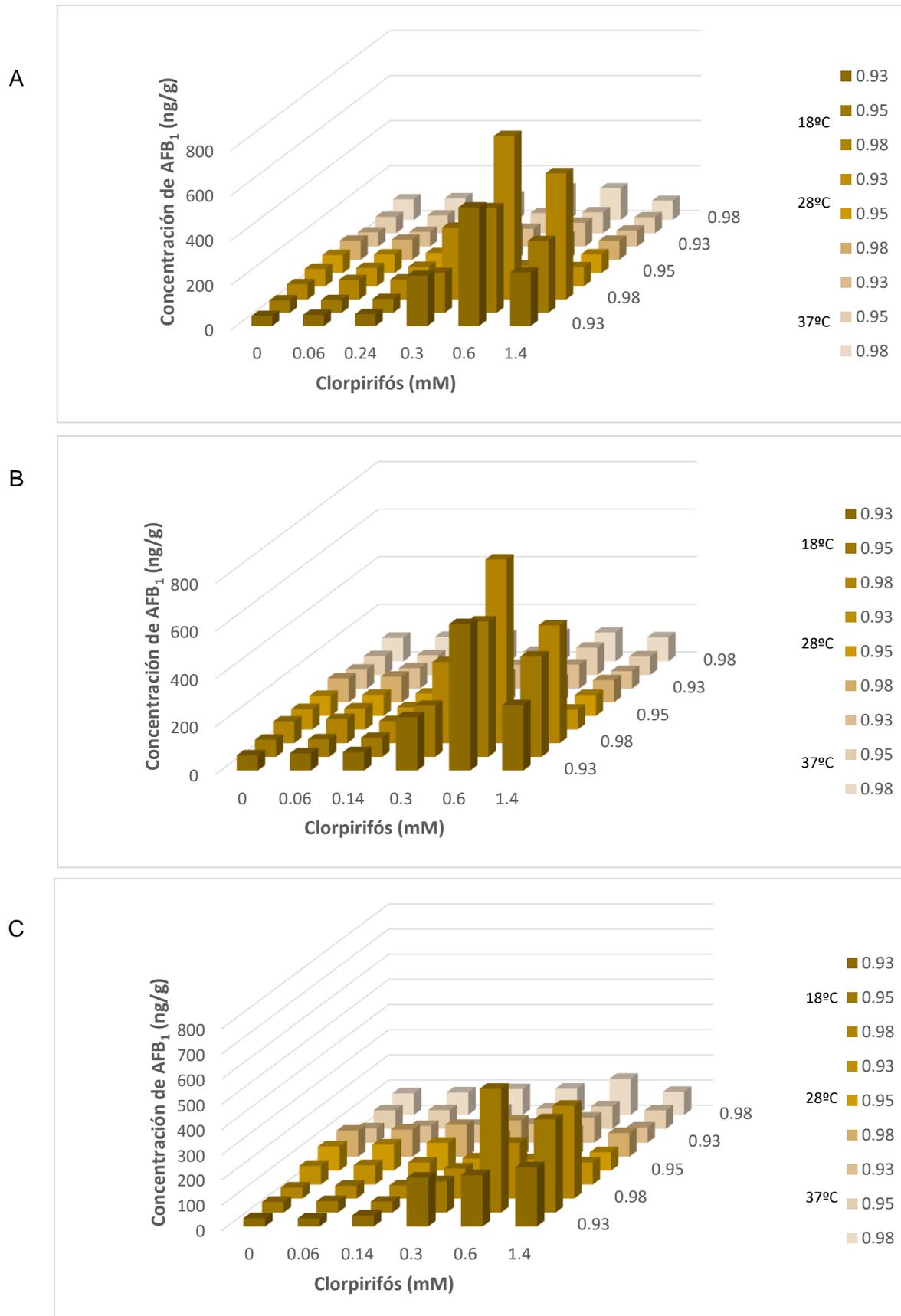
**Figura 24:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y temperatura a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tablas correspondientes: anexos de tablas (tablas 1, 3 y 5).



**Figura 25:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y temperatura a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tablas correspondientes: anexos de tablas (tablas 1, 3 y 5).



**Figura 26:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> y temperatura a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tablas correspondientes: anexos de tablas (tablas 2, 4 y 6).



**Figura 26:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y temperatura a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tablas correspondientes: anexos de tablas (tablas 2, 4 y 6).

**Tabla 6:** Valores medios de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55).

<b>Cepas:</b>	<b>NRRL 2999</b>	<b>AP 55</b>
<b>Concentración (mM) (C)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0	67.05 a	87.47 ab
0.06	75.53 a	93.53 ab
0.14	85.14 ab	101.54 bc
0.3	104.17 bc	113.24 c
0.6	125.94 c	117.92 c
1.4	65.97 a	79.26 a
<b>Días de incubación (D)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
7	96.05 b	103.15 b
14	97.26 b	104.85 b
21	68.59 a	88.48 a
<b>Temperatura (°C) (T)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
18	86.99 a	101.50 a
28	88.25 a	100.99 a
37	86.66 a	94 a
<b>Actividad acuosa (<math>a_w</math>)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0.93	96.05 b	103.15 b
0.95	97.26 b	104.85 b
0.98	68.59 a	88.48 a

Los valores con letras distintas son significativos según el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ) (tabla 4: anexos estadísticos).

**Tabla 7:** Valores medios de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63).

<b>Cepas:</b>	<b>AF 56</b>	<b>AF 63</b>
<b>Concentración (mM) (C)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0	74.85 a	74.11 a
0.06	79.49 a	79.17 ab
0.14	87.53 ab	84.59 ab
0.3	118.53 ab	144.84 bc
0.6	208.05 c	239.54 d
1.4	134.84 b	176.13 cd
<b>Días de incubación (D)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
7	115.7 a	137.5 a
14	123.52 a	150.08 a
21	112.43 a	111.6 a
<b>Temperatura (°C) (T)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
18	169.43 b	212.63 b
28	86.18 a	96.93 a
37	96.03 a	89.62 a
<b>Actividad acuosa (<math>a_w</math>)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0.93	115.7 a	137.5 a
0.95	123.52 a	150.08 a
0.98	112.43 a	111.6 a

Los valores con letras distintas son significativos según el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ) (tabla 5: anexos estadísticos).

#### **V.3.4. Efectos de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de temperatura y $a_w$ .**

Para llevar a cabo este ensayo se eligieron dos concentraciones de glifosato de 30 y 300 mM en donde, por estudios anteriores se sabe que existen diferencias significativas entre ellas.

En las figuras 28, 29, 30 y 31 se observa el comportamiento de la fase de latencia en las diferentes cepas analizadas. Cuando se analizó ANOVA de tres factores se registró un efecto significativo de los factores por separado y sus interacciones para todas las cepas, excepto para la cepa NRRL 2999 donde sólo fue significativa la interacción entre temperatura y concentración de glifosato. El factor que produjo más efecto sobre el comportamiento de la fase de latencia fue  $a_w$  (tabla 6: anexos estadísticos). En general, en los tratamientos controles se observó que a 18 y 28 °C los valores de la fase de latencia se mantenían constantes a 0.93 y 0.98 de  $a_w$ , mientras que a 0.95 se registraron las fases de latencias más largas. A 37 °C este parámetro se mantuvo constante en las tres  $a_w$  ensayadas.

En la cepa NRRL 2999 se observó que la fase de latencia a 18 °C, 0.98 de  $a_w$  y 30 mM se mantuvo constante en relación con el control, con un aumento significativo con 300 mM. Con respecto a 0.95 y 0.93 de  $a_w$  la fase de latencia aumentó a media que las diferentes dosis de glifosato también aumentaron, registrándose diferencias significativas con 300 mM ( $p < 0,01$ ) (figura 28a). A 28 °C la fase de latencia a las tres  $a_w$  y con 30 mM se mantuvo siempre constante en los tratamientos controles. Con una concentración 300 mM, 0.98 y 0.93 de  $a_w$  la fase de latencia aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ). A 37 °C se observó que este parámetro se comporta de igual manera con 30 mM a 0.98 y 0.93 de  $a_w$  con relación al control. Mientras que con 300 mM se observa que la fase de latencia aumenta con respecto al control en las tres  $a_w$  ensayadas ( $p < 0,01$ ). La fase de latencia de la cepa NRRL 2999 con 300 mM tanto a 18 °C como a 37 °C se extendió por más de 504 h, es decir hasta el tiempo final de incubación del ensayo (figura 28c).

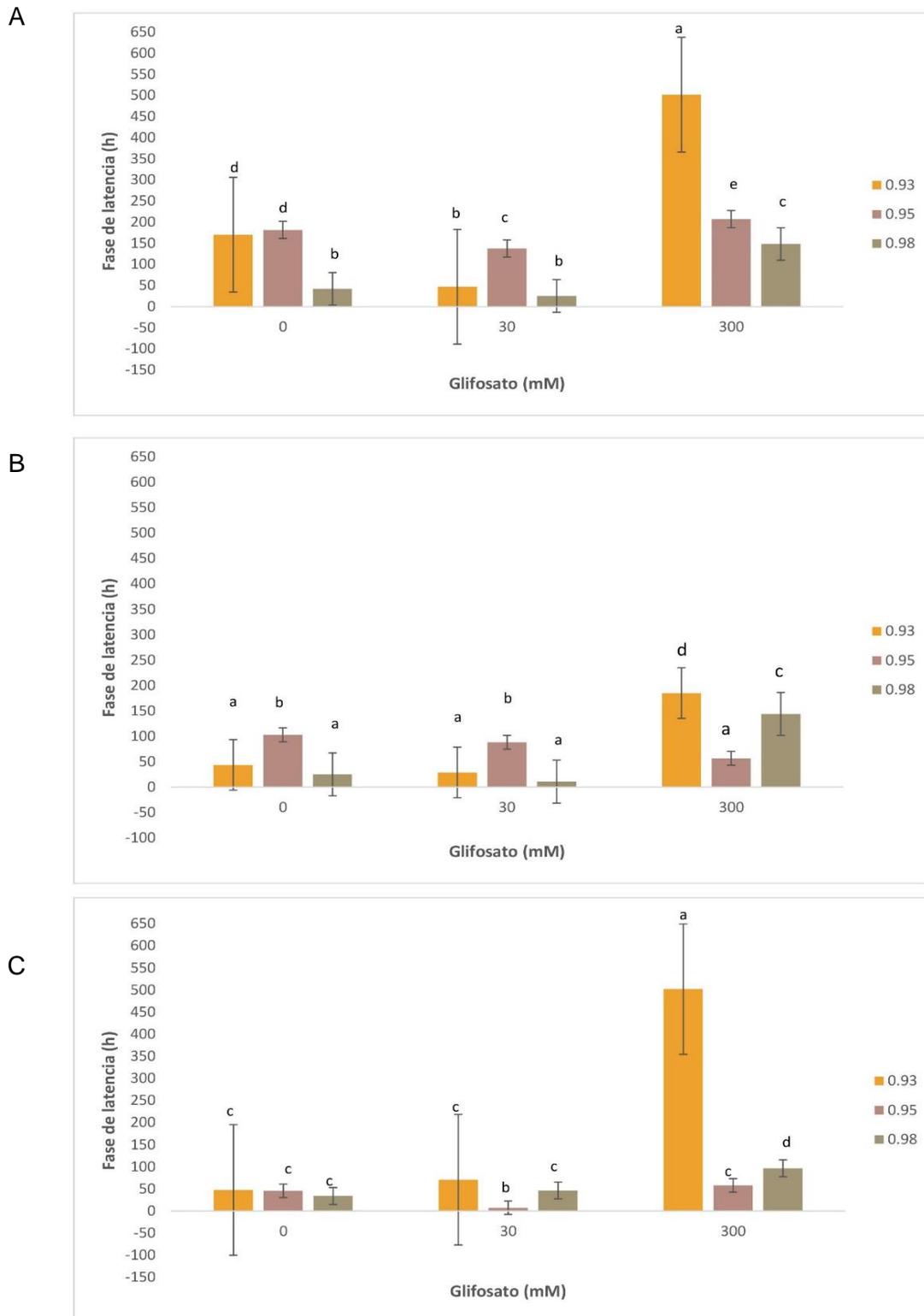
Al analizar la cepa AP 55 se observó que a 18 °C la fase de latencia con 30 mM se mantuvo siempre constante en los tratamientos controles en las tres  $a_w$ . Con 300 mM la fase de latencia aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) (figura 29a). A 28 °C se observó que a 0.98 de  $a_w$  a medida que la concentración de glifosato aumentaba la fase de latencia se mantuvo constante con respecto al control. A 0.93 y 0.95 de  $a_w$  con 30 mM se registraron valores iguales al control, mientras que con 300 mM sólo a 0.93 de  $a_w$  aumentó (figura 29b). Al analizar la fase de latencia a una temperatura de 37 °C bajo las tres  $a_w$  y con 30 mM se observaron periodos de latencia similares a los tratamientos controles. Mientras que con 300

mM aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ). A 0,93 de  $a_w$  y con 300 mM en esta cepa la fase de latencia también se extendió por más de 504 h en todo el ensayo.

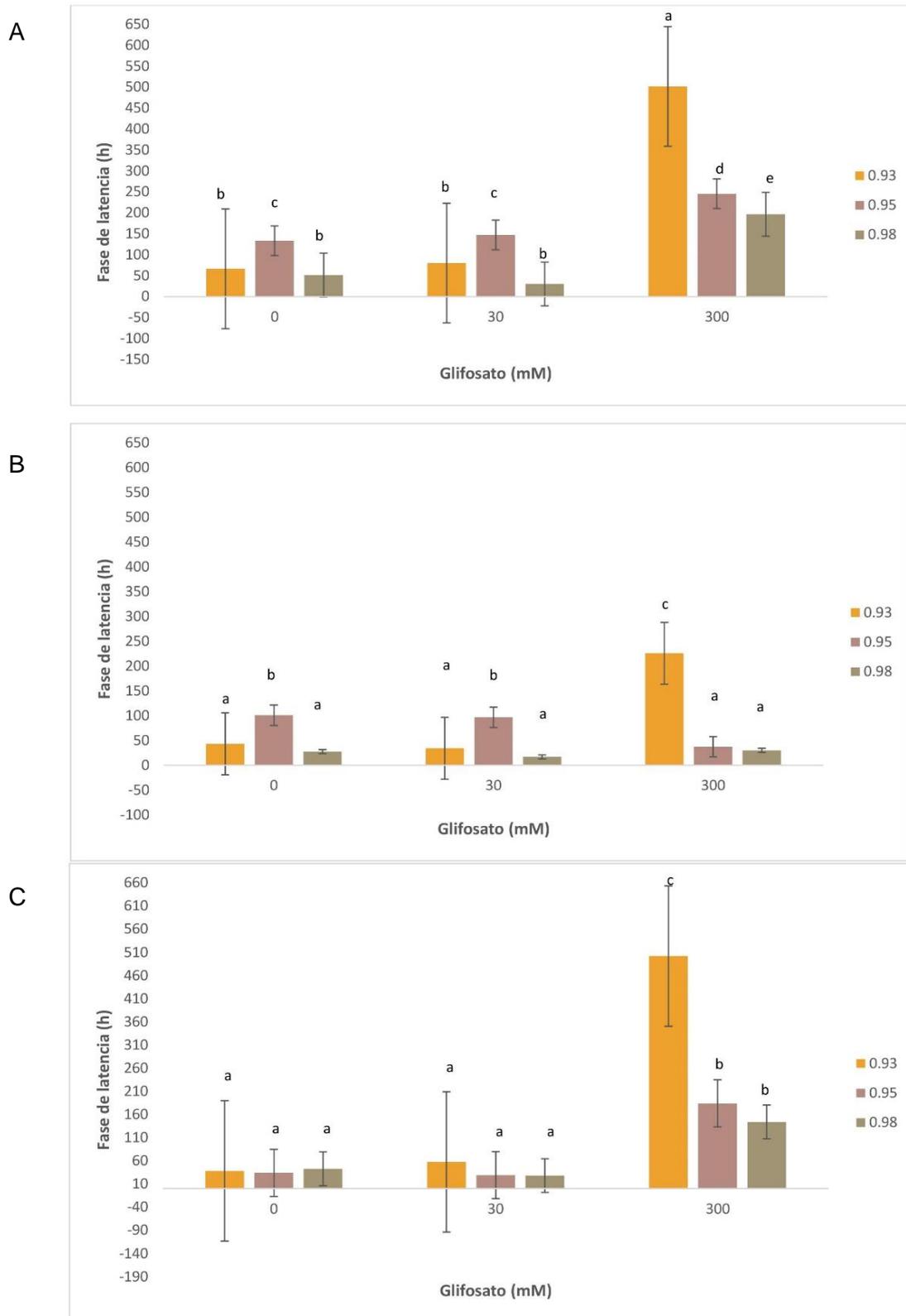
Para la cepa AF 56 y a 18 °C se observó que la fase de latencia a 0.98 y 0.95 de  $a_w$  aumentó a 300 mM registrándose diferencias significativas, mientras que a 30 mM se mantuvo constante al control. A 0.93 de  $a_w$  y con 300 mM también se extendió a más de 504 hs (figura 30a). A 28 y 37 °C la fase de latencia bajo las tres  $a_w$  y con 30 mM se mantuvo siempre constante respecto a los tratamientos controles, mientras que con 300 mM aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) (figuras 30b y 30c).

Con respecto a la cepa AF 63 se observó que en las tres temperaturas ensayadas la fase de latencia con 30 mM del herbicida se mantuvo igual que los tratamientos controles en las tres  $a_w$ , mientras que con 300 mM la misma aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ) (figura 31).

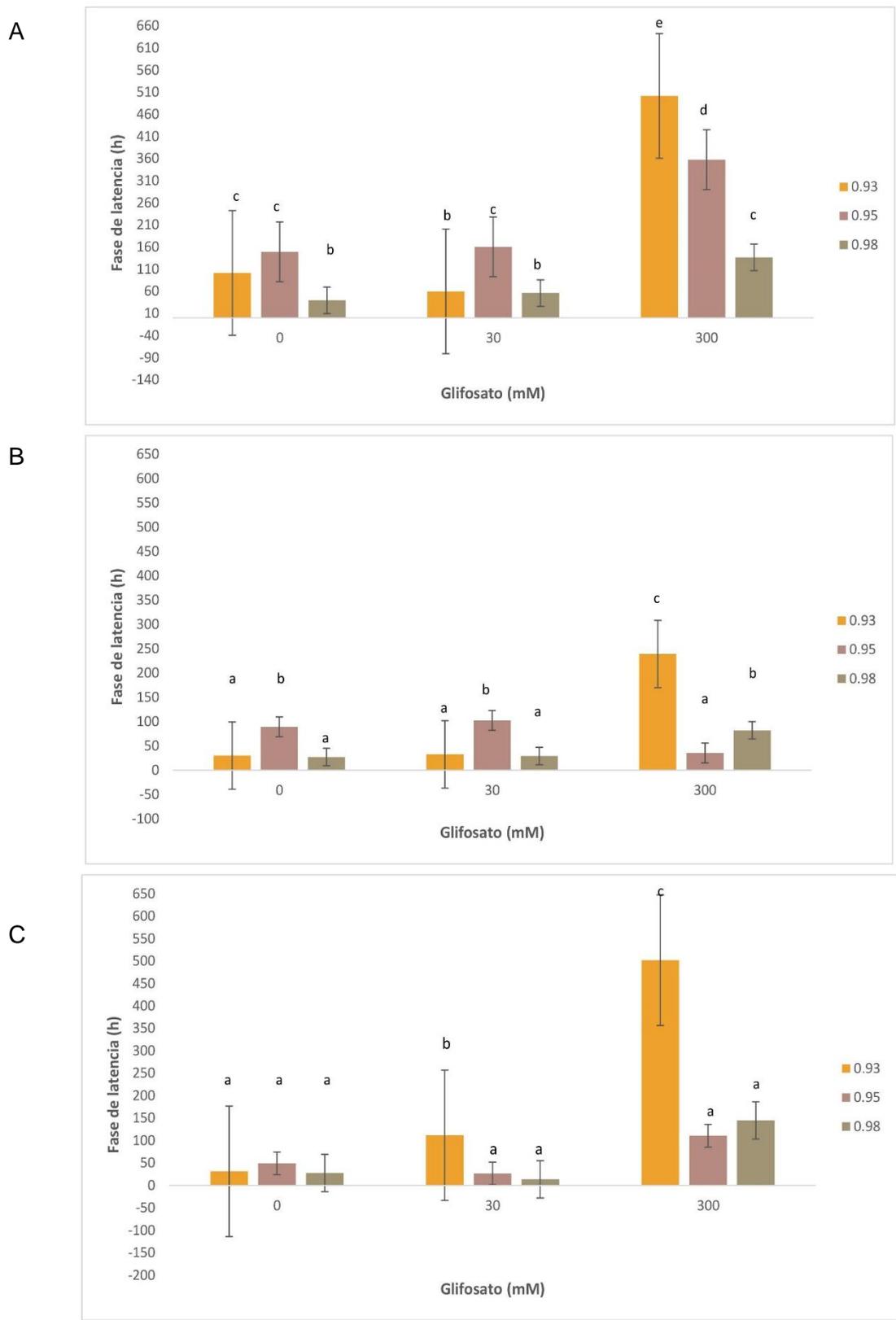
Los menores valores de fase de latencia registrados fueron a 28 °C y 0.98 de  $a_w$  para las cepas de *A. parasiticus*; y 37 °C a 0.95 de  $a_w$  para ambas cepas de *A. flavus*, mientras que los mayores valores se registraron con niveles de 0.93 de  $a_w$  y 300 mM en las tres temperaturas ensayadas para todas las cepas.



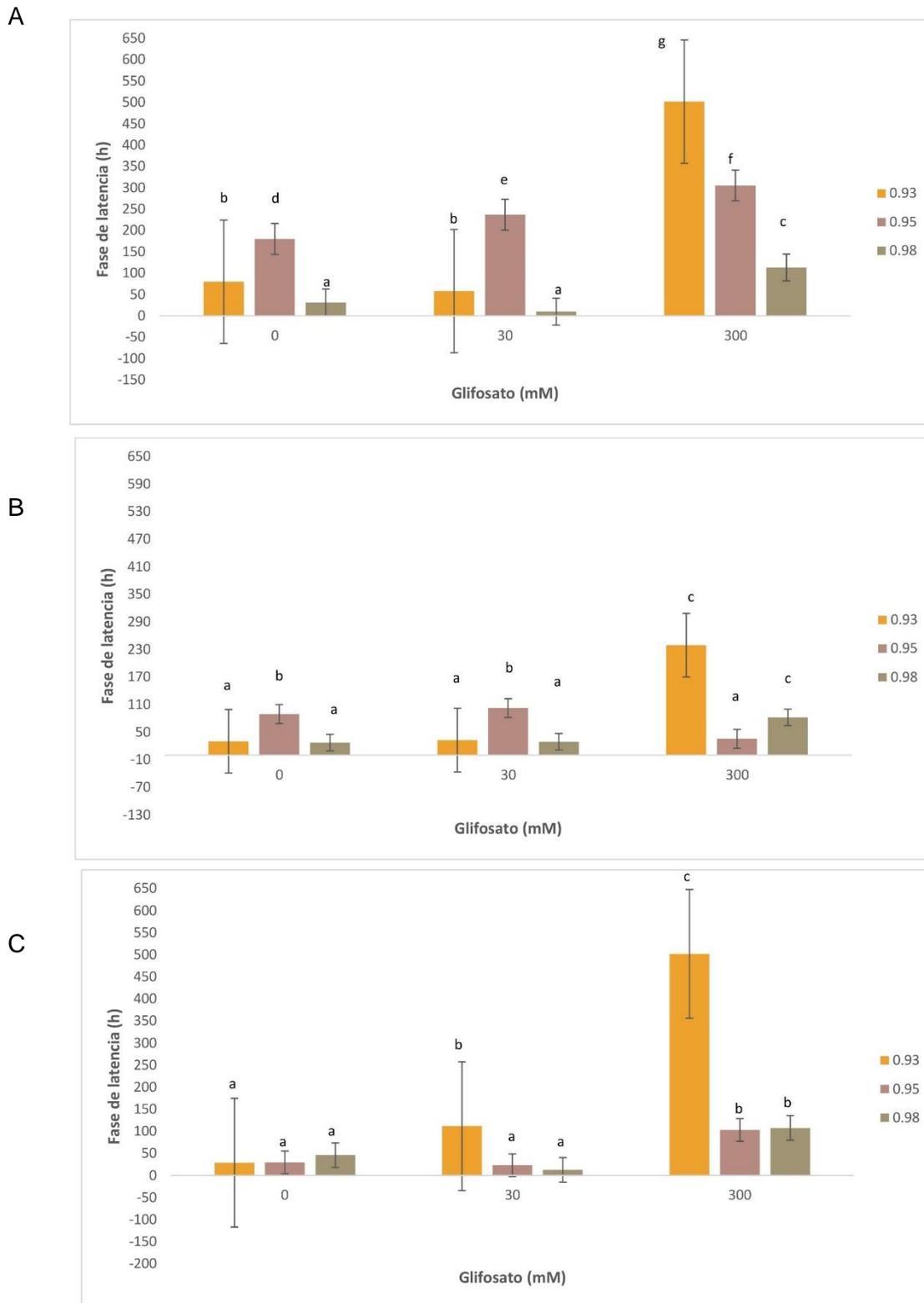
**Figura 28:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. parasiticus* (NRRL 2999) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 7: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C



**Figura 29:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. parasiticus* (AP 55) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 7: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C



**Figura 30:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. flavus* (AF 56) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 8: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C



**Figura 31:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la fase de latencia (h) de *A. flavus* (AF 63) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 8: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C

### V.3.5. Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de temperatura y $a_w$ .

Para llevar a cabo este ensayo se eligieron dos concentraciones de glifosato, entre 30 y 300 mM, ya que por estudios anteriores se demostró que influyen en el crecimiento. En las figuras 32, 33, 34 y 35 se muestran los diferentes efectos de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial de las cuatro cepas en estudio. Los resultados obtenidos demostraron que se registró un efecto significativo de los factores por separado y sus interacciones ( $a_w$ , concentración de glifosato y temperatura) para todas las cepas, excepto para las cepas de *A. flavus* donde la triple interacción no fue significativa. El factor que produjo más efecto sobre el comportamiento de la velocidad de crecimiento fue  $a_w$  (tabla 6: anexos estadísticos). En general, se observó que en los tratamientos controles independientemente de la cepa, a medida que aumentaba la  $a_w$ , la velocidad de crecimiento también aumentó. A la temperatura de 28 °C para las cuatro cepas en estudio, se observó que las velocidades de crecimiento obtenidas fueron mayores con relación a las otras dos temperaturas ensayadas, en todas las  $a_w$ . Lo mismo ocurrió en los tratamientos con glifosato, donde las velocidades de crecimiento fueron, en general superiores a las obtenidas a 18 y 37 °C en todas las  $a_w$ .

En la cepa NRRL 2999 a 18 °C, se observó un efecto conjunto de la  $a_w$  y de las diferentes dosis de glifosato, ya que a los 300 mM la velocidad de crecimiento registrada fue la menor en las tres  $a_w$  ensayadas, observándose diferencias significativas con 0.93 de  $a_w$  ( $p < 0,01$ ). A la concentración de 30 mM la velocidad de crecimiento se comportó de manera similar en las dos  $a_w$  menores, pero a los 0.95 no se observaron diferencias significativas con respecto al control mientras que a los 0.93 la misma disminuyó; a 0.98 se observó que si bien la velocidad de crecimiento disminuye con respecto al control, las diferencias entre ellas no fueron significativas (figura 32a). A 28 °C se vio que en las  $a_w$  de 0.95 y 0.93 la velocidad de crecimiento en 30 mM se comportó de manera similar que el control, mientras que a 0.98 ésta aumentó ( $p < 0,01$ ). Los valores registrados en 300 mM fueron menores en comparación al control. A 37 °C se observó un efecto simple de las diferentes concentraciones de glifosato, es decir que a medida que este parámetro aumenta, la velocidad de crecimiento disminuye ( $p < 0,01$ ) (figura 32c).

En relación con la cepa AP 55 al realizarse un análisis de interacción doble entre los factores  $a_w$  y concentración se observó un efecto conjunto sobre la velocidad de crecimiento. A 18 °C, se observó que la velocidad de crecimiento se mantuvo constante en relación con el control a 0.93 y 0.95 de  $a_w$  con 30 mM, mientras que a 0.98 aumentó registrándose diferencias significativas con respecto al control ( $p < 0,01$ ). Con 300 mM la velocidad disminuyó significativamente en las tres  $a_w$  ensayadas (figura 33a). A 28 °C y con 30 mM se observó que en las  $a_w$  de 0.93-0.95 la misma se mantiene constante con respecto

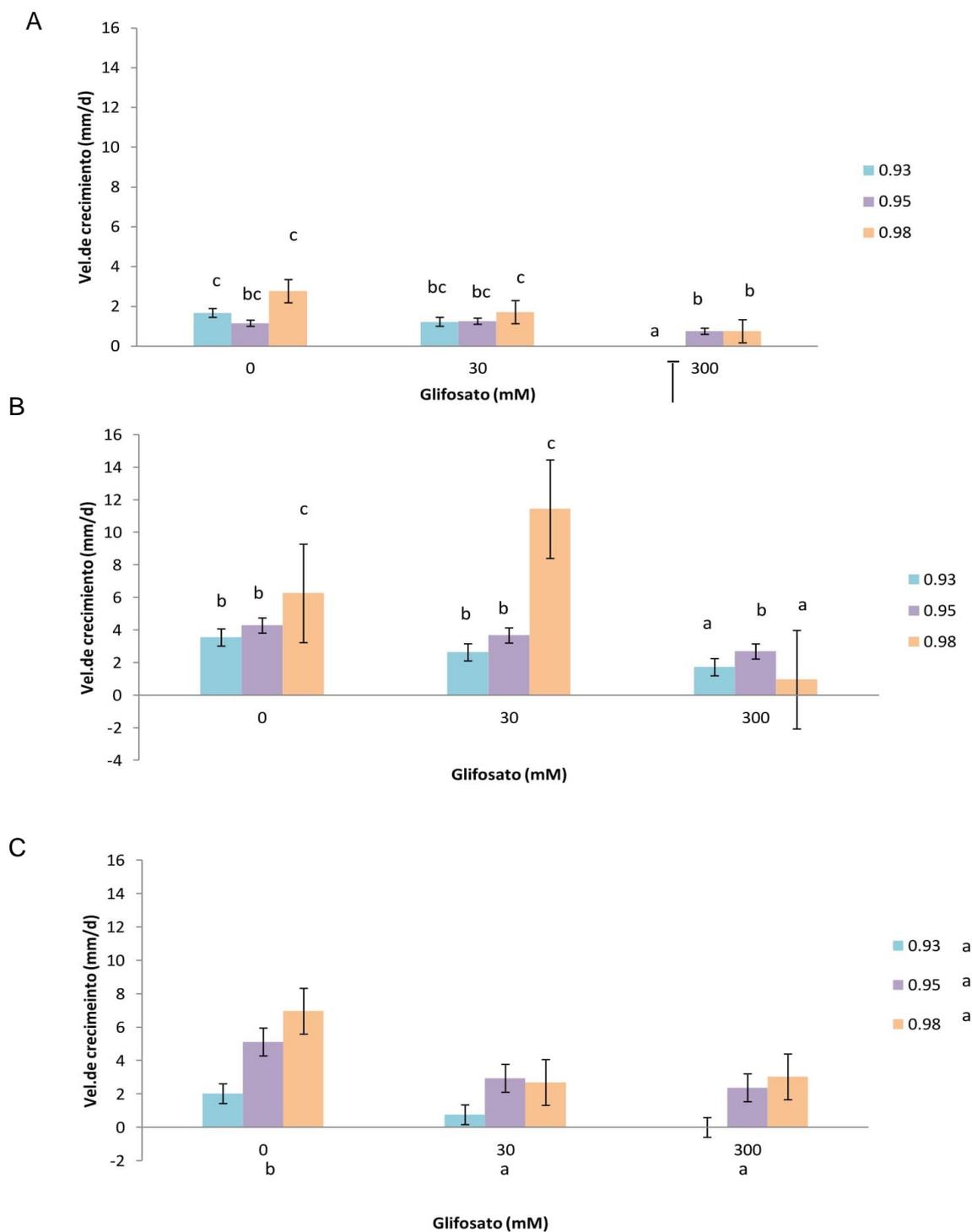
al control, mientras que a 0.98 de  $a_w$  disminuye significativamente. A 300 mM se registraron los menores valores de velocidad de crecimiento (figura 33b). A 37 °C, a medida que la concentración de glifosato aumentó la velocidad de crecimiento disminuyó. En cuanto a las  $a_w$  ensayadas se observó que entre 0.98 y 0.95 este parámetro no mostró diferencias, siendo significativas sólo a 0.93 de  $a_w$  ( $p < 0,01$ ) (figura 33c).

Cuando se analizó la cepa AF 56 a 18 °C se observó que con 30 mM la velocidad de crecimiento se mantuvo constante con respecto al control, mientras que con 300 mM la misma disminuyó. Este parámetro se comportó de igual manera a 0.95 y 0.93, pero a 0.98 aumentó significativamente (figura 34a). A 28 °C se observó que con 30 mM y a 0.93-0.95 de  $a_w$  la velocidad se mantuvo constante con respecto al control, mientras que a 0.98 la misma disminuye. Con 300 mM se registraron los valores más bajos a las tres  $a_w$  ensayadas, sin diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,01$ ) (figura 34b). A 37 °C, a medida que la concentración de glifosato aumenta la velocidad de crecimiento disminuye. En cuanto a las  $a_w$  ensayadas sólo se observaron diferencias significativas a la menor  $a_w$  (0.93) ( $p < 0,01$ ).

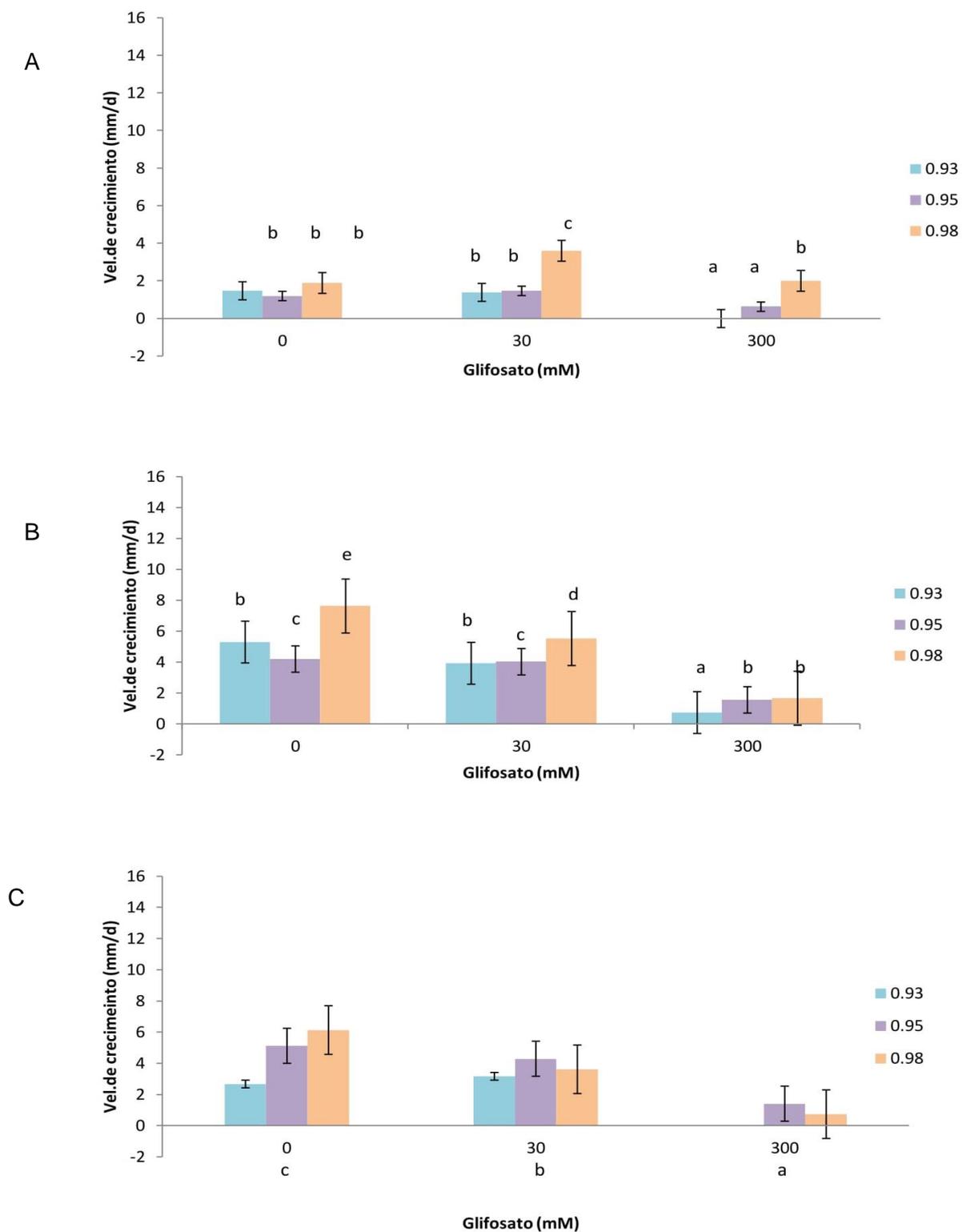
Con respecto a la cepa AF 63 a 18 °C se observó que con 30 mM la velocidad de crecimiento se mantuvo constante con respecto al control mientras que con 300 mM la misma disminuyó (figura 35a). Este parámetro se comportó de igual manera a 0.95 y 0.93, pero a 0.98 aumentó. A 28 °C se observa que a medida que la  $a_w$  aumenta, la velocidad de crecimiento también lo hace. Con respecto a las diferentes concentraciones de glifosato se observó diferencias significativas solamente con 300 mM, donde se registraron los menores valores ( $p < 0,01$ ). A 37 °C, a medida que la concentración de glifosato aumenta la velocidad de crecimiento disminuye. En cuanto a las  $a_w$  ensayadas se observó que a 0.98 y 0.95 de  $a_w$  este parámetro se comporta de igual manera, con diferencias significativas sólo a 0.93 ( $p < 0,01$ ) (figura 35c).

La máxima velocidad de crecimiento registrada fue de 12 mm/d para NRRL 2999 en condiciones de 0.98 de  $a_w$  y a 28 °C. Mientras que una inhibición total fue registrada en esta misma cepa y en las condiciones marginales ensayadas (18 °C y 0.93  $a_w$ ) y también a 37 °C y 0.93 de  $a_w$

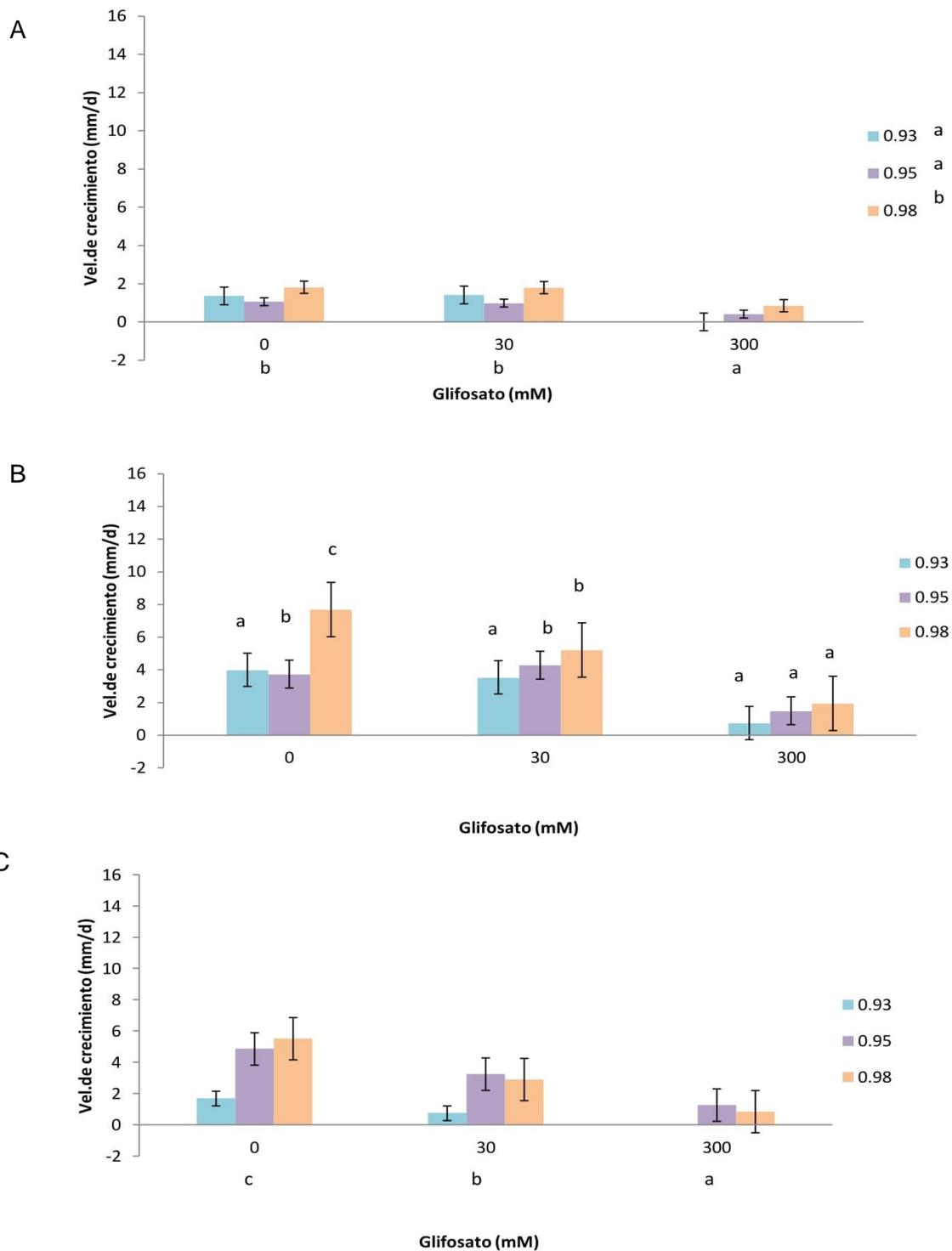
En la figura 36 se observa el efecto de diferentes dosis de glifosato sobre el crecimiento y esporulación de la cepa AF 63 a los 21 días de incubación en agar harina de maíz.



**Figura 32:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. parasiticus* (NRRL 2999) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 7: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C.

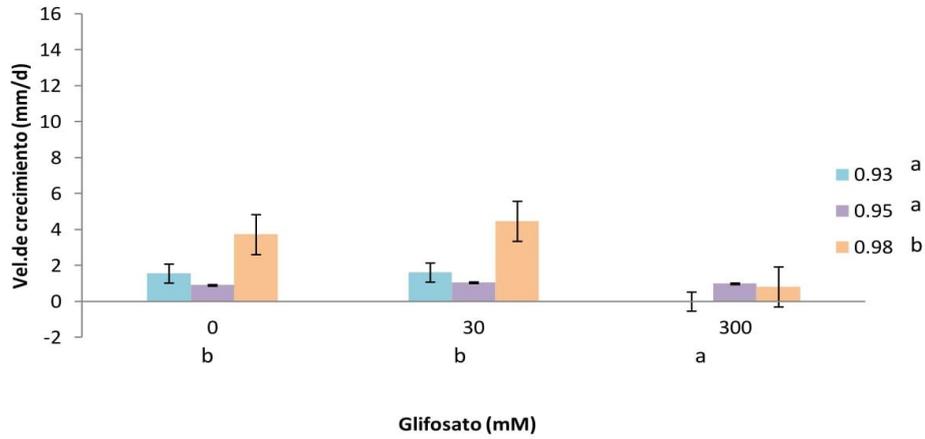


**Figura 33:** Interacción de diferentes  $a_w$  y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. parasiticus* (AP 55) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 7: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C.

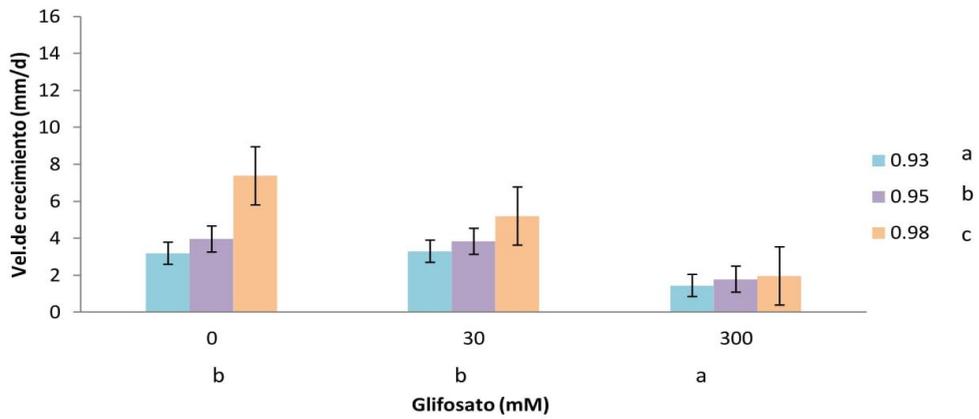


**Figura 34:** Interacción de diferentes aw y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. flavus* (AF 56) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 8: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C.

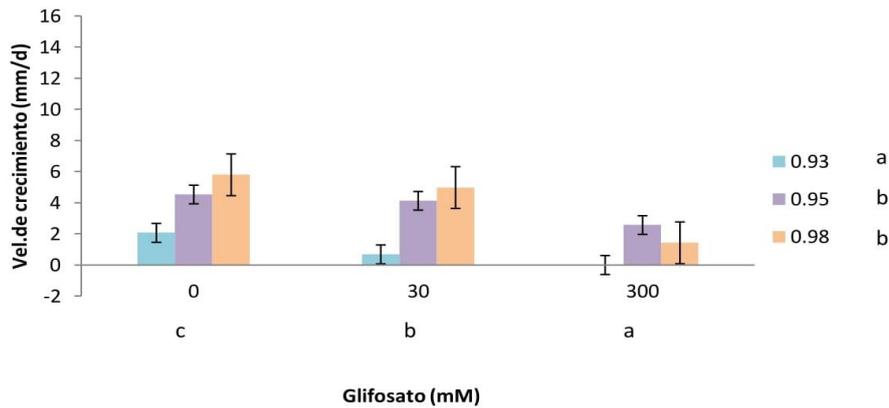
A



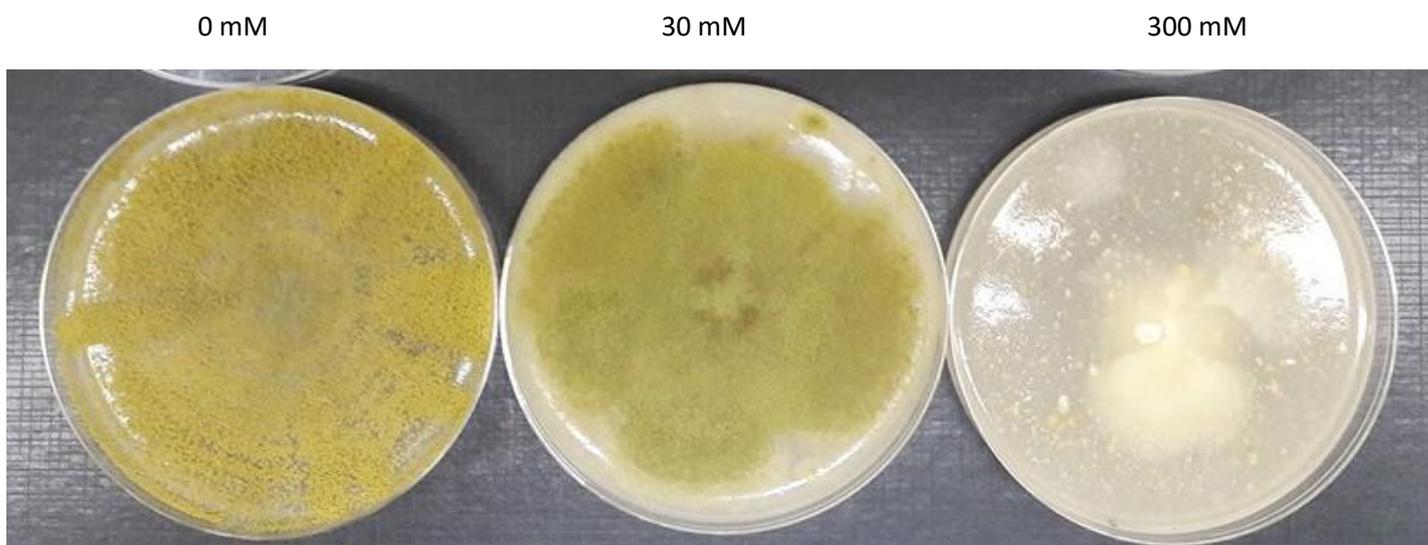
B



C



**Figura 35:** Interacción de diferentes  $aw$  y temperaturas sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A.flavus* (AF 63) sobre un medio a base de maíz suplementado con glifosato. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas a cada temperatura ensayada (tabla 8: anexos estadísticos). **A:** 18 °C, **B:** 28 °C, **C:** 37 °C

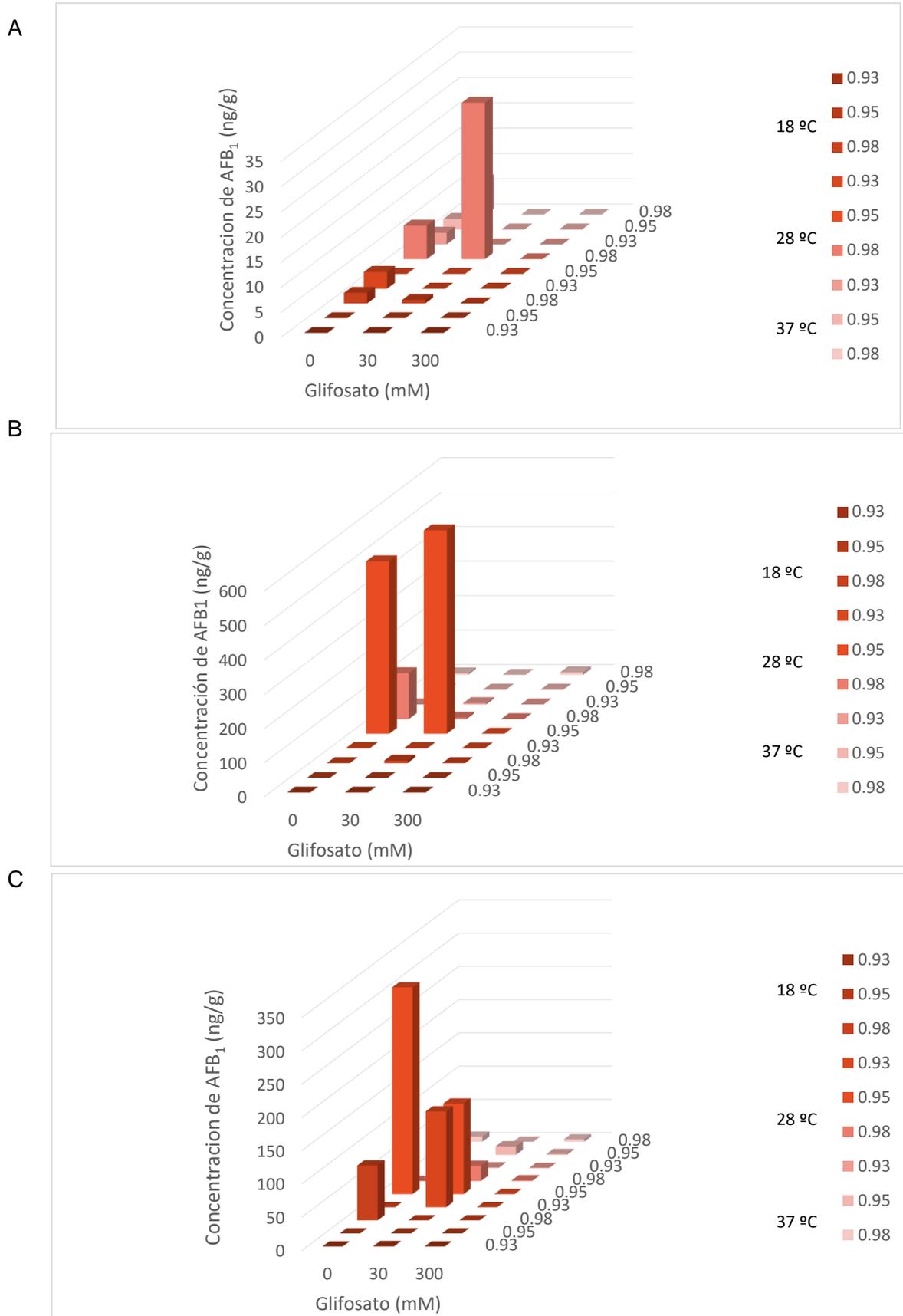


**Figura 36:** Crecimiento y esporulación de la cepa *Aspergillus* sección *Flavi* (AF 63) bajo diferentes dosis de glifosato en agar harina de maíz a 37°C a 21 días de incubación

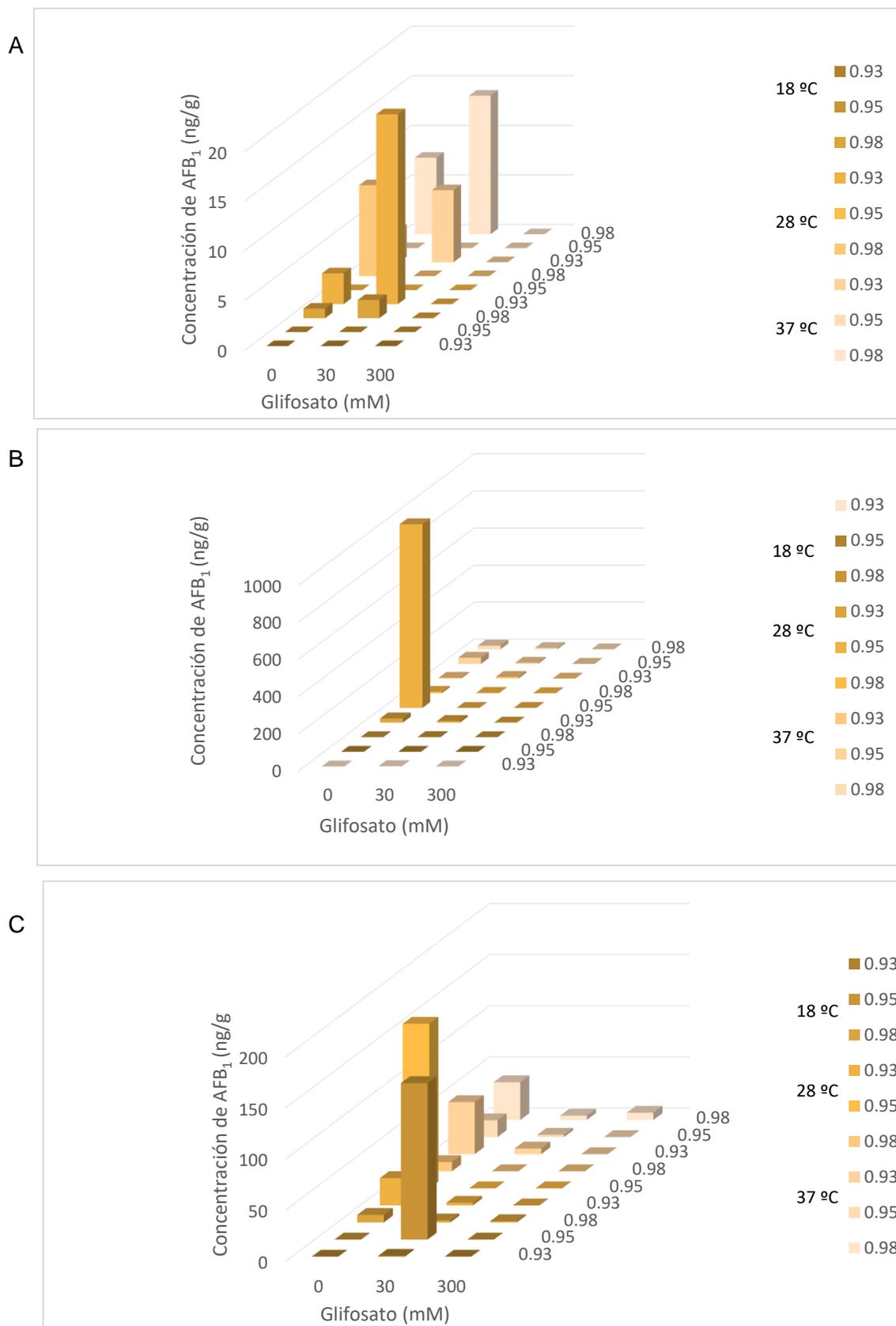
#### **V.3.6. Efecto del glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> bajo diferentes condiciones de temperatura y a<sub>w</sub>.**

Los resultados del ANOVA muestran que existió efecto significativo de cada uno de los factores ( $p < 0,01$ ) (figuras 37, 38, 39 y 40). Al evaluarse la producción de toxinas en todas las cepas en presencia de diferentes concentraciones de glifosato a diferentes condiciones de temperatura y  $a_w$  (tabla 15), se observó que en general a altas concentraciones de glifosato la producción de AFB<sub>1</sub> se inhibió por completo. Sólo en algunas condiciones se registró producción de bajos niveles de toxina. Las condiciones a las cuales la producción de la toxina se vio estimulada fue a 28 °C en los tratamientos controles, en las tres actividades acuosas ensayadas y en las cuatro cepas. Excepto para la cepa AF 63 donde los mayores niveles de AFB<sub>1</sub> se registraron con 30 y 300 mM; desde los 7 días de incubación ya se observó producción de AFB<sub>1</sub>. Las mayores concentraciones de toxina se registraron en la cepa AP 55, en la condición control a 28 °C y 0.95 de  $a_w$  a los 14 días de incubación (990 ng/g), seguido por la cepa AF 56 (669 ng/g) en las mismas condiciones y por la cepa NRRL 2999 a 0.95 de  $a_w$  en la condición control y 30 mM de glifosato, con valores de 501.7 y 591.4 ng/g, respectivamente.

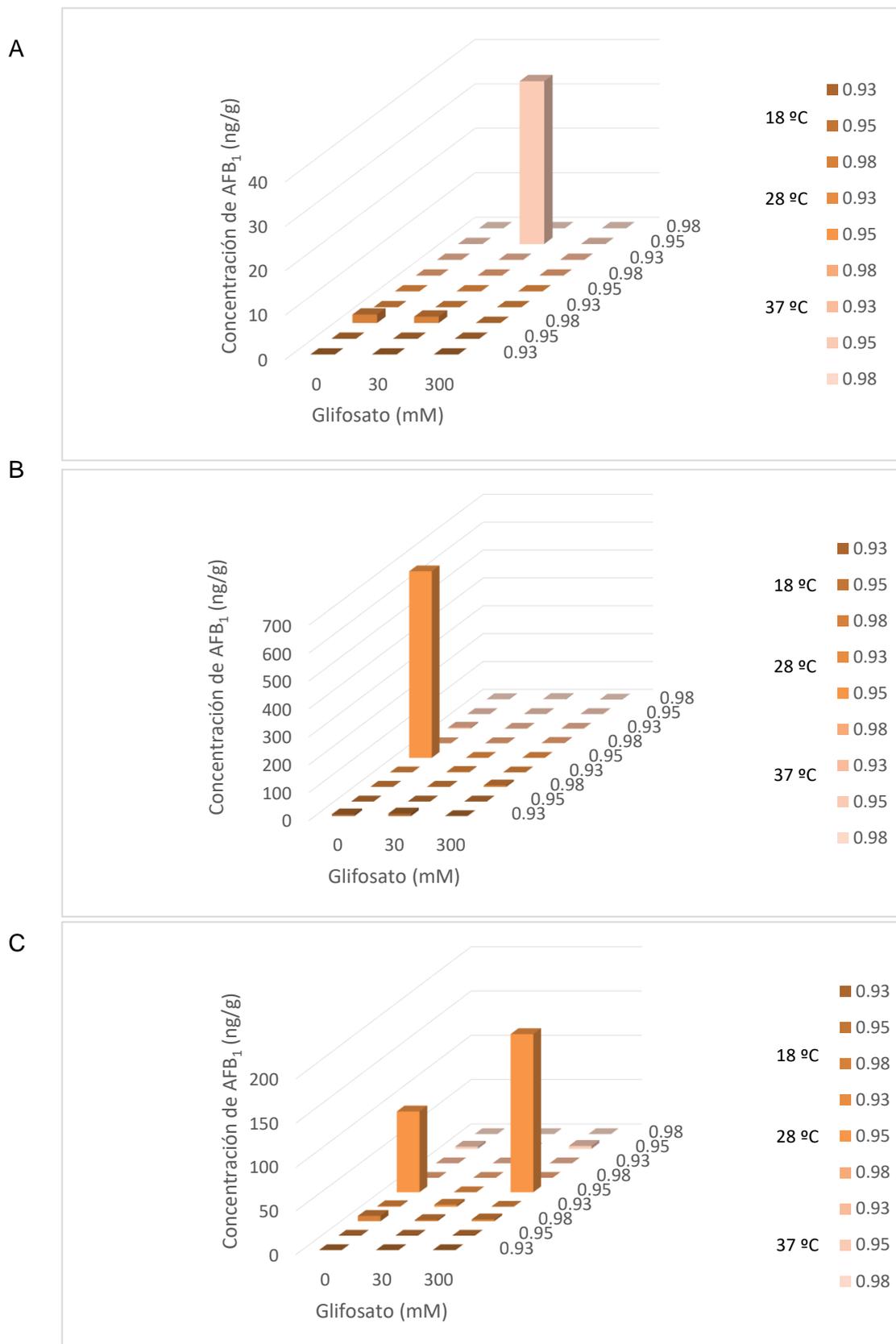
Los análisis estadísticos aplicando el test de Análisis de la Varianza para cada factor por separado (concentración, días, temperatura y  $a_w$ ) en cada una de las cepas se muestran en las tablas 9 y 10 en la sección anexos estadísticos.



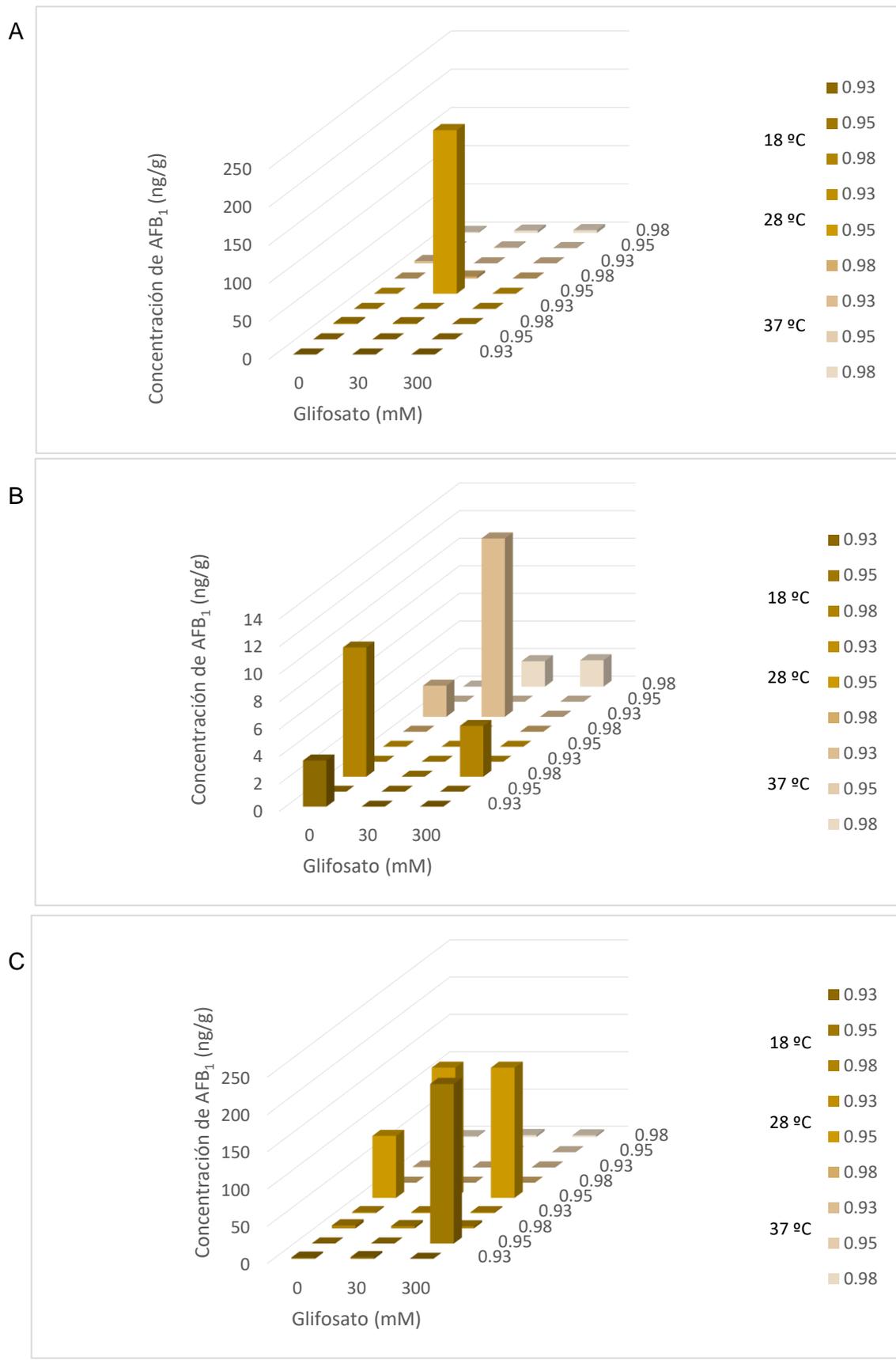
**Figura 37:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y temperaturas a los 7 (A), 14 (B) y 21 días (C) de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 7).



**Figura 38:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y temperaturas a los 7 (A), 14 (B) y 21 días (C) de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 7).



**Figura 39:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  y temperaturas a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 7).



**Figura 40:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de *a<sub>w</sub>* y temperaturas a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<0.7 ng/g). Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 7).

**Tabla 8:** Valores medios de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55).

<b>Cepas:</b>	<b>NRRL 299</b>	<b>AP 55</b>
<b>Concentración (mM) (C)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0	39.54 b	52.2 b
30	35.46 b	9.2 a
300	0.49 a	0.31 a
<b>Días de incubación (D)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
7	2.04 a	2.46 a
14	46.59 c	41.2 b
21	26.87 b	18.04 a
<b>Temperatura (°C) (T)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
18	3.47 a	6.32 a
28	70.03 b	46.7 b
37	1.99 a	8.69 a
<b>Actividad acuosa (<math>a_w</math>)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0.93	5.9 a	6.1 a
0.95	57.64 c	50.46 b
0.98	11.95 b	5.14 a

Los valores con letras distintas son significativos según el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ) (tabla 9: anexos estadísticos).

**Tabla 9:** Valores medios de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63).

<b>Cepas:</b>	<b>AF 56</b>	<b>AF 63</b>
<b>Concentración (mM) (C)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0	29.05 b	4.23 a
30	2.06 a	15.58 b
300	7.2 a	14.97 b
<b>Días de incubación (D)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
7	1.48 a	8.6 a
14	26.12 b	1.31 a
21	10.71 a	24.86 b
<b>Temperatura (°C) (T)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
18	1.32 a	9.14 a
28	35.03 b	24.2 b
37	1.96 a	1.43 a
<b>Actividad acuosa (<math>a_w</math>)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0.93	0.89 a	1.13 a
0.95	36.51 b	15.58 b
0.98	0.92 a	1.68 a

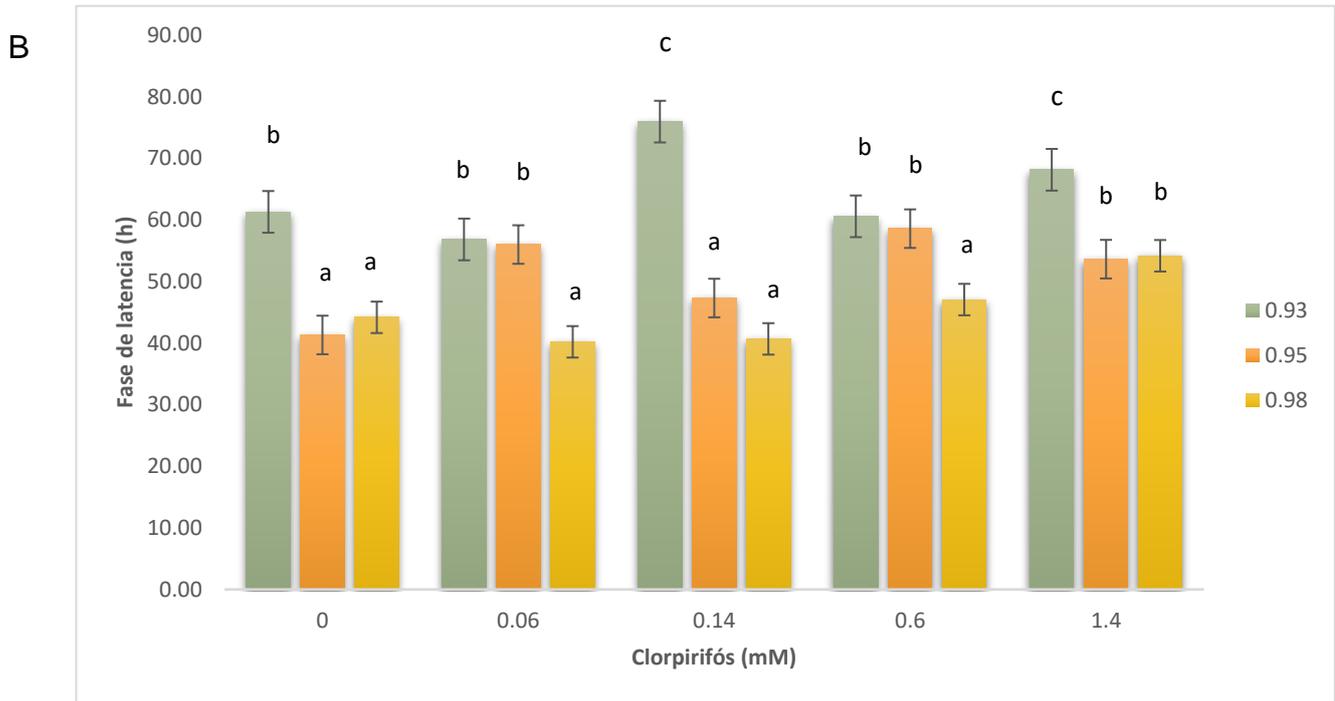
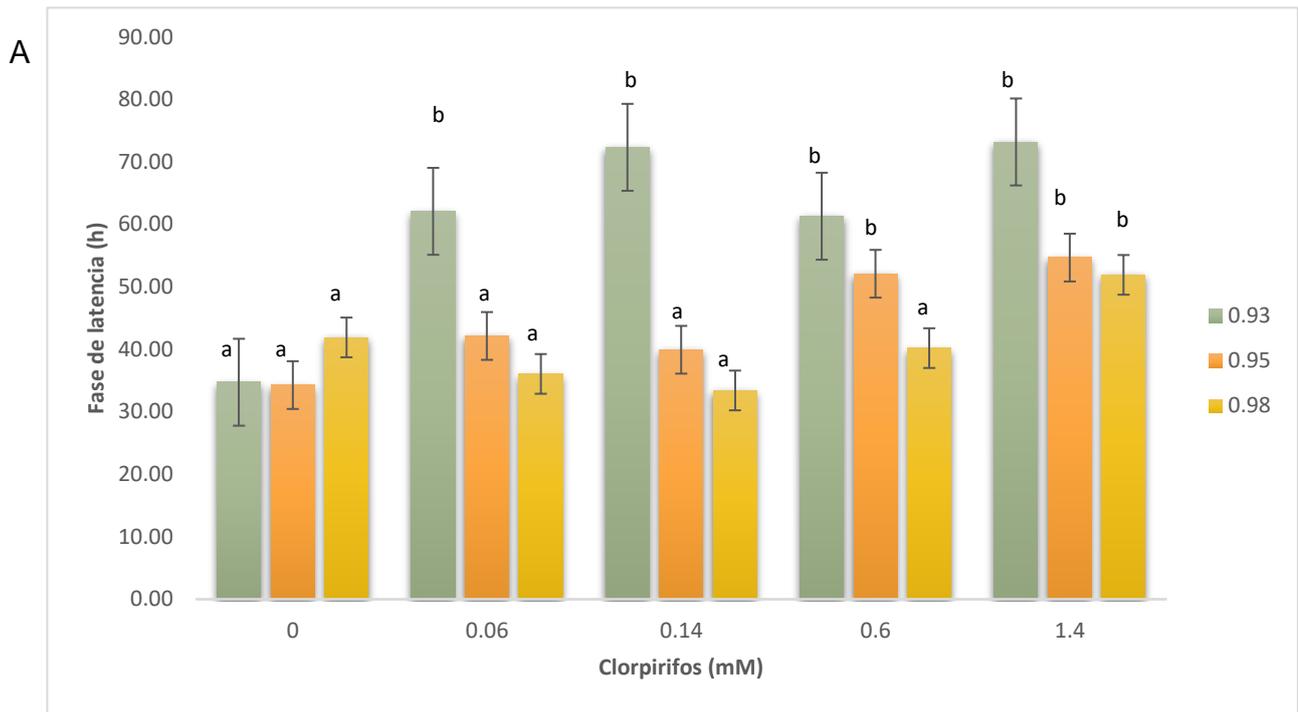
Los valores con letras distintas son significativos según el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ) (tabla 10: anexos estadísticos).

#### **V.4. Ensayos *In situ*: Evaluación sobre sustrato natural de los parámetros de crecimiento y producción de AFB<sub>1</sub> en especies de *Aspergillus* sección *Flavi* en presencia de clorpirifós y glifosato.**

Para realizar este ensayo se eligieron aquellas cepas que presentaron los mejores parámetros de crecimiento en el medio AHM: AP 55 (*A. parasiticus*) y AF 63 (*A. flavus*).

##### **V.4.1. Efecto de clorpirifós sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25°C.**

La figura 41 muestra los resultados del efecto del insecticida clorpirifós sobre el crecimiento de AP 55 y AF 63 sobre granos de maíz. El análisis de ANOVA mostró efectos simples de los factores por separados y su interacción ( $a_w$  y concentración de clorpirifós) (tabla 11: anexos estadísticos). En el tratamiento control de la cepa AP 55, no se observaron cambios significativos en la fase de latencia a medida que la  $a_w$  aumentaba, es decir que se mantuvo constante. En la cepa AF 63, la fase de latencia disminuyó a medida que aumentó la  $a_w$  ( $p < 0,01$ ). En los tratamientos con clorpirifós, para la cepa AP 55 a medida que la concentración del insecticida aumentó, la fase de latencia también aumentó con respecto al control, siendo significativo en 1.4 mM a las dos  $a_w$  menores. A 0,93 de  $a_w$  se vio que la fase de latencia aumentó significativamente en relación con las otras  $a_w$  ensayadas ( $p < 0,01$ ). En cuanto a la cepa AF 63 se observó que a 0.98 y 0.95 de  $a_w$  en todas las concentraciones de clorpirifós ensayadas los valores registrados de fase de latencia fueron menores que los observados a 0.93; y a medida que aumentó la concentración se mantuvo constante con respecto al control.

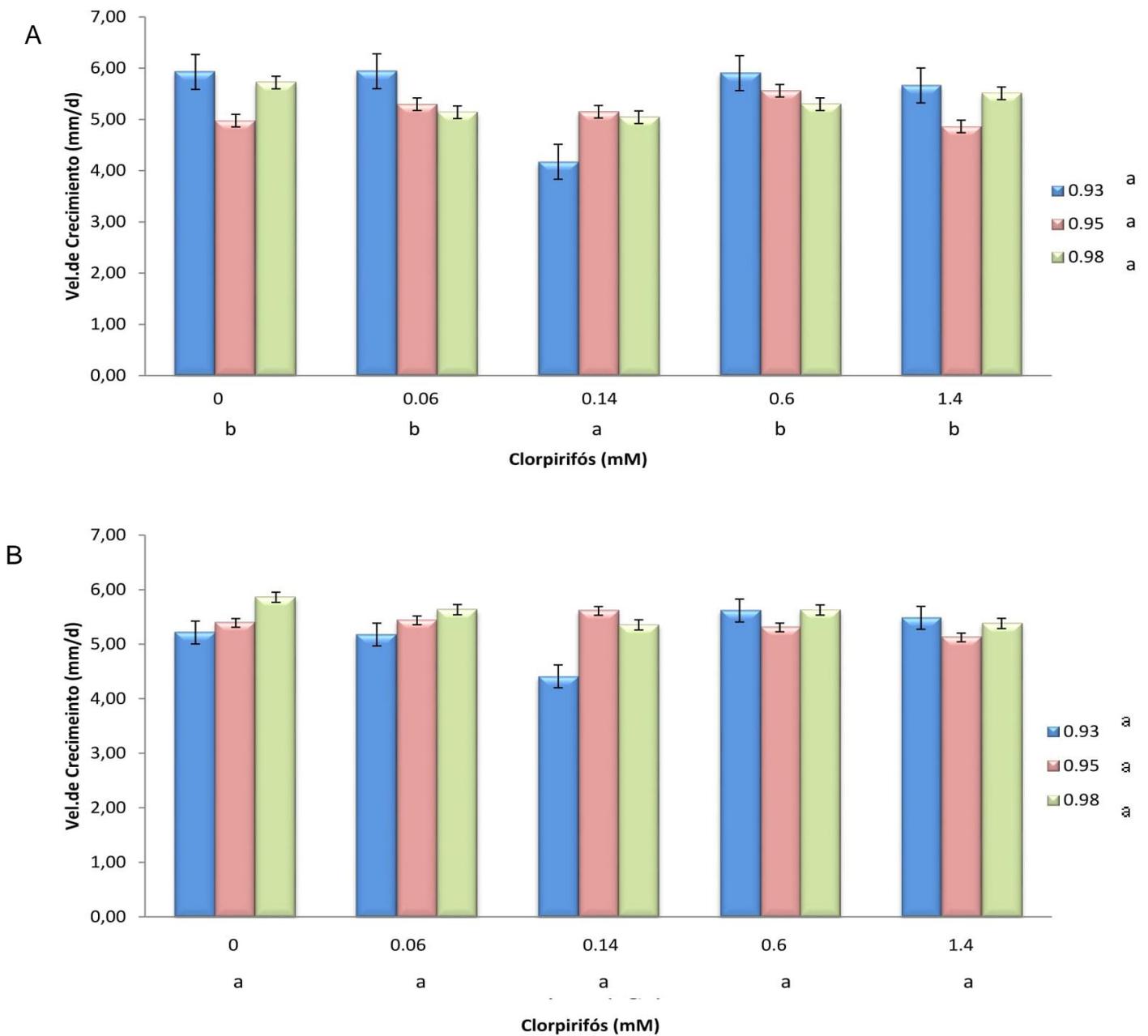


**Figura 41:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la fase de latencia (h) de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  a 25°C sobre granos de maíz. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0,01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas (tabla 11: anexos estadísticos). D.E: desvío estándar. A. AP 55, B. AF 63

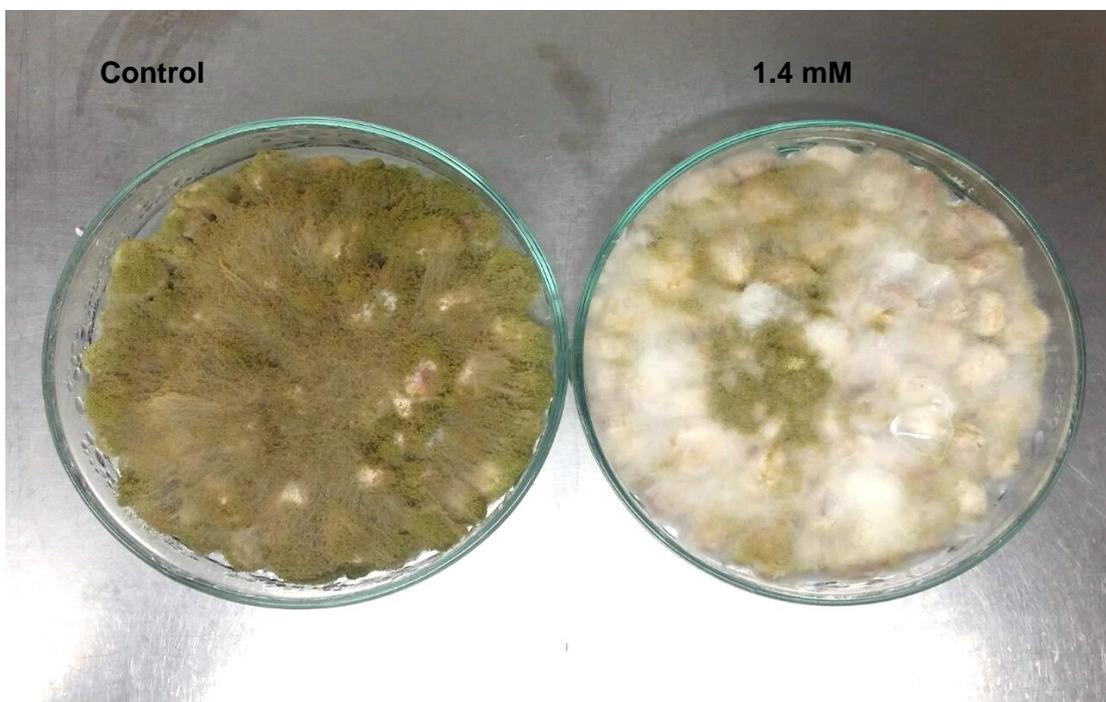
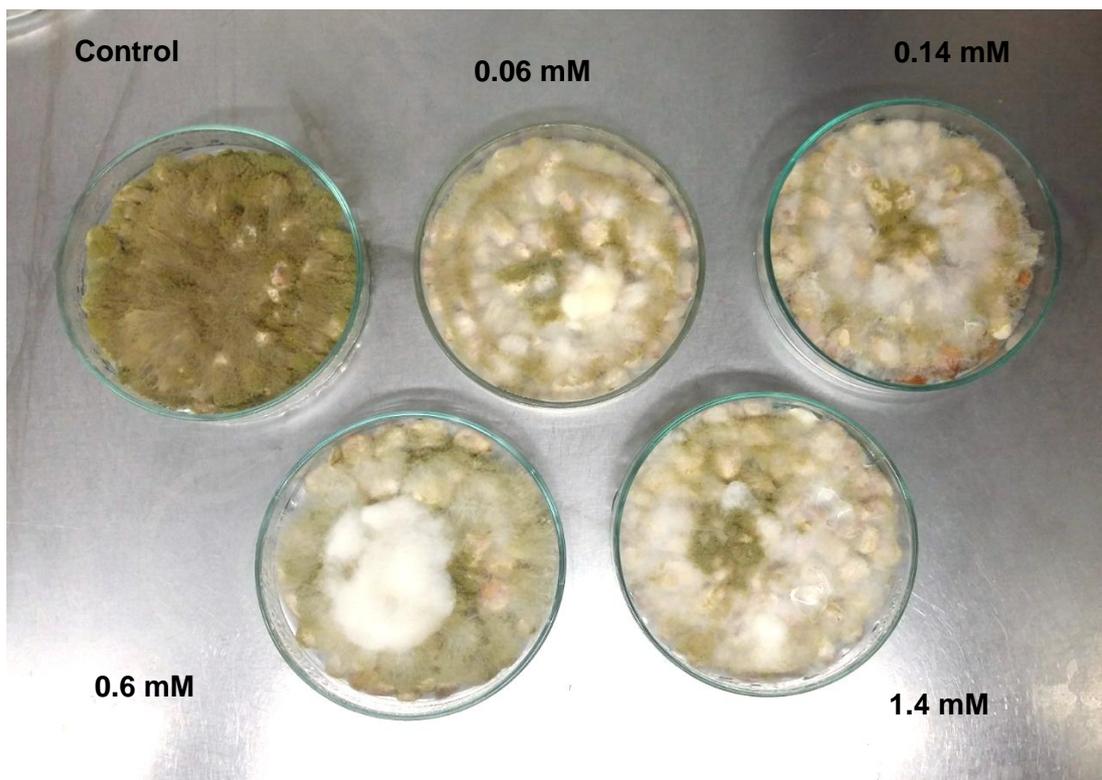
#### **V.4.2. Efecto de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25°C.**

En la figura 42 se muestra el efecto de las diferentes dosis de clorpirifós sobre la velocidad de crecimiento radial de las dos cepas analizadas en sustrato natural. El análisis de ANOVA sólo mostró efecto simple del factor concentración en la cepa AP 55 (tabla 11: anexos estadísticos). Cuando se evaluó el comportamiento de la velocidad de crecimiento de ambas cepas bajo diferentes condiciones de  $a_w$  en los tratamientos controles, se observó que se mantenía relativamente constante en las tres  $a_w$  ensayadas. Con respecto a los tratamientos con clorpirifós, independientemente de la cepa analizada, lo que se observó fue que la velocidad de crecimiento bajo las diferentes dosis del insecticida no presentó diferencias significativas con respecto al control con valores entre 5 y 6 mm/d, excepto en la cepa AP 55 a la concentración de 0.14 mM donde la velocidad disminuyó. El efecto de las tres  $a_w$  ensayadas no fue significativo ( $p>0,01$ ). Ambas cepas lograron una velocidad de crecimiento similar en los diferentes tratamientos ensayados.

La figura 43 muestra el efecto de clorpirifós sobre el crecimiento y esporulación de la cepa AP 55 sobre granos de maíz a los 21 días de incubación.



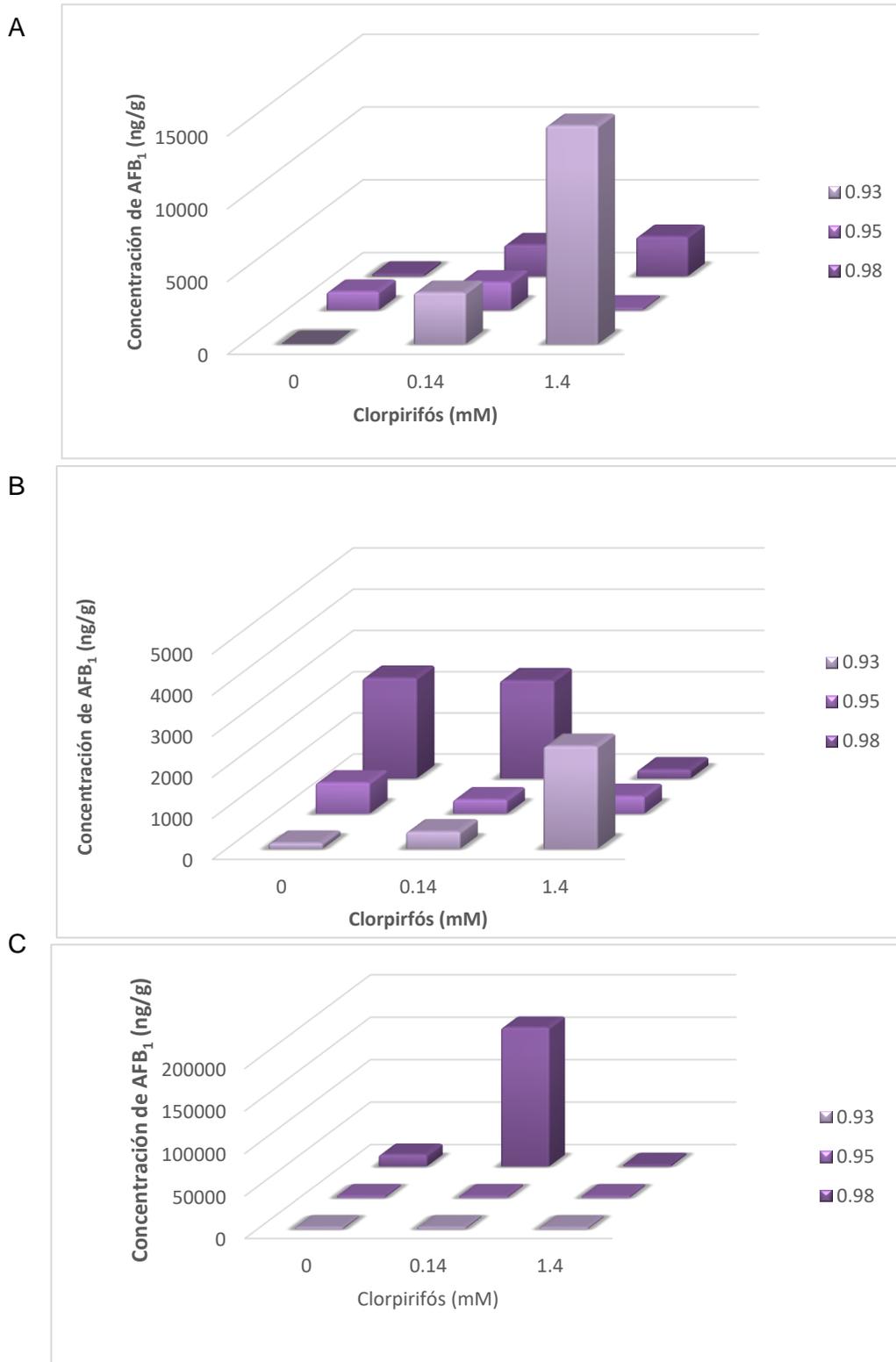
**Figura 42:** Interacción de diferentes  $a_w$  sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) sobre granos de maíz suplementados con diferentes concentraciones de clorpirifós a 25 °C. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0.01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas (tabla 11: anexos estadísticos). **A.** AP55, **B.** AF 63.



**Figura 43:** Crecimiento y esporulación de la cepa *Aspergillus* sección *Flavi* (AP 55) bajo diferentes dosis de clorpirifós en medio sustrato natural a 25°C a 21 días de incubación.

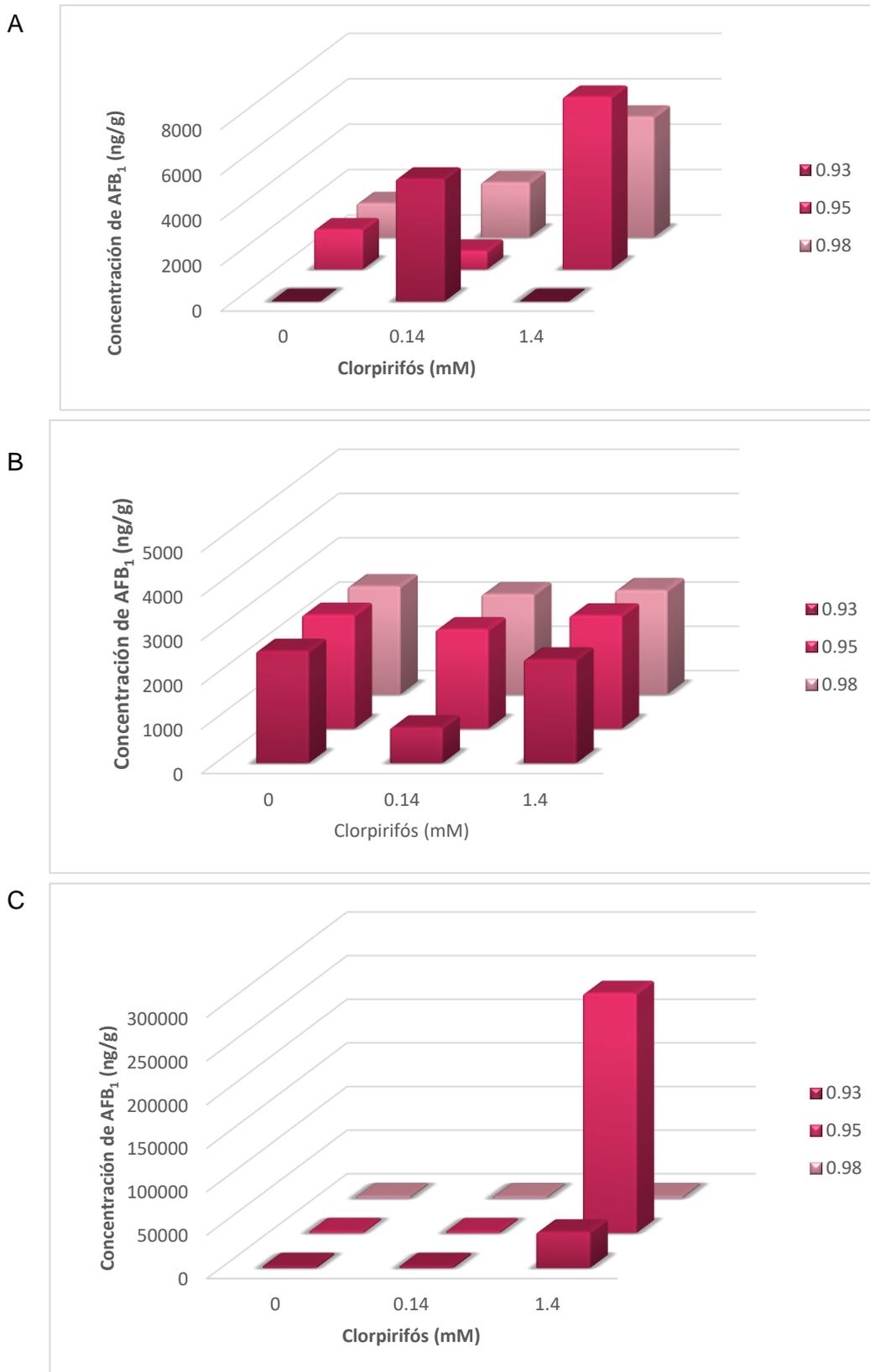
#### **V.4.3. Efecto de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> y a 25°C.**

En las figuras 44 y 45 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós en granos de maíz sobre la producción de AFB<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos de ANOVA muestran que existe efecto significativo de cada uno de los factores analizados ( $p < 0,01$ ) (tabla 12: anexos estadísticos). En general en los tratamientos controles se observó que para la cepa AP 55 a medida que a<sub>w</sub> aumentó, la producción de toxina también lo hizo; mientras que para la cepa AF 56 se mantuvo constante en los tres niveles. Se observó que el insecticida clorpirifós estimuló la producción de la toxina en altas concentraciones. A los 7 días de incubación en las dos cepas y a los 14 días para la cepa AP 55, existió una relación directamente proporcional entre concentración de la toxina y el aumento de clorpirifós en el sustrato, y se observó que desde los 7 días de incubación las cepas producían toxina. Por otro lado, se observó que a los 14 días de incubación en la cepa AF 63 y a los 21 días en ambas cepas analizadas, a medida que la concentración del insecticida aumentó, las concentraciones de toxinas se mantuvieron constantes con respecto a los controles en las tres actividades acuosas ensayadas, sin diferencias significativas entre los valores registrados ( $p > 0,01$ ). Con respecto al comportamiento de las cepas frente a la a<sub>w</sub>, se observó que en la cepa AP 55 a medida que este parámetro aumentó la producción de AFB<sub>1</sub> también aumentó; mientras que en la cepa AF 63 se observó un efecto contrario, las mayores concentraciones de la toxina se registró a 0.93. A los 21 días en la cepa AP 55, a 0.98 y con 0.14 mM y en la cepa AF 63 a 0.93 y 0.95 de a<sub>w</sub> con 1.4 mM se observaron los valores más altos de AFB<sub>1</sub>.



**Figura 44:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  a 25°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. . nd: valores por debajo del límite de detección (<2.2 ng/g). .)

Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 8).



**Figura 45:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz por cepas de *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  a 25°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<2.2 ng/g). .)

Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 8).

**Tabla 10:** Valores medios de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C) y días de incubación (D) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por AP 55 y AF 63 sobre granos de maíz a 25°C

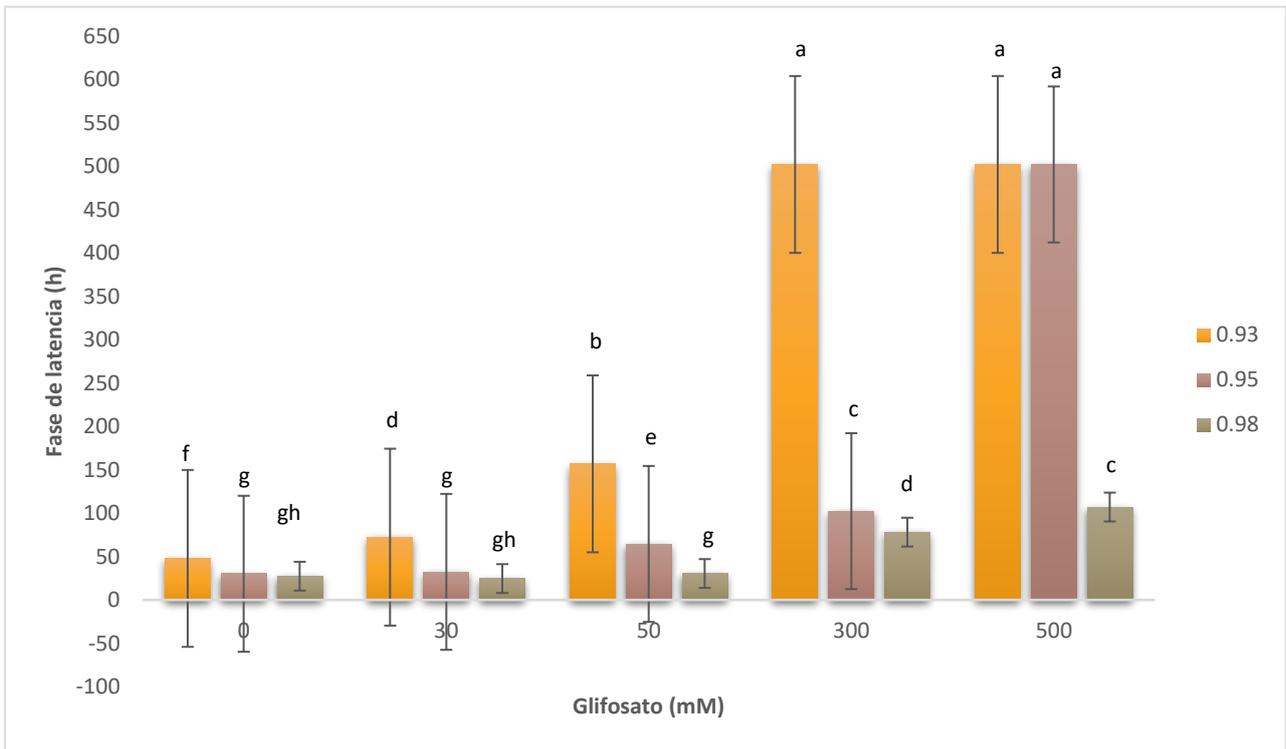
<b>Cepas:</b>	<b>AP 55</b>	<b>AF 63</b>
<b>Concentración (mM) (C)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0	2612.21 a	1992.79 a
0.14	19881.64 b	2320.19 a
1.4	17354.24 b	37724.52 b
<b>Días de incubación (D)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
7	17276.54 b	2757.96 a
14	1069.86 a	2233 a
21	21501.7 a	37046.54 b
<b>Actividad acuosa (<math>a_w</math>)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0.93	17462.84 b	6415.94 a
0.95	1275.54 a	33062.6 b
0.98	21109.71 b	2558.96 b

Los valores con letras distintas son significativos según el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ) (tabla 12: anexos estadísticos).

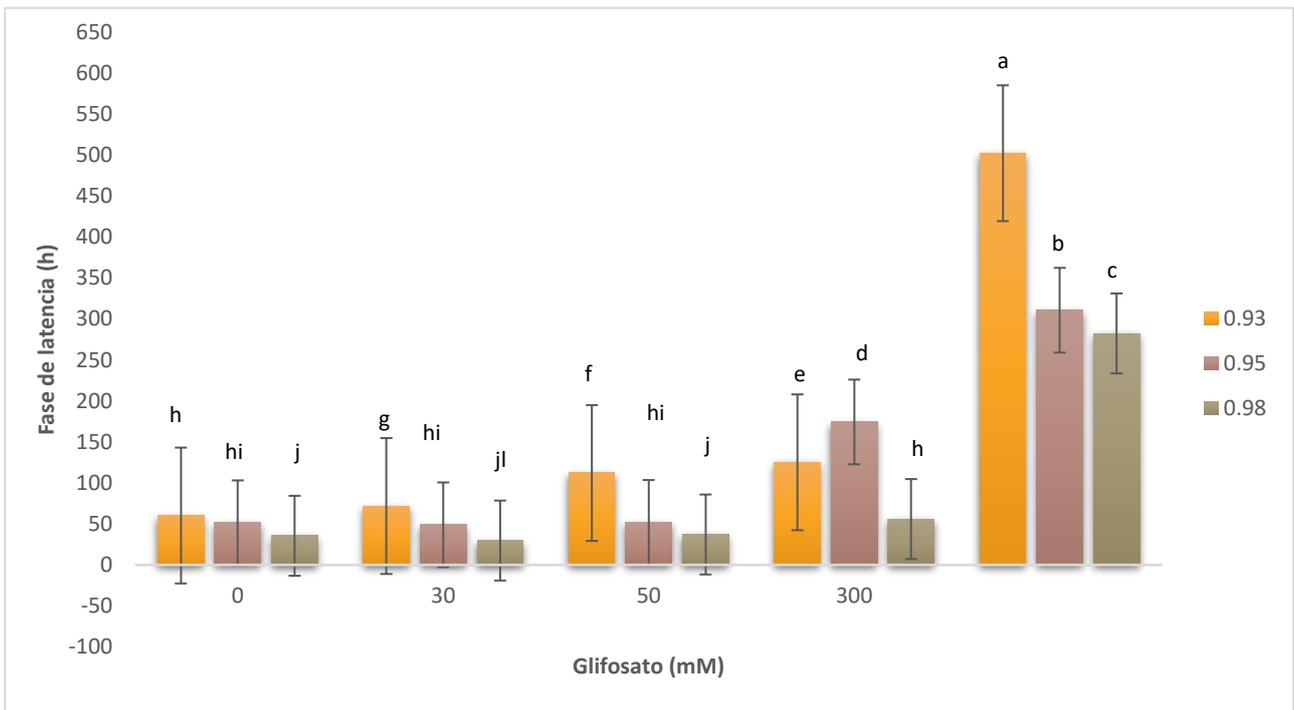
#### **V.4.4. Efecto de glifosato sobre la fase de latencia bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25°C.**

Cuando se realizó el análisis de ANOVA se observó efecto significativo de cada uno de los factores por separado y sus interacciones ( $p < 0,01$ ) (tabla 13: anexos estadísticos). Al analizarse el parámetro fase de latencia (figura 46), se observó que en general, en ambas cepas estudiadas en los tratamientos controles la misma disminuyó a medida que las diferentes condiciones de actividad acuosa aumentaron. Lo que se observó con respecto a los tratamientos con glifosato fue que en las tres  $a_w$  a medida que la misma aumentó, la fase de latencia también incrementaba, observándose diferencias significativas entre 300 y 500 mM con respecto al control. En las concentraciones de 30 y 50 mM si bien, se apreció un incremento de la fase de latencia, no se observó diferencias significativas con respecto al control.

A



B



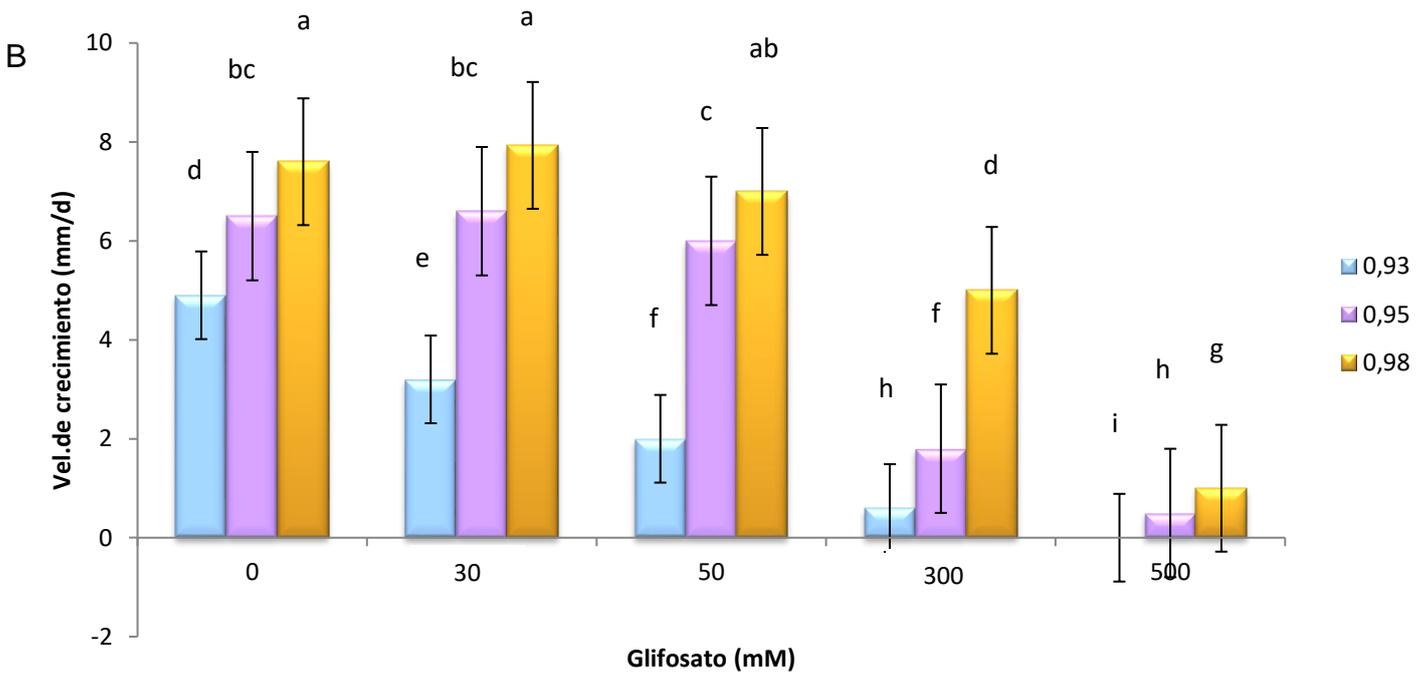
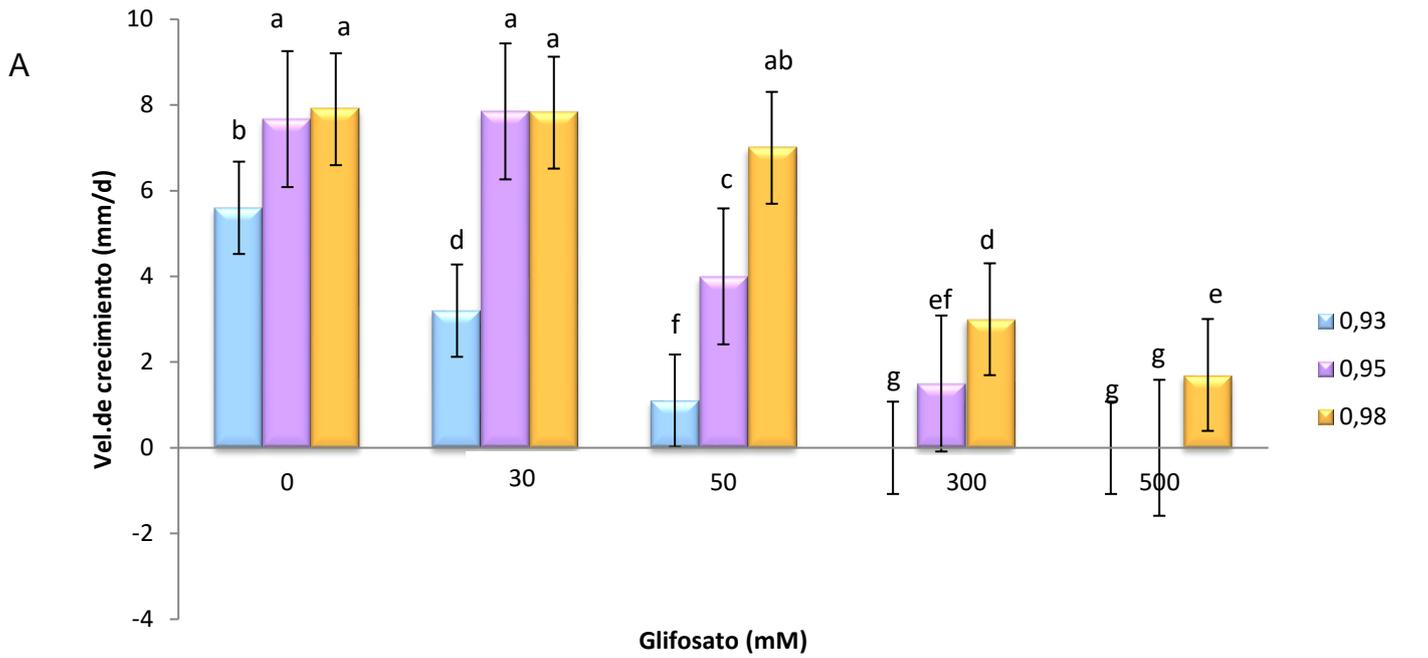
**Figura 46:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la fase de latencia (hs.) de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  a 25°C sobre granos de maíz.

Valores de 502 hs superan el periodo de incubación. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0.01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas (tabla 13: anexos estadísticos). D.E: desvío estándar. A.AP 55,

B. AF 63

#### **V.4.5. Efecto de glifosato sobre la velocidad de crecimiento radial bajo diferentes condiciones de $a_w$ y a 25°C.**

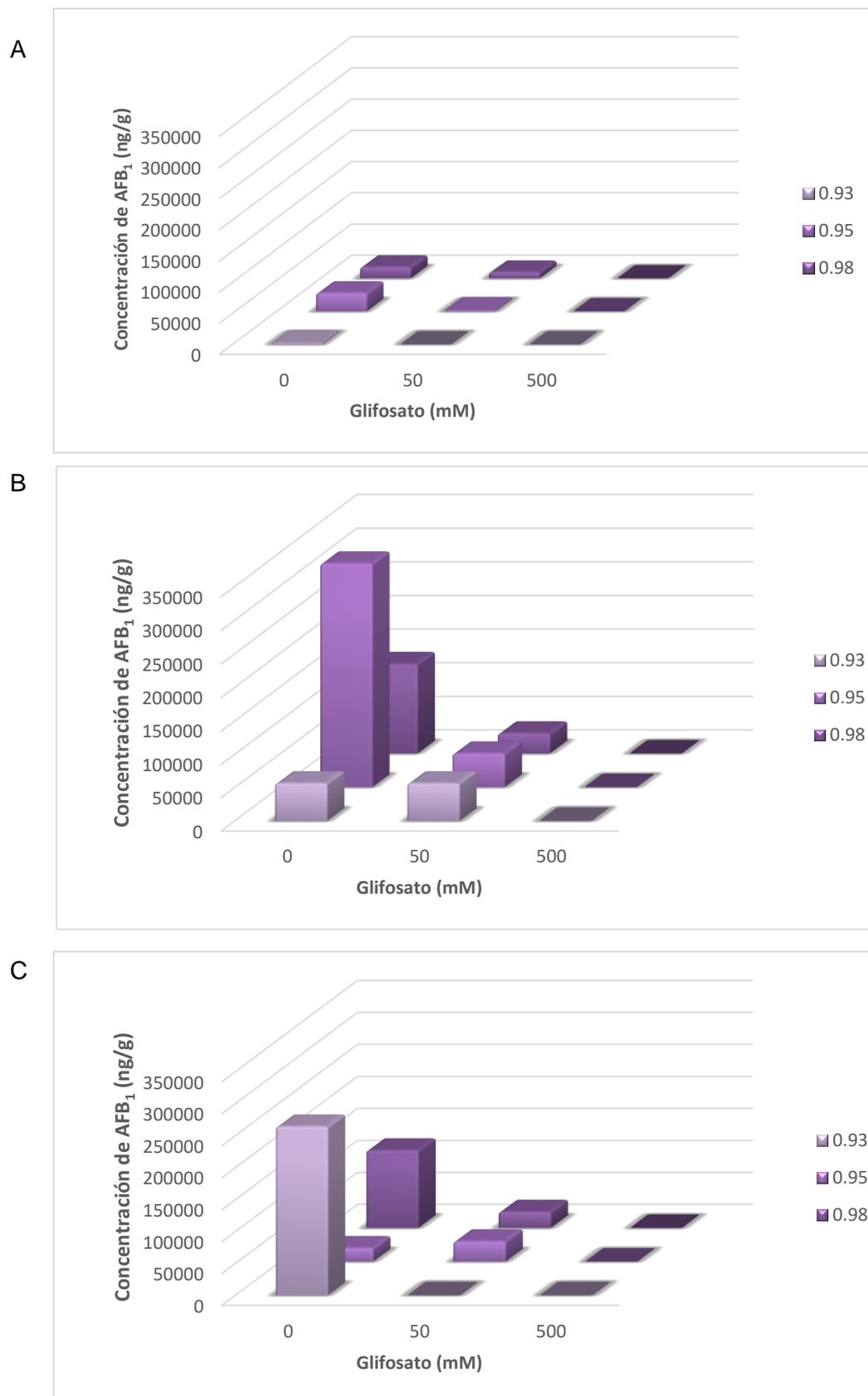
En la figura 47 se muestran los diferentes efectos de glifosato y  $a_w$  sobre la velocidad de crecimiento radial de las dos cepas en estudio sobre sustrato natural. Cuando se realizó el análisis de ANOVA se observó efecto significativo de cada uno de los factores por separado y sus interacciones ( $p < 0,01$ ) (tabla 13: anexos estadísticos). Se observó que en general ambas cepas presentaron el mismo comportamiento. En los tratamientos controles a medida que la actividad acuosa aumentó la velocidad de crecimiento también lo hizo, registrándose diferencias significativas entre ellas ( $p < 0,01$ ), excepto en la cepa AP 55 a 0.95 y 0.98 de  $a_w$  donde no hubo diferencias significativas. Con respecto a los tratamientos con glifosato a medida que la concentración del herbicida incrementó, la velocidad de crecimiento decreció en las tres  $a_w$  ensayadas. En la cepa AP 55, a 30 mM en las tres  $a_w$  y a 50 mM a 0.98 de  $a_w$  los valores de velocidad de crecimiento registrados se mantuvieron constantes con respecto al control, es decir que no se registraron diferencias significativas de la velocidad en esta concentración del herbicida. En las condiciones marginales (300, 500 mM y 0.93  $a_w$ ) el crecimiento fúngico fue totalmente inhibido.



**Figura 47:** Interacción de diferentes  $a_w$  sobre la velocidad de crecimiento (mm/d) de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) sobre granos de maíz suplementados con diferentes concentraciones de glifosato a 25 °C. Las letras diferentes son estadísticamente significativas según el test de la mínima diferencia de Fisher (LSD), ( $p < 0.01$ ). El análisis estadístico se realizó para cada una de las cepas (tabla 13: anexos estadísticos). **A.** AP 55, **B.** AF 63

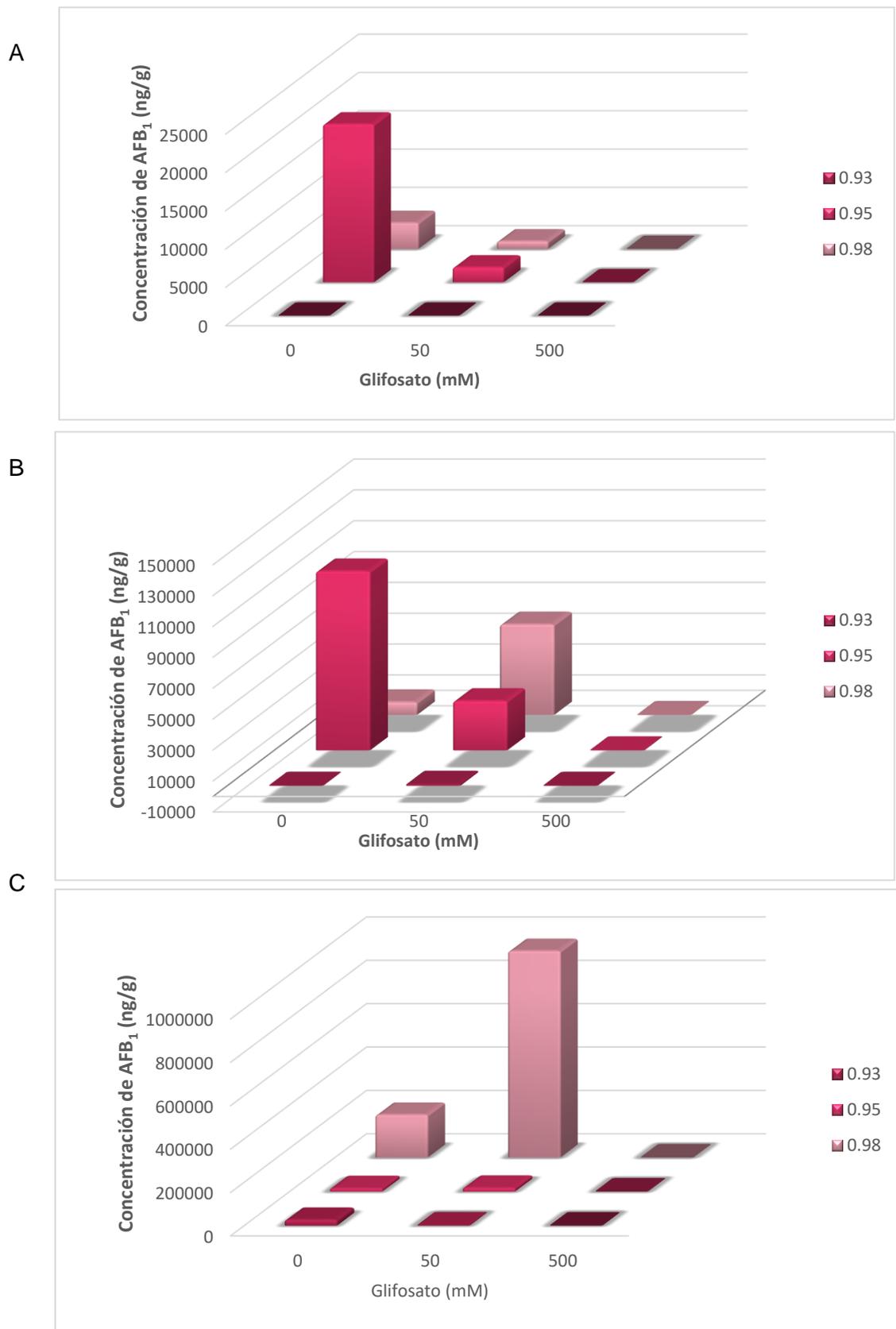
#### **V.4.6. Efecto de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> en granos de maíz bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> y a 25°C.**

En las figuras 48 y 49 se muestra el efecto de diferentes dosis de glifosato y a<sub>w</sub> sobre la producción de AFB<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos de ANOVA muestran que existe efecto significativo de cada uno de los factores ( $p < 0,01$ ) (tabla 14: anexos estadísticos). En general, se observó que a medida que la concentración de glifosato fue en aumento, la producción de toxina se fue inhibiendo; a las mayores concentraciones del herbicida (500 mM) ninguna de las cepas en estudio produjo AFB<sub>1</sub> en las condiciones ensayadas. Con concentraciones de 50 mM y 0.93 de a<sub>w</sub> la producción de toxina también se inhibió. Mientras que en las demás condiciones la acumulación de toxina aumentó a medida que transcurrían los días de incubación ( $p < 0,01$ ). En la cepa AP 55 la producción de AFB<sub>1</sub> se estimuló a 0.95 de a<sub>w</sub>, mientras que en la cepa AF 63 se observó que a 0.98 se registraron las mayores concentraciones de la toxina. Las mayores concentraciones de AFB<sub>1</sub> se registraron en la cepa AP 55 a los 14 días de incubación y 0.95 de a<sub>w</sub> con valores de 333754.1 ng/g.



**Figura 48:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  a 25°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación. nd: valores por debajo del límite de detección (<2.2 ng/g).

Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 9).



**Figura 49:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz por cepas de *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de  $a_w$  a 25°C a los 7 (A), 14 (B) y 21 (C) días de incubación nd: valores por debajo del límite de detección (<2.2 ng/g). Tabla correspondiente: anexo tablas (tabla 9).

**Tabla 11:** Valores medios de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C) y días de incubación (D) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por AP 55 y AF 63 sobre granos de maíz a 25°C.

<b>Cepas:</b>	<b>AP 55</b>	<b>AF 63</b>
<b>Concentración (mM) (C)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0	109011.57 b	43201.28 b
30	22964.34 a	118405.67 c
300	0 a	0 a
<b>Días de incubación (D)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
7	6892.49 a	3007.52 a
14	73516.29 b	24041.08 b
21	51567.13 b	134558.35 c
<b>Actividad acuosa (<math>a_w</math>)</b>	Medias (ng/g)	Medias (ng/g)
0.93	42241.67 a	3270.41 a
0.95	52144.62 a	22578.46 b
0.98	37589.62 a	135758.08 c

Los valores con letras distintas son significativos según el Test de la mínima diferencia de Fisher (LSD) ( $p < 0,01$ ).

## VI. DISCUSIÓN

### VI.1. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* de suelos agrícolas expuestos a la aplicación de los plaguicidas clorpirifós y glifosato.

Los resultados obtenidos en este ensayo permitieron determinar que los recuentos de hongos filamentosos aislados de suelos agrícolas expuestos a diferentes plaguicidas variaron dependiendo de la localidad analizada, con recuentos entre 3,5 a 5,5 y entre 4,7 a 5,6  $\log_{10}$  UFC/g en las localidades de Sampacho y Serrano, respectivamente. Con respecto a los recuentos de *Aspergillus* sección *Flavi* se observó el mismo comportamiento, observándose una frecuencia de aislamiento del 100% en muestras de la localidad de Serrano y un porcentaje menor para la localidad de Sampacho. Por otro lado, al analizar la distribución de especies de la sección *Flavi*, se observó que *A. flavus* fue la especie más frecuentemente aislada. En estudios previos en suelos de maní de la provincia de Córdoba, *A. flavus* se informó como la especie dominante dentro de la sección *Flavi*, aislándose en 90% de las muestras (Barros y col., 2003). Carranza y col. (2014a), también informaron que *A. flavus* fue la especie aislada con mayor frecuencia en suelos provenientes del sur de la provincia de Córdoba con más de 10 años de exposición a plaguicidas, con porcentajes de aislamiento del 87,5% en suelos de maíz, 50% en suelos de soja y 67% en suelos con rotación soja-maíz. En otro trabajo realizado en campos de maní localizados en el centro-sur de la provincia de Córdoba, se informaron altos porcentajes de muestras de suelo (75 %) también contaminados con esta especie (Barros y col., 2006). Todos estos resultados previos concuerdan con los obtenidos en este estudio. Contrario a lo informado en suelos expuestos a plaguicidas, Carranza y col. (2015) no aislaron especies de *Aspergillus* de la sección *Flavi* en suelos sin labranza y sin exposición a plaguicidas.

La evaluación de la capacidad toxicogénica de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* mediante HPLC y TLC, mostraron un alto porcentaje de cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* productoras de AFs. Estos resultados coinciden con los informados por Carranza y col. (2014a), quienes aislaron a partir de suelos de soja, maíz y rotación soja-maíz de la provincia de Córdoba altos porcentajes de *Aspergillus* sección *Flavi* toxicogénicos. En este trabajo el 90% de las cepas identificadas como *A. flavus* y *A. parasiticus* produjeron AFB<sub>1</sub>. Estos resultados coinciden también con lo observado por otros autores ya que informaron un alto porcentaje de cepas de *A. parasiticus* y *A. flavus* toxicogénicas aisladas de suelos agrícolas (Nesci y Etcheverry, 2002; Barros y col., 2003; Vaamonde y col., 2003). Los porcentajes bajos de cepas no toxicogénicas de la sección *Flavi* aisladas en el presente

estudio, coinciden con lo informado previamente por algunos autores (Barros y col., 2003; De Oliveira Rocha, 2012).

## **VI.2. Evaluación del efecto de clorpirifós sobre el crecimiento y la producción de AFB<sub>1</sub> por especies toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura.**

En este estudio se evaluó el efecto de clorpirifós en los parámetros de crecimiento y producción de AFB<sub>1</sub> de cepas toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* en un medio de cultivo a base de maíz. Los resultados mostraron que las cepas toxicogénicas son capaces de crecer efectivamente en medio a base de maíz suplementado con clorpirifós bajo diferentes condiciones de actividad acuosa y temperatura. Se observó que en general, a medida que la actividad de agua y temperatura disminuyen, la velocidad de crecimiento disminuye y la fase de latencia aumenta en todos los tratamientos controles.

En los ensayos con clorpirifós se observó que en la fase de latencia, como se esperaba, los mayores tiempos fueron registrados en condiciones marginales, 18 °C y 0.93 de  $a_w$ , independientemente de la cepa en ensayo, mientras que, a la misma temperatura, y a 0.98 de  $a_w$  se registraron las mejores condiciones para la adaptación de las cepas al medio; condición en la cual se observaron las fases de latencia más cortas. La fase de latencia más corta registrada fue para la cepa NRRL 2999 a 0.98 de  $a_w$  y 18 °C con un valor menor a 1 hora en el tratamiento control. Los estudios realizados por Lahouar y col. (2016) mostraron que los menores valores de fase de latencia se encontraron a temperaturas altas (25°C y 37 °C) y  $a_w$  cercanas a las óptimas de crecimiento (0.97 y 0.99) para *A. flavus*. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que los menores valores no fueron registrados a altas temperaturas ensayadas sino a 18 °C. Otros estudios realizados por Somjai peng y Ta-urea (2016) coinciden parcialmente con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que estos autores estudiaron el efecto de la temperatura y  $a_w$  sobre la fase de latencia en cepas toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* aisladas de granos de arroz y demostraron que la fase de latencia más larga se observó a temperaturas marginales (20°C) y en todos los niveles de  $a_w$  ensayados (0.90, 0.95 y 0.98), mientras que la fase más corta se registró a 30°C y 0.95-0.98 de  $a_w$ .

Respecto a los tratamientos con el insecticida, clorpirifós sólo influyó en el crecimiento de las cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*, a 37 °C y en dosis de 0.6 y 1.4 mM, debido a que en estas condiciones la fase de latencia aumentó significativamente con respecto a los tratamientos controles ( $p < 0,01$ ). Mientras que con concentraciones entre 0.06 y 0.3 mM no se registraron efectos significativos. A 18 °C y 28 °C la fase de latencia se

mantuvo constante con respecto a los tratamientos controles en todas las condiciones ensayadas, excepto a 18 °C y 0,93 de  $a_w$  donde se registraron valores significativamente más altos. Este último comportamiento indica que la fase de latencia es influenciada en mayor medida por las condiciones ambientales adversas a la que se encuentran las cepas y no por las concentraciones de clorpirifós ensayadas en el medio en concentraciones entre 0.06 y 0.3 mM ( $p < 0,01$ ). Los resultados obtenidos en estudios previos por Carranza y col. (2014b) mostraron que la fase de latencia disminuía significativamente en concentraciones de 0.06 mM de clorpirifós con respecto al control en cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* a 25°C. nuestro estudio no concuerda con estos resultados debido a que a esta temperatura no se observaron diferencias significativas en ninguna concentración ensayada. No existen datos sobre la influencia de clorpirifós sobre cepas de *Aspergillus* sección *Flavi*. Otros autores (Medina y col., 2007) estudiaron el efecto del fungicida carbendazima ( $2.6 \times 10^{-4}$ , 0.0013, 0.0018 y 0.0023 mM) sobre la fase de latencia de cepas de *Aspergillus carbonarius* y observaron que el nivel más alto de este fungicida (0.0023 mM) produjo un aumento significativo de este parámetro comparado con el tratamiento control y con las dosis más bajas, donde en estas últimas se registraron valores de 1-3 días, mientras que a 0.0023 mM 1-7 días. Los comportamientos observados por estos autores coinciden con los registrados en este trabajo. Por otro lado, cuando se estudió velocidad de crecimiento se observó que todas las cepas analizadas presentaron valores máximos a 37°C con niveles de  $a_w$  de 0.98 y 0.95. A la temperatura más baja ensayada los valores obtenidos fueron significativamente menores que los obtenidos a temperaturas de 28 °C y 37 °C, donde bajo condiciones marginales (18°C y 0.93 de  $a_w$ ) se observó una disminución del crecimiento fúngico. Además, la incubación a 28 °C favoreció el crecimiento fúngico. Resultados similares fueron obtenidos por Medina y col. (2007) en ensayos con *Aspergillus carbonarius* y más reciente por Mateo y col. (2017) en cepas de *Aspergillus flavus*. Medina y col. (2007) estudiaron el crecimiento de cepas en presencia de diferentes plaguicidas (carbendazima) a diferentes temperaturas: 20°C - 25°C - 28 °C y niveles de  $a_w$ : 0.94-0.96-0.98 y observaron que los niveles más altos de velocidad de crecimiento se registraron a las más altas temperaturas ensayadas y a niveles de 0.96 y 0.98 de  $a_w$ . Mateo y col. (2017) realizaron estudios similares sobre plaguicidas derivados de azoles a temperaturas de 25°C y 37 °C y  $a_w$  0.94, 0.96 y 0.98 respectivamente y; demostraron que el crecimiento de las cepas en estudio fue siempre mayor a 37 °C en comparación con 25°C en todas las  $a_w$  ensayadas. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparados con otros trabajos en los que se estudió el efecto de fungicidas debido a que hasta el momento no existe bibliografía en la que se estudie el efecto del insecticida clorpirifós u otros insecticidas. Pose y col. (2009) realizaron estudios similares de crecimiento, pero sin la presencia de plaguicidas, con cepas de *Alternaria alternata* en un medio sintético a base de tomate y mostraron que la máxima

velocidad de crecimiento obtenida fue a 21°C con niveles de 0.98 de  $a_w$ , mientras que la menor velocidad registrada para estas cepas fue a 15°C. En los tratamientos controles de este trabajo se observaron resultados similares, probablemente esto sugiere que el crecimiento esté afectado por las condiciones sub-óptimas bajo las cuales el hongo se desarrolla más que al efecto del plaguicida en estudio.

Con respecto a las diferentes concentraciones de clorpirifós en general se pudo determinar que en condiciones de 18 °C y 28 °C no influyeron sobre el crecimiento de las cepas, mientras que a 37 °C en presencia de concentraciones de 0.06, 0.14 y 0.3 mM la velocidad de crecimiento se mantuvo constante con respecto a los tratamientos controles en las cuatro cepas ensayadas. Mientras que con 0.6 y 1.4 mM la misma disminuyó significativamente. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Carranza y col. (2014b) quienes observaron que a 25°C, a medida que la concentración de clorpirifós aumentaba (0.014, 0.03 y 0.06 mM), el crecimiento de cepas no toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Nigri* disminuía en medio MEA. Mateo y col. (2017) observaron en cepas de *Aspergillus flavus* en concentraciones más bajas de plaguicidas que las ensayadas en este estudio, para procloraz ( $2.6 \times 10^{-5}$ ,  $2.6 \times 10^{-4}$  y 0.005mM) y tebuconazole (0.0016, 0.016y 0.03 mM), la velocidad de crecimiento disminuía a medida que la concentración aumentaba en todas las condiciones ensayadas (0.99 y 0.95 de  $a_w$  a 25°C y 37 °C); registrándose sólo diferencias significativas a partir de 0.005 y 0.03 mM, respectivamente. Nuestros resultados concuerdan parcialmente con éstos, debido a que solo se observó este comportamiento a 37 °C, pero a partir de concentraciones de 0.6 mM. Esto puede atribuirse a la diferencia de tolerancia a los plaguicidas usados en cada uno de los ensayos sobre *Aspergillus* sección *Flavi*. Cabe destacar que solo en la cepa de *A. parasiticus* NRRL 2999 la máxima concentración de clorpirifós usada (1.4 mM) fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento de la misma bajo condiciones óptimas de temperatura y  $a_w$ ; esto nos indica la resistencia de estas cepas a plaguicidas.

Al analizar el efecto de clorpirifós sobre la producción de AFs bajo diferentes condiciones ambientales, en general se observó que las cuatro cepas en estudio se comportaron de la misma manera frente al factor de  $a_w$  ya que, a medida que los niveles de  $a_w$  aumentaron, la concentración de toxinas aumentó. Con respecto al crecimiento de las cuatro cepas frente a las diferentes temperaturas el comportamiento fue diferente, ya que para las cepas de *A. parasiticus* (NRRL 299 y AP 55) los niveles de AFB<sub>1</sub> producidos se mantuvieron constante, mientras que para las cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) a 18 °C la misma aumentó significativamente ( $p < 0,01$ ). También se observó que en sólo 7 días de incubación las cepas fueron capaces de producir altas concentraciones de AFB<sub>1</sub>. Para la cepa de *A. parasiticus* de referencia y AP 55 a los 14 días se registraron los mayores niveles de toxinas y a los 21 días la misma disminuyó. Mientras que para AF 56 y AF 63 las

concentraciones registradas se mantuvieron constantes a los 7, 14 y 21 días de incubación. Las cuatro cepas tuvieron un comportamiento similar, es decir que a medida que la concentración de clorpirifós aumentó también lo hizo la cantidad de toxina producida. Probablemente la presencia de clorpirifós genera un estrés en las cepas y estimule la producción de AFB<sub>1</sub> bajo condiciones marginales ensayadas (0.93 a<sub>w</sub>, 18 °C y 0.6 mM). Es importante destacar que el plaguicida clorpirifós no produjo efectos inhibitorios sobre este parámetro. Gallo y col. (2016) al estudiar el efecto de la temperatura y a<sub>w</sub> sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* observaron que las condiciones favorables para la acumulación de las mismas fue 28 °C y 0.96 de a<sub>w</sub>, mientras que a 20°C y 37 °C se registró un descenso en la producción. Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con los de estos autores. Por otro lado, Mateo y col. (2017) demostraron el efecto de fungicidas del tipo de los azoles sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por *A. flavus* en medio de cultivo YES y observaron que en las condiciones controles (sin el agregado del plaguicida) se produjo toxinas mientras que a altas concentraciones (0.005 mM de procloraz, y 0.03 mM de tebuconazole) no se detectó AFB<sub>1</sub> sin diferencias significativas entre los diferentes niveles de a<sub>w</sub> ensayados (0.99 y 0.95). La concentración de toxinas fue siempre mayor a 25°C que a 37 °C y decreció con el incremento de las dosis de los fungicidas ensayados. Los resultados obtenidos por estos autores coinciden parcialmente con los obtenidos en este estudio, ya que, si bien las mayores concentraciones de AFB<sub>1</sub> se registraron a la menor temperatura ensayada, el efecto del plaguicida en estudio no produjo efectos inhibitorios en ninguna concentración ensayada a pesar de ser mayores a las que se utilizaron en otros estudios (Mateo y col. 2017).

Estudios similares fueron realizados por Medina y col. (2007) donde probaron la eficacia de carbendazima sobre la producción de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus carbonarius* a diferentes temperaturas (20°C, 25°C y 28 °C) y a<sub>w</sub> (0.98, 0.96 y 0.94) y observaron que los mayores niveles de toxinas se produjeron a 20°C y 0.98 de a<sub>w</sub> y decrecieron a medida que este parámetro también lo hizo. La concentración de este fungicida influyó positivamente en la acumulación de OTA, observando que a altas dosis de carbendazima se registraron los mayores valores de OTA acumulados. Los resultados en este estudio coinciden con los de este autor debido a que clorpirifós a concentraciones elevadas no produjo inhibición de la misma.

### **VI.3. Evaluación del efecto de glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB<sub>1</sub> por especies toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura.**

Cuando se analizó el efecto producido por el herbicida glifosato sobre la velocidad de crecimiento, fase de latencia y producción de toxina, se vio que este plaguicida influenciaba en mayor medida los parámetros de crecimiento de las cepas y la producción de AFB<sub>1</sub> que éstas producían en comparación con clorpirifós.

El comportamiento de la fase de latencia fue similar para todas las cepas donde en concentraciones comunmente usadas en el campo (30 mM), la misma no registró diferencias significativas con los tratamientos controles mientras que a 300 mM se apreció un aumento significativo. Estos resultados no coinciden con los observados por Barberis y col. (2013), ya que cuando estudiaron el efecto de glifosato sobre cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* utilizando concentraciones menores (0.5, 1, 1.5, 2, 5 y 10 mM) observaron que en las concentraciones más altas ensayadas, la fase de latencia disminuía con respecto al control. En este estudio los menores valores de fase de latencia registrados fueron a 28 °C y 0.98 de a<sub>w</sub> para las cepas de *A. parasiticus*; y 37 °C a 0.95 de a<sub>w</sub> para ambas cepas de *A. flavus*, mientras que los mayores valores se registraron a niveles de 0.93 a<sub>w</sub> y 300 mM en las tres temperaturas ensayadas para todas las cepas. Estudios similares fueron realizados por Krzysko-Lupicka y col. (2008), quienes estudiaron el efecto de glifosato en concentraciones entre 0.5 a 2 mM sobre cepas de *Fusarium* como fuente de fósforo y demostraron que estas cepas resultaron resistentes a las concentraciones del herbicida ensayadas. En concentraciones entre 1 y 1.5 mM se registró un incremento significativo de la biomasa de las cepas, mientras que a 2 mM se observó un efecto inhibitorio. Los resultados de este trabajo coinciden con los resultados de estos autores, debido a que en las concentraciones más bajas ensayadas se registró la presencia de biomasa fúngica, mientras que a las concentraciones más altas se apreció una inhibición completa de la misma.

En los ensayos de velocidad de crecimiento se observó que en general, los mayores valores de este parámetro se registraron a 28 °C en todas las a<sub>w</sub> ensayadas. En la menor temperatura ensayada, el crecimiento fúngico se vio muy afectado. Resultados similares fueron obtenidos por Astoreca y col. (2007), estos autores demostraron el efecto de diferentes temperaturas (15, 25 y 30°C) y a<sub>w</sub> (0.85, 0.89, 0.91, 0.94, 0.95, 0.97) sobre el crecimiento de cepas de *A. niger*, *A. awamori* y *A. carbonarius* y observaron que a la mayor temperatura ensayada y a 0.97 de a<sub>w</sub> la mayoría de las cepas en estudio registraron la máxima velocidad de crecimiento, mientras que a 15°C se observó la menor en todas las a<sub>w</sub> ensayadas. Por otro lado, Gallo y col. (2016) demostraron el efecto de tres temperaturas

(20, 28 y 30°C) y cinco niveles de  $a_w$  (0.90, 0.93, 0.96 y 0.99) sobre el crecimiento de cepas de *A. flavus* y observaron que la máxima acumulación de biomasa fúngica fue obtenida a 28 °C y 0.96 de  $a_w$  mientras que a 20°C y a los niveles más bajos de  $a_w$  (0.90 y 0.93) no registraron crecimiento. Los resultados obtenidos en este estudio en los controles fueron similares a los de estos autores.

Al estudiar el efecto de diferentes dosis de glifosato sobre el crecimiento se observó que a 18 °C el herbicida no tuvo efecto sobre el mismo, es decir no se registraron diferencias significativas respecto al tratamiento control ( $p > 0,01$ ). A 28 °C se observó que a medida que la concentración de glifosato aumentaba, la velocidad de crecimiento disminuía solo en el nivel de 0.98 de  $a_w$ ; en las dos  $a_w$  más bajas ésta se mantuvo constante con respecto al control. A 37 °C en general se observó que a medida que la concentración de glifosato aumentaba, la velocidad de crecimiento disminuía en todas las  $a_w$  ensayadas. En nuestro estudio se observó una inhibición significativa del crecimiento de las cepas a 300 mM, y en algunos casos en condiciones de 18 y 37 °C y 0.93 de  $a_w$  una inhibición completa. Este comportamiento no concuerda con lo observado por Barberis y col. (2013), quienes informaron un comportamiento paralelo entre el aumento de las concentraciones de glifosato ensayadas (0.5, 1, 1.5, 2, 5 y 10 mM) y la velocidad de crecimiento en cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* a 25°C. Reddy y col. (2007) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de glifosato (5 y 10 mM) sobre el crecimiento de cepas de *A. flavus* aislados de suelos destinados al cultivo de maíz y algodón. El ensayo se llevó a cabo en dos medios de cultivos (agar papa dextrosa-PDA) y agar agua. En el medio enriquecido, estos autores observaron una inhibición parcial y temporal en las concentraciones de glifosato más altas ensayadas (10 mM) mientras que en el medio con escasos nutrientes tanto con 5 mM como con 10 mM se pudo apreciar una inhibición parcial del crecimiento de las cepas. Este comportamiento coincide con los observados por este estudio, debido a que a medida que la concentración del plaguicida iba en aumento, la misma disminuía, a pesar de que a 30 mM la velocidad de crecimiento no fue inhibida totalmente. Cuando se estudió el efecto de glifosato sobre otros géneros fúngicos, tales como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, Larson y col. (2006) observaron que el comportamiento de la velocidad de crecimiento en concentraciones menores a 0.25 mM era similar que en los tratamientos controles, mientras que con 2,5 mM ya se podía apreciar una inhibición significativa.

Cuando se evaluaron los efectos producidos por glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> se observó que en general a altas concentraciones de este herbicida la producción de AFB<sub>1</sub> se inhibió por completo en todas las cepas analizadas; sólo en algunos casos se pudo registrar producción de toxina, pero con valores relativamente bajos. Las condiciones a las cuales la producción de la toxina se ve significativamente estimulada fue a 28 °C en los tratamientos controles, es decir sin el agregado del plaguicida en las tres actividades acuosas ensayadas

y en las cuatro cepas. Excepto para la cepa AF 63 donde las mayores concentraciones de AFB<sub>1</sub> se registraron con 30 y 300 mM. En estas condiciones se observó que ya desde los 7 días de incubación se producía AFB<sub>1</sub>. Barberis y col. (2013) al evaluar la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *Aspergillus* sección *Flavi* en presencia de glifosato encontraron que existió una estimulación en la producción de toxina en concentraciones entre 1.5 y 5 mM a 0.95 de a<sub>w</sub>. Los resultados de este estudio no concuerdan con los de estos autores debido a que se registró una estimulación de toxina sólo en los tratamientos controles y en todos los niveles de actividad acuosa ensayadas. Otro estudio similar fue realizado por Reddy y col (2007), quienes estudiaron la incidencia de aflatoxinas en maíz y algodón; y la resistencia al plaguicida de las cepas de *A. flavus* aisladas. Estos autores observaron que a medida que la concentración del herbicida aumentaba (5 y 10 mM) la producción de toxinas disminuía. Este comportamiento informado concuerda con los observados en este estudio.

#### **VI.4. Evaluación sobre sustrato natural del efecto de clorpirifós y glifosato sobre el crecimiento y la producción de AFB<sub>1</sub> por especies toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi* bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua y temperatura.**

Se realizaron los mismos ensayos ecofisiológicos para evaluar el comportamiento de los parámetros de crecimiento y producción de AFB<sub>1</sub> en presencia de ambos plaguicidas sobre granos de maíz a diferentes niveles de a<sub>w</sub> y a 25°C, con el fin de simular las condiciones ambientales y de campo. Para realizar este ensayo se eligieron aquellas cepas que presentaron los mejores parámetros de crecimiento en el medio AHM: AP 55 (*A. parasiticus*) y AF 63 (*A. flavus*).

El comportamiento sobre la fase de latencia en presencia de este insecticida fue diferente en ambas cepas en estudio. Para la cepa AP 55 a medida que la concentración del plaguicida aumentó, la fase de latencia también se incrementó con respecto al control a las dos a<sub>w</sub> menores, registrándose los valores más altos a 0.93. En cuanto a la cepa AF 63 se observó que a medida que aumentaba la concentración de clorpirifós, la fase de latencia se mantenía constante con respecto al control. Cuando se evaluó el comportamiento de la velocidad de crecimiento de ambas cepas bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> (0.93, 0.95 y 0.98) en los tratamientos controles, a diferencia de los ensayos realizados en medio de cultivo se observó que estos factores no tuvieron efecto sobre este parámetro en estudio. En ambas cepas la velocidad de crecimiento se mantenía relativamente constante en las tres a<sub>w</sub> ensayadas. Con respecto a los tratamientos con clorpirifós, independientemente de la cepa analizada se observó que la velocidad de crecimiento bajo las diferentes dosis del

plaguicida (0.06, 0.14, 0.6 y 1.4 mM) no mostró diferencias significativas con respecto al control, excepto en la cepa AP 55 a la concentración de 0.14 mM donde la velocidad disminuyó. La respuesta diferente de las cepas ensayadas en el medio de cultivo y en el sustrato natural podría atribuirse a las diferencias nutricionales entre ambos, como así también a la posible distribución no homogénea de los plaguicidas sobre la superficie de los granos. No hay estudios donde se evalúe el efecto de plaguicidas sobre el crecimiento fúngico en granos de cereales. Un estudio similar, sobre granos de maíz, fue realizado por Mateo y col. (2017) quienes estudiaron el efecto de fungicidas azoles en el control del crecimiento de *A. flavus* y observaron que en los tratamientos controles la máxima velocidad de crecimiento fue registrada a 37 °C y a 0.99 de  $a_w$ , mientras que a 25°C la misma disminuyó. En los tratamientos con los fungicidas la velocidad de crecimiento fue menor que en los controles, donde sólo se registró crecimiento fúngico en las dosis más bajas del fungicida ( $2.6 \times 10^{-5}$  mM de procloraz y  $1.6 \times 10^{-3}$  mM de tebuconazole). A 37 °C y a 0.95 de  $a_w$  la velocidad de crecimiento fue totalmente inhibida. Estos autores observaron que en general, los valores registrados de velocidad de crecimiento sobre granos de maíz son menores que los obtenidos en medio de cultivo bajo las mismas condiciones. En este estudio se ensayaron diferentes concentraciones de clorpirifós sobre el crecimiento sobre el crecimiento de las cepas de *Aspergillus* a 25°C, donde las concentraciones no tuvieron efecto significativo, por lo que estos resultados no coinciden con los autores mencionados anteriormente. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron comparados con otros trabajos en los que se estudió el efecto de fungicidas debido a que hasta el momento no existe bibliografía en la que se estudie el efecto del insecticida clorpirifós u otros insecticidas.

Al estudiar el efecto producido por clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> se observó que en general este plaguicida estimuló la producción de toxinas en las cepas, ya sea en concentraciones normalmente utilizadas a campo (0.14 mM), como a concentraciones 100 veces mayores (1.4 mM), y se observó que en presencia del insecticida con tan sólo 7 días de incubación las cepas producen toxina. El efecto sobre las diferentes cepas en estudio fue diferente, ya que para la cepa AP 55 se observó que a medida que la concentración del plaguicida iba en aumento, la producción de AFB<sub>1</sub> se estimuló; mientras que para la cepa AF 63 se mantuvo constante con respecto a los tratamientos controles. Las concentraciones de toxinas producidas en este ensayo fueron mayores a las obtenidas en los medios a base de maíz. En un estudio previo, Mateo y col. (2017) observaron que no pudo determinarse producción de AFB<sub>1</sub> a 37 °C y  $a_w$  de 0.95 ni en los tratamientos con altas dosis de los fungicidas prochloraz ( $5 \times 10^{-3}$  mM) y tebuconazole (0.03 mM). Sin embargo, estos autores informaron que en los tratamientos controles, la acumulación de toxinas fue mayor sobre granos que en los medios de cultivos. Estos resultados coinciden parcialmente con los

obtenidos en este trabajo ya que, si bien la concentración de toxinas producidas en los granos de maíz fue mayor que en las obtenidas en los medios de cultivo, la misma siempre se mantuvo constante en todas las condiciones ensayadas.

Con respecto a los ensayos con glifosato sobre granos de maíz, se observó que en general ambas cepas presentaron el mismo comportamiento, observándose que en los tratamientos controles a medida que la actividad acuosa aumentó la velocidad de crecimiento también aumentó. En los tratamientos con glifosato a medida que la concentración del plaguicida fue en aumento, la velocidad de crecimiento decrecía en las tres  $a_w$  ensayadas. Al analizarse el parámetro de fase de latencia lo que se observó fue que en general, independientemente de las cepas en estudio, en los tratamientos controles la misma disminuyó a medida que las diferentes condiciones de actividad acuosa aumentaron. Con respecto a los tratamientos con glifosato se observó que a medida que la misma aumentó, la fase de latencia también se incrementó, observándose diferencias significativas a los 300 y 500 mM con respecto al control, en las tres  $a_w$  estudiadas. Estudios similares fueron realizados por Reddy y col. (2009) quienes estudiaron la eficacia de diferentes fungicidas sobre la contaminación por *Aspergillus* spp. en granos de arroz. Uno de ellos fue carbadazima testeado en diferentes concentraciones (5, 10, 15 y 20 mM) y observaron que con tan sólo 5 mM el crecimiento fúngico se inhibió. Estos autores demostraron la eficacia de este fungicida como medida de control del crecimiento de *Aspergillus* spp. Otro de los fungicidas en ensayo fue triziclazole (5, 10, 15, 20 mM) que, de manera contraria al fungicida anterior, éste fue capaz de inhibir el crecimiento fúngico a concentraciones de 20 mM. Los resultados de estos autores coinciden con los de este trabajo.

Por otro lado, la producción de AFB<sub>1</sub> se fue inhibiendo a medida que las concentraciones de glifosato aumentaron. A las mayores concentraciones del plaguicida (300 mM) ninguna de las cepas en estudio produjo AFB<sub>1</sub> bajo las condiciones ensayadas. En las condiciones de 30 mM y 0.93 de  $a_w$  la producción de toxina también fue inhibida. No existen datos sobre el efecto de plaguicidas en la producción de micotoxinas sobre granos. Reddy y col. (2009) evaluaron la influencia de carbadazima y trizicazole sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por *A. flavus*, observaron que este parámetro disminuía conforme aumentaban las concentraciones de ambos fungicidas. La inhibición total de la producción de toxina se registró a la concentración más baja estudiada (5 mM) para carbadazima, mientras que para trizicazole la inhibición fue a 20 mM.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio se puede observar claramente que ambos plaguicidas provocan efectos totalmente diferentes sobre cepas toxicogénicas de *Aspergillus* sección *Flavi*. Por un lado, se observó que en general el insecticida clorpirifós, no provoca efectos inhibitorios sobre el crecimiento y la producción de

AFB<sub>1</sub>, ya sea en concentraciones que usualmente son usadas a campo (0.06 y 0.14 mM) como 100 veces mayores a éstas. En algunos casos este insecticida fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento de las cepas en condiciones marginales de  $a_w$  (0.93 y 0.95) con altas concentraciones de clorpirifós y sólo a 37 °C. Estos resultados sugieren que la determinación de las dosis óptimas de los insecticidas aplicados sobre un sustrato natural es de gran importancia. Altos niveles de los mismos no aseguran la inhibición en el crecimiento y la producción de toxina, e implican la posibilidad de producir efectos indeseables en las características organolépticas del grano y un riesgo por la presencia de residuos de estos compuestos en los granos. Por otro lado, se ha estudiado que dosis muy bajas de éstos y una inadecuada distribución causarían un incremento en la esporulación, velocidad de crecimiento y producción de metabolitos secundarios. Al analizarse los resultados obtenidos en los ensayos con glifosato se observó que este plaguicida afecta negativamente el crecimiento y producción de toxinas del hongo en estudio en todas las condiciones, tanto en los ensayos *in vitro* como *in situ*, a medida que las concentraciones utilizadas iban en aumento tanto el crecimiento fúngico y la producción de toxinas disminuían.

Finalmente, estos resultados indican que la presencia del herbicida glifosato y del insecticida clorpirifós afectan el desarrollo y la producción de aflatoxinas por cepas de *A. flavus*, constituyendo un factor más de riesgo si estas especies están expuestas a estos compuestos organofosforados en los sistemas productivos.

Estos tipos de ensayos ecofisiológicos son muy importantes debido a que permiten conocer a que condiciones el hongo es capaz de desarrollarse y producir sus micotoxinas y a que condiciones no. Una vez conocidas las condiciones a las cuales el hongo se desarrolla y produce sus micotoxinas sobre el grano de maíz, junto con la implementación de buenas prácticas agrícolas y de almacenamiento es posible crear estrategias futuras para evitar el desarrollo de este hongo y su posterior producción de AFB<sub>1</sub> en el campo y de esta manera evitar pérdidas en las características organolépticas del grano, en los rendimientos económicos y riesgos en la salud del hombre y animales.

## VII. CONCLUSIONES

En base a la evaluación y discusión de los resultados, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- La población de hongos filamentosos aislados de suelos agrícolas expuestos a diferentes plaguicidas varían dependiendo de localidad analizada.
- La frecuencia de aislamiento de *Aspergillus* sección *Flavi* a partir de los suelos en estudio fue elevada en ambas localidades.
- La especie aislada en mayor frecuencia fue *Aspergillus flavus*, seguida por *A. parasiticus*, *A. oryzae* y por último las cepas identificadas como sección *Flavi*. Todas las cepas de *A. flavus*, *A. parasiticus* y cepas pertenecientes a la sección *Flavi* (no identificadas como especie) produjeron AFB<sub>1</sub>.
- El insecticida clorpirifós posee una influencia parcial sobre los parámetros de crecimiento (velocidad y fase de latencia) y producción de AFB<sub>1</sub> de las cepas analizadas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio de cultivo.
- Sobre granos de maíz clorpirifós a concentraciones usadas en campo (0.06 y 0.14) como 100 veces mayores a estas, estimuló tanto el crecimiento como la producción de AFB<sub>1</sub> de las cepas de *A. parasiticus* y *A. flavus* en estudio bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> (0.93, 0.95 y 0.98) y a 25°C.
- El herbicida glifosato a altas concentraciones (300 y 500 mM) afecta negativamente el crecimiento y producción de AFB<sub>1</sub> de estas cepas tanto en ensayos *in vitro* como *in situ*.
- Los valores de velocidad de crecimiento y producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz fueron siempre mayores a los obtenidos en el medio a base de sustrato (agar harina de maíz).

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Abarca M. L. (2000a). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev. Iberoam. Micol. 17: S79-S84.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2011). Toxic Substances Portal. Chlorpyrifos. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=88>. Acceso: Marzo, 2017.
- Alaniz Zanon M.S., Chiotta M.L., Gaj-Merlera G., Barros G., Chulze S. (2013). Evaluation of potential biocontrol agent for aflatoxin in Argentinean peanuts. Int. J. Food Microbiol., 162: 220-223
- Alaniz Zanon, M.S., Barros, G.G, y Chulze, S. N. (2016). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* as potential biocontrol agents to reduce aflatoxin contamination in peanuts harvested in Northern Argentina. Int J of Food Microbiol., 231: 63-68.
- Antunes S., Pereira J., Cachada A., Duarte A., Gonçalves F., Sousa J., Pereira R. (2010). Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: Suitability of elutriate testing. J. Haz. Mat., 184: 215-225.
- Arrúa Alvarenga, A. A., Mendes, J. M., & Ríos, D. F. (2013). Aflatoxins, a Real Risk. Reportes Científicos de la FACEN, 4(1): 68-81.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995), Official Methods of Analysis 16<sup>th</sup> Ed. AOAC International, Arlington, VA, Vol. 1.
- Astoreca A., Magnoli C., Barberis C., Combina M., Chiacchiera S.M., Dalcerro (2007). A. Ochratoxin A production in relation to ecophysiological factors by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from different substrates in Argentina. Sci. Total Environ. 388: 16-23.
- Astoreca, A., Magnoli, C., Ramirez, M. L., Combina, M., Dalcerro, A. (2007). Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. Int. J. of Food Microbiol., 119(3), 314-318.
- Aubert A.C., Lampurlanés X.S., Alonso Espadalé R.M. (2010). Micotoxinas en ambientes laborales. Fuente: Centro Nacional de Condiciones de Trabajo. Barcelona.
- Aysal P., Tiryaki O., Tunçbilek A.S. (2004). 14C dimethoate residues in tomatoes and tomato products. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73: 352-357.

- Barberis C., Astoreca A., Asili R., Fernandez-Juri G., Chulze S., Magnoli C., Dalcero A. (2009). *In vitro* control of growth and ochratoxin A production by butylated hydroxyanisole in *Aspergillus* section *Nigri* species. *Food Cont.* 20: 709-715.
- Barberis C.L., Carranza C.S., Chiacchiera S.M., Magnoli, C. E. (2013). Influence of herbicide glyphosate on growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production by *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from soil on in vitro assay. *J. Environ. Sci. Health B.* 48: 1070-1079.
- Barros G., Chiotta M.L., Torres A., Chulze S. (2006). Genetic diversity in *Aspergillus parasiticus* population from the peanut agroecosystem in Argentina. *Letts. Appl. Microbiol.* 42: 560-566.
- Barros G., Torres A., Chulze S. (2005). *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxicogenic profile. *J. Sci. Food Agric.* 85: 2349-2353.
- Barros G., Torres A., Palacio G., Chulze S. (2003). *Aspergillus* species from section *Flavi* isolated from soil at planting and harvest time in peanut-growing regions of Argentina. *J. Sci. Food Agric.* 83: 1303–1307.
- Bolsa de Cereales de Rosario (2015). Disponible en: <http://www.bcr.com.ar/Pages/Publicaciones/anuario.aspx>. Acceso: Noviembre, 2017.
- Bräse S.y col. (2013) Aflatoxins. In: *The Chemistry of Mycotoxins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol 97. Springer, Vienna.
- Brunstein L., Digón A., Licastro S., Moreno I. (2009). Generalidades sobre plaguicidas y control de plagas. *Plaguicidas. Información y estrategias para la gestión ecológicamente racional de plaguicidas de uso sanitario.* Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires, Argentina.
- Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). (2005). *Evolución del mercado fitosanitario argentino.* Bs. As. Argentina. Disponible en: <http://www.casafe.org.ar/m2005.htm> . Fecha de acceso: Marzo, 2017
- Cámara Argentina del Maní (2015). Disponible en: <http://www.camaradelmani.org.ar/espanol>. Acceso: Marzo, 2017
- Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). (2012). *Clasificación toxicológica y etiquetado de productos fitosanitarios. Criterios regulatorios locales e internacionales.* Disponible en: <http://www.casafe.org/pdf/2015/DOCUMENTOS/Clasificacion-toxicologica-etiquetado.pdf>. Fecha de Acceso: Marzo, 2017.

- Camiletti B.X., Torrico A.K., Maurino M.F., Cristos D., Magnoli C., Lucini E.I., Pecci, M.D.L.P.G. (2017). Fungal screening and aflatoxin production by *Aspergillus* section *Flavi* isolated from pre-harvest maize ears grown in two Argentine regions. *Crop Prot.* 92: 41-48.
- Carranza C.S., Aluffi M.E., Barberis C.L. Magnoli C.E. (2015). Microbiota cultivable de suelos agrícolas con y sin exposición prolongada a plaguicidas. Presentado al III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental CAMAYA, 25 al 27 de noviembre de 2015. Bs. As
- Carranza C.S., Bergesio M.V., Barberis C.L., Chiacchiera S.M. y Magnoli C.E. (2014a). Survey of *Aspergillus* section *Flavi* presence in agricultural soils and effect of glyphosate on nontoxicogenic *A. flavus* growth on soil-based medium. *J. of Appl. Microbiol.*, 116: 1229-1240.
- Carranza, C.S., Barberis, C.L., Chiacchiera, S.M., y Magnoli, C.E. (2014b). Influence of the pesticides glyphosate, chlorpyrifos and atrazine on growth parameters of nonochratoxigenic *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from agricultural soils. *J. Environ. Sci. Health B*, 49: 747-755.
- Chandra, S., Mahindrakar, A.N., Shinde, L.P. (2010). Determination of cypermethrin and chlorpyrifos in vegetables by GC-ECD. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2, 908-911.
- Chang P., Lai C. (2005). A hybrid system combining self-organizing maps with case-based reasoning in wholesaler's new-release book forecasting, *Exp. Syst. Appl.* 29:183-192.
- Chulze, S., Bertinetti, C., Dalcero, A., Etcheverry, M., Farnochi, C., Torres, A. y Varsavsky, E. (1989). Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentina. *Mycotox. Res.*, 5(1), 9-12.
- Cisar J.L., Snyder G.H. (2000). Mobility and persistence of turf grass pesticides in a U.S. Golf Association green: pesticides in percolate, thatch, soil, and clippings, and approaches to reduced fenamiphos and fenamiphos metabolite leaching. En: Clark, J.M., Kenna, M.P. (Eds.), *Fate and management of turf grass chemicals*. American Chemical Society Symposium Series 743. Oxford University Press, New York, pp. 106-126.
- Cleveland T.E., Dowd P.F., Desjardins A.E., Bhatnagar D., Cotty P.J. (2003). United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service research on preharvest prevention of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in US crops. *Pest Manag. Sci.* 59: 629-642.

- Dallyn H. y Fox A. (1980). Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. En: Gould G.H. y Carry J.E.L. (Eds.). Society of Applied Bacteriology Technical Series, 5:129-139. London Academic Press.
- De Oliveira Rocha L., Reis G. M., Braghini R., Kobashigawa E., de Araújo J., Correa B. (2012). Characterization of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *Europ. J. Plant Pathol.* 132: 353-366.
- Domagalski J.L., Munday C. (2003). Evaluation of diazinon and chlorpyrifos concentrations and loads, and other pesticide concentrations, at selected sites in the San Joaquin Valley, California, April to August, 2001. United States Geologic Survey. Disponible en: <https://pubs.er.usgs.gov/publication/wri034088>. Acceso: Marzo, 2017
- Donner A., Rotondi M.A. (2010) Sample size requirements for interval estimation of the kappa statistic for interobserver agreement studies with a binary outcome and multiple raters. *Int. J. Biost.* 6: 31.
- Draughton F.A. y Ayres J.C. (1982). Inhibition of aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *J. Food Prot.* 44: 211- 212.
- EPA (United States Environmental Protection Agency). Glyphosate registration review human health assessment scoping document. <http://www.regulations.gov/search/Regs/home.html#documentDetailR=09000064809d3a62>. Acceso: Marzo, 2017
- Etcheverry M., Nesci A., Barros G., Torres A., Chulze S. (1999). Ocurrance of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin B<sub>1</sub> in corn genotypes and corn meal in Argentina. *Mycopathologia* 147:37-40.
- Ferreres O.J. (2017). La cosecha de granos más grande de 1810. Disponible en: <http://www.lanacion.com.ar>. Acceso: Marzo, 2017
- Furlong C.E., Holland N., Richter R.J., Bradman A., Ho A., Eskenazi B. (2006). PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmacog. Genomic.* 16: 183-190.
- Futuros y Opciones (FyO). (2012). El maíz en la Argentina y el mundo. Disponible en: <http://portal.fyo.com/especiales/maiz>. Fecha de acceso: Marzo, 2017.
- Gallo A., Solfrizzo M., Epifani F., Panzarini G. y Perrone G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *Int. J. Food Microbiol.* 217: 162-169.
- Geisen, R. (1996). Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. *Syst. Appl. Microbiol.* 19: 388-392.

- Getzin L. W. (1981). Degradation of chlorpyrifos in soil: influence of autoclaving, soil moisture, and temperature. *J. Econ. Entomol* 74: 158–162.
- Giordano G., Afsharinejad Z., Guizzetti M., Vitalone A., Kavanagh T.G., Costa L.G. (2007). Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 219: 181-189.
- Jergentz S., Mugni H., Bonetto C., Schulz, R. (2005). Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere* 61: 817-826.
- Jergentz S., Pessacq P., Mugni H., Bonetto C., Schulz, R. (2004). Linking *in situ* bioassays and population dynamics of macroinvertebrates to assess agricultural contamination in streams of the Argentine pampa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59: 133-141.
- Klich M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, The Netherlands.
- Krzysko-Lupika T., Sudol T. (2008). Interactions between glyphosate and autochthonous soil fungi surviving in aqueous solution of glyphosate. *Chemosphere* 71: 1386-1391.
- Kulshrestha G., Kumari A. (2011). Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. *Biol. Fertil. Soils* 47: 219-225.
- Lahouar A., Marin S., Crespo-Sempere A., Saïd S., Sanchis V. (2016). Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Rev. Argent. de Microbiol.* 48: 78-85.
- Larson, R. L., Hill, A. L., Fenwick, A., Kniss, A. R., Hanson, L. E., Miller, S. D. (2006). Influence of glyphosate on Rhizoctonia and Fusarium root rot in sugar beet. *P. Manag. Scie.* 62(12), 1182-1192.
- Lee W.J., Blair A., Hoppin J.A., Lubin J.H., Rusiecki J.A., Sandler D.P., Dosemeci M., Alavanja M.C. (2004). Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study. *J. Nat. Cancer Inst.* 96: 1781-1791.
- Lupwayi N.Z., Harker K.N, Clayton G.W., O'Donovan J.T, Blackshaw R.E. (2009). Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-tolerant and non-tolerant crops. *Environ. Pollut.* 129: 171-176
- Madhyastha S.M., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Platford G., Abramson D. (1990). Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of

toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum*. J. Agric. Food Chem. 38:1506-1510.

- MAIZAR. (2013). La cadena del maíz y las oportunidades para desarrollo en la argentina. Disponible en: <http://www.maizar.org.ar/vertext.php?id=425>. Fecha de acceso: Marzo, 2017.
- Marino D., Ronco A. (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75: 820–826.
- Martínez-Toledo M.V., Salmeron V., González-López J. (1992). Effect of the insecticides methylpyrimifos and chlorpyrifos on soil microflora in an agricultural loam. Plant Soil 147:25-30.
- Massiha A., Majid M.R., Pahlaviani K., Issazadeh K. (2011). Microbial degradation of pesticides in surface soil using native strain in Iran. En: Int. Conf. Biotechnol. Environ. Manag., vol. 18. IPCBEE. IACSIT Press, Singapore, pp. 76-81.
- Mateo E. M., Gómez J.V., Gimeno-Adelantado J.V., Romera D., Mateo-Castro R., Jiménez M. (2017). Assessment of azole fungicides as a tool to control growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> production in maize. Food Addit. Contam. A. 34:1039-1051.
- Medina Á., Mateo R., Valle-Algarra F. M., Mateo E. M., Jiménez M. (2007). Effect of carbendazim and physicochemical factors on the growth and ochratoxin A production of *Aspergillus carbonarius* isolated from grapes. Int. J. Food Microbiol. 119: 230-235.
- Menon P., Gopal M., Prasad R. (2004). Influence of two insecticides, chlorpyrifos and quinalphos, on arginine ammonification and mineralizable nitrogen in two tropical soil types. J. Agric. Food Chem. 52:7370–7376.
- Miller J.D., Trenholm H.L. (1994). Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin. Editorial: Eagan Press, St. Paul.
- Ministerio de Agroindustria, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Subsecretaría de Agricultura, (2015). Disponible en: <http://www.minagri.gob.ar>. Fecha de acceso: Febrero 2016.
- Morales H. (2011). Mohos productores de micotoxinas. En: Las micotoxinas y su efecto en la salud animal y humana. Ramos G.A. (Editor). Primera edición, Editorial: A. Madrid Vicente Ediciones, Madrid, España.
- Moss M. O., Frank M (1987) Prevention: effects of biocides and other agents on mycotoxin production. In: Watson D H (ed.) Natural Toxicants in Food. Chichester, UK: Ellis Horwood. pp. 231–251.

- Moss M.O. (1991). Mycology of cereal grain and cereal products. *Developments in Food Sci.*, 28: 23-51.
- Mühlencoert E., Mayer I., Zapf M.W., Vogel R.F., Niessen L. (2004). Production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus*. *Europ. J. Plant Pathol.* 110: 651- 659.
- Nepote M.C., Piontelli E., Saubois A. (1997). Ocurrance of *Aspergillus flavus* strains and aflatoxins in corn from Santa Fé, Argentina. *Arch. Latinoam. Nutr.* 47: 262-264.
- Nepote, M.C; Saubois, A.; Beccaria, A. & Basilico, J. (1994). Grado de contaminación por aflatoxinas y zearalenona. *Rev. Iberoam. Micol.* 11:37-39
- Nesci A., Etcheverry M. (2002). *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Lett. Appl. Microbiol.* 34: 343-348.
- Nufarm (2015). Ficha técnica del herbicida Glifosato. Disponible en: <http://nufarm.ec/>. Fecha de acceso: Marzo, 2017.
- OMS ("Organizacion Mundial de la Salud). Disponible en: <http://www.who.int/es/>. Acceso: Noviembre, 2017.
- Oviedo M.S., Ramirez M.L., Barros G.G., Chulze S.N. (2009). Effect of environmental factors on tenuazonic acid production by *Alternaria alternata* on soybean-based media. *J. Appl. Microbiol.* 107(4):1186-1192.
- Paterson R. R. M., y Lima N. (Eds.). (2015). *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. CRC Press.
- Picco M., Nesci A., Barros G., Cavaglieri L., Etcheverry M. (2000). Aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in mixed cultures of *Aspergillus flavus* and *Fusarium proliferatum* on maize. *Nat.Toxins.* 7: 331-336.
- Pildain M.B., Vaamonde G., Cabral D. (2004). Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. *Int. J. Food Microbiol.* 93:31-40.
- Pitt J.I., Hocking A.D. (2009b). *Aspergillus* and related teleomorphs. En: *Fungi and Food Spoilage*. Third Edition. Springer US.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009a) *Fungi and Food Spoilage*, 3ed edn. CSIRO Division of Food Science and Technology, Sydney Academic, Press. Australia.
- Portal Agro fy 2016. Dsiponible en: <https://news.agrofy.com.ar/especiales/maiz>. Acceso: Marzo, 2017.
- Pose G., Patriarca A., Kyanko V., Pardo A., Pinto V. F. (2009). Effect of water activity and temperature on growth of *Alternaria alternata* on a synthetic tomato medium. *Int. J. Food Microbiol.* 135: 60-63.
- Pozo C., Martinez-Toledo M.V., Salmeron V., Rodelas B., Gonzalez-Lopez J. (1995) Effect of chlorpyrifos on soil microbial activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 14:187-192.

- Rauh V., Arunajadai S., Horton M., Perera F., Hoepner L., Barr D.B., Whyatt R., (2011). 7-Year neuro developmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ. Health Perspect.* 119: 1196-1201.
- Reddy K.N., Abbas H.K., Zablutowicz R.M., Abel C.A., Koger C.H. (2007). Mycotoxin occurrence and *Aspergillus flavus* soil propagules in a corn and cotton glyphosate-resistant cropping systems. *Food Addit. Contam.* 24: 1367-1373.
- Reddy K.R.N., Reddy C.S., Muralidharan K. (2009). Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochem. Physiol.* 93: 53-57.
- Resnick S.L., Neira, S., Pacin A., Martínez E., Apro N., Latreite S. (1996). A survey of the natural occurrence of aflatoxin and zearalenone in Argentina field maize *Food Addit. Contam.* 13:115-120.
- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., Filtenborg O. (2000). *Introduction to Food-Borne Fungi.* 6th edn. CBS,Utrecht.
- Samson R.A., Houbraken J., Thrane U., Frisvad J.C., Andersen B. (2010). *Food and Indoor Fungi,* Utrecht, The Netherlands, Centraal bureaau Voorschimmel cultures-Utrecht. 390 p. (CBS Laboratory Manual Series; No. 2).
- Samson R.A., Noonin P., Meijer M., Houbraken J., Frisvad J.C., Varga J. (2007). Diagnostic tools to identify black *Aspergilli*. *Studies in Mycology,* 59: 129-145.
- Sardar D., Kole R.K. (2005). Metabolism of chlorpyrifos in relation to its effect on the availability of some plant nutrients in soil. *Chemosphere* 61:1273–1280.
- Satorre E.H. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy.*15: 24-31.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2010). Cereales. *Revista Alimentos Argentinos* Nº48, pp. 26-29.
- Seibert C.M., Raushel F.M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry* 44: 6383-6391.
- Sepúlveda C., Piontelli E. (2005). Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación argentina: Énfasis en la sección *Flavi*. *Boletín Micológico,* 20.
- Serrano-Coll H.A., Cardona-Castro N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Medicina,* 29: 143-151.
- Singh B.K., Walker A., Grayston S.J., Del Re A.A.M., Capri E., Padovani L., Trevisan M. (2009). Degradation of chlorpyrifos and its effects on the soil biota. En: *Pesticide in air, plant, soil and water system. Proceedings of the XII symposium pesticide chemistry,* Piacenza, Italy, La Goliardica Pavese srl, pp 27–34.

- Smith G., Weil E. (2004). Aspergillosis of Gorgonians. En: Rosenberg E., Loya Y. (Editores). Coral health and disease. Editorial Springer, Berlin, pp. 279–287.
- Smith, J.E. and Moss, M.O. (1985) Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance. Chichester, NY: John Wiley and sons.
- Somjaipeng S., Ta-uea P. (2016). Evaluation of the effect of water activity and temperature on lag phase and growth rate of aflatoxigenic *Aspergillus* section *Flavi* strains isolated from stored rice grain. Agric. Agric. Sci. Procedia, 11: 38-45.
- Soriano del Castillo J.M. (2007). Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz de Santos, España.
- Tejada M. (2009). Evolution of soil properties after addition of glyphosate on growth, chlorophyll, and nodulation in glyphosate-resistant and susceptible soybean (*Glycine max*) varieties. J. New Seeds 2: 37-52.
- Trucksess M.W., Stack M.E., Nesheim S., Albert R.H. Romer T.R. (1994). Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in corn, almonds, Brazil nuts, peanuts, and pistachio nuts: collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. 6: 1512-1521.
- USGS. (United States Geological Survey) (2000). Organophosphorus pesticide occurrence and distribution in surface and ground water of the United States, 1992–97. pp. 1-4. <http://pubs.usgs.gov/of/2000/ofr00-187/index.html>. Fecha de acceso: marzo 2017.
- Vaamonde G., Patriarca A., Fernández Pinto V., Comerio R., Degrossi C. (2003). Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. Int. J. Food Microbiol. 88: 79-84.
- Van Egmond H.P. (1989). Introduction. En: Van Egmond H.P. (Editor. Mycotoxin in dairy products. Elsevier, London, pp. 1-9.
- Vereecken H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. Pest. Manag. Sci. 61: 1139–1151.
- Villaamil Lepori E.C., Mitre G.B., Nassetta M. (2013). Situación actual de la contaminación por plaguicidas en Argentina. Rev. Inter. Contam. Amb. 29: 25-43.
- Vischetti C., Coppola L., Monaci E., Cardinali A., Castillo M.D.P. (2007). Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. Agron. Sustain. Dev. 27: 267-272.
- Wang L.G., Jiang X., Mao Y. M., Zhao Z.H., Bian Y.R. (2005). Organophosphorus pesticide extraction and cleanup from soils and measurement using GC-NPD. Pedosphere, 15: 386-394.

- Williams J.H., Phillips T.D., Jolly P.E., Stiles J.K., Jolly C.M., Aggarwal D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 1106-1122.
- Woloshuk C.P., Cavaletto J.R., Cleveland T.E. (1997). Inducers of aflatoxin biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from *Aspergillus flavus*. *Biochem. Cell Biol.* 87: 164-169.

## IX. ANEXOS ESTADÍSTICO

**Tabla 1:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C) y temperatura (T); y sus interacciones dobles y triples sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) y *A. flavus* (AF 56 y AF 63).

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
			CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
NRRL 2999	C	5	6.33	7.36*	3648.81	7.36*
	$a_w$	2	31.66	36.76*	18234.08	36.76*
	T	2	6.18	7.17*	3558.17	7.17*
	C x $a_w$	10	1.41	1.63	809.31	1.63
	C x T	10	8.78	10.20*	5059.17	10.20*
	$a_w$ x T	4	1.48	1.72	854.49	1.72
	C x $a_w$ x T	20	1.33	1.55	767.64	1.55
AP 55	C	5	5.54	8.40*	2900.07	4.40*
	$a_w$	2	53.41	80.99*	43462.84	65.97*
	T	2	34.40	52.16*	4946.08	7.51*
	C x $a_w$	10	1.59	2.41*	1712.98	2.60
	C x T	10	5.83	8.85*	2626.50	3.99*
	$a_w$ x T	4	6.21	9.41*	10292.41	15.62*
	C x $a_w$ x T	20	2.28	3.45*	3615.00	5.49*
AF 56	C	5	5.27	14.85*	1898.06	6.42*
	$a_w$	2	22.41	63.10*	55720.84	188.53*
	T	2	18.93	53.29*	7982.60	27.01*
	C x $a_w$	10	0.94	2.64	1914.00	6.48*
	C x T	10	5.73	16.12*	2000.88	6.77*
	$a_w$ x T	4	5.73	16.14*	11039.57	37.35*
	C x $a_w$ x T	20	0.92	2.59*	2099.01	7.10*
AF 63	C	5	7.04	11.12*	7052.95	5.88*
	$a_w$	2	25.42	40.12*	71960.14	60.00*
	T	2	28.31	44.69*	8822.75	7.36*
	C x $a_w$	10	0.78	1.24*	3861.53	3.22*
	C x T	10	9.70	15.31*	6423.62	5.36*
	$a_w$ x T	4	5.73	9.04*	16230.21	13.53*
	C x $a_w$ x T	20	1.64	2.58*	5181.43	4.32*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 2:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) a diferentes temperatura.

Cepas	Temperaturas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
				CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
NRRL 2999	18° C	C	5	1.69	1.04*	1580.23	1.86
		$a_w$	2	4.18	2.57*	38157.48	44.95*
		C x $a_w$	10	0.84	0.52	1561.91	1.84
	28° C	C	5	1.88	3.25*	68.24	0.06
		$a_w$	2	10.75	18.59*	1269.84	1.13
		C x $a_w$	10	1.27	2.19	256.71	0.23
	37° C	C	5	20.33	54.18*	81668.10	9.14*
		$a_w$	2	19.69	52.47*	27677.10	4.1*
		C x $a_w$	10	1.96	5.22*	7741.53	0.87
AP 55	18° C	C	5	0.15	0.29	889.81	1.12
		$a_w$	2	8.02	15.28*	56047.38	70.77*
		C x $a_w$	10	0.84	1.60	2868.73	3.62*
	28° C	C	5	0.21	1.00	98.88	11.56*
		$a_w$	2	7.66	36.35*	2981.54	348.50*
		C x $a_w$	10	0.18	0.88	92.07	10.76*
	37° C	C	5	16.85	13.55*	7164.39	6.09*
		$a_w$	2	50.15	40.35*	5018.74	4.27
		C x $a_w$	10	5.12	4.12*	5982.18	5.09*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 3:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) a diferentes temperaturas.

Cepas	Temperaturas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
				CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AF 56	18° C	C	5	0.30	1.14	1427.87	2.49
		$a_w$	2	7.29	27.35*	54212.86	94.71*
		C x $a_w$	10	0.43	1.62	2483.76	4.34*
	28° C	C	5	0.44	1.73	32.75	1.05
		$a_w$	2	0.47	1.85	1647.03	52.68*
		C x $a_w$	10	0.43	1.70	86.25	2.76
	37° C	C	5	15.98	29.23*	4439.20	15.69*
		$a_w$	2	26.13	47.79*	21940.09	77.54*
		C x $a_w$	10	1.91	3.50*	3542.01	12.52*
AF 63	18° C	C	5	0.39	0.58	6014.05	3.81*
		$a_w$	2	10.18	15.28*	85401.96	39.88*
		C x $a_w$	10	0.52	0.78	4283.18	2.00
	28° C	C	5	0.12	0.34	83.10	5.64*
		$a_w$	2	0.59	1.71	2640.19	179.28*
		C x $a_w$	10	0.13	0.37	43.33	3.94*
	37° C	C	5	25.94	29.15*	13803.04	9.58*
		$a_w$	2	26.10	29.33*	16378.42	11.36*
		C x $a_w$	10	3.41	3.83*	9897.89	6.87*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 4:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55).

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
NRRL 2999	C	5	15041.80	11.61*
	D	2	14190.38	10.95*
	T	2	38.02	0.03
	$a_w$	2	12356	11.23*
AP 55	C	5	6045.77	11.19*
	D	2	4371.47	8.09*
	T	2	948.30	1.75
	$a_w$	2	3371.1	10.05*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 5:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63)

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AF 56	C	5	68374.86	13.68*
	D	2	1752.00	0.35
	T	2	111722.02	22.35*
	$a_w$	2	1976.8	0.4
AF 63	C	5	119130.44	12.23*
	D	2	20785.08	2.13
	T	2	257122.87	26.39*
	$a_w$	2	19563	1.9

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 6:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C) y temperatura (T); y sus interacciones dobles y triples sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) y *A. flavus* (AF 56 y AF 63).

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
			CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
NRRL 2999	C	2	36.85	25.13*	11570.06	72.47*
	$a_w$	2	27.40	18.69*	15669.30	98.15*
	T	2	66.30	45.23*	10193.65	63.85*
	C x $a_w$	4	6.26	4.27*	25643.02	160.62*
	C x T	4	12.51	8.53*	10089.16	63.20*
	$a_w$ x T	4	8.48	5.79*	6531.57	40.91*
	C x $a_w$ x T	8	7.67	5.23*	12489.83	78.23*
AP 55	C	2	54.56	114.11*	31784.4	82.7*
	$a_w$	2	40.69	85.1*	22705.04	59.08*
	T	2	21.89	45.79*	15252.88	39.69*
	C x $a_w$	4	1.98	4.14*	3977.36	10.35*
	C x T	4	6.79	14.2*	616.86	1.61*
	$a_w$ x T	4	7.23	15.13*	17319.26	45.07*
	C x $a_w$ x T	8	2.31	4.83*	19301.97	50.22*
AF 56	C	2	46.09	59.24*	32315.52	63.49*
	$a_w$	2	25.76	33.12*	27926.18	54.86*
	T	2	34.5	44.35*	26445.58	51.95*
	C x $a_w$	4	2.75	3.53*	4171.34	8.19*
	C x T	4	5.52	7.1*	940.77	1.85
	$a_w$ x T	4	4.6	5.91*	27213.24	53.46*
	C x $a_w$ x T	8	1.58	2.03	23943.11	47.04*
AF 63	C	2	44.38	67.98*	17731.56	65.14*
	$a_w$	2	40.1	61.42*	43233.9	158.83*
	T	2	24.82	38.01*	19318.17	70.97*
	C x $a_w$	4	6.62	10.14*	9048.53	33.24*
	C x T	4	1.91	2.92	317.23	1.17
	$a_w$ x T	4	6.17	9.45*	32234.13	118.42*
	C x $a_w$ x T	8	0.89	1.37	11669.72	42.87*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 7:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) a diferentes temperaturas.

Cepas	Temperaturas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia		
				CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	
NRRL 2999	18° C	C	2	4.18	22.61*	9448.81	78.70*	
		$a_w$	2	1.58	8.54*	32067.38	267.09*	
		C x $a_w$	4	0.55	4.98*	15431.98	128.53*	
	28° C	C	2	29.85	34.10*	1800.14	8.82*	
		$a_w$	2	39.82	45.48*	19008.20	93.17*	
		C x $a_w$	4	20.26	23.14*	10488.76	51.41*	
	37° C	C	2	17.86	5.35*	248.06	1.51	
		$a_w$	2	12.94	3.88	1284.71	7.83*	
		C x $a_w$	4	0.79	0.24	3864.81	23.57*	
	AP 55	18° C	C	2	3.68	19.88*	11762.92	27.93*
			$a_w$	2	6.56	35.42*	37229.72	88.39*
			C x $a_w$	4	0.85	4.57*	14810.66	35.16*
28° C		C	2	40.86	78.27*	13764.54	105.25*	
		$a_w$	2	26.78	51.31*	6092.33	46.58*	
		C x $a_w$	4	3.65	6.99*	16441.81	125.72*	
37° C		C	2	37.67	51.80*	15162.88	25.23*	
		$a_w$	2	7.74	10.64*	6349.31	10.57*	
		C x $a_w$	4	2.10	2.89	11328.85	18.85*	

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 8:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) a diferentes temperaturas.

Cepas	Temperaturas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
				CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AF 56	18° C	C	2	2.91	34.19*	52518.94	44.20*
		$a_w$	2	1.16	13.67*	48160.68	40.53*
		C x $a_w$	4	0.15	1.8	5359.27	4.61*
	28° C	C	2	27.00	19.73*	13617.97	124.28*
		$a_w$	2	20.76	15.17*	6692.61	61.08*
		C x $a_w$	4	3.81	3.79*	18161.63	165.74*
	37° C	C	2	27.23	30.92*	16492.53	40.58*
		$a_w$	2	13.03	14.80*	3581.45	8.81*
		C x $a_w$	4	1.94	2.20	4133.68	10.17*
AF 63	18° C	C	2	2.91	34.19*	4898.7	25.93*
		$a_w$	2	1.16	13.67*	110938.47	587.23*
		C x $a_w$	4	0.15	1.80	10513.7	55.65*
	28° C	C	2	27.00	19.73*	8874.5	27.61*
		$a_w$	2	20.76	15.17*	1118	3.48
		C x $a_w$	4	3.81	4.79	8294.1	25.8*
	37° C	C	2	27.23	30.92*	2840.76	2.29
		$a_w$	2	13.03	14.80*	54.96	0.04
		C x $a_w$	4	1.94	2.20	11279.79	35.29*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 9:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55).

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
NRRL 2999	C	2	12440.94	8.67*
	D	2	13456.1	7.81*
	T	2	40781.88	5.47*
	$a_w$	2	21608.91	4.9*
AP 55	C	2	20791.87	4.71*
	D	2	10263.85	6.84*
	T	2	13856.76	5.14*
	$a_w$	2	18102.66	5.49*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 10:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), días de incubación (D) y temperatura (T) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas *A. flavus* (AF 56 y AF 63).

Cepas	Fuentes de variación	gl <sup>1</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AF 56	C	2	5547.78	5.96*
	D	2	4182.28	6.73*
	T	2	10041.33	4.75*
	$a_w$	2	11408.43	5.98*
AF 63	C	2	1101.34	5.69*
	D	2	3924.97	4.45*
	T	2	3621.16	6.26*
	$a_w$	2	8400.49	5.25*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 11:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) a 25° C sobre sustrato natural.

Cepas	Fuentes de variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
			CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AP 55	C	4	0.94	3.23*	615.97	5.55*
	$a_w$	2	0.46	2.01	1690.63	15.24*
	C x $a_w$	8	0.63	2.15	240.62	5.17*
AF 63	C	4	0.22	0.74	131.11	5.87*
	$a_w$	2	0.57	1.89	1460.16	65.35*
	C x $a_w$	8	0.33	1.09	142.79	6.39*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 12:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de clorpirifós (C), días de incubación (D) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) en sustrato natural a 25° C.

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AP 55	C	2	782922938	5.42*
	$a_w$	2	1003083728	5.54*
	D	2	1046953457	5.56*
AF 63	C	2	3795496165	4.44*
	$a_w$	2	2483089410	5.94*
	D	2	3581948675	5.36*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 13:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C) y sus interacciones sobre la velocidad de crecimiento y la fase de latencia de cepas de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) a 25° C sobre sustrato natural.

Cepas	Fuentes de variación	gl <sup>1</sup>	Velocidad de crecimiento		Fase de latencia	
			CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AP 55	C	4	1.24	2.14	615.97	5.55*
	$a_w$	2	2.25	3.60	1690.63	15.24*
	C x $a_w$	8	10.71	12.67*	240.62	5.17*
AF 63	C	4	1.79	0.74	131.11	5.87*
	$a_w$	2	1.24	1.89	1460.16	65.35*
	C x $a_w$	8	16.10	15.68*	142.79	6.39*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

**Tabla 14:** Análisis de la varianza del efecto de la actividad acuosa ( $a_w$ ), concentración de glifosato (C), días de incubación (D) sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) en sustrato natural a 25° C.

Cepas	Fuentes de Variación	gl <sup>1</sup>	CM <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>
AP 55	C	2	2.9723E+10	6.34*
	$a_w$	2	497337107	6.11*
	D	2	1.0374E+10	5.21*
AF 63	C	2	3.2313E+10	6.01*
	$a_w$	2	4.6103E+10	5.44*
	D	2	4.4943E+10	5.4*

<sup>1</sup>Grados de libertad

<sup>3</sup> Estadístico

<sup>2</sup> Cuadrado medio

\* Significancia  $p < 0,01$

## X. ANEXO DE TABLAS

**Tabla 1:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 18°C.

Cepas	a <sub>w</sub>	Días	Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)					
			Clorpirifós (mM)					
			0	0.06	0.14	0.3	0.6	1.4
NRRL 2999	0.93	7	43.5	67.5	72.3	80.2	210.1	40.0
		14	67.2	48.2	52.15	67.1	121.2	60.5
		21	22.1	37.6	39.5	43.4	60	13.3
	0.95	7	50.2	70.21	83.5	87.1	198.2	60.7
		14	53.5	78.9	101.2	132.5	231.7	47.2
		21	28.1	35.6	40.2	40.2	50.3	30.2
	0.98	7	67.3	82.3	124.7	179.5	324.7	72.2
		14	80.0	103.2	137.6	200.3	374	79.8
		21	40.1	40.7	50.7	67.13	67.9	39.8
AP 55	0.93	7	68.3	70.3	75.2	80.3	111.5	66.50
		14	72.29	75.7	79.9	89.5	123.3	77.2
		21	42.7	60.1	62.3	66.6	72.4	50.2
	0.95	7	94.1	99.1	121.3	127.5	169.2	70.25
		14	101.2	132.5	138.7	143.5	222.7	81.3
		21	60.7	67.2	75.4	80.2	103.4	65.2
	0.98	7	123.1	130.3	175.5	192.3	233.2	90.3
		14	103.4	111.2	123.2	133.3	198.5	113.5
		21	68.3	65.3	70.2	90.3	90.9	70.3

**Tabla 2:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 18°C.

Cepas	a <sub>w</sub>	Días	Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)					
			Clorpirifós (mM)					
			0	0.06	0.14	0.3	0.6	1.4
AF 56	0.93	7	39.7	53.7	59.6	63.5	397.2	128.5
		14	56.6	60.3	68.3	75.5	398.1	139.4
		21	40.2	43.5	46.6	51.9	333.7	117.9
	0.95	7	66.3	70.7	77.8	85.3	421.5	193.3
		14	90.3	92.5	94.3	96.6	433.2	203.5
		21	43.1	45.5	50.1	52.5	452.7	207.3
	0.98	7	70.2	78.3	80.5	267.1	423.5	389.5
		14	98.6	105.3	123.3	292.7	454.7	395.5
		21	90.3	93.7	142.7	302.1	463.1	327.3
AF 63	0.93	7	45.2	50.3	52.8	225.3	530.2	239.7
		14	63.3	71.7	76.7	222.7	613.2	272.9
		21	32.7	32.0	43.7	193.0	202.8	233.8
	0.95	7	55.7	57.2	62.0	178.4	467.3	321.2
		14	71.5	73.3	79.9	213.2	567.1	420.0
		21	42.3	44.7	43.2	123.5	489.9	368.7
	0.98	7	68.7	87.4	89.8	321.4	728.9	563.0
		14	90.6	101.3	92.72	339.6	770.3	493.9
		21	43.5	50.6	52.2	118.7	220.8	367.5

**Tabla 3:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 28°C.

Cepas	a <sub>w</sub>	Días	Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)					
			Clorpirifós (mM)					
			0	0.06	0.14	0.3	0.6	1.4
NRRL 2999	0.93	7	73.4	76.5	80.25	121.2	72.5	68.5
		14	82.5	90.2	91.37	109.3	82.2	79.1
		21	60.25	63.3	80.3	123.3	90.3	82.4
	0.95	7	80.3	83.4	95.25	115.7	97.3	87.9
		14	78.2	80.1	85.7	96.9	72.5	69.7
		21	80.7	93.4	100.3	115.9	90.5	73.7
	0.98	7	93.4	105.7	109.3	134.1	100.2	67.5
		14	85.4	90.3	98.7	109.3	92.3	80.5
		21	63.4	72.7	79.2	103.3	85.7	70.2
AP 55	0.93	7	85.3.0	89.3.7	99.3	117.5	101.3	68.5
		14	87,27	93,2	98,3	109,9	91,3	70,24
		21	93,51	101,5	104,7	123,1	103,2	93,3
	0.95	7	95.71	99.9	107.2	115.4	104.2	65.3
		14	93.3	101.15	105.2	113.5	93.7	84.4
		21	97.21	103.3	111.8	137.7	102.8	92.7
	0.98	7	101.15	104.25	115.9	141.24	92.8	73.15
		14	103.21	110.3	123.1	131.23	89.2	87.7
		21	92.7	99.7	103.24	135.7	102.8	90.7

**Tabla 4:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 28°C.

Cepas	a <sub>w</sub>	Días	Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)					
			Clorpirifós (mM)					
			0	0.06	0.14	0.3	0.6	1.4
AF 56	0.93	7	65.02	69.2	79.3	103.5	92.3	85.5
		14	69.9	73.4	76.9	135.5	111.8	97.3
		21	61.24	69.3	82.8	99.3	85.2	83.1
	0.95	7	73.2	81.3	87.8	103.25	93.7	90.7
		14	79.2	87.28	95.6	107.31	101.1	85.4
		21	85.3	90.13	95.18	109.3	87.3	65.2
	0.98	7	59.2	63.23	70.39	99.6	83.1	70.2
		14	63.5	71.1	79.15	93.4	91.1	87.3
		21	81.3	85.5	90.13	113.7	100.7	92.5
AF 63	0.93	7	78.13	82.45	87.23	103.5	92.7	85.4
		14	85.4	88.23	93.24	107.3	91.3	83.3
		21	74.24	76.6	87.15	103.5	100.1	87.5
	0.95	7	80.5	83.3	89.7	119.7	92.3	83.6
		14	83.7	88.26	93.27	125.13	101.7	87.2
		21	95.4	103.13	109.9	137.3	90.87	72.8
	0.98	7	85.9	89.9	89.3	140.2	103.7	85.3
		14	99.7	107.1	111.3	115.5	93.7	92.3
		21	103.15	107.3	125.7	143.3	102.79	93.28

**Tabla 5:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 37°C.

Cepas	a <sub>w</sub>	Días	Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)					
			Clorpirifós (mM)					
			0	0.06	0.14	0.3	0.6	1.4
NRRL 2999	0.93	7	67.28	69.25	76.72	105.15	110.25	70.5
		14	82.3	89.18	95.17	99.7	105.21	81.21
		21	56.73	63.27	69.72	79.9	91.4	42.37
	0.95	7	71.14	83.26	89.15	93.93	107.14	69.15
		14	76.25	85.29	92.15	99.87	109.18	72.3
		21	69.78	79.63	87.28	101.1	120.8	82.3
	0.98	7	89.9	93.17	99.23	109.26	118.3	87.3
		14	85.15	89.9	93.25	103.42	109.17	72.56
		21	62.28	66.67	73.8	93.9	107.2	80.28
AP 55	0.93	7	76.18	79.28	85.21	93.18	120.5	68.18
		14	89.95	93.23	99.15	103.3	105.18	72.2
		21	81.13	85.72	88.37	93.3	99.23	60.5
	0.95	7	85.15	89.19	95.65	99.82	99.18	78.5
		14	93.12	95.23	103.22	105.81	107.28	88.8
		21	78.72	85.15	90.23	98.12	105.0	98.15
	0.98	7	93.23	93.29	93.15	125.18	129.23	90.15
		14	98.71	104.23	106.12	106.9	110.25	72.12
		21	82.02	85.7	89.97	103.2	101.59	100.71

**Tabla 6:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. flavus* (AF 56 y AF 63) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 37°C.

Cepas	a <sub>w</sub>	Días	Concentración de AFB <sub>1</sub>					
			Clorpirifós (mM)					
			0	0.06	0.14	0.3	0.6	1.4
AF 56	0.93	7	83.15	87.23	89.15	122.02	124.17	80.53
		14	81.28	83.15	88.26	103.12	107.14	83.71
		21	72.15	79.11	89.27	93.16	99.08	77.32
	0.95	7	89.9	95.5	97.3	107.68	108.22	100.5
		14	97.18	100.3	101.73	105.25	107.3	88.8
		21	67.20	66.29	72.31	74.62	80.08	59.27
	0.98	7	101.12	104.25	106.15	106.71	109.07	98.34
		14	103.4	105.72	108.18	110.37	110.29	99.7
		21	92.5	90.7	110.39	125.35	147.9	93.15
AF 63	0.93	7	63.27	65.79	72.33	79.24	105.72	71.19
		14	79.18	85.27	93.13	99.28	100.7	73.15
		21	57.15	66.25	70.32	74.41	99.21	60.37
	0.95	7	72.73	79.37	87.36	90.13	93.27	70.79
		14	79.47	83.23	89.27	97.15	115.23	78.10
		21	73.13	73.92	76.26	80.25	89.17	72.92
	0.98	7	91.73	96.61	103.7	139.27	140.17	85.15
		14	99.13	103.27	109.28	115.46	121.27	101.31
		21	85.5	89.23	102.36	104.18	143.28	91.13

**Tabla 7:** Efectos de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> por cepas de *A. parasiticus* (NRRL 2999 y AP 55) y *A. flavus* (AF 56 y AF 63) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> y temperatura.

		Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)																										
		7 días									14 días									21 días								
		18°C			28°C			37°C			18° C			28° C			37° C			18°C			28°C			37°C		
Cepas	a <sub>w</sub>	0	30	300	0	30	300	0	30	300	0	30	300	0	30	300	0	30	300	0	30	300	0	30	300	0	30	300
	0.93	nd	nd	nd	3.35	nd	nd	2.3	nd	nd	nd	nd	nd	2.1	0.99	nd	nd	3.9	nd	nd	0.7	nd	0.5	144	nd	1	0.9	nd
<b>NRRL 2999</b>	0.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.1	nd	nd	nd	nd	nd	501.7	591	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	311	136	nd	nd	12.7	1.2
	0.98	2.1	0.7	nd	6.7	31	nd	6.8	nd	nd	nd	7.8	2.5	134.2	4.1	nd	4.25	nd	7.3	82.5	nd	nd	nd	23	1.1	7.5	nd	3.5
	0.93	nd	nd	nd	3.1	19.1	nd	3.2	7.25	nd	nd	2.4	nd	22.1	8.6	nd	4	8.4	nd	nd	0.8	nd	26.7	2.6	nd	50.9	5.5	nd
<b>AP 55</b>	0.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	990	nd	nd	33.4	6.5	nd	nd	153	nd	161	nd	nd	16.4	2.2	nd
	0.98	0.95	1.8	nd	9.15	0.5	0.5	7.7	14	nd	0.5	0.9	nd	7.5	1.9	nd	20	6.8	nd	7.4	2.05	1.3	9	nd	nd	36.9	4.3	7.1
	0.93	nd	nd	nd	lod	nd	nd	nd	nd	nd	6.3	9.2	nd	nd	1.7	nd	3.7	nd	nd	nd	nd	nd	0.7	2.3	nd	nd	nd	nd
<b>AF 56</b>	0.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	36.6	nd	nd	nd	nd	669	nd	nd	nd	nd	3.3	nd	nd	nd	92	nd	179	2.4	nd	3.2
	0.98	1.9	1.4	nd	nd	nd	nd	0.5	0.5	nd	0.85	0.9	5.4	nd	nd	1.2	1.5	1.95	nd	6.1	1.35	2.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	0.93	nd	nd	nd	nd	1.4	nd	3.1	nd	nd	3.4	nd	nd	nd	nd	nd	2.25	13	nd	1.6	2.3	nd	1.35	1.3	nd	1.1	nd	nd
<b>AF 63</b>	0.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.95	0.9	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	214	83.2	175	nd	nd	nd
	0.98	1.4	1.15	nd	nd	0.5	nd	1.25	3	3.5	9.4	nd	3.7	nd	nd	nd	nd	1.84	1.9	3.9	3	2.7	lod	lod	0.5	1.1	2.6	2.1

nd: no detectado según la técnica utilizada (<0.7 ng/g).

**Tabla 8:** Efecto de diferentes concentraciones de clorpirifós sobre la producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de a<sub>w</sub> a 25°C

		Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)								
		7 días			14 días			21 días		
		Clorpirifós (mM)								
Cepas	a <sub>w</sub>	0	0.14	1.4	0	0.14	1.4	0	0.14	1.4
	0.93	nd	3535.6	143567	140.8	417.1	2499.6	2363.4	2438	2204.1
<b>AP 55</b>	0.95	1282.5	1923.9	139.4	755.2	344.1	426.8	2351.3	2112	2144.7
	0.98	158.0	2157.5	2725	2443	2384	218.1	14015.7	163622.6	2263.5
	0.93	nd	5403.8	nd	2526.9	803.2	2334.2	2440.5	2468.6	41766.3
<b>AF 63</b>	0.95	1762.6	821.3	7596	2570	2242.5	2556.4	2351.3	2326	275337.3
	0.98	1501.2	2422.8	5313.9	2443	2264.5	2356.3	2339.6	2129.	2260.3

nd: no detectado, valores bajo el límite de detección según la técnica utilizada (<2.2 ng/g)

**Tabla 9:** Efecto de diferentes concentraciones de glifosato sobre la producción de AFB<sub>1</sub> sobre granos de maíz por cepas de *A. parasiticus* (AP 55) y *A. flavus* (AF 63) bajo diferentes condiciones de aw y a 25°C.

		Concentración de AFB <sub>1</sub> (ng/g)								
		7 días			14 días			21 días		
		Glifosato (mM)								
		aw	0	30	300	0	30	300	0	30
<b>Cepas</b>	0.93	2491.3	nd	nd	56673.7	56673.7	nd	264336.3	nc	nd
	<b>AP 55</b>	0.95	29483.2	2140.7	nd	333754.1	50806.3	nd	21279.3	31838
	0.98	18191.9	9725.3	nd	133526.1	30212.7	nd	121368.2	25282.4	nd
	0.93	nd	nd	nd	nd	1051.6	nd	27480.2	901.9	nd
<b>AF 63</b>	0.95	20640.1	1976.3	nd	116124.6	31986.3	nd	15271	17207.8	nd
	0.98	3427.9	1023.4	nd	84184.5	58792.7	nd	197453.25	952711	nd

nd: no detectado, valores bajo el límite de detección según la técnica utilizada (<2.2 ng/g).