

Departament de Patologia i Producció Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE *Aspergillus* SECCIÓN *Nigri*

Memoria presentada para optar
al grado de doctor

Francesc Accensi i Alemany.

T UAB

5236

Universitat Autònoma de Barcelona
Servei de Biblioteques



1500465947

Departament de Patologia i Producció Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE *Aspergillus* SECCIÓN *Nigri*

Memoria presentada para optar
al grado de doctor

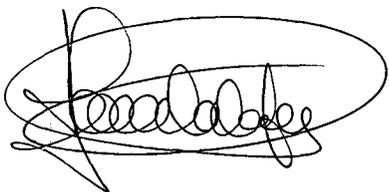
Francesc Accensi i Alemany.

FRANCISCO JAVIER CABAÑES SAENZ y MARIA LOURDES ABARCA i SALAT, profesores titulares del Departament de Patologia i Producció Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

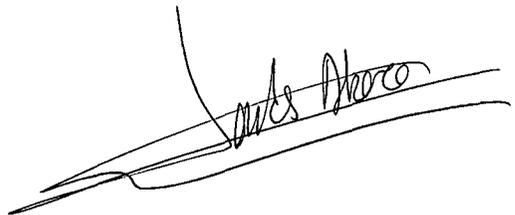
CERTIFICAN:

que Don FRANCESC ACCENSI i ALEMANY ha realizado el presente trabajo sobre "Aportación al conocimiento de *Aspergillus* Sección *Nigri*" bajo nuestra dirección en el Departament de Patologia i Producció Animals de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste, a efectos de ser presentada como Memoria de Tesis para optar al grado de Doctor en Veterinaria, firmamos el presente certificado en Bellaterra a 14 de Abril de 2000.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco Cabañes Saenz', enclosed within a large, hand-drawn oval.

F.J. Cabañes Saenz

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M.L. Abarca i Salat', written over a horizontal line.

M.L. Abarca i Salat

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, los Dres. M.L. Abarca y F.J. Cabañes, por enseñarme a plantear y realizar esta tesis, así como la amistad, el apoyo, y la paciencia que en todo momento han tenido conmigo.

A la Dra. M.R. Bragulat, por su significativo ($p > 0,01$) apoyo en la realización de esta tesis.

A la Dra. Gemma Castellá, por la ayuda moral recibida y por ser la principal sufridora de mis, a su entender, horrorosos CDs.

A Doña Gregoria Sáez, por su inestimable colaboración y por sus no menos inestimables regañinas.

A Chus, por sufrir junto a mi toda la realización de este trabajo.

A Susanita, César, Marta G. y Marta B. Por haberme ayudado, cada uno en su momento a llevar este trabajo a buen puerto. Sin vosotros, hubiera tardado (todavía) más tiempo en realizarlo.

A Albert, Eva, Mariví, Sunci, Marta C., Marta L. y Esther por crear un buen ambiente de trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Riu, por las relajantes saunas de los viernes, con la correspondiente etapa de "la vuelta al mundo en ochenta restaurantes".

Al Dr. J. Cano, así como a Lidia, Carmete, Maria y los demás miembros de la Unitat de Microbiologia de la Facultat de Medecina de Reus, por acogerme y tratarme como un compañero más.

A mi familia, mama, iaia, Ana y Davis por apoyarme en todo momento y a Viridiana y Justine, por sus reconfortantes ronroneos.

A Javi y a Newton por crear un buen ambiente en casa.

A mis amigotes y amiguitas, que no se si se lo merecen.

Miscelánea: a la Dra. Albanell, por sus mails que me han distraído de mis tribulaciones; a Angela, por ser una funcionaria que funciona; a Robert y Tanja por las puntuales traducciones.

Creo que me dejo a alguien. Seas quien seas (aunque no figures en esta lista que ya cansa de lo larga que es) también te lo agradezco. Ya sabes lo despistado que soy.

Finalmente, a Liliana, que es lo mejor que me ha pasado en mucho tiempo.

Al meu pare.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia del género <i>Aspergillus</i>.....	2
1.2. Clasificación del género <i>Aspergillus</i>.....	5
1.2.1. Características morfológicas.....	6
1.2.2. Antecedentes históricos.....	8
1.2.3. Clasificación actual.....	9
1.3. <i>Aspergillus</i> Sección <i>Nigri</i>.....	15
1.3.1. Clasificación.....	16
1.3.1.1. Criterios morfológicos.....	17
1.3.1.2. Otros criterios.....	19
1.3.2. Capacidad micotoxigénica.....	26
1.4. Las ocratoxinas.....	26
1.4.1. Hongos productores y biosíntesis.....	27
1.4.2. Incidencia.....	29
1.4.3. Metabolismo y mecanismo de acción.....	30
1.4.4. Ocratoxicosis natural.....	32
1.4.4.1. Ocratoxicosis en animales.....	32
1.4.4.2. Ocratoxicosis en el hombre.....	33
1.4.5. Ocratoxicosis experimental.....	35
1.4.6. Métodos analíticos.....	37
1.4.6.1. Extracción.....	37
1.4.6.2. Detección y cuantificación.....	38
1.4.7. Prevención y detoxificación.....	40
1.4.8. Legislación.....	42
2. OBJETO DEL ESTUDIO.....	43
3. PLAN DE TRABAJO.....	46
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
4.1. Estudio de la micoflora presente en muestras de piensos y materias primas.....	49
4.1.1. Muestras estudiadas.....	49
4.1.2. Procesado de las muestras.....	49
4.1.3. Identificación hasta nivel de especie de las cepas del género <i>Aspergillus</i>.....	50

4.2. Estudio del agregado <i>A. niger</i>	52
4.2.1. Cepas objeto del estudio	52
4.2.2. Estudio molecular	52
4.2.2.1. Extracción del DNA fúngico.....	52
4.2.2.2. Amplificación mediante PCR del DNA que codifica el gen 5.8S del DNA ribosomal y los ITS1 y 2	54
4.2.2.3. Secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del DNA ribosomal y los ITS1 y 2.....	55
4.2.2.4. Obtención de patrones de RFLP.....	55
4.2.3. Estudio morfológico.....	55
4.2.4. Estudio del comportamiento de las cepas a distintas temperaturas de incubación	56
4.2.4.1. Estudio de las características macroscópicas y microscópicas a las temperaturas máxima y mínima de crecimiento.	57
4.2.5. Determinación de la resistencia al NaCl.....	57
4.2.5.1. Estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a 25 y 35°C	58
4.2.6. Estudio de la producción de ocratoxina A	59
4.2.6.1. Extracción de la OA a partir de bocados de agar.....	59
4.2.6.2. Extracción de OA a partir de cultivos en caldo YES	59
4.2.6.3. Preparación del patrón de ocratoxina A.....	60
4.2.6.4. Detección de ocratoxina A en TLC	60
4.2.6.5. Detección y cuantificación de ocratoxina A en HPLC.....	61
4.3. Medios de cultivo, diluyentes, colorantes y reactivos	62
4.3.1. Medios de cultivo	62
4.3.2. Diluyentes	64
4.3.3. Colorantes y reactivos	65
4.4. Tratamiento estadístico.....	67
5. RESULTADOS	68
5.1. Resultados correspondientes al estudio de la micoflora presente en muestras de piensos y materias primas	69
5.2. Resultados correspondientes al estudio del agregado <i>A. niger</i>	87
5.2.1. Resultados correspondientes al estudio molecular de las cepas del agregado <i>A. niger</i>	87
5.2.1.1. Resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS1 y 2.....	87

5.2.1.2. Resultados correspondientes a la digestión enzimática de los fragmentos del 5.8S-ITS rDNA mediante PCR.....	89
5.2.2. Resultados correspondientes al estudio morfológico de las cepas del agregado <i>A. niger</i>	103
5.2.3. Resultados correspondientes al estudio del comportamiento de las cepas a distintas temperaturas de incubación	104
5.2.3.1. Resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a las temperaturas máxima y mínima de crecimiento.....	120
5.2.4. Resultados correspondientes a la determinación de la resistencia al NaCl.....	128
5.2.4.1. Resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a 25 y 35°C	160
5.2.5. Resultados correspondientes al estudio de la producción de ocratoxina A.....	166
6. DISCUSIÓN	168
6.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio de la micoflora presente en muestras de piensos y materias primas.....	169
6.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del agregado <i>A. niger</i>	172
6.2.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio molecular de las cepas del agregado <i>A. niger</i>	172
6.2.1.1. Discusión de los resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS1 y 2.....	172
6.2.1.2. Discusión de los resultados correspondientes a la digestión enzimática de los fragmentos del 5.8S-ITS rDNA mediante PCR	173
6.2.2. Discusión de los resultados correspondientes al estudio morfológico de las cepas del agregado <i>A. niger</i>	176
6.2.3. Discusión de los resultados correspondientes al estudio del comportamiento de las cepas a distintas temperaturas de incubación.....	180
6.2.3.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a las temperaturas máxima y mínima de crecimiento.....	182
6.2.4. Discusión de los resultados correspondientes a la determinación de la resistencia al NaCl.....	184
6.2.4.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a 25 y 35°C	187

6.2.5. Discusión de los resultados correspondientes al estudio de la producción de ocratoxina A.....	188
7. CONCLUSIONES.....	193
8. BIBLIOGRAFÍA.....	196
9. ANEXOS.....	216
9.1. Anexo 1. Abreviaciones.....	217
9.2. Anexo 2. Colores.....	220
9.3. Anexo 3. Láminas.....	221

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Importancia del género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por Micheli en 1729, siendo validado por Link en el año 1809. Sus especies se hallan ampliamente distribuidas por todo el mundo, aislándose principalmente en zonas tropicales o subtropicales a partir de un gran número de substratos (Tabla 1).

	Substrato	Fuente
Aceites	Aceite de cacahuete	22
	Aceite de colza	22
	Aceite de maíz	22
	Aceite de oliva	22
	Aceite de palma	22
Carne y productos cárnicos	Bacón	22
	Carne	22, 68, 142, 216
	Jamón	22, 216
	Salami	22
	Salchicha	22
	Salchicha fermentada	22
Especies	Clavo	68
	Cilantro	68
	Mezcla de especies	22, 68, 216
	Pimienta	68, 216
Frutas y derivados	Albaricoque	22
	Caña de azúcar	68, 142
	Cítricos	22
	Dátil	142
	Higo	22, 216
	Manzana	68, 142
	Melocotón	22, 142
	Nectarina	22
	Papaya	68
	Pera	68, 142
	Piña	68
	Plátano	68
Uva	22, 142, 216	

Tabla 1. Incidencia de *Aspergillus* en diversos substratos (sigue).

	Substrato	Fuente
Frutas y derivados	Conservas de fruta	22, 68, 216
	Mermeladas	68, 142, 216
	Zumos de fruta	68
Frutos secos	Almendra	216
	Anacardo	216
	Avellana	216
	Cacahuete	68, 216
	Castaña del Brasil	68
	Ciruela seca	22, 216
	Coco	216
	Higo seco	216
	Nuez	216
	Pacana	68, 216
	Pistacho	216
Uva pasa	216	
Granos	Algodón	22, 68
	Arroz	56, 68, 142, 216,
	Avena	22, 68, 56
	Cacao	22, 68, 142
	Café	68, 142, 216, 56
	Cebada	68, 216, 56
	Centeno	68, 216, 56
	Garbanzo	216
	Guisante	68, 216
	Haba	22,68
	Maíz	22, 68, 142, 216, 56
	Semilla de girasol	216
	Soja	68, 216, 56
	Sorgo	68, 216
Trigo	68, 142, 216, 56	
Miscelánea	Agua	68
	Aguas residuales	68
	Aire	68
	Cuero	68
	Heces (hombre y animales)	68
	Insectos	68
	Madera	68
	Nidos y plumas de aves	68
	Suelo	68
	Tabaco	68, 142

Tabla1 (cont). Incidencia de *Aspergillus* en diversos substratos (sigue).

	Substrato	Fuente
Panadería / pastelería	Harinas	68, 142, 216
	Pasta	216
	Pasteles	216
Piensos		56
Productos lácteos	Queso	22, 216
	Mantequilla	68
Productos de la pesca y derivados	Katsuobuschi (fermentado)	22
	Pescado ahumado	216
	Pescado en salazón	142, 216
Verduras	Aceituna	68, 142
	Ajo	22, 142
	Cebolla	22, 68, 142, 216
	Col	68, 142
	Patata	68
	Pepino	68
	Tomate	68
	Zanahoria	142

Tabla1 (cont). Incidencia de *Aspergillus* en diversos substratos.

Algunas especies del género *Aspergillus* tienen una gran importancia en la industria, siendo utilizadas en la producción de ácidos orgánicos y de enzimas. *Aspergillus niger* es la principal especie implicada en la producción industrial de ácidos orgánicos, básicamente ácido cítrico y ácido glucónico. En la producción industrial de enzimas, cabe destacar a *A. oryzae* como productor de α amilasa, de amplio uso en la industria panadera, o a *A. niger* como productor de catalasa. En oriente y en menor medida en países de África y América del Sur, se utilizan diversas especies de *Aspergillus* como fermentos naturales en la producción de alimentos tradicionales. *Aspergillus awamori* o *A. oryzae*, entre otros microorganismos, se utilizan como fermentos en la producción del koji, una masa elaborada a partir de cereales y leguminosas fermentados que constituye la base del miso, la salsa de soja o el sake (23, 45).

Diversas especies del género *Aspergillus* son capaces de producir micotoxinas, destacando entre ellas las aflatoxinas, la ocratoxina A y la esterigmatocistina (Tabla 2).

Micotoxinas	Sección	Principales especies productoras
Aflatoxinas	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. nomius</i> , <i>A. parasiticus</i>
Ácido ciclopiazónico	<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i>
Ácido penicílico	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. alliaceus</i>
Citrinina	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>
Esterigmatocistina	<i>Nidulantes</i>	<i>E. nidulans</i>
	<i>Versicolores</i>	<i>A. versicolor</i>
Ocratoxina A	<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. alliaceus</i>
	<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i> *, <i>A. carbonarius</i> *
Patulina	<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>
	<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>

Tabla 2. Principales micotoxinas producidas por el género *Aspergillus* (adaptada y ampliada* de Frisvad y Thrane, 1996).

Aspergillus spp. produce numerosas pérdidas económicas al deteriorar cereales, frutas y otros alimentos almacenados (216). Algunas de sus especies son fitopatógenas, destacando principalmente *A. niger* que produce, entre otras enfermedades, la antracnosis del algodónero, y el carbón o añublo en los higos (142, 204, 266, 286, 287).

Algunas especies del género *Aspergillus* producen infecciones tanto en los animales como en el hombre (Tabla 3). Las aspergilosis se producen generalmente en el caso de individuos inmunodeprimidos. En los últimos años, la incidencia de infecciones por hongos oportunistas ha aumentado paralelamente al incremento de enfermedades y tratamientos que disminuyen la respuesta inmunitaria (102). La mayoría de aspergilosis están causadas por *A. fumigatus*, si bien también pueden estar producidas por *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* o *A. nidulans*, entre otros (35, 80, 160, 271).

1.2. Clasificación del género *Aspergillus*.

Aspergillus es un hongo mitospórico cuyas formas perfectas se incluyen dentro de la familia *Trichocomaceae*, del orden de los *Eurotiales*, perteneciente al *phylum Ascomycota* (108). El género *Aspergillus* se caracteriza por la producción de unas hifas especializadas, llamadas conidióforos, sobre las que se sitúan las células que darán lugar a la formación de las esporas asexuales o conidios.

Hospedador	Presentación clínica	Principales especies implicadas
Hombre	Aspergiloma ("bola fúngica")	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i>
	Aspergilosis invasiva	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
	Aspergilosis infiltrativa alveolar	<i>A. fumigatus</i>
	Aspergilosis alérgica broncopulmonar	<i>A. fumigatus</i>
	Aspergilosis asmática	<i>A. fumigatus</i>
	Aspergilosis tóxica	<i>A. fumigatus</i>
	Otomicosis	<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i>
Aves	Aspergilosis pulmonar	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i>
	Aspergilosis sistémica	<i>A. fumigatus</i>
Perro	Aspergilosis nasal	<i>A. fumigatus</i>
	Aspergilosis diseminada	<i>A. terreus</i>
Vaca	Aborto micótico	<i>A. fumigatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. nidulans</i>

Tabla 3. Principales patologías producidas por *Aspergillus* y especies más frecuentemente involucradas (35, 114, 229, 263).

1.2.1. Características morfológicas.

El conidióforo típico de *Aspergillus* posee tres partes diferenciadas entre sí aunque se trata de una estructura unicelular. Dichas partes son: un extremo apical hinchado, denominado vesícula, una sección cilíndrica localizada por debajo de la vesícula, llamada estipe y una sección final que une al conidióforo con el micelio, denominada célula pie, a veces separada por un septo. Encima de la vesícula se disponen las células que generarán los conidios, llamadas fiálides. En muchas especies de *Aspergillus* existen unas células dispuestas entre la vesícula y las fiálides denominadas métulas (Figura 1). Los *Aspergillus* que sólo presentan fiálides se denominan uniseriados, y los que presentan métulas y fiálides, biseriados.

Algunos autores (181) propusieron un cambio en la nomenclatura de las estructuras morfológicas de *Aspergillus*, usando terminología no latina y eliminando los términos que pudieran inducir a confusión. Dichos autores recomendaron la sustitución de los términos vesícula, estipe y célula pie por los de "ápice hinchado del conidióforo" (*swollen apex*), "parte media del conidióforo" (*medium part*) y "parte basal del conidióforo" (*basal part*), respectivamente, debido a que se trata de tres partes de una misma estructura. Además, el término estipe se utiliza para denominar otras estructuras fuera del género *Aspergillus*. Los mencionados autores recomendaron la sustitución de los términos fiálide y métula por los de "célula conidiógena" (*conidiogenous cell*) y "célula que

soporta a la célula conidiógena" (*cell supporting conidiogenous cell*) o simplemente "célula soporte" (*supporting cell*), respectivamente. Debido a que los términos biseriado y uniseriado se emplean en los *Ascomycota* para describir la disposición de las ascosporas dentro del asca, se desaconsejó su utilización para denominar la presencia y ausencia de métulas, respectivamente. Dichas propuestas de modificación de la nomenclatura parece no haber prosperado y la mayoría de los investigadores sigue utilizando la terminología tradicional (141) (Figura 1).

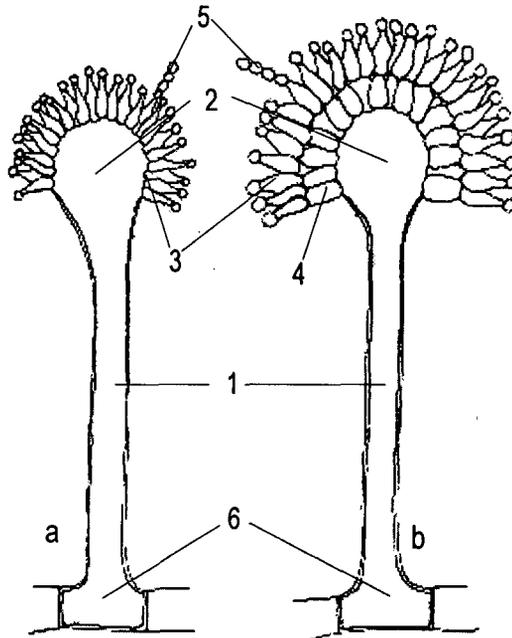


Figura 1. Conidióforos del género *Aspergillus*. a: uniseriado; b: biseriado; 1: estipe o "parte media del conidióforo"; 2: vesícula o "ápice hinchado del conidióforo"; 3: fiálide o "célula conidiógena"; 4: métula o "célula soporte"; 5: conidio; 6: célula pie o "parte basal del conidióforo". Adaptada y ampliada de Klich y Samson (1996).

En el género *Aspergillus*, la ontogenia conidial es holoblástica, es decir, todas las capas de la pared de la célula conidiógena están implicadas en la formación del conidio y la secesión conidial es esquizolítica, lo que implica que el conidio, al madurar, se libera de la célula que lo genera por escisión del septo de separación creado entre ésta y el conidio (108).

Algunas especies del género *Aspergillus* pueden reproducirse sexualmente. Las formas perfectas de *Aspergillus* se incluyen en los géneros *Chaetosartorya*; *Dichlaena*; *Emericella*; *Eurotium*; *Fennellia*; *Hemicarpenales*; *Neosartorya*; *Petromyces*; *Sclerocleista* y *Warcupiella* (Tabla 4) (92).

Algunas especies son capaces de producir esclerocios, formados por masas de hifas endurecidas, generalmente observables a simple vista. Se desconoce la función de los esclerocios si bien se ha especulado con la posibilidad que sean cleistotecios abortados. Algunos miembros del género producen las denominadas células de Hülle, de función desconocida, que comúnmente se asocian con los cleistotecios.

1.2.2. Antecedentes históricos

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por Micheli en el año 1729 en su *Nova Plantarum genera*. Describió las estructuras típicas del género, como los conidióforos y sus cabezas conidiales y la forma de los mismos le recordaron a un hisopo de los usados para bendecir en las ceremonias cristianas cuyo nombre latino es *aspergillum*. Micheli describió, con una nomenclatura latina bi o trinomial, 9 especies dentro del género *Aspergillus*. Años más tarde, Haller, en sus tratados fechados en 1742 y 1768, usó la nomenclatura polinomial y las especies descritas por Micheli, afianzando el nombre de *Aspergillus*. En el año 1801, Persoon incluyó las especies descritas en el género *Aspergillus* en el género *Monilia*, debido a la presencia de cadenas de esporas que recordaban las cuentas de un rosario (142, 227).

Link, en 1809, restableció la definición de *Aspergillus* hecha por Micheli, restringiendo el género a aquellos taxones en los que las cadenas de conidios se originaban en el *capitulum* (cabeza) lo que situó al género fuera de *Monilia*. Link está considerado como el autor que validó el género, describiendo seis especies, entre ellas algunas de las más conocidas del género como *A. flavus*, *A. candidus*, o *A. glaucus*. En el año 1832, Fries sancionó todas las especies establecidas por Link. Inicialmente, las formas perfectas del género *Aspergillus* fueron clasificadas independientemente hasta que, en 1854, De Bary introdujo las técnicas necesarias para estudiar cultivos puros de hongos en el laboratorio, demostrando la relación existente entre los anamorfos de *Aspergillus* y los teleomorfos de *Eurotium* (91, 142, 227).

Wehmer fue el primero en introducir la idea de grupo de especies. Así, en 1901 publicó la monografía *Die Pilzgattung Aspergillus* en la que se describían 102 especies. Éste fue el primer

tratado crítico sobre *Aspergillus* y en él se basó la taxonomía del género en el siglo XX. En 1926 se publicó *The Aspergilli*, el primer tratado en inglés sobre taxonomía del género *Aspergillus*. En dicho estudio, Thom y Church redujeron a 69 las 350 especies descritas hasta la fecha, y las distribuyeron en 11 grupos según criterios morfológicos tales como color y tamaño de la colonia, tamaño y forma de las vesículas, conidios, etc. En 1938, Smith, incidiendo en la importancia de los grupos, simplificó considerablemente las descripciones de las especies. Basándose en el color de las colonias y la forma de las cabezas conidiales, dividió el género en seis grupos que incluían a 20 especies y un conjunto de 12 especies no agrupadas. En su tratado, sólo estaban consideradas las especies que él creyó de mayor incidencia (142, 227).

En 1945, Thom y Raper revisaron el género y publicaron *A Manual of the Aspergilli*, donde describían 80 especies y diez variedades, divididas en 14 grupos. En este tratado, al igual que hicieron Thom y Church, el nombre genérico *Aspergillus* se aplicó a todas las especies, presentaran éstas o no su forma perfecta. Benjamin en 1955 comparó las formas perfectas del género *Aspergillus* y las dividió en tres series relacionadas con los grupos descritos por Thom y Raper. Considerando que debían poseer el rango de género denominó a las series de la siguiente forma: *Eurotium* para el grupo *A. glaucus*, *Emericella* para el grupo *A. nidulans* y *Sartorya* para la serie *A. fischerianus* del grupo *A. fumigatus* (142, 227).

The Genus Aspergillus, la tercera gran revisión del género, fue realizado por Raper y Fenell (1965). Dividieron al género en 18 grupos que agrupaban a 132 especies. No reconocieron la división genérica realizada por Benjamin, con lo que las formas perfectas descritas están incluidas en el género *Aspergillus*. Su clasificación, si bien con amplias modificaciones, aún es utilizada hoy en día. Samson (1979) realizó un compendio de las nuevas especies descritas desde la publicación del manual de Raper y Fennell (1965).

1.2.3. Clasificación actual.

La división en grupos del género *Aspergillus* realizada por Raper y Fennell (1965) no seguía las normas del código de nomenclatura botánica. Con el fin de reemplazar el uso erróneo del término "grupo", Gams *et al.* (1985) reclasificaron el género *Aspergillus* y lo dividieron en seis subgéneros

cada uno de los cuales dividido a su vez en una o más secciones (Tabla 4). Dichas secciones se correspondieron con los grupos descritos por Raper y Fenell (1965). Gams y Samson (1985) tipificaron el género *Aspergillus* y sus teleomorfos y Samson y Gams (1985) tipificaron las especies de *Aspergillus* aceptadas por Raper y Fenell (1965). Klich y Pitt (1988) publicaron un manual de identificación de las especies más frecuentes del género, incluyendo a sus teleomorfos, que incorporó todas estas modificaciones.

Kozakiewicz (1989) realizó una clasificación de las especies de *Aspergillus* más frecuentemente aisladas de productos agralmacenados basándose en la ornamentación de los conidios observada mediante técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM). Dicha clasificación parece haber tenido poca repercusión y no ha sido utilizada por ningún otro autor. Es más, algunos investigadores (276) dudaron de la validez de la técnica de SEM en este tipo de estudios taxonómicos debido a que puede producir artefactos.

Pitt y Samson (1993) elaboraron una lista de 186 especies de *Aspergillus* y de 72 teleomorfos con un anamorfo clasificado dentro de *Aspergillus* para su conservación que fue presentada para su aprobación en el *Fifteenth International Botanical Congress* celebrado en Japón. Así, entre otros, se propuso la conservación del nombre *A. niger* frente a denominaciones más antiguas como *A. phoenicis* o *A. ficuum*. La propuesta de conservación de dicho nombre se hizo en base al poco uso de los nombres que deberían sustituirlos y a la gran importancia económica de *A. niger* (83, 143). La conservación del nombre *A. niger* fue la única propuesta aprobada en dicho congreso (97). La lista de especies realizada por Pitt y Samson (1993), si bien no fue finalmente aprobada, sirve actualmente como referente de los nombres que deben utilizarse para denominar a las especies de *Aspergillus* y sus teleomorfos (97).

Los criterios seguidos hasta este momento para clasificar las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos fueron características morfológicas, tanto macroscópicas como microscópicas. En algunas de las secciones esta aproximación morfológica no fue suficiente y por ello se realizaron diversos estudios bioquímicos o moleculares encaminados a resolver los problemas planteados en la clasificación de dichas secciones.

-
- I **Subgénero *Aspergillus* Gams et al.**
Especie tipo: *A. glaucus* (Mich. ex L.: Fr) Link
Teleomorfo: *Eurotium* Link: Fr., *Edyullia* Subram.
- a. **Sección *Aspergillus* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. glaucus* Thom y Church
Especie tipo: *A. glaucus*
Teleomorfo: *Eurotium* Link: Fr., *Edyullia* Subram.
- b. **Sección *Restricti* Gams et al.**
Sinónimos: Serie *A. restrictus* Thom y Raper
 Grupo *A. restrictus* Raper y Fenell
Especie tipo: *A. restrictus* G. Sm.
Teleomorfo: desconocido
- II **Subgénero *Fumigati* Gams et al.**
Especie tipo: *A. fumigatus* Fres.
Teleomorfo: *Neosartorya* Malloch y Cain
- a. **Sección *Fumigati* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. fumigatus* Thom y Church
Especie tipo: *A. fumigatus*
Teleomorfo: *Neosartorya*
- b. **Sección *Cervini* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. cervinus* Raper y Fennell
Especie tipo: *A. cervinus* Masee
Teleomorfo: desconocido
- III **Subgénero *Ornati* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. ornatus* Raper y Fennell
 (excluyendo las especies con células de Hülle)
Especie tipo: *A. ornatulus* Samson y Gams
Teleomorfo: *Warcupiella* Subram., *Sclerocleista* Subram., *Hemicarpenoteles*
Sarbhoj & Elphick
- IV **Subgénero *Clavati* Gams et al.**
Sección *Clavati* Gams et al.
Sinónimos: Grupo *A. clavatus* Thom y Church.
Especie tipo: *A. clavatus* Desm.
Teleomorfo: desconocido
-

Tabla 4. Clasificación del género *Aspergillus* realizada por Gams et al. (1985) (sigue).

-
- V Subgénero *Nidulantes* Gams et al.**
Especie tipo: *A. nidulans* (Eidam) Winter
Teleomorfo: *Emericella* Berk., *Fennellia* Wiley y Simmons.
- A Sección *Nidulantes* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. nidulans* Thom y Church.
Especie tipo: *A. nidulans*
Teleomorfo: *Emericella*
- B Sección *Versicolores* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. versicolor* Thom y Church.
Especie tipo: *A. versicolor* (Vuill.) Tirab.
Teleomorfo: desconocido.
- C Sección *Usti* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. ustus* Thom y Raper
Especie tipo: *A. ustus* (Bain.) Thom y Church
Teleomorfo: desconocido.
- D Sección *Terrei* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. terreus* Thom y Raper
Especie tipo: *A. terreus* Thom
Teleomorfo: desconocido.
- E Sección *Flavipedes* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. flavipes* Thom y Church
Especie tipo: *A. flavipes* (Bain. y Sart.) Thom y Church
Teleomorfo: *Fennellia*.
- V Subgénero *Circumdati* Gams et al.**
Especie tipo: *A. ochraceus* Wilh.
Teleomorfo: *Petromyces* Malloch y Cain, *Chaetosartorya* Subram.
- A Sección *Wentii* Gams et al.**
Sinónimos: Grupo *A. wentii* Thom y Raper
Especie tipo: *A. wentii* Wehmer
Teleomorfo: desconocido.
-

Tabla 4 (cont). Clasificación del género *Aspergillus* realizada por Gams et al. (1985) (sigue).

-
- B** **Sección Flavi** Gams *et al.*
Sinónimos: Grupo *A. flavus-oryzae* Thom y Church, grupo *A. flavus*
Raper y Fenell.
Especie tipo: *A. flavus* Link: Fr.
Teleomorfo: desconocido.
- C** **Sección Nigri** Gams *et al.*
Sinónimos: Grupo *A. niger* Thom y Church
Especie tipo: *A. niger* van Tieghem
Teleomorfo: desconocido.
- D** **Sección Circumdati** Gams *et al.*
Sinónimos: Grupo *A. ochraceus* Thom y Church
Especie tipo: *A. ochraceus*
Teleomorfo: *Petromyces*
- E** **Sección Candidi** Gams *et al.*
Sinónimos: Grupo *A. candidus* Thom y Raper
Especie tipo: *A. candidus* Link: Fr.
Teleomorfo: desconocido
- F** **Sección Cremei** Gams *et al.*
Sinónimos: Grupo *A. cremeus* Raper y Fennell
Especie tipo: *A. cremeoflavus* Samson y Gams
Teleomorfo: *Chaetosartorya* Subram
- G** **Sección Sparsi** Gams *et al.*
Sinónimos: Grupo *A. sparsus* Raper y Fennell
Especie tipo: *A. sparsus* Raper y Thom
Teleomorfo: desconocido
-

Tabla 4 (cont). Clasificación del género *Aspergillus* realizada por Gams *et al.* (1985).

El análisis de la distribución de los sistemas de ubiquinonas en *Aspergillus* y sus teleomorfos, generalmente Q-9 y Q-10, puede ayudar a la clarificación de la relación entre algunas especies del género, pero no resulta útil para diferenciar especies muy relacionadas (154, 239). Asimismo, el análisis del perfil de isozimas ha sido utilizado por diversos investigadores aunque por el momento tampoco ha resultado ser un sistema práctico de identificación (239, 288, 325).

Algunos autores indican que el estudio de los perfiles de metabolitos secundarios puede ser una técnica útil en la clasificación de *Aspergillus* (239). Los estudios realizados en la sección *Fumigati* confirmaron la separación de taxones propuesta por Raper y Fennell (1965) (84) y demostraron la relación existente entre las secciones *Fumigati* y *Clavati* (239). La producción de micotoxinas también puede resultar de ayuda en la identificación de ciertas especies. Así, en la sección *Flavi* se encontró una buena correlación entre la morfología de las especies y su capacidad de producir aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ y ácido ciclopiazónico (140)

Se han diseñado técnicas de ELISA y de aglutinación en látex para detectar polisacáridos extracelulares de ciertas especies de *Aspergillus*. En este sentido, pueden producirse anticuerpos especie-específicos o género-específicos (196). Estas técnicas inmunológicas son de gran utilidad para la detección rápida de *Aspergillus* en el suero de pacientes con aspergilosis (163) o para detectar la presencia de *Aspergillus* en alimentos. (88, 239).

De entre las técnicas moleculares aplicadas a la taxonomía de *Aspergillus* como el porcentaje de G+C (155, 156), las técnicas de complementaridad de DNA (155, 156), el análisis de cariotipo (178, 289) o la secuenciación génica (183, 312, 320), podemos destacar el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y el análisis de polimorfismos del DNA amplificado aleatoriamente (RAPD) (16). Estas técnicas han sido ampliamente usadas para revisar la taxonomía de las especies incluidas en varias secciones del género *Aspergillus*, especialmente en aquellas en las que la clasificación morfológica presenta más problemas, como pueden ser las secciones *Nigri* (apartado 1.3.1.2) o *Flavi*.

En un estudio realizado con cepas de la Sección *Circumdati*, se observó que los RFLP de mtDNA obtenidos mediante digestión con *HaeIII* fueron especie-específicos salvo en el caso de *A. ochraceus* y *A. petrakii*, que presentaron patrones idénticos. Los patrones de RFLP de rDNA obtenidos mediante la digestión con *SmaI* del DNA total sugirieron posibles relaciones entre algunas especies del grupo (49).

Las técnicas de RFLP se han utilizado para diferenciar especies muy próximas dentro de la Sección *Flavi* (155, 156). Así pues, mediante digestión con *SmaI* del DNA total se obtuvieron unos patrones

que permitían distinguir entre *A. flavus*, *A. sojae*, *A. oryzae* y *A. parasiticus* (138). Yuan *et al.* (1995) diferenciaron cepas de *A. parasiticus* y *A. sojae* en base a los patrones de RAPD obtenidos. Otros investigadores (184, 185) pudieron diferenciar, mediante digestión del DNA con *HinfI* y *RsaI*, *A. flavus*, *A. nomius* y *A. parasiticus*, si bien el pequeño grado de variación obtenido entre los patrones hacía concluir a los autores que se trataba de especies muy relacionadas.

Los estudios moleculares realizados en la Sección *Fumigati* tienen básicamente por objetivo la caracterización de especies aisladas de muestras clínicas y así se han obtenido patrones de hibridación específicos de *A. fumigatus* usando sondas de diversos orígenes (64, 163). Por otra parte, también se han aplicado técnicas moleculares, como el análisis de RFLP del rDNA y mtDNA, para intentar clarificar la taxonomía de esta sección (230).

Con respecto a la Sección *Nidulantes*, a pesar de la variedad fenotípica observada en *A. nidulans*, se pudo demostrar muy poca variabilidad a nivel genotípico en dicha especie mediante análisis de RFLP con o sin hibridación con distintas sondas y análisis de RAPD (48, 49).

1.3. *Aspergillus* sección *Nigri* (Gams *et al.*).

Los componentes de la sección *Nigri* son unos de los de mayor importancia del género *Aspergillus*. De distribución ubicuitaria, se aíslan de infinidad de substratos: semillas, granos, forrajes, piensos, frutas, verduras y cuero, entre otros, siendo especialmente abundantes en suelos de las áreas tropicales y subtropicales (68; 216, 227). Algunas especies de la sección, como *A. niger* o *A. awamori*, se utilizan a nivel industrial como productoras de ácidos y enzimas. Estos productos de *A. niger* y *A. awamori* poseen la categoría GRAS (*generally regarded as safe*) de la FDA (24). Algunas especies de la sección *Nigri* como *A. niger*, *A. awamori* o *A. foetidus* se utilizan en la elaboración de alimentos y bebidas tradicionales, principalmente en el lejano oriente (45).

1.3.1. Clasificación.

La taxonomía de los componentes de *Aspergillus* sección *Nigri* es una de las complejas del género. Dicha complejidad se debe en gran parte a lo minucioso de los estudios realizados (11, 227), ya que las diferencias descritas entre algunos taxones son tan sutiles que es muy difícil distinguirlos con certeza. Por otra parte, al ser unas especies distribuidas por todo el mundo y ser ampliamente utilizadas a nivel industrial, muchos de sus nombres, a veces obsoletos, han visto su uso conservado a lo largo de la historia.

Ya en 1729, cuando Micheli describió por primera vez el género *Aspergillus*, una de las nueve especies que describió fue *Aspergillus capitatus capitulo pullo*, un *Aspergillus* de color negro. Posteriormente, otros autores incluyeron especies pertenecientes a la sección *Nigri* en otros géneros, como por ejemplo *Ustilago phoenicis* o *U. ficuum*, que más tarde serían denominadas como *A. phoenicis* o *A. ficuum*, respectivamente. Cramer, en el año 1859 describió el género *Sterigmatocystis* con el fin de agrupar a las especies biseriadas de *Aspergillus*. La especie tipo, *S. antacustica*, fue un *Aspergillus* de la Sección *Nigri* y es considerada hoy día como un probable sinónimo de *A. niger*. Pese a que en 1901, Wehmer, en su tratado sobre *Aspergillus*, reúne en un solo grupo a las especies negras de *Sterigmatocystis* y *Aspergillus*, algunos autores continuaron describiendo especies de *Aspergillus* negros dentro del género creado por Cramer. Spegazzini, en el año 1911, complicó aún más las cosas describiendo un nuevo género, *Aspergillopsis*, en el que incluyó las especies negras de *Sterigmatocystis*, si bien esta propuesta no tuvo una gran aceptación (11).

Thom y Church, en 1926, agruparon las especies de *Aspergillus* en base a sus características morfológicas y describieron 13 especies (tanto uniseriadas como biseriadas) dentro de lo que ellos definieron como el grupo *A. niger* (11). En 1934, Mosseray describió hasta 35 especies de *Aspergillus* negros, de las que 25 eran nuevas especies o nuevas combinaciones (227). La clave de identificación que realizó es poco práctica debido a la gran cantidad de características que contempla. En su tratado del año 1945, Thom y Raper redujeron el número de especies a 15 y subdividieron el grupo *A. niger* en tres series según el tamaño de los conidios y la ausencia o presencia de métulas (11).

1.3.1.1. Criterios morfológicos.

En 1965 se realiza el gran paso hacia la clarificación de la taxonomía del género *Aspergillus* con la publicación del manual de Raper y Fenell, que redujeron a 12 el número de especies dentro del que ellos denominaron Grupo *A. niger*, basándose en características morfológicas tales como el tamaño y color de la colonia, presencia o ausencia de métulas, tamaño, forma y ornamentación de los conidios, etc. Pese a todo, la distinción entre algunas de las especies del grupo *A. niger* en su clave es muy sutil y puede inducir a error. Samson (1979), en su compendio de especies de *Aspergillus* descritas desde la publicación del manual de Raper y Fennell (1965), no aceptó ninguna especie nueva dentro de la sección *Nigri*.

Al Musallam (1980) realizó una gran revisión de las especies negras del género *Aspergillus*, basándose en características morfológicas y de cultivo y dividió el grupo en 5 especies claramente distinguibles entre sí y el agregado *A. niger*, formado por dos especies: *A. foetidus* y *A. niger*, ésta última dividida a su vez en seis variedades y dos formas. Las modificaciones a la taxonomía de la Sección *Nigri* propuestas por Al Musallam fueron aceptadas en la clave que aparece en el manual de Klich y Pitt (1988).

Dentro de la sección existen unas especies fácilmente distinguibles por sus características morfológicas: *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. helicothrix*, *A. ellipticus* y *A. heteromorphus*. Dichas especies tienen los siguientes rasgos distintivos (11):

- *A. japonicus*: es la única especie uniseriada de la Sección *Nigri*. Esta especie incluye dos variedades, *A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var. *aculeatus*, que se diferencian por el tamaño de las vesículas, menores o mayores de 45 μm , respectivamente.
- *A. carbonarius*: esta especie se reconoce fácilmente debido al gran tamaño de todas sus estructuras microscópicas y, especialmente, por sus conidios de más de 6 μm de diámetro.
- *A. helicothrix*: presenta unos característicos esclerocios recubiertos por hifas espiriladas y unos conidios de más de 6 μm de diámetro.
- *A. ellipticus*: este taxón es reconocible por sus conidios típicamente elípticos.

- *A. heteromorphus*: esta especie se distingue por presentar en algunas cabezas conidiales métulas anormalmente alargadas, que presentan el ápice hinchado y recubierto éste por métulas y fiálides normales, como si fueran unas cabezas conidiales secundarias.

Los integrantes del agregado *A. niger* se caracterizan por presentar unas colonias con tonalidades negruzcas y conidios más o menos globosos, de diámetros inferiores a 6 μm y una ornamentación más o menos marcada (11). Dicho agregado está compuesto por los siguientes taxones:

- *A. niger* var. *niger*
- *A. niger* var. *niger* f. *hennebergii*
- *A. niger* var. *phoenicis*
- *A. niger* var. *phoenicis* f. *pulverulentus*
- *A. niger* var. *awamori*
- *A. niger* var. *nanus*
- *A. niger* var. *usamii*
- *A. niger* var. *intermedius*
- *A. foetidus*.

Las dos especies que integran el agregado, *A. niger* y *A. foetidus* se diferenciaron por el diámetro de las colonias, mientras que las variedades de *A. niger* se diferenciaron básicamente según el grado de rugosidad y la ornamentación de los conidios. Algunos de los tipos de ornamentación descritos son muy difíciles de diferenciar entre sí, lo que hace que dichas variedades sean morfológicamente idénticas.

Gams *et al.* (1985), al reclasificar el género *Aspergillus* de acuerdo con las normas del código de nomenclatura botánica, crearon la sección *Nigri*, incluida dentro del subgénero *Circumdati*. *A. niger* fue considerada la especie tipo de la sección (Tabla 4).

Kozakiewicz (1989), observó que la maduración de los conidios de las especies de la sección *Nigri* es lenta y, en el caso de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, puede demorarse hasta las 5 semanas de incubación en condiciones óptimas. Así, desestimó la clasificación realizada por Al

Musallam (1980) y propuso una clasificación distinta de la sección, basándose en la ornamentación de los conidios utilizando técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM). En su estudio distinguió dos patrones básicos de ornamentación conidial: conidios verrugosos o conidios espinosos y dividió a los *Aspergillus* negros en diez especies y ocho variedades: *A. carbonarius*; *A. fonsecaeus*; *A. heteromorphus*; *A. ellipticus*; *A. helicothrix*; *A. japonicus*; *A. atroviolaceus*; *A. acidus*; *A. citricus*, con dos variedades, *A. citricus* var. *citricus* y *A. citricus* var. *pallidus* y *A. niger*, con 6 variedades, *A. niger* var. *niger*, *A. niger* var. *tubingensis*, *A. niger* var. *phoenicis*, *A. niger* var. *pulverulentus*, *A. niger* var. *awamori* y *A. niger* var. *ficuum*. Dicha clasificación parece haber tenido poca repercusión y no ha sido utilizada por ningún otro autor.

En la Tabla 5 se resumen las clasificaciones de *Aspergillus* sección *Nigri* realizadas por Raper y Fennell (1965), Al Musallam (1980) y Kozakiewicz (1989).

Algunos autores han descrito, basándose en características morfológicas, dos nuevas especies dentro de la sección *Nigri* aisladas de muestras de suelo del área del mar Muerto (277).

Cabe destacar que, en Japón, debido al gran interés que estos hongos tienen en la industria, existe un sistema de clasificación distinto basado en características morfológicas y fisiológicas para ordenar las especies que integran la Sección *Nigri* (11, 189, 190).

1.3.1.2. Otros criterios.

Las dificultades que presenta la clasificación morfológica de las especies de la sección *Nigri*, especialmente en el caso de los componentes del agregado *A. niger*, propiciaron la aplicación de otros criterios de clasificación tales como la capacidad de hidroxilar la progesterona (75), la asimilación de fuentes de carbono (104, 134), el análisis de isozimas (104, 134, 178) o técnicas de biología molecular (104, 134, 143, 157, 158, 178, 309, 310, 315).

Raper y Fennell (1965)	Al Musallam (1980)	Kozakiewicz (1989)	Análisis de RFLP*
<i>A. carbonarius</i> (Bainier.) Thom	<i>A. carbonarius</i> (Bain.) Thom	<i>A. carbonarius</i> (Bain.) Thom	<i>A. carbonarius</i> (134, 178)
<i>A. heteromorphus</i> Batista y Maia	<i>A. heteromorphus</i> Bat. y Maia	<i>A. fonsecaeus</i> Thom y Raper.	
<i>A. ellipticus</i> Raper y Fennell, sp. nov.	<i>A. ellipticus</i> Raper y Fennell emend. Al Musallam	<i>A. heteromorphus</i> Bat. y Maia	<i>A. heteromorphus</i> (158, 178)
	<i>A. helicothrix</i> Al Musallam, sp. nov.	<i>A. ellipticus</i> Raper y Fennell	<i>A. ellipticus</i> (158, 178)
	<i>A. japonicus</i> Saito var. <i>japonicus</i>	<i>A. helicothrix</i> Al Musallam	
<i>A. aculeatus</i> Iizuka	<i>A. japonicus</i> Saito var. <i>aculeatus</i> (Iizuka) Al Musallam, comb. nov.	<i>A. japonicus</i> Saito	<i>A. japonicus</i> (104, 158, 178)
<i>A. niger</i> van Tiegh.	<i>A. japonicus</i> Saito var. <i>aculeatus</i> (Iizuka) Al Musallam, comb. nov.	<i>A. atroviolaceus</i> Moss.	<i>A. aculeatus</i> (104)
<i>A. ficuum</i> (Reichard) Hennings	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>niger</i>	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>niger</i>	
<i>A. tubingensis</i> (Schöber) Mosseray		<i>A. niger</i> var. <i>tubingensis</i> (Moss.) Kozakiewicz, comb. nov.	
	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>niger</i> f. <i>hennebergii</i> Blochwitz ex Al Musallam, comb. nov.	<i>A. niger</i> var. <i>phoenicis</i> (Corda) Al Musallam, comb. nov.	
<i>A. phoenicis</i> (Corda.) Thom		<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>phoenicis</i> (Corda) Al Musallam, comb. nov.	<i>A. niger</i> o <i>A. tubingensis</i> (158, 178, 206, 309, 310)
<i>A. pulverulentus</i> (McAlp.) Thom	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>phoenicis</i> (Corda) f. <i>pulverulentus</i> (McAlp) Al Musallam, comb. nov.	<i>A. niger</i> var. <i>pulverulentus</i> (McAlp) Kozakiewicz, comb. nov.	
<i>A. awamori</i> Nakazawa	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>awamori</i> (Nakazawa) Al Musallam, comb. nov.	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>awamori</i> (Nakazawa) Al Musallam	
	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>nanus</i> (Mont.) Al Musallam, comb. nov.	<i>A. niger</i> var. <i>ficuum</i> (Reich.) Kozakiewicz, comb. nov.	
	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>usamii</i> (Sakaguchi et al.) Al Musallam, comb. nov.		
	<i>A. niger</i> van Tiegh. var. <i>intermedius</i> (Speg.) Al Musallam, comb. nov.		
<i>A. foetidus</i> (Naka.) Thom y Raper			* <i>A. brasiliensis</i> * (302)
<i>A. foetidus</i> (Naka.) T. y R. var. <i>acidus</i> Naka., Simo y Watanabe	<i>A. foetidus</i> Thom y Raper	<i>A. acidus</i> Kozakiewicz, sp. nov.	
<i>A. foetidus</i> (Naka.) T. y R. var. <i>pallidus</i> Naka., Simo y Watanabe		<i>A. citricus</i> (Wehrmer) Moss. var. <i>citricus</i>	¿ <i>A. foetidus</i> ? (206)
		<i>A. citricus</i> var. <i>pallidus</i> (Naka., Simo y Watanabe) Kozakiewicz, comb. nov.	

*Situación de la sección *Nigri* según los estudios moleculares realizados.

Tabla 5. Especies de *Aspergillus* sección *Nigri* contempladas en los distintos estudios realizados.

La asimilación de distintas fuentes de carbono por parte de cepas de la Sección *Nigri* fue ensayada por diversos investigadores (104, 134). En dichos estudios se probaron más de cien compuestos entre azúcares, alcoholes, oligo y polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc. Siete de estos compuestos: melicitosa, xilitol, galactitol, ácido vanílico, ácido cis-aconítico, L-serina y L-tirosina dieron lugar a ciertos patrones de asimilación de fuentes de carbono por parte de las cepas estudiadas. Los resultados obtenidos fueron muy homogéneos, encontrándose pocas variaciones dentro de los tres grupos de cepas ensayadas: cepas del agregado *A. niger*, cepas de *A. carbonarius* y cepas de *A. japonicus* y *A. aculeatus*. Más del 95% de las 400 cepas ensayadas del agregado *A. niger* fueron capaces de utilizar como única fuente de carbono los compuestos previamente mencionados, a excepción de la L-tirosina. Las restantes cepas no fueron capaces de asimilar la melicitosa, el xilitol o el galactitol (104, 134). Con respecto a los ensayos realizados con cepas de *A. carbonarius*, la melicitosa y el xilitol fueron utilizados como única fuente de carbono por todas las cepas. Por el contrario ninguna cepa asimiló el ácido vanílico, el ácido cis-aconítico, la L-serina y la L-tirosina, mientras que en el caso del galactitol los resultados obtenidos fueron variables (134). En el estudio realizado por Hamari *et al.* (1997) con las especies uniseriadas de la sección *Nigri*, sólo una cepa fue capaz de asimilar las siete fuentes de carbono anteriormente mencionadas, mientras que otra no pudo usar ninguna y las 38 restantes sólo asimilaron la L-tirosina como única fuente de carbono.

Se han realizado varios estudios en los que se incluyó el análisis de isozimas de cepas de la sección *Nigri* (104, 134, 178). En un estudio que incluía cepas de colección del agregado *A. niger* y una cepa de cada una de las siguientes especies: *A. carbonarius*, *A. ellipticus*, *A. helicothrix*, *A. heteromorphus*, *A. japonicus* y *A. aculeatus* (178) se demostró mediante el análisis de la aspartato transaminasa, la dihidrofolato reductasa, la 6 fosfogluconato deshidrogenasa y la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa una gran variabilidad entre las cepas ensayadas. Estos resultados coincidieron con los obtenidos mediante el análisis de RAPD, y RFLP de rDNA en el mismo estudio (178). En un estudio con aislamientos de *A. carbonarius*, se obtuvieron unos patrones constantes en la mayoría de las cepas ensayadas con la malato deshidrogenasa NADP dependiente y con la glutamato deshidrogenasa NADP dependiente ya que solamente dos cepas mostraron un patrón distinto en el primer caso y sólo una en el segundo. Todas las cepas de *A. carbonarius* se comportaron homogéneamente en el caso de la malato deshidrogenasa NAD dependiente (134). En un estudio

realizado con *A. japonicus* y *A. aculeatus*, mediante el análisis de la superóxido dismutasa y la lactato deshidrogenasa no se demostró ninguna variabilidad entre las 40 cepas ensayadas. Por el contrario, mediante el análisis de la arilesterasa y las glutamato y malato deshidrogenasas se observó una gran variabilidad intraespecífica, en contraposición con los resultados obtenidos mediante RFLP de rDNA (104).

En el primer estudio realizado aplicando técnicas de biología molecular con cepas de especies pertenecientes al agregado *A. niger* se obtuvieron, mediante doble digestión del mtDNA con *HindIII* y *EcoRI*, unos resultados un tanto sorprendentes. Los patrones de RFLP obtenidos indicaron sólo una ligera relación entre *A. niger* y *A. awamori* y que *A. niger* estaba filogenéticamente más cerca de *A. oryzae* que de *A. awamori* (144).

Kusters van Someren *et al.* (1990) basándose en técnicas de Southern blot usando el gen *peID* como sonda y un análisis de Western blot de la pectina liasa no pudieron diferenciar las cepas del agregado *A. niger* ensayadas. En un trabajo posterior (158) realizado con 23 cepas de colección de la sección *Nigri* (mayoritariamente integrantes del agregado *A. niger*) estudiaron los patrones de RFLP del rDNA obtenidos mediante digestión del DNA total con *SmaI*. Basándose en los patrones de RFLP obtenidos, propusieron la división del agregado *A. niger* en dos especies morfológicamente idénticas: *A. niger* (rDNA tipo I) y *A. tubingensis* (rDNA tipo II), denominadas así ya que entre las cepas del grupo I se encontraba la cepa neotipo de *A. niger* (CBS 554.65) y entre las del grupo II, la cepa tipo de *A. tubingensis* (CBS 134.48). Estos resultados se confirmaron mediante análisis de Southern blot, usando como sondas a varios genes de pectina liasa. Entre cepas de los dos grupos no se observó la formación de heterokarion. La propuesta de separación del agregado *A. niger* en las dos mencionadas especies fue confirmada en estudios posteriores (Tabla 6) (178, 206, 309, 310, 315).

	Kusters van Someren <i>et al.</i> (1991)	Megn�n�n�au <i>et al.</i> (1993)	Varga <i>et al.</i> (1993)	Varga <i>et al.</i> (1994)	Parenticov� <i>et al.</i> (1997)	
	RFLP rDNA	RFLP rDNA	RFLP mtDNA	RFLP rDNA	RFLP/Southern 28S	RFLP/Southern <i>pe/A</i>
<i>A. niger</i> *	I	I	1a 1b 1c	I I' 1c 1d 1e	C	E / F / D
<i>A. tubingensis</i> *	II	II II'	2a 2b	II II'	B / D	B / A
" <i>A. brasiliensis</i> "				III		
¿ <i>A. foetidus</i> ?				3		
* Especies propuestas por Kusters van Someren (1991)						

Tabla 6. Distintos patrones de RFLP presentados por las cepas del agregado *A. niger* ensayadas en los estudios realizados.

Megnegneau *et al.* (1993) confirmaron los resultados de Kusters van Someren *et al.* (1991) mediante análisis de RFLP del DNA total digerido con distintas enzimas de restricción (*Sma*I, *Eco*RI y *Pst*I). En las cepas de colección del agregado *A. niger* se obtuvieron cuatro patrones de RFLP de rDNA (I, I', II y II'), que podían agruparse en dos grupos principales (I y II). Estos dos grupos principales se correspondieron con las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991). Mediante análisis de RAPD demostraron la existencia de una gran variabilidad intraespecífica, compatible con los resultados obtenidos con los RFLP de rDNA. En este estudio (Megnegneau *et al.* 1993), el análisis de cariotipo mostró una notable variación entre las cepas ensayadas.

Varga *et al.* (1993), en un estudio realizado con cepas de colección del agregado *A. niger*, obtuvieron cinco patrones de RFLP de mtDNA (1a, 1b, 1c, 2a y 2b) al digerir el DNA total y el mtDNA con distintas enzimas de restricción. Dichos patrones se podían agrupar en dos grupos principales (1 y 2) que se correspondían con las dos especies propuestas por Kusters van Someren (1991). Posteriormente, en un estudio con aislamientos de suelos del agregado *A. niger* (309) confirmaron la existencia de un gran nivel de variación en el mtDNA dentro del agregado, describiendo hasta doce patrones distintos de mtDNA. Todos los patrones excepto uno podían agruparse en los dos tipos 1 y 2 correspondientes a *A. niger* y *A. tubingensis*. Este tercer patrón de RFLP sólo se mostró en seis cepas aisladas de muestras de tierra del Brasil. Los autores apuntaron la posibilidad que esas cepas correspondieran o bien a una subespecie de *A. niger* o bien a una especie nueva dentro del agregado que, de manera provisional, se denominó "*A. brasiliensis*". Los resultados obtenidos mediante RFLP de mtDNA se confirmaron con RFLP de rDNA.

Kevei *et al.* (1997) demostraron que es posible transferir mitocondrias entre cepas del agregado *A. niger* con distintos patrones de mtDNA. Dicha transferencia no fue posible entre cepas del agregado *A. niger* y cepas de *A. carbonarius* o *A. japonicus* (135).

La división del agregado en dos especies, *A. niger* y *A. tubingensis*, fue confirmada de nuevo mediante digestión del DNA total con distintas enzimas de restricción e hibridación con varias sondas (315). En un nuevo estudio (206) se describió un nuevo patrón de RFLP entre algunas de las cepas de colección ensayadas pertenecientes al agregado *A. niger* mediante la digestión del

DNA total con *Pst*I y *Sal*I. Sin embargo, las cepas que presentaron este nuevo patrón podían clasificarse como *A. niger* o *A. tubingensis* al analizar sus RFLP de DNA total digerido por *Sma*I según el método propuesto por Kusters van Someren *et al.* (1991). Parenicová *et al.* (1997) propusieron la división del agregado en tres especies, morfológicamente idénticas: *A. niger*, *A. tubingensis* y una especie por denominar descrita en torno a variedades de *A. foetidus*.

Mediante técnicas de Southern blot usando el gen *pelD* como sonda y análisis de Western blot de la pectina liasa, Kusters van Someren *et al.* (1990) obtuvieron patrones diferenciados en cepas de colección de *A. japonicus*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus* y *A. ellipticus*, si bien los resultados obtenidos con ambas técnicas mostraron una baja correlación. Posteriormente, en 1991, mediante digestión del DNA total con *Sma*I obtuvieron un patrón de RFLP diferenciado en dos de las tres cepas ensayadas de *A. carbonarius*. La cepa restante presentó el mismo patrón de bandas que *A. tubingensis* (rDNA tipo II). Algunos autores (178, 206) sugirieron que dicha cepa estaba mal identificada y Visser *et al.* (1996) la identificaron como *A. tubingensis*. La cepa de *A. helicothrix* ensayada por Kusters van Someren *et al.* (1991) presentó el mismo patrón que la de *A. ellipticus*, por lo que los autores la consideraron como una variante de *A. ellipticus*.

Mediante análisis de RFLP del rDNA y análisis de RAPD, Megnegneau *et al.* (1993) detectaron patrones claramente diferenciados para las cepas de *A. carbonarius*, *A. ellipticus* y *A. japonicus* ensayadas. Parenicová *et al.* (1997) describieron también patrones de RFLP diferenciados para *A. carbonarius* y en el caso de *A. heteromorphus* y *A. ellipticus*, observaron unos patrones muy parecidos entre ellos, pero claramente distintos del resto de las especies de la sección ensayadas.

Kevei *et al.* (1996) realizó un estudio con 13 cepas de *A. carbonarius* aplicando técnicas de Southern blot, con *pMN1* como sonda; RFLP de DNA total y mitocondrial y RAPD. Todas las cepas excepto una mostraron una gran uniformidad. La cepa discordante ha sido presentada por parte de los autores como una posible subespecie, a la que denominaron como "*A. carbonarius* var. *indicus*". El análisis RAPD fue útil para detectar características específicas de cada cepa (134).

En el caso de las especies uniseriadas se ha realizado un estudio (104) con 40 cepas aplicando las técnicas anteriormente mencionadas. No se observó ninguna variabilidad en los patrones de RFLP

de rDNA y se encontraron hasta siete patrones distintos de RFLP al digerir el mtDNA. Uno de estos grupos estaba formado por las tres cepas de *A. aculeatus* estudiadas, lo que demostró, según los autores, que se trata de una especie diferenciada y no de una variedad como concluyó Al Musallam (1980). El análisis RAPD detectó variabilidad entre los grupos de RFLP y características específicas de cada cepa (104). Sin embargo, otros estudios no distinguieron entre los patrones de RFLP obtenidos de las cepas ensayadas de *A. aculeatus* y *A. japonicus* (158, 206) y sugirieron que se trata de una sola especie (158).

1.3.2. Capacidad micotoxigénica.

Algunas de las especies de la sección *Nigri* son capaces de producir micotoxinas (Tabla 7). Así, los integrantes del agregado *A. niger* producen ocratoxina A (OA) (3), malforminas y naftopironas (85). *Asperillus carbonarius* también produce OA (115) y naftopironas (85). La OA es la más importante de las micotoxinas producidas por la sección *Nigri*. La producción de OA por parte de la sección *Nigri*, reviste una especial importancia, debido al extensivo uso que en la industria alimentaria se hace de especies como *A. niger*, que dispone de la categoría GRAS de la FDA (24) y por otra parte, por la gran incidencia de estas especies en todo el mundo.

1.4. Las ocratoxinas

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas, producidas por algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La OA es la más importante de ellas y se caracteriza por ser nefrotóxica, carcinogénica, teratógena e inmunosupresora. Está formada por una dihidrocumarina unida en su grupo 7-carboxilo a una molécula de L-β-fenilalanina mediante un enlace amida. Su estructura química es la siguiente: (R)-N-((5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil)-L-fenilalanina (Figura 2). La ocratoxina B (OB) es el derivado dicloro de la OA y la ocratoxina C (OC) es el etil éster de la OA. La OA, junto con su metil éster y la 4R-hidroxi-OA, la OB, junto con sus metil y etil ésteres y la OC son metabolitos fúngicos. La ocratoxina α (Oα) y la ocratoxina β (Oβ) son productos de la hidrólisis de la OA y la OB, respectivamente, no poseen la mitad fenilalanina y no son tóxicos (152, 153). La Oα ha sido aislada de la orina de animales de experimentación a los que se administró OA (275, 285). La OA está estructuralmente relacionada

con la citrinina (153), otra importante micotoxina que puede aparecer como co-metabolito de la OA en *P. verrucosum* (216).

Especie	Metabolito
<i>A. aculeatus</i>	Ácido secalónico B, D y F Aculeasinas Eumodina Endocrocina Neoxalina
<i>A. japonicus</i>	E-64
<i>A. carbonarius</i>	Naftopironas Ocratoxina A*
<i>A. niger</i>	Ácido glutacónico Ácido 4 hidroximandélico Ácido kójico (?) Ácido monoglucosil oxi octadecanoico Aspergillinas Aspereillonas Asperrubrol Dehidroflavininas Flaviolina Genisterinas Malforminas A ₁ , A ₂ , B ₁ , B ₂ , C Naftopironas Neoequinulina A Nigerazinas Nigragillina Ocratoxina A* Orlandina Tubingensina A y B

Tabla 7: Micotoxinas y otros metabolitos secundarios producidos por las especies de la sección *Nigri* (adaptada y ampliada* de Frisvad y Samson, 1991)

1.4.1. Hongos productores y biosíntesis.

La ocratoxina A fue aislada por primera vez en Sudáfrica en 1965 a partir de un cultivo de *A. ochraceus* (179). Posteriormente se constató que dicha toxina era producida también por otras especies de la sección *Circumdati* (el antiguo grupo *A. ochraceus*) tales como *A. sulphureus*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus* y *A. petrakii* (111). Recientemente, *A. auricomus* y *A. albertensis* han sido descritos también como productoras de OA (311).

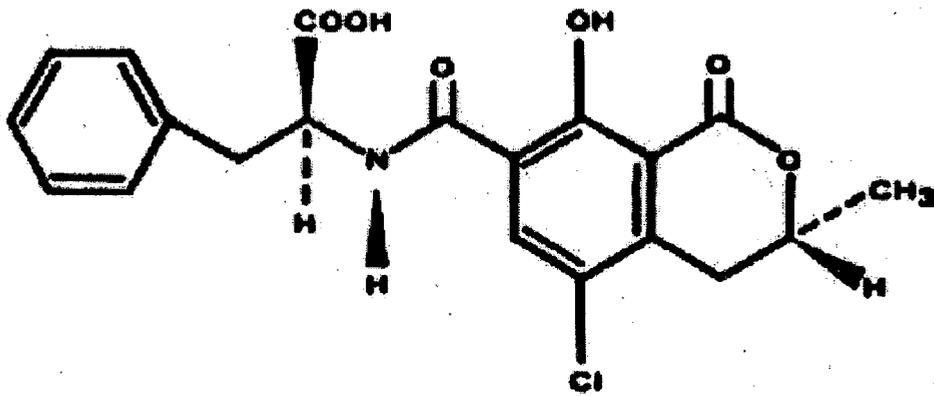


Figura 2. Fórmula química de la OA.

La producción de OA por especies del género *Aspergillus* no se restringe a la sección *Circumdati*. Así, se describió la capacidad ocratoxigénica de las siguientes especies: *E. chevalieri* (245) y *E. herbariorum* (58) de la sección *Aspergillus*; *A. fumigatus* de la sección *Fumigati* (1, 290); *A. awamori* (200, 296), *A. carbonarius* (109, 115, 296, 322), *A. foetidus* (304), *A. niger* (3, 109, 191, 295, 296) y *A. usarii* (200) dentro de la sección *Nigri*; *A. terreus* en la sección *Terrei* (304); *A. ustus* de la sección *Usti* (304); *A. sydowii* (304) y *A. versicolor* (1) de la sección *Versicolores* y *A. wentii* de la sección *Wentii* (311).

Aunque la OA se describió inicialmente como un metabolito de *A. ochraceus*, se detectó poco después en cepas de *Penicillium viridicatum* (317) y posteriormente en otras especies, en algunos casos no siempre correctamente identificadas dada la complejidad taxonómica del género *Penicillium*. Pitt (1987) demostró que las cepas de *P. viridicatum* ocratoxigénicas eran en realidad cepas de *P. verrucosum*. Este error de identificación se ha perpetuado hasta hoy por lo que cabe remarcar que *P. verrucosum* es la única especie del género *Penicillium* actualmente considerada como ocratóxigénica (216).

Generalmente se considera que *P. verrucosum* es el responsable de la producción de OA en zonas frías mientras que la contaminación por OA en zonas más cálidas se atribuye a *A. ochraceus* (177). Sin embargo, parece posible que las especies ocratoxigénicas de la sección *Nigri* sean las responsables de la contaminación por OA en zonas tropicales donde *A. ochraceus* no parece estar

muy extendido y *P. verrucosum*, más propio de zonas frías, no tiene su nicho ecológico (216). Las especies ocratoxigénicas de la sección *Nigri* podrían ser el origen de la OA presente en substratos procedentes de zonas tropicales o ecuatoriales como, por ejemplo, los granos de café (191, 294).

La detección de cepas ocratoxigénicas en el laboratorio se realiza mediante cultivos en substratos naturales tales como arroz (115, 182, 200), maíz (1, 3, 111, 179) o trigo (51, 58, 111, 175) y en medios semisintéticos líquidos (1, 3, 51, 127, 244, 311, 317) o sólidos (26, 109, 215). La producción depende principalmente de la temperatura y de la a_w del sustrato (153). A una a_w óptima, el rango de temperaturas de producción de OA por parte de *A. ochraceus* es de 12-37°C y en el caso de *P. verrucosum*, de 4-31°C. Para *A. ochraceus* y *P. verrucosum*, las a_w mínimas necesarias para la producción de OA oscilan entre 0.83 y 0.90 y las a_w óptimas entre 0.85 y 0.99, a una temperatura de 24°C (177).

1.4.2. Incidencia

Debido a la amplia distribución de los hongos que la producen, la OA es una micotoxina de distribución mundial. La OA se ha detectado en substratos vegetales, principalmente cereales, así como en cerdos y aves alimentados con piensos contaminados, en un elevado número de países (5, 113, 153, 220, 278, 327). Sin embargo, en los últimos años, se ha detectado también la presencia de OA en otro tipo de substratos (Tabla 8).

Debido a la amplia distribución de la OA en diferentes substratos en todo el mundo, el hombre se encuentra cada vez más expuesto a esta micotoxina. Cada vez son más los estudios en los que se detecta OA en el hombre, especialmente en suero (Tabla 9). La detección de OA en suero humano ha sido sugerida como un indicador del nivel de exposición del hombre a dicha micotoxina (220).

Substrato	País	Fuente
Café	Dinamarca	130
	España	31
	Hungría	294
	Reino Unido	209
	Suiza	30, 221
	USA	300
	Japón	191, 303, 304
Cerveza	Alemania	63
	España	163
	Dinamarca	163
	Japón	192, 303
Licores	Japón	303
Vinos y mosto	Alemania	329
	España	33
	Italia	314
	Japón	303
Salsa de soja	Japón	303
Leche de vaca	Noruega	269

Tabla 8. Incidencia de OA en diversos alimentos.

1.4.3. Metabolismo y mecanismo de acción

Los grupos fenólico y carboxílico dan a la molécula de OA unas propiedades débilmente ácidas. La difusión de las formas no ionizadas a través de la membrana lipídica es el principal mecanismo de penetración en el tracto gastrointestinal. La absorción de la OA tiene lugar en los tramos superiores del tracto gastrointestinal siendo máxima en el yeyuno proximal. En el torrente sanguíneo la OA se encuentra unida a la albúmina y esta unión con las proteínas sanguíneas es reversible (90).

La OA se hidroliza, convirtiéndose en $O\alpha$ en distintos lugares. En los rumiantes esta transformación la efectúan los microorganismos del rumen, lo que los hace relativamente resistentes a los efectos de la OA ingerida (121, 136). En terneros, un 85-90% de la OA se eliminó en forma de $O\alpha$, mayoritariamente en la orina (275). No obstante, recientemente se ha detectado también la presencia de OA en la leche (269). En roedores, la hidrólisis la llevan a cabo las bacterias a nivel del ciego, si bien en el duodeno, íleon y páncreas también se produce esta reacción. Las enzimas carboxipeptidasa A y quimiotripsina, son las responsables de dicha hidrólisis tanto en rumiantes como roedores (153).

Tanto la excreción biliar como la filtración glomerular juegan un papel importante en la eliminación de la OA del plasma de las ratas (153). En ratas el metabolito mayoritario (tanto en heces como en orina) es la O α , seguida de la propia OA y el 4R-OH-OA (285).

	País	Fuente
Suero	Alemania	19, 103
	Bulgaria	280
	Canadá	257
	Checoslovaquia	89
	Rep. Checa	172
	Croacia	212, 223
	Dinamarca	213
	España	32, 126
	Francia	213
	Hungría	274, 294
	Italia	213
	Polonia	153
	Suecia	28
	Suiza	213
	Egipto	315
	Túnez	169
	Sierra Leona	128
Japón	305	
Leche	Alemania	93
	Italia	180
	Sierra Leona	129
Riñón	Alemania	19
	Egipto	315
Orina	Egipto	315

Tabla 9. Incidencia de OA en la especie humana

La OA actúa inhibiendo la síntesis de proteínas; secundariamente a esta inhibición la síntesis de RNA y DNA podría estar también inhibida (153). El efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas se ha demostrado en bacterias, levaduras y cultivos celulares de mamíferos (302). Dicha inhibición es específica y tiene lugar a nivel post transcripcional donde la OA tiene un efecto directo en el paso de la traducción en la síntesis de proteínas. La fenilalanina-tRNA sintetasa reconoce la mitad fenilalanina de la OA, con lo que la OA actúa como inhibidor de dicha enzima, parando la aminoacetilación y bloqueando la elongación del péptido. Los análogos de la OA en los que la

fenilalanina ha sido substituida por otro aminoácido tienen un efecto inhibitorio similar sobre la respectiva tRNA sintetasa específica del aminoácido (153, 302).

La OA induce en ratas y ratones la formación de aductos OA-DNA, con una mayor presencia y persistencia de los mismos en el riñón (193) y detectándose en menor número en hígado y bazo (65). Estos aductos han sido localizados en células tumorales de riñón y bufeta urinaria de hombres procedentes del área de la nefropatía endémica de los Balcanes y en cultivos celulares de riñón de mono, de células epiteliales de bufeta urinaria de cerdo y de células de epitelio bronquial humano (65). Sin embargo, a pesar de estos datos, algunos autores ponen en duda el efecto genotóxico de la OA (249). Inicialmente la OA fue considerada como no mutagénica basándose en los resultados obtenidos en el test de Ames (302). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado el poder mutagénico de la OA (101). Es poco probable que la inmunosupresión producida por la OA sea un factor primario en la aparición de tumores renales, pero podría ser importante en el posterior desarrollo y metástasis de dichos tumores (153).

1.4.4. Ocratoxicosis natural

1.4.4.1. Ocratoxicosis en animales

La nefropatía porcina es una enfermedad no infecciosa descrita por primera vez en Dinamarca en 1928 (146). Dicha enfermedad se describió posteriormente en otros países, tales como Alemania; Bulgaria (183, 284), Finlandia (177), Hungría (177), Noruega (177), Polonia (98, 99), el Reino Unido (177), Suecia (235), USA (44) y la ex Yugoslavia (177). La OA es la causa primaria de la enfermedad, si bien la acción de otra micotoxina, la citrinina, puede colaborar en su aparición. La nefropatía porcina se asoció, desde un principio, al consumo de cereales enmohecidos (146). Krogh *et al.* (1973) asociaron el consumo de cereales contaminados con OA y citrinina con la nefropatía porcina. Los autores (148) aislaron cepas, inicialmente identificadas como *P. viridicatum*, productoras de OA y citrinina de muestras de cereales recogidas en zonas con una elevada incidencia de la enfermedad. La sintomatología en la nefropatía porcina es bastante vaga: polidipsia, poliuria, disminución de la producción y ocasionalmente la muerte, precedida de depresión y apatía. A veces no se observan síntomas clínicos y la enfermedad es un hallazgo de matadero,

presentándose unos riñones pálidos y aumentados de tamaño (44, 203). Histopatológicamente se observa degeneración de los túbulos proximales, seguida de una atrofia del epitelio tubular; fibrosis intersticial del córtex renal y hialinización de los glomérulos (146, 153, 203).

La nefropatía aviar asociada a OA, se describió por primera vez en 1975 en Dinamarca, en unos pollos y gallinas decomisados en el matadero por sufrir lesiones renales. Los riñones de dichas aves estaban pálidos y presentaron un tamaño mayor al normal. En dichos riñones se observó una fibrosis intersticial y una degeneración de los túbulos proximales y distales de las nefronas (112, 146). La ocratoxicosis aviar también se detectó en otros países como Italia, Canadá y USA, afectando a gansos, pavos, broilers y gallinas ponedoras (105, 146, 259, 264, 313). La sintomatología en la ocratoxicosis aviar es vaga: anorexia, diarrea, pérdidas en la producción (retraso en el crecimiento, disminución del grosor de la cáscara del huevo...), problemas respiratorios y muerte (105, 112, 264, 313). Otros efectos observados en la ocratoxicosis aviar son la degeneración grasa hepática (105, 264) y pérdida de resistencia del intestino grueso, produciéndose roturas durante el procesado de la canal (319).

Los rumiantes son generalmente considerados resistentes a la intoxicación por OA. A pesar de ello, se han descrito casos esporádicos de una supuesta ocratoxicosis bovina. Los animales murieron tras presentar un cuadro clínico específico y tras la necropsia se detectaron fibrosis renal y degeneración grasa hepática. En el pienso de dichos animales se detectó la presencia de OA y citrinina (225).

Se han descrito casos puntuales de ocratoxicosis en perros, asociados al consumo de alimentos enmohecidos en los que posteriormente se detectó la presencia de OA (166, 313).

1.4.4.2. Ocratoxicosis en el hombre.

La nefropatía endémica de los Balcanes (BEN), descrita en los años 50, es una enfermedad renal crónica observada únicamente en zonas rurales de Bulgaria, Rumania, Croacia, Bosnia y Serbia. La enfermedad, que evoluciona lentamente hasta la muerte, se observa generalmente en individuos

con edades comprendidas entre los 30 y 50 años, afectando más frecuentemente a mujeres que a hombres (145). Inicialmente, la sintomatología de la BEN es muy vaga: debilidad, palidez, polidipsia y poliuria. Más tarde aparecen los síntomas típicos de una insuficiencia renal: náuseas, vómitos, convulsiones y otros síntomas característicos de una uremia crónica. Los riñones sufren una marcada reducción de su tamaño y presentan las siguientes lesiones: degeneración tubular, fibrosis intersticial y hialinización de glomérulos en la zona más superficial del córtex. La BEN es una enfermedad de etiología incierta. Buscando su origen se barajaron desde infecciones por bacterias o virus hasta intoxicaciones por metales pesados, plantas o micotoxinas, pasando por problemas de autoinmunidad o defectos genéticos. Krogh, en el año 1974, comparó los procesos de la nefropatía porcina y la BEN y propuso la implicación de la OA en la etiología de dicha enfermedad. En este sentido, diversos estudios destacaron que los niveles de OA en suero humano así como en alimentos destinados al consumo animal y humano fueron más altos en las zonas endémicas de BEN que en las zonas no endémicas (146, 149, 211, 224, 266, 280). Por el contrario, algunos autores consideraron que la OA es ubicua en los alimentos y que debe existir algún tipo de factor hereditario, hipótesis que tampoco se ha podido demostrar (52). Así pues, hasta la fecha no se ha podido establecer una relación de causalidad clara entre la OA y la BEN. Por otra parte, diversos autores apuntaron a una nefrotoxina producida por *P. aurantiogriseum* como posible causa de la BEN (8, 170, 173-175, 327) sin obtener resultados concluyentes. Cabe destacar no obstante que la BEN está asociada con una alta incidencia de tumores del tracto urinario (38, 153).

En Túnez (15, 169) y Egipto (316) se han descrito casos de nefropatías asociadas a la OA. En los casos acaecidos en Túnez, mayoritariamente en zonas rurales, se demostró la existencia de una relación entre el consumo de alimentos con un alto contenido en OA con elevados niveles de OA en suero y la aparición de la enfermedad. En los casos descritos en Egipto se detectaron concentraciones superiores de OA en suero y orina en los individuos afectados que en los individuos control y se detectó la presencia de OA en las muestras obtenidas de carcinoma renal. Los autores (316) concluyeron que si bien la OA parece estar implicada en dichos casos de nefropatía, se necesitan más estudios epidemiológicos para establecer una relación de causalidad.

1.4.5. Ocratoxicosis experimentales.

Se han hecho muchos estudios de intoxicaciones experimentales por OA en muchas especies animales: ratón (133), rata (285), gallinas (51, 66, 72, 117-120, 150, 151, 201, 246, 248, 268, 281, 301), pavos (53), cerdos (147, 203, 265, 293), rumiantes (121, 136, 225, 275) y perros (137, 291, 292).

En cuanto a la intoxicación aguda, los animales más sensibles son el perro y el cerdo y los menos sensibles la rata y el ratón (Tabla 10) (153).

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

Tabla 10. Toxicidad aguda de la OA (146)

La nefropatía porcina fue reproducida en un estudio realizado con cerdos a los que se alimentó durante dos años con un pienso que contenía 1 mgOA/Kg. Estos animales presentaron unas lesiones renales idénticas a las observadas en animales afectados por dicha enfermedad (147). En otro estudio se administraron a cerdos dosis entre 5 y 10 mgOA/Kg, unos niveles raramente encontrados en la naturaleza. Además de las lesiones renales se produjeron lesiones hepáticas, esplénicas e intestinales (293).

La nefropatía aviar fue reproducida en un estudio realizado con pollos y gallinas alimentadas durante un año con un niveles de OA 0,3-1 mg/Kg. En estos animales, se observó unas lesiones renales similares a las que produce la enfermedad natural (146). Mediante administración de niveles elevados de OA a gallinas se han obtenido cuadros agudos que produjeron lesiones renales y hepáticas (116, 118, 320) y de gota visceral (212, 223, 324). En intoxicaciones subagudas y crónicas se observó, además de los problemas renales y hepáticos, retraso en el crecimiento (112, 324), aumento de la fragilidad de los huesos (117), alteraciones en la coagulación (112, 222), cambios en la pigmentación de la canal (248) y problemas a nivel de la puesta de huevos (Wyatt, 1991). La ocratoxicosis en los patos es parecida a la sufrida por las gallinas o los pavos, pero con unas lesiones menos graves (53).

Los rumiantes son muy resistentes a los efectos de la intoxicación aguda por OA debido a que la ocratoxina es hidrolizada y convertida en O α por la microflora ruminal. (121, 136, 275). En un estudio realizado con ovejas, 5 ppm de OA administrados con la ración fueron rápidamente degradados a O α por la flora ruminal, por otra parte, la capacidad de degradar la OA, disminuyó al incrementar la concentración de OA en la ración (136). Por otra parte, en un estudio realizado con ganado vacuno al que se administró 1 ppm de OA con la dieta durante 7 semanas se detectó la presencia de OA en el riñón (225).

Estudios realizados en perros de la raza Beagle, los animales mostraron síntomas propios de una afectación renal. Histopatológicamente, se observó necrosis renal y degeneración grasa hepática, con necrosis centrilobular (137, 291, 292).

La OA es un carcinogénico renal en ratones y ratas, siendo los machos más sensibles que las hembras. En la especie humana no existen estudios que demuestren de forma definitiva una causalidad directa entre la OA y el cáncer de riñón, con lo que la OA fue clasificada en el grupo 2B (posible carcinógeno humano) por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (39, 153). Sin embargo, algunos autores (65) recomendaron su inclusión en el grupo 2A (probable carcinógeno humano). La BEN, enfermedad posiblemente producida por la ingestión de alimentos contaminados con OA, está íntimamente relacionada con un incremento en la incidencia de los tumores del tracto

urinario (38, 153). Cabe destacar que la citrinina, otra micotoxina producida por *P. verrucosum*, posee un efecto sinérgico en la carcinogenicidad de la OA (133).

Diversos estudios realizados con gallinas, perros y ratas, demostraron que la OA tiene características inmunosupresoras. La respuesta inmune fue suprimida en ratones a los que se administró una dosis oral de OA de 0,005 mg/kg PV (107). En pollos alimentados con 4 ppm de OA disminuyó la fagocitosis y la movilidad de los neutrófilos (54, 177). Tras la ingesta de OA se produce una depleción de las células linfoides, particularmente en timo, Bursa de Fabricio, bazo y placas de Peyer. Dicha depleción se produce concomitantemente a una disminución de la respuesta de hipersensibilidad retardada, lo que sugiere una posible supresión de la inmunidad celular. La OA es también un potente inhibidor de los linfocitos T y B (177). En perro, la OA produjo necrosis de los tejidos linfoides del bazo, tonsilas y timo y de los ganglios linfáticos del yeyuno, íleo, ciego, colon y recto (137, 291, 292). En ratones, la OA tiene un efecto mielotóxico, disminuyendo el número de células precursoras de células de la serie blanca, eritrocitos y megacariocitos (202, 207).

La OA es un potente teratógeno en ratones, ratas, hámsters y pollos (153). Un estudio realizado en cerdas en las primeras semanas de gestación, demostró que la OA no es teratogénica en cerdos, debido a que la OA no fue capaz de cruzar la barrera placentaria (264).

1.4.6. Métodos analíticos.

1.4.6.1. Extracción.

La OA es un compuesto cristalino incoloro de características ligeramente ácidas. La OA es soluble en solventes orgánicos polares y soluciones acuosas de bicarbonato y ligeramente soluble en agua. Así pues, puede ser extraída de una fase acuosa mediante un solvente menos polar inmiscible en agua solamente en condiciones ácidas, mientras que bajo condiciones neutras o básicas se encuentra en forma disociada (306). Los métodos de extracción existentes combinan mezclas de solventes orgánicos, agua, ácidos y agitación mecánica para conseguir la extracción de la OA.

La extracción de OA a partir de muestras de piensos, cereales, maíz, etc. se realiza mediante combinaciones de varios solventes y mezclas de solventes con agua, como por ejemplo: acetonitrilo-solución acuosa de KCl; cloroformo-agua acidificada con HCl 1N; cloroformo-metanol u otras mezclas de solventes orgánicos con ácido fosfórico diluido (21). En algunos métodos (96), el extracto de acetonitrilo-solución acuosa de KCl obtenido se lava una o más veces con isooctano para eliminar los lípidos de la muestra.

La OA se extrae de sangre o de tejidos animales mediante cloroformo acidificado (36, 256, 306). Otros investigadores (162), extrajeron OA de plasma utilizando sólo metanol. La OA se extrae de riñón con cloroformo, previa acidificación con ácido fosfórico (194, 261) o con diclorometano y ácido cítrico (306). En leche y en orina se realiza la extracción con métodos similares a los anteriormente descritos (307, 308).

Para purificar los extractos obtenidos se usan los métodos de partición líquido-líquido (LLP) y los que emplean una columna de cromatografía de extracción de fase sólida (SPE). La LLP se basa en cambios en el pH de los solventes utilizados en la extracción, eliminando sustancias que pueden interferir en la detección de la OA, mientras que la SPE consiste en la utilización de unos cartuchos, rellenos con gel de sílice o C₁₈ que retienen las impurezas cuando se hace pasar los extractos de las muestras (o en algún caso la propia muestra) a través de ellos (308). El avance más importante en los métodos de purificación en los últimos años ha sido la aparición de las columnas de inmunoafinidad (IAC). En el interior de las IAC se fijan Ac monoclonales específicos contra la OA. El extracto de la muestra a analizar se pasa por la columna y la OA queda unida a los Ac (71, 306). Las IAC cada vez son más usadas, siendo el método de elección para la extracción de OA de muestras de cereales (130, 206-262), café (31, 209, 221, 303), cerveza (130, 192, 164, 303), vino (33, 303, 314) o plasma (32, 252, 305, 306).

1.4.6.2. Detección y cuantificación.

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

debido a que no precisa un equipamiento excesivamente caro. El límite de detección de la técnica es de unos 10 ng/g (153). Para la detección de la OA en TLC se usan placas de gel de sílice comerciales sin indicador de fluorescencia. Los extractos de las muestras se inoculan en la placa procurando que el diámetro del inóculo sea el menor posible y que nunca exceda de 2 mm (279). Como fase móvil se usan combinaciones de solventes orgánicos ligeramente acidificados, como por ejemplo Tolueno:acetato de etilo:ácido acético (5:4:1, V/V), tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico (6:3:1, V/V), acetona:ácido acético (3:1, V/V), entre otros (21).

Para la visualización de la toxina, se expone la placa a la luz UV a 366 nm. La OA aparece como una mancha verde fluorescente con una Rf variable en función de la fase móvil utilizada. La intensidad de esta fluorescencia disminuye al exponer la placa a la luz UV a 254 nm. La fluorescencia de la OA cambia a azul púrpura al exponer la placa a los vapores de amoníaco o al ser pulverizada con una solución acuosa de hidrógeno carbonato sódico o de hidróxido de sodio (21) o con una solución de $AlCl_3$ en etanol (94).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección fluorimétrica ha sido el método más usado en los últimos diez años para la determinación de OA, debido principalmente a su alta sensibilidad, reproducibilidad y a que puede ser fácilmente automatizado. El límite de detección en tejidos animales es de 0,02-0,03 $\mu g/Kg$ (130) y en cerveza es de 0,001 $\mu g/l$ (192). Cabe destacar que el límite de detección puede variar dependiendo de la técnica de extracción utilizada.

Para la detección de OA generalmente se usan columnas de fase reversa. Debido a las características ligeramente ácidas de la OA, la fase móvil empleada en el HPLC de fase reversa debe ser ácida para evitar una adsorción inespecífica a la columna. En la mayoría de los casos se usan mezclas de acetonitrilo o metanol con ácido acético diluido o ácido fosfórico. Suele usarse más el acetonitrilo, debido a que las mezclas de acetonitrilo con agua tienen una menor viscosidad y una mejor eficacia separadora que las mezclas de metanol con agua. De forma general se utiliza una elución isocrática y las longitudes de onda de excitación y emisión son de 330 nm y 460 nm, respectivamente. La confirmación se realiza mediante derivatización de la OA en su metil-éster tras un tratamiento con BF_3 al 14% en metanol o bien mediante técnicas de ELISA (306).

La cromatografía de gases no es un método empleado en la detección de OA (254). Sin embargo, a veces se utiliza para la confirmación de resultados positivos (306).

Los métodos inmunoquímicos para la detección de OA han recibido una gran aceptación debido a su alta sensibilidad y especificidad y la posibilidad de poder analizar un gran número de muestras en un corto periodo de tiempo. Desde que en 1981 se describió el primer ELISA para la detección de OA (153), se han puesto a punto diversos métodos ELISA y RIA para la detección de OA en cereales (18), sangre (274, 294, 305), productos cárnicos (323), riñón (43, 87) y suero (304) porcinos. El límite de detección de la técnica de ELISA, en muestras de plasma humano, es de 4 pg/ml (305). Los antisueros utilizados se obtuvieron inicialmente a partir de conejo y gallina, hasta que las técnicas de anticuerpos monoclonales facilitaron la producción de anticuerpos de alta especificidad (323).

1.4.7. Prevención y detoxificación

La mejor manera de controlar la presencia de ocratoxinas en los alimentos y piensos (preparados a partir de granos) es prevenir y evitar su formación ya sea en el campo, antes de la cosecha o durante el almacenamiento (253).

Según la FAO, los métodos de detoxificación deben destruir, inactivar o desplazar la micotoxina; no producir o dejar residuos tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos; retener el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto; no alterar propiedades tecnológicamente importantes del producto y destruir las esporas y el micelio fúngicos para evitar la producción de más micotoxinas. La FDA añade también como requisito el respeto al medio ambiente (255).

La OA en cereales almacenados se puede ir descomponiendo lentamente. En centeno contaminado de forma natural, la OA disminuyó en un 63% en 2 años; en harinas de trigo, cebada y maíz entre un 71-79% en periodos de 4 días a 6 meses. Lógicamente, el almacenamiento se ha de realizar en buenas condiciones, ya que si el grano no está lo suficientemente seco, pueden desarrollarse cepas de hongos ocratoxigénicos y el contenido en OA puede aumentar rápidamente (253).

La OA no se elimina del grano ni con un lavado húmedo ni con un lavado en seco. Al molerse los granos contaminados, la OA se distribuye por igual entre la harina y la cáscara (252), si bien al descascarillar la cebada, la cáscara resultó tener un contenido de OA superior (de tres a 24 veces más) que la cebada descascarillada (253). La OA parece ser destruida con mayor facilidad en el cereal seco que en el cereal húmedo. El proceso de ensilado tampoco destruye la OA (255).

La OA es estable a la irradiación con rayos gamma a dosis de 7,5 Mrad (236). La OA es moderadamente estable a los tratamientos con calor. En este sentido, existen diversos estudios con resultados bastante dispares. Calentando trigo con OA añadida a 200°C durante 20 minutos se redujo la contaminación en un 93%, mientras que al calentar harina a 200°C durante 40 minutos no se observaron reducciones apreciables (253). La estabilidad de la OA en procesos como el tostado de los granos de café presenta resultados contradictorios que varían desde una destrucción casi total de la toxina, hasta un efecto muy limitado de menos de un 30% de reducción de la concentración de OA (255). El hervido y pasteurización de la cebada no reduce el contenido de OA y en el proceso de cocido, sólo se destruye un 4-9%. A pesar de ello en el proceso completo de elaboración de la cerveza la degradación de la OA puede llegar a ser de un 98% y en lotes de cebada moderadamente contaminados, la OA es destruida completamente en el proceso del malteo (253).

La amonización con una solución acuosa de amonio al 2% descompone la OA en maíz, trigo y cebada. La degradación de la micotoxina es mayor a altas temperaturas, por encima de 45°C y con sustratos que contengan bajas concentraciones de OA. Concentraciones de 1,2µg OA/g maíz fueron eliminados completamente tras una amonización a 20°C durante 6 semanas. Pese a todo, se han observado resultados contradictorios en la amonización de la cebada en cerdos, en los que se encuentran residuos de OA en riñón más altos de lo esperado, con lo que esta técnica es demasiado arriesgada para su uso (253).

La adición de carbón no tuvo ningún efecto sobre la toxicidad de la OA en gallinas (253). La OA es resistente al aluminosilicato de calcio y sodio hidratado (HSCAS®), un potente absorbente muy efectivo con las aflatoxinas (255).

1.4.8. Legislación

En España no existe legislación al respecto. Sin embargo en otros países se han establecido los niveles máximos de OA permitidos en los alimentos (Tabla 11). En un futuro es probable que, siguiendo las recomendaciones de la OMS, se establezca un nivel máximo de 5 µg OA/Kg para cereales y productos a base de cereales en países europeos (113, 232).

País	Substrato	Límite máximo	Comentarios
Austria	trigo y centeno	5 µg/Kg	
Rep. Checa	alimentos para bebés	1 µg/Kg.	
	alimentos para niños	5 µg/Kg	
	resto de alimentos	20 µg/Kg	
Chipre	en leche y productos lácteos	0,5 µg/Kg*	
Dinamarca	cereales y productos a base de cereales	5 µg/Kg	
	riñón de cerdo	10 µg/Kg	decomiso de las vísceras
	riñón de cerdo	25 µg/Kg	decomiso de la canal
Francia	cereales	5 µg/Kg	
Grecia	granos de café sin tostar	20 µg/Kg ¹	
Holanda	cereales, legumbres, leguminosas y derivados	0 µg/Kg*	
Hungría	alimentos en conserva	0 µg/Kg*	
Rumania	todos los alimentos y piensos	5 µg/Kg	
Suecia	piensos completos para cerdos	200 µg/Kg	
	piensos completos para aves	100 µg/Kg	
Suiza	productos a base de cereales	2 µg/Kg	
Brasil	arroz, cebada, judías y maíz	50 µg/Kg ¹	
Uruguay	arroz, cebada, judías, café y maíz	50 µg/Kg	

*Límite máximo para todas las micotoxinas.

¹Propuesta de reglamentación.

Tabla 11. Niveles máximos tolerados de OA en alimentos y piensos (25, 70, 80, 113).

OBJETO DEL ESTUDIO

2. OBJETO DEL ESTUDIO.

Los hongos pueden desarrollarse sobre un gran número de substratos. La mayoría de alimentos destinados al consumo humano y animal son susceptibles de ser contaminados por hongos durante alguna fase de su producción, transporte o almacenamiento. Algunos hongos son capaces de sintetizar metabolitos secundarios tóxicos que se conocen con el nombre de micotoxinas.

La presencia de hongos toxigénicos en un substrato no implica necesariamente la producción de micotoxinas, pero indudablemente debe ser motivo de alerta de un peligro potencial. Por tanto, es muy importante conocer la distribución de los hongos capaces de elaborarlas y las circunstancias que inciden en su capacidad toxigénica.

Las especies del género *Aspergillus* son capaces de elaborar un elevado número de micotoxinas, aunque quizá una de las que está recibiendo actualmente una especial atención por su elevada toxicidad y amplia distribución sea la ocratoxina A. Esta micotoxina se asocia normalmente a *Penicillium verrucosum* y en el género *Aspergillus*, a *A. ochraceus* y otras especies de la sección *Circumdati*. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto su producción por parte de algunas especies de la sección *Nigri*. Los componentes de esta sección son unos de los más importantes del género *Aspergillus*. De distribución ubicuitaria, algunas de sus especies se utilizan ampliamente en la industria alimentaria y poseen la categoría de GRAS (*generally regarded as safe*) de la FDA, por lo que su posible capacidad de elaborar OA supone un riesgo inesperado para la salud humana y animal. Por todo ello, consideramos de gran interés conocer la frecuencia de aparición de las especies del género *Aspergillus* y en especial de las especies de la sección *Nigri* en piensos y materias primas y estudiar la capacidad ocratoxigénica de las cepas de esta sección.

Por otro lado, la taxonomía de los integrantes de *Aspergillus* Sección *Nigri* es una de las más complejas del género y está basada fundamentalmente en criterios morfológicos. En una de las últimas revisiones se creó el agregado *A. niger*, constituido por dos especies, seis variedades y dos formas. En un intento de clarificar la taxonomía del agregado, se ha propuesto la división del agregado en dos especies, morfológicamente indistinguibles, denominadas *A. niger* y *A. tubingensis* atendiendo a patrones de RFLP obtenidos del DNA total. Dado que la mayoría de los aislamientos se encuentran incluidos en el agregado, consideramos de sumo interés conocer la

distribución de las dos especies propuestas en los substratos estudiados. Con este fin, encontramos de utilidad proponer una nueva técnica de RFLP que sea más sencilla y fácil de interpretar y que permita diferenciar de forma más clara estos grupos de cepas.

Continuando con los criterios clásicos de clasificación y con el fin de determinar si existen diferencias entre las dos especies propuestas, nos parece interesante realizar paralelamente un estudio de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las cepas y su comportamiento a distintas temperaturas y concentraciones de NaCl.

PLAN DE TRABAJO

3. PLAN DE TRABAJO.

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

- Elección y obtención de piensos y materias primas. Toma de muestras.
- Recuento de los hongos presentes en los distintos substratos.
- Recuento, aislamiento e identificación de las especies de *Aspergillus* y sus teleomorfos presentes en los diferentes substratos.
- Selección y obtención de cepas de colección del agregado *A. niger*.
- Puesta a punto de un método molecular que permita clasificar las cepas del agregado *A. niger* en las dos especies en las que se ha propuesto su división.
- Estudio de las características morfológicas de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*.
- Estudio del comportamiento de las cepas del agregado *A. niger* a distintas temperaturas de incubación.
- Determinación de la resistencia al NaCl de las cepas del agregado *A. niger*.
- Valoración de la capacidad productora de ocratoxina A de las cepas del agregado *A. niger*.
- Lectura y tratamiento de los resultados.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN MUESTRAS DE PIENSOS Y MATERIAS PRIMAS.

4.1.1. Muestras estudiadas.

Para llevar a cabo este estudio se analizaron 300 muestras de piensos y materias primas destinadas a la alimentación animal, de las que 117 fueron cereales, 36 leguminosas y 147 piensos.

4.1.2. Procesado de las muestras.

Se tomaron, en condiciones de asepsia, 10 g de cada muestra y se realizó un banco de diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} en suero fisiológico estéril al que se le había añadido Tween 80 al 0,05% (SFW) cuya composición se detalla en el apartado 4.3.2. Las materias primas se molieron durante 15 segundos antes de realizar el banco de diluciones.

Con una pipeta estéril se tomaron 0,1 ml de cada dilución y se inocularon tres placas de Petri conteniendo 20 ml del medio de cultivo agar extracto de malta al 2% (MEA), adicionados de 100 ppm de cloranfenicol y 50 ppm de estreptomina, la composición de los cuales se detalla en el apartado 4.3.1.

Las placas se sembraron en superficie, mediante asa de Digralsky, incubando las placas en oscuridad a 28°C durante siete días.

El recuento total se determinó a los siete días de incubación, escogiendo la dilución a partir de la cual se desarrollaron entre diez y cien colonias por placa (241). No obstante, en las muestras poco contaminadas, se tuvieron también en cuenta las colonias desarrolladas en un número inferior a 10 en las placas inoculadas con la mínima dilución ensayada (10^{-1}). Las unidades formadoras de colonias por gramo de pienso (UFC/g), se determinaron calculando la media aritmética del número

de colonias desarrolladas a partir de la dilución adecuada, teniendo en cuenta el factor de dilución y el volumen del inóculo.

Asimismo, se procedió a realizar el recuento, aislamiento e identificación de aquellas colonias que, a simple vista o mediante su observación al microscopio estereoscópico se consideraron pertenecientes al género *Aspergillus* o sus teleomorfos.

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

Paralelamente, también se conservaron las cepas liofilizadas. Para la liofilización se realizó una suspensión en leche descremada estéril a partir de un cultivo de siete días en MEA. La suspensión se repartió en viales de conservación, a razón de 0,5 ml por vial y se congelaron a -80°C durante una hora. Pasado este tiempo, con un liofilizador Lio-Alpha 6 (Telstar, Terrassa), se liofilizaron los viales a -40°C , aplicando un vacío de 100 micrones durante 18 horas. Una vez liofilizadas, las cepas fueron conservadas a -80°C .

4.1.3. Identificación hasta nivel de especie de las cepas del género *Aspergillus*.

La identificación hasta nivel de especie se realizó siguiendo el tratado de Klich y Pitt (1988). A partir de los cultivos se realizó una suspensión en tubos conteniendo 3 ml de SFW. A partir de dicha suspensión y con la ayuda de una asa de nicrom doblada, se realizaron siembras en tres puntos en placas de Petri conteniendo 20 ml de medio MEA, agar Czapek extracto de levadura (CYA) y agar Czapek extracto de levadura con un 20% de sacarosa (CY20S) descritos en el apartado 4.3.1. La siembra en CYA se realizó por duplicado. La incubación se realizó en oscuridad a 25°C , excepto una de las dos placas de medio CYA, que fue incubada a 37°C , durante siete días, aunque a veces, en el caso de los aislamientos de formas perfectas, fue necesario prolongar la incubación para permitir el desarrollo de las ascosporas.

Para realizar una preparación microscópica se separaron fragmentos del centro y la periferia del cultivo de MEA con la ayuda de un asa de nicrom. Dicho fragmento se colocó sobre un portaobjetos

y se le añadieron unas gotas de alcohol con el fin de dispersar los conidios y poder observar con claridad el conidióforo y las células conidiógenas de la cepa en estudio. A continuación se realizó la preparación entre portaobjetos y cubreobjetos, añadiendo unas gotas de lactofenol o de azul algodón (apartado 4.3.3.) antes de proceder a la observación microscópica.

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

Las principales características macroscópicas son:

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

Las principales características microscópicas son:

- Disposición de los conidios en la cabeza conidial (observada directamente en el cultivo bajo el microscopio a bajos aumentos).
- Tamaño, textura y color del estipe.
- Forma, tamaño y color de la vesícula.
- Forma, tamaño y color de las métulas.
- Forma, tamaño y color de las fiálides.
- Forma, tamaño, textura y color de los conidios.
- Forma, tamaño, textura y color de los cleistotecios.
- Forma, tamaño, textura y color de las ascas.
- Forma, tamaño, textura y color de las ascosporas.
- Forma, tamaño, textura y color de las células de Hülle.

4.2. ESTUDIO DEL AGREGADO *A. niger*.

4.2.1. Cepas objeto del estudio.

Se han estudiado 92 cepas pertenecientes al agregado *A. niger*. De las cepas estudiadas, 76 han sido aisladas en nuestro laboratorio, principalmente procedentes del estudio de la micoflora presente en piensos y materias primas (Apartado 4.1.), aunque también se han incluido cepas de otros orígenes. Las 16 cepas restantes provienen de colecciones de cultivos internacionales, excepto la cepa "*A. brasiliensis*" aislada de suelo de Brasil, facilitada a nuestro laboratorio por J. Varga.

Las cepas se resembraron periódicamente en tubos de MEA y se mantuvieron a 4°C para su conservación. Paralelamente, para evitar la pérdida de viabilidad de algún aislamiento, las cepas se liofilizaron y los líofilos resultantes se mantuvieron a -80°C.

La relación de las cepas estudiadas y su origen, se detalla en la Tabla 12.

4.2.2. ESTUDIO MOLECULAR.

4.2.2.1. Extracción del DNA fúngico.

Las extracciones de DNA se hicieron siguiendo el método propuesto por Estruch *et al.* (1989) con algunas modificaciones (7). Las cepas se inocularon en tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían 500 µl de caldo Sabouraud con un 1 mg/l de cloranfenicol (apartado 4.3.1.) y se incubaron orbitalmente durante un periodo comprendido entre 12 y 24 horas a una temperatura de 30°C y a una velocidad de 300 rpm. Tras la incubación, se centrifugó a 13000 rpm a temperatura ambiente durante cinco minutos. El sobrenadante se eliminó por decantación y el micelio obtenido se lavó con suero fisiológico (SF) (apartado 4.3.2.). Posteriormente, este micelio se congeló con nitrógeno líquido y se homogeneizó con una punta de micropipeta de 1 ml deformada al calor hasta obtener un polvo fino. Se añadieron 500 µl de tampón de extracción (apartado 4.3.3.) al micelio y se incubó durante una hora al baño María a una temperatura de 65°C, posteriormente se le añadieron 500 µl

Especie	Origen	n	cepa
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	cereales	12	A74, A77, A78, A79, A82, A83, A84, A251, A306, A307, A308, A634
		3	A486, A487, A655
	Trigo		
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	leguminosas	3	A76, A80, A81
		7	A85, A86, A87, A88, A89, A136, A250
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	pienso	8	A14, A15, A75, A174, A175, A176, A180, A505
		8	A197, A219, A220, A223, A312, A325, A388, A629
		7	A391, A614, A615, A623, A631, A651, A654
		2	A390, A632
		1	A630
		1	A488
		1	A488
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	Animal/humano	5	A628, A652, A653, A657, A659
		1	A484
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i>	Miscelanea	3	A644, A645, A660
		1	A266
		1	A348
		1	A624
		2	A190, A198
<i>A. niger</i>	Cepas de coleccion	1	A656
		1	A656
		1	A510
		17	CBS 554,65 (NT)
			ATCC 26036
			CBS 117.32
			ATCC 22343
			CBS 121.55
			NRRL 3122
			CBS 618.78
		CBS 134.48 (T)	
<i>A. niger</i> (<i>A. foetidus</i>)*			IMI 172296
<i>A. foetidus</i>			IMI 211394 (T)
<i>A. tubingenis</i>			IMI 63764
<i>A. awamori</i>			NRRL 3112
<i>A. phoenicis</i>			CBS 126.49
<i>A. usami</i>			CBS 139.52 (T)
<i>A. pulverulentus</i>			CBS 558.65
<i>A. hennbergii</i>			CBS 118.35 (T)
<i>A. brasiliensis</i> *			607 (J. Varga)

*Cepa reclasificada como *A. foetidus* por Varga et al. (1993). (T) Cepa tipo. (NT) Cepa neotipo.

Tabla 12. Cepas del agregado *A. niger* estudiadas y su origen.

de fenol:cloroformo (1:1, vol/vol) (Fluka) y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un Eppendorf, junto con un 20% de NaOAc 3M y un 23% de NaCl 1M; a continuación se agitó suavemente por inversión y se dejó reposar en hielo durante una media hora. Se recogieron 500 µl de sobrenadante y se traspasaron a otro tubo Eppendorf de 1 ml, junto con 0,54 volúmenes de isopropanol. Dicho tubo se agitó suavemente por inversión y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Tras el centrifugado se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µl de alcohol al 70%. El tubo Eppendorf se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío, a 50°C. A continuación se resuspendió en 20µl de tampón TE (apartado 4.3.3.). El DNA obtenido se limpió posteriormente con el "GeneClean kit II" (BIO 101, inc., La Jolla, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.2.2. Amplificación mediante PCR del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS1 y 2.

El 5,8S rDNA y los ITS1 y 2 se amplificaron según el método descrito por Gené *et al* (1996). Los cebadores usados para la reacción fueron el ITS5 (3' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 5') y el ITS4 (3' TCCTCCGCTTATTGATATGC 5'), descritos por White *et al.* (1990). En tubos MicroAmp (Perkin Elmer) de 0,2 ml se inocularon los siguientes reactivos para conseguir en un volumen final de 50 µl en agua desionizada estéril una concentración final de: Tris HCl 10mM; KCl 50mM; MgCl₂ 1,5mM; 20pmol de ITS4 y de ITS5; 200µmol de cada dATP, dCTP, dTTP y dGTP; 2,5 unidades de *AmpliTaq* DNA polimerasa (Perkin Elmer) y entre 0,1 y 10 ng del DNA a amplificar. Los tubos se dispusieron en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp 2400 (Perkin Elmer Cetus Corporation, Emeryville, CA). En cada reacción de amplificación se usaron como control tubos que no contenían DNA. El programa de amplificación constó de un paso de pre-desnaturalización a 94°C, durante cinco minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 30 segundos a 95°C, anillamiento durante un minuto a 50°C y un minuto de extensión a 72°C; para finalizar el proceso se realizó una extensión final a 72°C, durante siete minutos. Los pesos moleculares de los productos amplificados se estimaron por comparación con el 100bp DNA ladder (Gibco BRL).

4.2.2.3. Secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS1 y 2.

Para realizar la reacción de secuenciación se siguió el protocolo "Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" (Applied Biosystems, Gouda, Holanda). Los cebadores utilizados, ITS4 y ITS5, fueron los mismos utilizados en la fase de amplificación. Para obtener la secuencia, se utilizó un secuenciador "Applied Biosystems sequencer mod. 310". Las secuencias obtenidas fueron alineadas mediante el uso del programa Clustal W (v. 1.5) (297).

4.2.2.4. Obtención de patrones de RFLP.

Los amplificados fueron digeridos con la endonucleasa *RsaI* (GT/AC), siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim), durante toda una noche a una temperatura de 37°C.

El análisis de RFLP se hizo según indica Sambrook *et al.* (1989). El producto de la digestión se inoculó en un gel de agarosa al 2% conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis del gel se desarrolló en tampón TBE1X (apartado 4.3.3.) en una cubeta de electroforesis submarina a un voltaje de 22V.

El gel se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 312nm. Los pesos moleculares de los fragmentos digeridos se estimaron por comparación con el 100bp DNA ladder (Gibco BRL).

4.2.3. ESTUDIO MORFOLÓGICO

Las cepas del agregado *A. niger* se sembraron en placas de MEA, CYA y CYA20S tal y como se detalla en el apartado 4.1.3. Tras siete días de incubación a 25°C se valoraron las siguientes características macroscópicas de las colonias desarrolladas en dichos medios:

- Diámetro de las colonias.
- Color del anverso de las colonias.
- Color del reverso de las colonias.
- Presencia de esclerocios.

- Presencia de gotas de exudado.
- Textura y densidad de la colonia.
- Presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo.

A partir de las colonias desarrolladas en MEA se realizó una preparación microscópica montada con lactofenol tal y como se detalla en el apartado 4.1.3. A partir de esta preparación se tomaron diez medidas de cada una de las siguientes estructuras.

- Longitud y anchura de los estipes.
- Diámetro de las vesículas.
- Longitud y anchura de las métulas.
- Longitud y anchura de las fiálides.
- Diámetro de los conidios.

Asimismo, se determinó el color que presentaban estas estructuras, así como la textura de los estipes y la ornamentación de los conidios.

4.2.4. MÉTODO DE ESTUDIO PARA LA OBSERVACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN.

Para la realización de este estudio, las cepas se sembraron en tubos conteniendo 3 ml de medio MEA que se incubaron a una temperatura de 28°C, durante siete días. A partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones en SFW. Estas suspensiones se filtraron a través de gasa estéril y se valoraron en cámara de Bürker ajustándose hasta conseguir una concentración final aproximada de 1×10^8 conidios/ml.

Con asa de nicrom calibrada (1 μ l) se inocularon en un punto placas de Petri que contenían 20 ml de medio MEA. La incubación se realizó en ausencia de luz a las temperaturas siguientes: 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C y 55°C (para temperaturas inferiores a 30°C se utilizaron estufas de cultivo refrigeradas).

El periodo de incubación fue de siete días para todas las temperaturas ensayadas a excepción de las de 5°C y 10°C, en las que se prolongó hasta tres meses y 14 días, respectivamente. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Las lecturas se realizaron a los tres y a los siete días. En cada lectura se determinó el diámetro de las colonias obtenidas.

4.2.4.1. Estudio de las características macroscópicas y microscópicas a las temperaturas máxima y mínima de crecimiento.

En la lectura realizada a los siete días de incubación, se efectuaron determinaciones de ciertos caracteres macroscópicos y microscópicos de las colonias desarrolladas a las temperaturas mínima y máxima.

En las colonias desarrolladas se determinó:

- Diámetro
- Color del anverso y del reverso
- Textura de la colonia
- Formación de micelio aéreo blanco
- Formación de surcos
- Formación de gotas de exudado
- Presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo

Se valoró la presencia de alteraciones del aspecto microscópico normal de las cepas.

4.2.5. MÉTODO EMPLEADO EN LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL NaCl.

Las cepas se sembraron en tubos conteniendo 3 ml de medio MEA que se incubaron a una temperatura de 28°C, durante siete días. A partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones en SFW. Estas

suspensiones se filtraron a través de gasa estéril y se valoraron en cámara de Bürker ajustándose hasta conseguir una concentración final aproximada de 1×10^8 conidios/ml.

Con asa de nicrom calibrada (1 μ l) se inocularon en un punto placas de Petri que contenían 20 ml de medio MEA al que previamente se le había adicionado la cantidad de NaCl adecuada para obtener las distintas concentraciones ensayadas. Dichas concentraciones oscilaron entre el 2% y el 18%, aumentando progresivamente a intervalos del 2%.

Paralelamente se realizaron controles de crecimiento de todas las cepas en MEA, utilizando la misma técnica de siembra. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Una vez inoculadas las placas, éstas se incubaron a 25°C y 35°C en oscuridad y las lecturas se realizaron a los tres y a los siete días de incubación.

En cada lectura se determinó el diámetro de las colonias desarrolladas, así como la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada cepa.

4.2.5.1. Estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a 25 y 35°C.

En la lectura realizada a los siete días de incubación, se efectuaron determinaciones de ciertos caracteres macroscópicos y microscópicos de las colonias desarrolladas a concentraciones extremas de NaCl.

En las colonias desarrolladas se determinó:

- Diámetro
- Color del anverso y del reverso
- Textura de la colonia
- Formación de micelio aéreo blanco
- Formación de surcos

- Formación de gotas de exudado
- Presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo

Se valoró la presencia de alteraciones del aspecto microscópico normal de las cepas.

4.2.6. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A.

4.2.6.1. Extracción de la OA a partir de bocados de agar.

La extracción de la OA se realizó el método descrito por Bragulat *et al.* (1998). Las cepas se sembraron en tubos conteniendo 3 ml de medio MEA que se incubaron a una temperatura de 28°C, durante siete días. A partir de estos cultivos, se prepararon suspensiones en SFW. Con un asa de nicrom se inocularon en tres puntos placas de Petri que contenían 20 ml de agar extracto de levadura sacarosa (YES) y CYA (apartado 4.3.1.). Las placas se incubaron a 25°C, en oscuridad, durante siete días.

Tras la incubación, mediante una campana de Durham, utilizada como sacabocados se practicaron tres bocados de agar en el área central de las colonias obtenidas. Los bocados de agar obtenidos se retiraron de la placa de Petri con la ayuda de una aguja enmangada y se introdujeron dentro de un vial de vidrio topacio de 4 ml con tapón de rosca y teflón. A cada vial se le añadieron 500 µl de una solución de metanol y ácido fórmico (25:1, vol/vol) y se dejó reposar durante una hora. El extracto obtenido se filtró a través de un filtro MILLEX®-HV₁₃ (MILLIPORE) y se recogió en un vial de vidrio topacio de 4ml con tapón de rosca y teflón y se conservó a 4°C.

4.2.6.2. Extracción de OA a partir de cultivos en caldo YES.

Las cepas productoras de OA, detectadas mediante la técnica de criba detallada en el apartado 4.2.6.1. se sembraron en tubos de caldo extracto de levadura sacarosa (caldo YES) para cuantificar la producción de OA. Para tal fin, se sembraron las cepas en tubos conteniendo agar patata glucosado (PDA) cuya composición se detalla en el apartado 4.3.1. y se incubaron a 25°C en oscuridad durante siete días.

A partir de cada uno de los cultivos obtenidos en PDA se obtuvo una densa suspensión conidial en SFW (apartado 4.3.2.). Se recogieron 100 µl de dicha suspensión y se inocularon en tubos que contenían 5 ml de caldo YES. Dichos tubos se incubaron inclinados (para obtener así una mayor superficie de cultivo) a 25°C en oscuridad durante siete días.

La extracción de la OA se realizó con dos fracciones de 10 ml de cloroformo, en caliente (258). A cada tubo de cultivo de caldo YES se añadieron 10 ml de cloroformo, se agitó y se mantuvo a 55°C durante cinco minutos. El contenido líquido del tubo se vertió en un embudo de decantación, dejándolo reposar para obtener una separación de fases. El extracto clorofórmico se recogió en un vial cónico, tras una filtración a través de sulfato de sodio anhidro. Se volvió a añadir 10 ml de cloroformo al cultivo en YES y se repitió el proceso una vez más. El cloroformo contenido en el vial se evaporó en un rotavapor en vacío a 55°C. El extracto evaporado fue rediluido en 0,5 ml de metanol en un vial de vidrio topacio de 4 ml con tapón de rosca y teflón y se conservó a 4°C.

4.2.6.3. Preparación del patrón de ocratoxina A.

El patrón de OA fue suministrado por Sigma (St. Louis, Mo). Se preparó una solución madre de OA en cloroformo, con una concentración de 5 µg/ml. La solución patrón se conservó en nevera a 4°C, en viales de vidrio topacio con tapón de rosca y teflón.

4.2.6.4. Separación por cromatografía en capa fina (TLC).

Como soporte se utilizan cromatofolios de silicagel 60, sin indicador de fluorescencia, de 20x20 cm y espesor de capa 0,25 mm (Merck 5553), divididos en franjas de 1 cm de anchura y activados en estufa a 110°C durante 30 minutos. Una vez activadas se guardan en un desecador, hasta alcanzar la temperatura ambiente.

La inoculación de los cromatofolios se realiza en una línea imaginaria situada a 4 cm de la base. Mediante una microjeringa se depositan 10 µl del extracto, en un punto central de las citadas franjas. El inóculo ha de tener un diámetro lo más pequeño posible, no siendo éste superior a 2 mm. En uno

de los depósitos se superponen 5 μ l de la solución patrón de OA (patrón interno). En otro punto de la línea imaginaria se depositan 5 μ l de la solución patrón de OA (patrón externo).

Una vez inoculados los cromatofolios se traza con un lápiz una recta a 15 cm de la línea en la que se habían colocado los depósitos para indicar la altura hasta la que debe llegar el frente del disolvente.

La cámara de desarrollo se prepara con 100 ml de fase móvil, consistente en una mezcla de tolueno-acetato de etilo-cloroformo-ácido fórmico al 99%.

Transcurridos unos 5-10 minutos, los cromatofolios se introducen en la cubeta, en posición vertical y con la superficie de silicagel distante 3-5 cm de la pared frontal de la cámara de desarrollo. Se dejan desarrollar en cámara insaturada hasta que el frente del disolvente alcanza la altura indicada. Finalizado el proceso, los cromatofolios se secan al aire, en ausencia de luz.

Los cromatofolios se observan bajo luz ultravioleta a 365 y 254 nm, apareciendo la OA como una mancha azul verdosa.

Para confirmar la presencia de OA el cromatofolio fue pulverizado con una solución de cloruro de aluminio al 20% en etanol. El cromatofolio se dejó secar al aire, en ausencia de luz y se observó bajo luz ultravioleta a 365 y 254 nm, apareciendo la OA como una mancha azul intenso (21).

4.2.6.5. Detección y cuantificación de ocratoxina A en HPLC.

Para la detección y cuantificación de la producción de OA de las cepas mediante HPLC se inyectaron 20 μ l del extracto obtenido en un cromatógrafo HPLC (Konik 500 B-G) equipado con un detector de espectrofluorescencia (Konik, modelo 403) (excitación: 330nm, emisión: 460nm) y una columna C₁₈ Spherisorb S5 ODS2 (250x4,6mm, 5 μ m). La fase móvil, con un flujo de 1ml/minuto, consistió en el gradiente lineal indicado a continuación: acetonitrilo, 57%; agua, 41%; ácido acético, 2%. (19). La OA se cuantificó por comparación con la respuesta fluorimétrica producida por la solución patrón de OA.

La confirmación de las muestras positivas se realizó mediante derivatizaciones de la OA en su correspondiente metil-éster tras un tratamiento con trifluoroboro al 14% en metanol (122).

4.3. MEDIOS DE CULTIVO, DILUYENTES, COLORANTES Y REACTIVOS.

4.3.1. Medios de cultivo.

Agar Czapek extracto de levadura (CYA) (139)

NaNO ₃	3 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	3 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

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

Agar Czapek extracto de levadura con un 20% de sacarosa (CYA20S) (139)

NaNO ₃	3 g
NaCl	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	200 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

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

Agar extracto de levadura sacarosa (agar YES) (26)

Extracto de levadura	20 g
Sacarosa	150 g
MgSO ₄	0,5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

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

Agar extracto de malta al 2% (MEA) (227)

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

Se ajusta el pH a 4,5-5,0 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Agar patata glucosado (PDA) (DIFCO)

Infusión de patatas	200 g
Bacto-glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

El pH del medio es 4,5-5,0 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

Caldo extracto de levadura sacarosa (caldo YES) (258)

Extracto de levadura (DIFCO)	20 g
Sacarosa	150 g
Agua destilada	1000 ml

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

Caldo Sabouraud-cloranfenicol (76)

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

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

Gel de agarosa (237).

Agarosa	2 g
Bromuro de Etidio	5 µg
TBE 1X	100 ml

Se mezclan los componentes calentando hasta llegar a la ebullición.

4.3.2. Diluyentes.

Suero fisiológico (SF)

NaCl	9 g
Agua destilada	1000 ml

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

Suero fisiológico con tween 80 al 0,05% (SFW) (241)

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

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

4.3.3. Colorantes y reactivos.

Azul de bromofenol (237)

Azul de bromofenol	0,5 g
EDTA	0,1 M
Glicerina	50 ml

Se añade agua destilada hasta enrasar a 100 ml en un matraz aforado. Se mezcla suavemente hasta la completa disolución.

Lactofenol de Amman (165)

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

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

Lactofenol-azul algodón (165)

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

Tampón de extracción (76)

Tris HCl 50mM	15 ml
NaCl	15 ml
EDTA 50mM	25 ml
SDS 3%	1,35 ml
2-mercaptoetanol 1%	1,5 ml

Se añade agua destilada hasta enrasar a 150 ml en un matraz aforado. Se mezcla suavemente hasta la completa disolución. Se ajusta el pH a 8,0.

Tampón Tris borato, solución concentrada (TBE 5X) (237).

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

Se disuelve en 700ml de agua destilada y se enrasa a 1000 ml en un matraz aforado. Se ajusta el pH a 8,0.

Tampón Tris borato, solución de trabajo (TBE 1X) (237).

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

Tampón TE (237)

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

Se ajusta el pH a 8,0.

4.4. Tratamiento estadístico. Gráficas.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se ha realizado mediante el programa SPSS versión 8.0 para *Windows*, efectuando diversos tratamientos que se indican a continuación:

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

- Pruebas de t de Student.

- Prueba de Chi cuadrado.

Las gráficas se han realizado mediante el programa *Microsoft Excel 97*.

RESULTADOS

5. RESULTADOS.

5.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN MUESTRAS DE PIENSOS Y MATERIAS PRIMAS.

En las Tabla 13 a 15 se muestran los recuentos totales y parciales del género *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) y sus especies aisladas en las muestras estudiadas de cereales (Tabla 13), leguminosas (Tabla 14) y piensos (Tabla 15).

Los recuentos fúngicos totales en el total de las muestras oscilaron entre 30 y $5,3 \times 10^6$ UFC/g, con una media de $1,4 \times 10^5$ UFC/g. Teniendo en cuenta el tipo de muestra analizada, en el caso de las muestras de cereales los recuentos fúngicos totales oscilaron entre $2,3 \times 10^2$ y $4,3 \times 10^6$, con un recuento medio de $2,5 \times 10^5$. En las muestras de leguminosas y piensos, los recuentos fúngicos totales oscilaron entre 9×10^2 y $1,1 \times 10^6$ y 30 y $5,3 \times 10^6$ UFC/g, con unos recuentos medios de $4,9 \times 10^4$ y $7,9 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente.

En el total de las muestras ensayadas, el recuento medio del género *Aspergillus*, fue de $2,2 \times 10^4$ UFC/g, oscilando entre la ausencia y $5,3 \times 10^6$ UFC/g. Teniendo en cuenta el tipo de muestra analizada, en las muestras de cereales, leguminosas y piensos los recuentos medios de *Aspergillus* fueron de $4,2 \times 10^3$, 3×10^3 y $4,1 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente. Estos recuentos oscilaron entre la ausencia y $1,4 \times 10^5$, $2,4 \times 10^4$ o $5,3 \times 10^6$ UFC/g, para las muestras de cereales, leguminosas y piensos, respectivamente.

En la Tabla 16 y las Figuras 3 y 4 se muestran las frecuencias de aparición del género *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) y sus especies en las distintas muestras analizadas, así como las diferencias significativas obtenidas mediante la prueba de chi cuadrado entre las distintas frecuencias observadas.

En la Tabla 17 se detallan, expresados en porcentajes, los recuentos parciales medios del género *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) respecto al recuento fúngico total medio y los recuentos parciales medios de las especies aisladas respecto al recuento medio de *Aspergillus*.

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
11	113,3	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	16,7	x	-	-	16,7	-
12	2600,0	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	10766,7	166,7	-	-	163,3	-	33,3	-	-	-	-	x	-	-	-	-
21	3066,7	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	9300,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	2400,0	433,3	-	-	433,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	7000,0	66,7	-	-	33,3	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	8766,7	266,7	-	-	266,7	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	4366,7	2,0	-	-	2,0	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	2266,7	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	7700,0	66,7	-	-	33,3	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	5833,3	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 ^a	13333,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
51	26,0	2,3	-	-	2,3	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	436,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	1633,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-
70	390,0	376,7	190,0	-	-	-	-	-	-	-	166,7	-	-	-	-	-
77	1433,3	1433,3	-	-	-	1166,7	-	-	-	-	266,7	-	-	-	-	-
79	263,3	263,3	-	-	-	190,0	-	-	-	-	73,3	-	-	-	-	-
80	72,0	14,0	-	-	0,3	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	13,3
81	16,7	4,0	0,3	-	0,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,0
82	5,7	1,0	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
83	77,0	1,7	-	-	0,7	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
84	353,3	33,3	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	x
																30,0

Tabla 13. Recuentos totales y recuentos parciales de *Aspergillus* y sus especies, expresados en UFC/g x 10², en AEM de las muestras de cereales analizadas (sigue).

(Tabla 13, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
85	7433,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
86	3566,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	86,0	1,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-
88	17,0	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x	-
89	64,7	0,7	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
90	39,7	36,0	1,7	-	-	x	-	x	-	-	-	-	0,3	1,3	32,7	-
91	41,7	17,0	3,0	-	-	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92	3,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-
93	30,7	27,3	15,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	-	-
98	10,0	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3	0,3	1,0
99	24,3	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
100	156,7	63,3	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-	56,7	-	-	-	-
101	6000,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
102	98,0	7,7	-	-	x	7,0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-
103	3033,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
104	823,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
105	55,0	47,7	-	-	2,7	-	0,3	-	-	-	-	x	-	26,7	-	-
106	48,0	0,7	-	-	-	-	x	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-	-
107	22,3	1,3	1,3	-	-	x	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-
108	72,3	-	-	x	-	x	-	-	-	-	x	-	-	x	-	x
109	82,0	1,3	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
112	129,0	1,0	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
113	96,0	86,0	80,3	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	5,3	-	-
118	40,0	1,0	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(sigue)

(Tabla 13, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	AcI	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
126	356,7	3,0	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-
129	34,0	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130	12266,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
131	49,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-
133	12000,0	566,7	-	-	-	166,7	-	-	-	-	400,0	-	-	-	-	-
139	12,3	3,0	-	-	0,3	0,3	-	-	x	-	-	-	-	0,3	2,0	-
140	2433,3	66,7	-	-	-	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
141	35,3	1,0	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	0,7	-	0,3
142	206,7	86,7	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	43,3	6,7	3,3
143	93,0	21,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	7,0
144	77,0	4,7	-	-	-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-
145	93,0	12,0	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	0,3	-	6,7	-	4,3
146	85,0	6,0	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-	2,0
147	86,3	6,7	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	x	-	5,3	0,3	x
148	263,3	10,0	-	-	-	6,7	-	-	-	-	-	x	-	-	-	3,3
149	840,0	306,7	6,7	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-	-	186,7	-	103,3
150	500,0	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	110,7	2,3	-	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
153	115,3	0,7	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	x	-	x	-	x
154	33,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
155	95,3	0,3	-	-	-	0,3	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-
156	17,0	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
157	82,0	1,7	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-
158	53,3	0,3	-	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	0,3	-	-

(sigue)

(Tabla 13, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
159	40,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
164	3,7	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
165	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
166	2,3	0,7	-	-	x	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
169	116,0	15,7	-	-	15,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
170	31,7	1,0	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	1,0
171	14,0	3,7	x	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7
172	10,7	3,7	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	x	-	-	-	3,3
173	1856,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
175	19,7	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3
177	18,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
178	36,0	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
179	5400,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	4466,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
181	7666,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
182	11866,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
183	13766,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
184	4433,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
185	5133,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
186	4800,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
187	2666,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
188	1120,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
189	2466,7	33,3	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
190	5333,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(sigue)

(Tabla 13, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	AcI	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ala	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
191	816,7	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
192	9133,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
193	266,7	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
194	11733,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
195	2933,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
196	9566,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
197	42566,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
198	5400,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
199	4233,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
246	8,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x
270	45,0	29,5	24,0	-	0,5	1,5	x	-	-	-	-	-	-	3,5	-	-
271	3366,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
285	57,0	7,7	-	-	0,3	-	x	-	-	-	-	-	1,7	-	2,7	3,0
286	406,7	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
287	49,7	49,0	-	-	0,3	-	0,7	-	-	-	-	-	-	34,3	13,0	0,7
288	40,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
289	3,0	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-
290	124,3	5,0	-	-	0,3	-	-	-	-	-	4,7	-	-	-	-	-
291	416,7	243,3	60,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	120,0	63,3
292	13,0	0,3	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
293	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

n°, referencia de la muestra; RT, Recuento total; Asp, Aspergillus; Aca, A. candidus; AcI, A. clavatus; Afl, A. flavus; Afu, A. fumigatus; An, A. niger; Ao, A. ochraceus; Ar, A. restrictus; Ala, A. tamarit; Ate, A. terreus; Av, A. versicolor; En, Emericella nidulans; Ea, Eurotium amstelodami; Ec, E. chevalieri; Er, E. rubrum.

-: ausencia.

x: especie aislada en las placas correspondientes a las diluciones a las que no se realizó el recuento.

n°	RT	Asp	Aca	AcI	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
14	403,3	6,7	-	-	3,3	3,3	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-
15	21,0	5,3	0,3	-	2,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-
20	14,0	2,0	-	-	x	-	x	-	-	-	x	-	-	2,0	-	-
23	866,7	66,7	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	-
24	54,3	1,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
25	486,7	16,7	-	-	13,3	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-
26	32,7	2,3	-	-	1,7	-	-	x	-	-	-	-	-	0,7	x	-
31	206,7	2,0	-	-	2,0	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	44,3	3,0	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	55,0	2,3	-	-	0,3	-	0,7	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-
37	163,3	6,7	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	6,7	x	-
38	303,3	133,3	-	-	10,0	-	3,3	-	-	-	-	-	-	120,0	x	-
39	250,0	243,3	-	-	x	-	-	x	-	-	-	x	-	236,7	6,7	-
40	183,3	163,3	-	-	26,7	-	-	-	-	-	-	-	-	83,3	53,3	-
41	12,7	12,3	-	-	0,7	-	-	-	-	0,3	-	-	-	x	9,3	2,0
42	27,3	26,0	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	25,7	x
43	23,0	14,7	-	-	-	1,7	x	-	-	-	-	-	-	-	13,0	-
44	21,7	14,7	-	-	0,3	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	13,7	-
45	33,7	29,7	-	-	x	2,7	x	-	-	-	-	-	-	-	27,0	-
46	16,0	13,7	-	-	0,7	2,0	x	-	-	-	-	-	-	x	11,0	-
47	16,0	11,0	-	-	x	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	10,3	-
49	600,0	66,7	-	-	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	300,0	-	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	163,3	13,3	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,3

Tabla 14. Recuentos totales y recuentos parciales del género *Aspergillus* y sus especies, expresados en UFC/g x 10², en AEM de las muestras de leguminosas analizadas (sigue).

(Tabla 14, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	AcI	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
53	110,0	2,0	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	1,0	1,0
54	113,3	36,7	-	-	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	36,7	x
55	39,3	29,7	0,3	-	1,3	-	x	0,7	-	-	-	-	-	0,7	26,0	0,7
56	9,0	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	1,3	4,7	x
57	52,0	43,3	21,3	-	22,0	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-
58	29,7	11,7	1,7	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,7	-
59	89,0	52,0	-	-	0,3	-	-	8,3	-	-	-	-	-	0,7	1,0	41,7
60	14,7	1,3	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	1,3
78	124,7	8,3	1,0	-	3,0	-	0,3	-	-	-	x	1,7	-	-	2,3	-
274	10700,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
275	1676,7	3,3	x	-	3,3	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-	x
273	11,0	5,3	0,3	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	1,0

n°, referencia de la muestra; RT, Recuento total; Asp, *Aspergillus*; Aca, *A. candidus*; AcI, *A. clavatus*; Afl, *A. flavus*; Afu, *A. fumigatus*; An, *A. niger*; Ao, *A. ochraceus*; Ar, *A. restrictus*; Ata, *A. tamarii*; Ate, *A. terreus*; Av, *A. versicolor*; En, *Emmericella nidulans*; Ea, *Eurotium amstelodami*; Ec, *E. chevalieri*; Er, *E. rubrum*.

-; ausencia.

x: especie aislada en las placas correspondientes a las diluciones a las que no se realizó el recuento.

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
1	26,7	0,7	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1,7	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	8,0	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7	2,0
4	6,0	2,3	0,3	-	0,7	-	x	-	-	-	-	1,0	-	-	0,3	x
5	28,0	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	6,3	0,7	0,7	-	x	-	x	-	-	-	-	x	-	-	-	-
9	3,0	2,0	0,7	-	x	-	-	-	-	-	0,3	-	-	0,3	0,3	0,3
10	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x
16	2366,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	126,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	1,7	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	0,3	-	-
19	12,0	1,0	3,3	-	x	3,3	-	-	-	-	-	3,3	-	-	-	-
61	0,3	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x
62	35,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	1,3	1,3	-	-	0,3	-	x	-	-	-	-	-	-	0,7	0,3	x
64	7,0	6,0	1,7	-	-	1,0	x	-	-	-	-	x	-	1,3	2,0	-
66	15,0	0,3	-	-	0,3	-	x	-	-	-	x	-	-	-	x	-
68	66,3	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-	-	-
69	3666,7	433,3	-	-	x	-	433,3	x	-	-	-	-	-	-	-	-
71	5,0	1,7	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,3
72	2,0	1,0	0,3	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	x	-	0,7
73	175,7	0,7	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	21,0	19,0	18,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
75	12,0	11,3	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x

Tabla 15. Recuentos totales y recuentos parciales de Aspergillus y sus especies, expresados en UFC/g x 10², en AEM de las muestras de piensos analizadas (sigue)

(Tabla 15, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Ave	En	Ea	Ec	Er
76	1,0	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
94	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	0,3	0,3	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
97	1,0	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	-
115	800,0	40,0	10,0	-	-	-	16,7	-	-	-	-	x	-	-	13,3	x
117	11,7	0,3	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
119	333,3	16,7	3,3	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	x	-	13,3
120	1,7	1,0	x	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	x
121	176,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-
122	1613,3	246,7	146,7	-	-	3,3	-	-	-	-	-	76,7	-	10,0	3,3	6,7
123	1443,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
124	966,7	1,0	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
127	323,3	53,3	-	-	x	x	53,3	-	-	-	-	-	x	x	-	-
128	45,7	4,7	3,6	-	1,0	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-
132	146,7	23,3	10,0	-	-	6,7	-	3,3	-	-	-	-	-	3,3	-	-
134	9666,7	1900,0	33,3	-	33,3	-	-	500,0	-	-	-	-	-	1333,3	-	-
135	23,3	16,7	-	-	16,7	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
137	43,3	0,7	-	-	x	0,3	-	x	-	-	0,3	-	-	x	x	-
138 ^a	3036,7	253,3	106,7	-	146,7	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
162	223,3	73,3	46,7	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	13,3	10,0	3,3
163	423,3	16,7	-	-	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
200	17,0	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,0	-	-	0,3	0,3
201	3,3	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	0,3	0,7	0,7
202	3,3	0,3	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3

(sigue)

(Tabla 15, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
203	16,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
204	1,3	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	x
205	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
206	6,7	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	2,0
207	8,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3
208	59,0	0,7	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3
210	6,0	3,7	-	-	1,3	2,0	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
211	2,7	0,3	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
213	1,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	x	-	-
214	11,0	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2,3
215	170,0	13,3	13,3	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
216	0,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
217	43,3	0,3	-	-	-	-	0,3	-	-	-	x	-	-	-	x	-
218	753,3	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
219	5,3	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	3,7	-
220	28,3	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,3	-	0,7
221	14,0	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3
222	2,0	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
223	373,3	3,3	3,3	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
224	6,7	3,0	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	x	-	2,0	0,3	0,3
225	836,7	6,7	-	-	-	-	-	6,7	-	-	-	-	-	-	-	-
227	42,3	1,0	-	-	x	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
229	35,0	16,7	10,0	-	6,7	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
230	49,7	0,7	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x
231	44,0	1,7	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	0,3

(sigue)

(Tabla 15, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	AcI	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
232	15,3	11,7	-	-	0,7	8,7	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-	-
233	11,3	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
234	3,3	1,3	x	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	0,3
235	26,7	4,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	4,0	-
236	54,3	1,3	-	-	0,7	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
238	4,0	2,7	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	0,3	2,3	-
239	2,7	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-
240	20,5	26,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,5
3795	746,7	6,7	3,3	-	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
244	13,0	5,0	0,7	-	1,0	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	1,7	1,3
250	122,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
252	3,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
255	6,0	113,3	33,3	-	-	-	-	x	-	-	-	-	-	5,0	3,0	-
257	32,5	20,5	13,5	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5	5,5	-
258	36,3	17,0	-	-	6,0	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0
259	26,7	0,7	x	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
261	166,7	46,7	23,3	-	x	x	x	-	-	-	-	-	-	20,0	-	3,3
262	510,0	90,0	15,0	-	40,0	15,0	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	-
263	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	-
264	11,7	8,7	5,0	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,0	1,0	0,3
265	2,7	1,7	0,7	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
272	5,0	1,3	1,0	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
276	173,3	43,3	43,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
277	2,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	-	0,3
278	37,3	25,0	-	-	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0	-
																17,7

(sigue)

(Tabla 15, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Bo	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
279	3,0	2,0	-	-	-	-	0,3	-	-	-	0,3	-	-	x	1,3	-
280	66,7	31,0	2,7	-	x	0,3	0,3	-	-	-	-	-	-	22,7	4,0	1,0
185/98	179,7	24,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13,3	10,7
168/98	94,0	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-
281	13,7	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,7	0,7
282	13,3	5,0	0,3	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3	-
283	31,0	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
284	41,7	6,4	0,7	-	0,7	x	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	3,0
294	13,3	11,7	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	x	11,0	-
298	126,7	946,7	-	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-	-	346,7	596,7	-
299	25,7	22,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20,0	2,3
300	53466,7	53433,3	-	-	33,3	x	-	-	-	-	-	-	-	600,0	52800,0	-
301	186,3	1,0	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
302	4,0	1,7	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	1,0
306	71,0	2,5	1,5	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	0,5	-	-
307	5,3	3,0	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,3	-
308	18,3	12,3	8,3	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,3	1,0
309	3,3	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	-
310	3,3	2,3	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,7	0,7
311	5,7	3,6	x	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,3	2,0
312	26,0	-	-	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-
314	1366,7	66,7	x	-	33,3	-	x	-	-	-	-	-	-	-	33,3	-
316	4,0	2,7	x	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	2,7
317	4,0	1,3	-	-	x	x	-	-	-	-	-	-	-	0,7	x	0,7
318	7,0	7,0	0,3	-	-	-	x	-	-	-	-	-	-	3,3	0,7	2,7
319	11,3	10,1	6,0	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	2,7	0,7

(sigue)

(Tabla 15, continúa)

n°	RT	Asp	Aca	Acl	Afl	Afu	An	Ao	Ar	Ata	Ate	Av	En	Ea	Ec	Er
320	9,3	4,7	-	-	-	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-	4,7
321	8,3	0,3	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x
323	13,3	5,0	3,7	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,3	x	0,7
325	52,0	50,0	30,0	-	x	x	6,7	-	-	-	-	-	-	3,3	10,0	-
338	19,0	2,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,7	x
339	3,7	2,0	0,7	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	x	x	1,3
341	3,7	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,7	1,3
342	3,3	1,0	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	x	0,7	0,3
343	4,3	1,7	-	-	x	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,7	0,7
344	3,0	1,7	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,0
350	10,3	2,3	0,7	-	x	-	x	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-
354	9,7	7,0	x	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	1,3	4,0	1,3
355	296,7	23,3	16,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,7	-	x
357	3,3	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2,0	0,7
358	343,3	10,0	3,3	-	x	-	6,7	-	-	-	-	-	-	-	x	-
359	3,3	2,7	-	-	x	0,3	x	-	-	-	-	-	-	x	1,0	1,3
360	3,7	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	0,3	0,7
94/99	13,0	2,3	-	-	x	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,3	1,7
364	4,0	4,0	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,3	0,3
365	5,3	1,3	-	-	-	-	0,3	-	-	-	x	-	-	x	x	1,0
369	6,0	2,3	1,7	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	x	x	0,3
375	243,3	26,7	10,0	-	-	3,3	x	-	-	-	-	-	-	x	x	6,7
379	270,0	83,3	50,0	-	3,3	-	x	-	-	-	-	x	-	-	23,3	6,7

n°, referencia de la muestra; RT, Recuento total; Asp, Aspergillus; Aca, A. candidus; Acl, A. clavatus; Afl, A. flavus; Afu, A. fumigatus; An, A. niger; Ao, A. ochraceus; Ar, A. restrictus; Ata, A. tamarit; Ate, A. terreus; Av, A. versicolor; En, Emericella nidulans; Ea, Eurotium amstelodami; Ec, E. chevalieri; Er, E. rubrum.

-. ausencia.

x: especie aislada en las placas correspondientes a las diluciones a las que no se realizó el recuento.

	Cereales		Leguminosas		Piensos		Total	
	n= 117		n= 36		n= 147		n= 300	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Aspergillus</i> **	67	57,3	34	94,4	132	89,8	233	77,7
<i>A. candidus</i> **	13	11,1	9	25,0	59	40,1	81	27,0
<i>A. clavatus</i>	1	0,9	0	0	0	0	1	0,3
<i>A. flavus</i> **	36	30,8	29	80,6	64	43,5	129	43,0
<i>A. fumigatus</i>	32	27,4	9	25,0	33	22,4	74	24,7
<i>A. niger</i> *	18	15,4	10	27,8	41	27,9	69	23,0
<i>A. ochraceus</i> **	5	4,3	8	22,2	9	6,1	22	7,3
<i>A. restrictus</i>	1	0,9	0	0	0	0	1	0,3
<i>A. tamarii</i> **	0	0	2	5,6	0	0	2	0,7
<i>A. terreus</i>	10	8,5	5	13,9	11	7,5	26	8,7
<i>A. versicolor</i>	17	14,5	3	8,3	14	9,5	34	11,3
<i>E. nidulans</i> *	9	7,7	0	0	3	2,0	12	4,0
<i>E. amstelodami</i> **	28	23,9	14	38,9	67	45,6	109	36,3
<i>E. chevalieri</i> **	12	10,3	22	61,1	76	51,7	110	36,7
<i>E. rubrum</i> **	24	20,5	11	30,6	72	49,0	107	35,7

**($p < 0,01$), *($p < 0,05$) se detectan diferencias significativas entre las frecuencias de aislamiento en los distintos tipos de muestras.

Tabla 16. Frecuencias y porcentaje de aparición del género *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) y de las especies aisladas en las distintas muestras estudiadas.

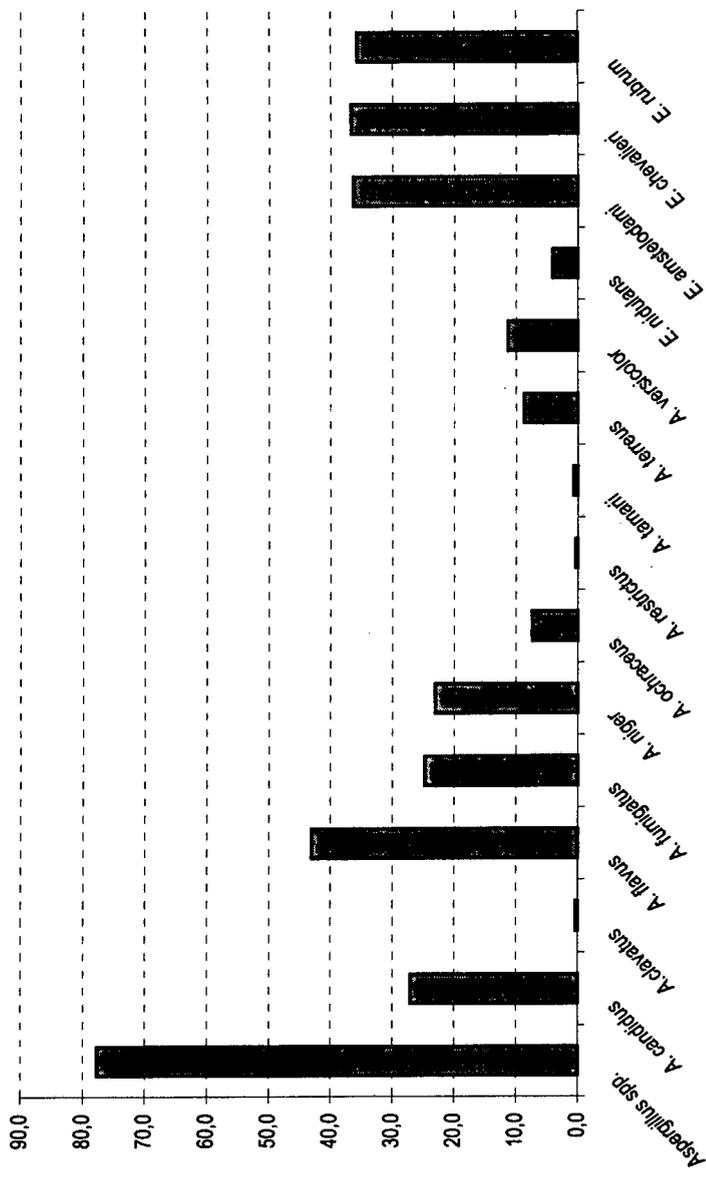


Figura 3. Porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) y sus especies en el total de muestras estudiadas.

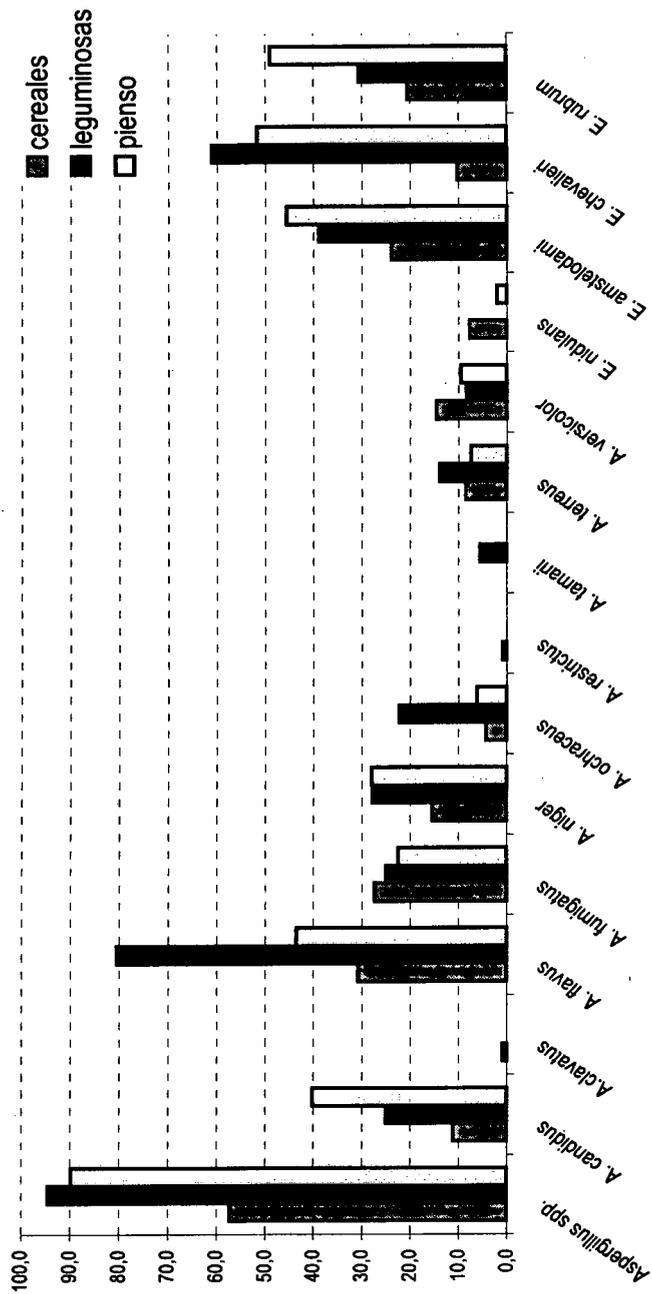


Figura 4. Porcentajes de aislamiento de *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) y sus especies según el tipo de muestra.

	Cereales	Leguminosas	Piensos	Total
<i>Aspergillus</i>	1,7	6,1	52,6	15,6
<i>A. candidus</i>	7,9	2,4	2,7	3,1
<i>A. clavatus</i>	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	19,5	15,4	2,8	4,2
<i>A. fumigatus</i>	33,8	1,1	0,1	2,6
<i>A. niger</i>	2,1	0,4	0,9	0,9
<i>A. ochraceus</i>	0,1	1,2	0,8	0,8
<i>A. restrictus</i>	-	-	-	-
<i>A. tamaritii</i>	-	0,03	-	0,001
<i>A. terreus</i>	19,2	-	0,03	1,5
<i>A. versicolor</i>	1,5	0,2	0,2	0,2
<i>E. nidulans</i>	0,4	-	0,02	0,1
<i>E. amstelodami</i>	7,1	43,2	4,1	4,9
<i>E. chevalieri</i>	4,0	30,6	88,4	81,1
<i>E. rubrum</i>	4,7	5,7	0,2	0,6

Tabla 17. Recuentos parciales medios del género *Aspergillus* (incluyendo sus teleomorfos) respecto al recuento fúngico total medio (%) y recuentos parciales medios de las especies aisladas respecto al recuento medio de *Aspergillus* (%).

5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL AGREGADO *A. niger*.

5.2.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MOLECULAR DE LAS CEPAS DEL AGREGADO *A. niger*.

5.2.1.1. Resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosomal y los ITS1 y 2.

Las secuencias alineadas del rDNA 5.8S y los dos espaciadores intergénicos ITS1 y ITS2 de *A. niger* CBS 554.65 y *A. tubingensis* CBS 134.48, cepas neotipo y tipo, respectivamente de las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991) están representadas en la Figura 5.

La sección de DNA secuenciado de la cepa *A. niger* CBS 554.65 presentó 595 pares de bases, distribuidas de la siguiente forma: 112A, 176C, 172G y 135T. La región del ITS1 ocupó los nucleótidos 31 a 214; el gen 5.8S rDNA, los nucleótidos 215 a 371 y el ITS2, los nucleótidos 372 a 595. La sección de DNA secuenciada de la cepa *A. tubingensis* CBS 134.48 presentó 595 pares de bases, distribuidas de la siguiente forma: 112A, 176C, 171G, y 136T. La región del ITS1 ocupó los nucleótidos 31 a 215; el gen 5.8S rDNA, los nucleótidos 216 a 372 y el ITS2 los nucleótidos 373 a 595.

Al realizar la comparación de las dos secuencias, éstas, resultaron ser muy parecidas. Ambas secuencias presentaron la delección puntual de un nucleótido. En el caso de *A. niger* CBS 554.65, la delección se presentó en el ITS1 (posición 44), mientras que en la cepa *A. tubingensis* CBS 134.48 se presentó en el ITS2 (posición 536). En el ITS1 se observaron cinco diferencias entre las dos secuencias, cuatro transiciones en las posiciones 35, 38, 75 y 128 y la mencionada delección en la posición 44. En el ITS2 sólo se presentaron dos diferencias, una transición en la posición 532 y la citada delección en la posición 536. La transición localizada en la posición 75, determinó la aparición de la diana de la endonucleasa *RsaI* (GTAC/ATAC) en la secuencia de *A. niger* CBS 554.65. El ITS1 del rDNA de *A. niger* CBS 554.65, presentó una diana para *RsaI*, mientras que la secuencia

correspondiente a la cepa de *A. tubingensis* CBS 134.48 no. Esta diferencia nos permitió distinguir entre las dos cepas mediante digestión con *Rsal* y el subsiguiente análisis de RFLP.

Las secuencias del 5.8S-ITS rDNA de *A. niger* CBS 554.65 y *A. tubingensis* CBS 134.48 han sido depositadas en el GenBank, con los números de acceso AJ223852 y AJ223853, respectivamente.

5.2.1.2. Resultados correspondientes a la digestión enzimática de los fragmentos del 5.8S-ITS rDNA mediante PCR.

Debido a la diferencia existente entre las dos secuencias en la posición 75, al digerir con *Rsal* los fragmentos de 5.8S-ITS rDNA amplificados mediante PCR de las dos cepas, pudimos obtener dos patrones de RFLP fáciles de identificar.

El 5.8S-ITS rDNA amplificado mediante PCR de *A. niger* CBS 554.65 fue digerido con *Rsal*, formando dos fragmentos de 519 y 76 pares de bases. Este patrón de RFLP se denominó patrón N. En el caso de *A. tubingensis* CBS 134.48, el 5.8S-ITS rDNA amplificado mediante PCR, al no tener ninguna diana para *Rsal* y por tanto no ser digerido, permaneció como un único fragmento de 595 pares de bases. Este patrón de RFLP se denominó patrón T.

En la Lámina I pueden apreciarse los dos patrones N y T (Apartado 3). La banda de 76 pares de bases del patrón N no se observa en la imagen, al perderse durante la electroforesis.

Todas las cepas ensayadas en nuestro estudio fueron clasificadas como N (44 cepas) o T (48 cepas), es decir, como *A. niger* o *A. tubingensis*, las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991), respectivamente. Los resultados correspondientes a la digestión de las 92 cepas estudiadas están expresados en la Tabla 18.

ITS1

```

                10         20         30         40         50         60
Asp_-niger : TCCGTAGGTG AACCTCCGGA AGGATCATTA CCGAATGTGG GTC-TTTGGG CCCAACCTCC : 59
Asp-tubing : TCCGTAGGTG AACCTCCGGA AGGATCATTA CCGAGTGC GG GTCCTTTGGG CCCAACCTCC : 60
                TCCGTAGGTG AACCTCCGGA AGGATCATTA CCGA TG GG GTC TTTGGG CCCAACCTCC

                70         80         90         100        110        120
Asp_-niger : CATCCGTGTC TATTTTACCC TGTTGCTTCG GCGGGCCCGC CGCTTGTCCG CCGCCGGGGG : 119
Asp-tubing : CATCCGTGTC TATTTTACCC TGTTGCTTCG GCGGGCCCGC CGCTTGTCCG CCGCCGGGGG : 120
                CATCCGTGTC TATT TACCC TGTTGCTTCG GCGGGCCCGC CGCTTGTCCG CCGCCGGGGG

                130        140        150        160        170        180
Asp_-niger : GGGCCCTTG CCCCCCGGG CCGTGCCCGC CGGAGACCCC AACACGAACA CTGTCTGAAA : 179
Asp-tubing : GGGCCCTTG CCCCCCGGG CCGTGCCCGC CGGAGACCCC AACACGAACA CTGTCTGAAA : 180
                GGGCCCT TG CCCCCCGGG CCGTGCCCGC CGGAGACCCC AACACGAACA CTGTCTGAAA

```

GEN 5.8S

```

                190        200        210        220        230        240
Asp_-niger : GCGTGCAGTC TGAGTTGATT GAATGCAATC AGTTAAAACT TTCAACAATG GATCTCTTGG : 239
Asp-tubing : GCGTGCAGTC TGAGTTGATT GAATGCAATC AGTTAAAACT TTCAACAATG GATCTCTTGG : 240
                GCGTGCAGTC TGAGTTGATT GAATGCAATC AGTTAAAACT TTCAACAATG GATCTCTTGG

                250        260        270        280        290        300
Asp_-niger : TTCCGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAGAT GCGATAACTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG : 299
Asp-tubing : TTCCGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGAAAT GCGATAACTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG : 300
                TTCCGGCATC GATGAAGAAC GCAGCGA AT GCGATAACTA ATGTGAATTG CAGAATTCAG

                310        320        330        340        350        360
Asp_-niger : TGAATCATCG AGTCTTTGAA CGCACATTGC GCCCCTGGT ATTCCGGGGG GCATGCCTGT : 359
Asp-tubing : TGAATCATCG AGTCTTTGAA CGCACATTGC GCCCCTGGT ATTCCGGGGG GCATGCCTGT : 360
                TGAATCATCG AGTCTTTGAA CGCACATTGC GCCCCTGGT ATTCCGGGGG GCATGCCTGT

```

ITS2

```

                370        380        390        400        410        420
Asp_-niger : CCGAGCGTCA TTGCTGCCCT CAAGCCCGGC TTGTGTGTTG GGTCGCCGTC CCCCTCTCCG : 419
Asp-tubing : CCGAGCGTCA TTGCTGCCCT CAAGCCCGGC TTGTGTGTTG GGTCGCCGTC CCCCTCTCCG : 420
                CCGAGCGTCA TTGCTGCCCT CAAGCCCGGC TTGTGTGTTG GGTCGCCGTC CCCCTCTCCG

                430        440        450        460        470        480
Asp_-niger : GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGGCGGCA CCGCGTCCGA TCCTCGAGCGT ATGGGGCTTT : 479
Asp-tubing : GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGGCGGCA CCGCGTCCGA TCCTCGAGCGT ATGGGGCTTT : 480
                GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGGCGGCA CCGCGTCCGA TCCTCGAGCGT ATGGGGCTTT

                490        500        510        520        530        540
Asp_-niger : GTCACATGCT CTGTAGGATT GGCCGGCGCC TGCCGACGTT TTCCAACCAT TCTTTACCA: 540
Asp-tubing : GTCACATGCT CTGTAGGATT GGCCGGCGCC TGCCGACGTT TTCCAACCAT TTTT-CCA: 540
                GTCACATGCT CTGTAGGATT GGCCGGCGCC TGCCGACGTT TTCCAACCAT T TTT CCA

                550        560        570        580        590
Asp_-niger : GTTTGACCTC GGATCAGGTA GGGATACCCG CTGAACCTAA GCATATCAAT AAGCGA : 595
Asp-tubing : GTTTGACCTC GGATCAGGTA GGGATACCCG CTGAACCTAA GCATATCAAT AAGCGA : 595
                GTTTGACCTC GGATCAGGTA GGGATACCCG CTGAACCTAA GCATATCAAT AAGCGA

```

Figura 4. Secuencias de DNA de los ITS1, gen 5.8S rRNA y ITS2 de *A. niger* CBS 554.65 (primera línea) y *A. tubingensis* CBS 134.48 (segunda línea). La tercera línea corresponde a la secuencia consenso, en la que hay un espacio cada vez que existe una diferencia entre las secuencias de *A. niger* y *A. tubingensis*. La numeración en el margen derecho indica el número real de bases que hay en cada secuencia al final de cada línea. La diana del enzima *RsaI* está marcada en negra.

Origen	Tipo N		Tipo T	
	n	Cepa	n	Cepa
Pienso	27		7	
Pienso para ave	8	A75	1	A14, A15, A174, A175, A176, A180, A505
Pienso para caballo	8	A219, A220, A388, A629	4	A197, A223, A312, A325
Pienso para cerdo	7	A623	1	A391, A614, A615, A631, A651, A654
Pienso para oveja	2	A390	1	A632
Pienso para perro	1	-	-	A630
Pienso para peces	1	-	-	A488
Materias primas	25		15	
Maíz	12	A74, A77, A79, A82, A83, A84, A251, A306, A307	9	A78, A308, A634
Guisante forrajero	3	A76, A80	2	A81
Soja	7	A85, A87, A136	3	A86, A88, A89, A250
Trigo	3	A655	1	A486, A487
Tierra	7	A635, A636, A638, A643, A658	5	A639, A650
Bolsas guturales	5	A659	1	A628, A652, A653, A657
Oído externo de caballo	1	A484	1	-
Espuito humano	3	A644, A645, A660	3	-
Piel humana	1	-	-	A266
Contaminante aéreo	1	-	-	A348
Contaminante de refresco	1	A624	1	-
Contaminante de colutorio	2	-	-	A190, A198
Arena de acuario	1	-	-	A656
Desconocido	1	A510	1	-
Cepas de colección	17	CBS 554.65, ATCC 22343, NRRL 3122, CBS 618.78, IMI 211394, NRRL 3112, CBS 126.49, CBS 139.52, CBS 118.35, 607 (J. Varga)	10	CBS 134.48, IMI 172296, ATCC 26036, CBS 117.32, CBS 121.55, CBS 558.65, IMI 63764
Total	92		44	

Tabla 18. Distribución de los patrones de RFLP resultantes de la digestión con RsaI de los fragmentos de ITS-5.8S rDNA amplificados mediante PCR según el origen de las cepas estudiadas.

5.2.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CEPAS DEL AGREGADO *A. niger*.

Los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas de las colonias desarrolladas en los medios CYA, MEA y CYA20S a los siete días de incubación a 25°C y los diámetros obtenidos en las placas de CYA incubadas a 37°C se resumen en las Tablas 19 a 21.

En las Tablas 19 y 20 se detallan las características macroscópicas de cada una de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N y tipo T, respectivamente, desarrolladas en los medios CYA, MEA, CYA20S a los siete días de incubación a 25°C y los diámetros obtenidos en las placas de CYA incubadas a 37°C.

Las coloraciones descritas se indican según las siguientes abreviaciones (ver Anexo 2):

A: amarillo	G: gris	MR: marrón rojizo
AC: amarillo claro	I: incoloro	N: negro
B: blanco	M: marrón	V: verde
C: caqui	MC: marrón claro	VC: verde claro
CR: crema	MO: marrón oscuro	VO: verde oscuro

En muchos casos, la coloración tanto del anverso como del reverso no fue uniforme. En estos casos, la variedad de color se expresa mediante las abreviaciones de cada uno de los colores que presentó la colonia. El orden de las coloraciones se corresponde con la importancia que éstos presentaban en la colonia.

La textura de las colonias (T) se indica de la siguiente forma:

AT: aterciopelada	F: flocosa	L: lanosa
-------------------	------------	-----------

En el caso de que la colonia presentara más de un tipo de textura, la textura o texturas no predominantes se indicaron entre paréntesis.

La densidad de la colonia (Den) se indica de la siguiente forma:

d: poco densa D: densa DD: muy densa

La ausencia de exudado (E), de pigmento difusible (P) y de esclerocios (Es) se expresa con el signo -, y la presencia se expresa con la descripción del color que presentaron.

En la Tabla 21 se detallan la media de los diámetros (expresados en mm) junto con los valores mínimos (mín), máximos (Máx) y su desviación típica (DT) de las colonias desarrolladas en los distintos medios a los 7 días de incubación a 25°C (en el caso del medio CYA, a 25°C y a 37°C) del total de las cepas estudiadas y de los dos grupos N y T, obtenidos a partir del análisis de sus patrones de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

Se realizó un análisis de la varianza con el que se detectaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los diámetros presentados en los distintos medios estudiados por el total de cepas ensayadas y por las cepas pertenecientes a los grupos N y T, descritos en función del análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

Se realizó una prueba t de Student para comparar los diámetros obtenidos a los 7 días de incubación en los distintos medios de cultivo por las cepas estudiadas con patrones de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N o tipo T. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos por ambos grupos de cepas.

Los resultados correspondientes al estudio de las características microscópicas de las colonias de las cepas del agregado *A. niger* desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C en el medio MEA se resumen en las Tablas 4 a 8.

En las Tablas 22 y 23 se detallan las características microscópicas de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N y T respectivamente, desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C en el medio MEA.

Se detallan, para cada una de las cepas estudiadas las siguientes características:

- Longitud (Long) y anchura (Anch) de los estipes (expresados en μm), así como su textura (T) y color.
- Diámetro (D) de las vesículas (expresado en μm) y su color.
- Longitud (Long) y anchura (Anch) de las métulas (expresados en μm), así como su color.
- Longitud (Long) y anchura (Anch) de las fiálides (expresados en μm), así como su color.
- Diámetro (D) de los conidios (expresado en μm), así como su ornamentación (Om) y color.

Las coloraciones descritas se indican según las siguientes abreviaciones (ver Anexo 2):

A: amarillo	I: incoloro	MO: marrón oscuro
AG: amarillo grisáceo	M: Marrón	N: negro
C: caqui	MC: marrón claro	VO: verde oscuro
G: gris	MG: marrón grisáceo	
GN: gris negruzco	MN: marrón negruzco	

En algunos casos, las estructuras estudiadas presentaron distintas coloraciones dentro de la misma preparación microscópica. En estos casos, la variedad de color se expresa mediante las abreviaciones de cada uno de los colores, ordenados según la importancia que éstos presentaron en la preparación microscópica realizada a partir de la colonia. Con frecuencia los estipes presentan, en su longitud, distintas coloraciones. En estos casos, la variedad de colores se expresa mediante las abreviaciones de cada uno de los colores, ordenados según la importancia que éstos presentaron en el estipe.

La textura de los estipes (T) se indica de la siguiente forma:

L: lisa

R: rugosa

La ornamentación de los conidios (Orn) se indica de la siguiente forma:

R: rugosa

RC: Rugosa con crestas longitudinales

RP: Rugosa con protuberancias

En la Tabla 24 se detallan la media de las mediciones (expresadas en μm) de los estipes, las vesículas, las métulas, las fiálides y los conidios en las preparaciones microscópicas realizadas a partir de las colonias desarrolladas en medio MEA a los 7 días de incubación a 25°C del total de las cepas estudiadas y los grupos N y T, definidos según el patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA. Asimismo, se indican los valores mínimos (mín), máximos (Máx) y su desviación típica (DT).

Se realizó un análisis de la varianza con el que se detectaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los resultados presentados en las distintas estructuras estudiadas por el total de cepas ensayadas y por las cepas pertenecientes a los grupos N y T, descritos en función del análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

Se realizó una prueba t de Student para comparar las mediciones de las distintas estructuras microscópicas estudiadas en las cepas ensayadas con patrones de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N y tipo T. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en la anchura de los estipes, la longitud y anchura de las métulas y los diámetros de los conidios de los grupos N y T. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el resto de las mediciones de las distintas estructuras microscópicas estudiadas en ambos grupos de cepas.

Cepa	CYA						MEA						CYA20S											
	D	D37°C	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es	D	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es							
A74	7,3	5,4	VO	MC	AT	D	-	-	-	5,9	VN	A	AT	d	-	-	-	7,3	C	A	F	D	-	-
A75	7,3	5,6	MON	M	AT(F)	D	-	-	-	4,8	VON	AC	AT(F)	d	-	-	-	7,3	MO	A	F	DD	-	-
A76	7,3	6,2	VO	AMC	AT	D	-	-	-	6,0	VON	A	AT	d	-	-	-	7,3	C	A	AT	D	-	-
A77	7,4	6,0	VO	A	F	D	-	-	-	5,9	VN	A	F	d	-	-	-	7,3	VN	A	L	D	-	-
A79	7,3	6,3	VO	MC	AT(F)	D	-	-	-	5,2	VN	A	F	d	-	-	-	7,3	AV	BA	F	DD	-	-
A80	7,2	5,1	CN	A	AT	D	-	-	-	6,3	CN	A	AT(F)	d	-	-	-	6,9	C	A	AT	D	-	-
A82	7,3	6,0	CMO	MC	AT	D	-	-	-	5,8	VN	I	AT	d	-	-	-	7,3	CVC	BA	F	DD	-	-
A83	7,4	4,8	MOB	MCB	AT	D	-	-	-	5,3	NBA	A	AT	d	-	-	-	7,5	CB	BA	L	DD	-	-
A84	7,3	5,6	VO	A	AT	DD	-	-	-	5,8	CN	AC	AT	d	-	-	-	7,1	VM	A	AT	DD	-	-
A85	7,3	5,4	VM	BA	AT	D	-	-	-	6,1	C	A	AT	d	-	-	-	7,3	VGN	BA	L	D	-	-
A87	7,3	6,5	MO	MC	AT	D	-	-	-	6,4	VN	AC	AT(F)	d	-	-	-	7,4	VO	A	F	D	-	-
A136	7,1	4,9	MO	A	AT	D	-	-	-	4,5	VN	AC	AT	d	-	-	-	7,2	MN	I	AT	D	-	-
A219	6,9	6,9	MVON	VCAC	AT	d	-	-	-	3,2	VON	G	AT	d	-	-	-	7,5	VMO	AC	AT	d	-	-
A220	6,8	6,9	MONA	AVG	AT	d	-	-	-	2,5	N	G	AT	d	-	-	-	7,2	VMON	ACG	AT	d	-	-
A251	7,1	7,1	VN	A	AT	d	-	-	-	4,9	N	A	F	d	-	-	-	7,0	NVG	AC	L	d	-	-
A306	7,4	7,3	NGV	A	AT	d	-	-	-	5,2	NVG	A	AT	d	-	-	-	7,3	NVG	A	AT	d	-	-
A307	6,8	7,4	NCG	AC	AT	d	-	-	-	4,8	NVG	AG	AT	d	-	-	-	7,5	VGN	A	AT	d	-	-
A388	7,0	6,9	VON	AG	AT	d	-	-	-	6,2	NVO	I	AT	d	-	-	-	7,4	CN	AG	AT	d	-	-
A390	7,1	7,0	MCN	GA	AT	d	-	-	-	6,5	NM	AC	AT	d	-	-	-	7,4	VGN	G	AT	d	-	-
A484	7,2	7,1	N	AG	AT	d	-	-	-	4,2	N	A	AT	d	-	-	-	6,9	VG	AC	AT	d	-	-
A510	7,3	5,8	MO	M	AT	D	-	-	-	5,2	MOVO	I	AT	d	-	-	-	7,4	MV	A	AT	D	-	-
A623	7,3	7,3	MN	AC	AT	D	-	-	-	4,5	N	I	AT	d	-	-	-	7,4	CN	A	AT(F)	DD	-	-
A624	7,3	7,3	MN	AC	AT	D	-	-	-	5,0	N	A	AT	d	-	-	-	7,4	CN	A	AT	DD	-	-
A629	7,4	7,0	MON	A	AT	DD	-	-	-	5,5	N	I	AT	d	-	-	-	7,4	VMCN	A	AT	DD	-	-

Tabla 19. Características macroscópicas de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C. D: diámetro (expresado en mm); D37°C: diámetro en CYA a 37°C (expresado en mm); Anv: anverso; Rev: reverso; T: textura; Den: densidad de la colonia; E: exudado; P: pigmento difusible; Es: esclerocios (sigue).

Cepa	CYA										MEA										CYA20S											
	D 37°C		Anv		Rev		T		Den		E		P		Es		D		Anv		Rev		T		Den		E		P		Es	
	D	D37°C	M	N	AC	AT	D	D	AT	AT	D	D	AT	AT	D	D	AT	AT	D	D	M	A	AT	AT	D	D	D	D	D	D	D	D
A635	6,5	7,2	M	N	AC	AT	D	D	AT	AT	5,4	N	I	AT	d	-	-	-	-	7,2	M	A	AT	DD	-	-	-	-	-	-	-	
A636	7,4	7,3	MN	N	AC	AT	D	D	AT	AT	5,1	N	I	AT	d	-	-	-	-	7,4	MV	AC	AT	DD	-	-	-	-	-	-	-	
A638	7,2	6,8	N	NV	GV	AT	d	-	AT	AT	4,7	NV	BA	AT	d	-	-	-	-	7,4	GVN	BA	AT	d	-	-	-	-	-	-	-	
A643	7,3	6,4	N	N	G	AT	d	-	AT	AT	5,2	N	BG	AT	d	-	-	-	-	7,4	NG	BA	AT	d	-	-	-	-	-	-	-	
A644	7,3	7,1	NMC	N	B	F	D	-	F	AT	4,6	MCN	BA	AT	d	-	-	-	-	7,3	MC	BA	F	D	-	-	-	-	-	-	-	
A645	7,3	6,8	N	N	VB	AT	d	-	AT	AT	5,2	NVO	VAC	AT	d	-	-	-	-	7,6	NG	AN	AT	D	-	-	-	-	-	-	-	
A655	7,4	6,8	V	V	A	AT	D	-	AT	AT	5,5	CN	AC	AT	d	-	-	-	-	7,0	VA	B	F	D	-	-	-	-	-	-	-	
A658	6,9	5,6	VO	VO	A	AT	D	-	AT	AT	5,2	VVO	I	AT(F)	d	-	-	-	-	7,3	C	AC	AT	DD	-	-	-	-	-	-	-	
A659	7,2	6,3	MNB	MNB	AM	F	D	-	F	AT	5,5	CN	AC	AT	d	-	-	-	-	7,3	C	AC	F	DD	-	-	-	-	-	-	-	
A660	7,4	6,1	ACVO	ACVO	A	F	D	-	F	AT	4,9	VOA	A	AT	d	-	-	-	-	7,3	C	BA	L	DD	-	-	-	-	-	-	-	
CBS 554.65	7,3	4,5	MO	MO	MC	AT(F)	d	-	AT(F)	F	6,4	VO	A	F	d	-	-	-	-	7,1	MO	A	L	D	-	-	-	-	-	-	-	
CBS 118.35	7,4	5,4	M	M	M	L	d	-	L	F	5,0	NVG	A	F	d	-	-	-	-	7,4	GA	A	L	d	-	-	-	-	-	-	-	
CBS 126.49	7,3	6,2	N	N	MC	AT	D	-	AT	AT(F)	5,7	N	A	AT(F)	d	-	-	-	-	7,3	MA	A	F(L)	DD	-	-	-	-	-	-	-	
CBS 139.52	7,3	6,5	GV	GV	AM	F	D	-	F	AT	5,7	GB	A	AT	D	-	-	-	-	7,2	VG	A	F	DD	-	-	-	-	-	-	-	
CBS 618.78	6,5	4,5	AM	AM	A	AT	d	-	AT	AT	5,3	MO	A	AT	d	-	-	-	-	7,3	AN	A	L	DD	-	-	-	-	-	-	-	
ATCC 22343	7,3	7,0	NGA	NGA	A	F	d	-	F	AT	6,0	NVG	A	F	d	-	-	-	-	7,4	VG	A	L	d	-	-	-	-	-	-	-	
IMI 211394	7,2	7,3	NB	NB	AC	AT	d	-	AT	AT	5,2	NB	AC	AT	d	-	-	-	-	7,3	VCAN	A	AT(F)	D	-	-	-	-	-	-	-	
NRRL 3122	3,8	5,4	N	N	MA	AT	d	-	AT	AT	3,4	MOA	AC	AT	d	-	-	-	-	4,1	VCA	A	AT	d	-	-	-	-	-	-	-	
NRRL 3112	5,9	5,4	NMOA	NMOA	AM	AT	d	-	AT	AT	4,9	MCA	AC	AT	d	-	-	-	-	7,2	GA	A	F	d	-	-	-	-	-	-	-	
607 (JC)	6,6	6,7	N	N	MAC	F(L)	d	-	F	F	6,3	N	AC	F	d	-	-	-	-	7,4	N	I	L	D	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 19 (cont). Características macroscópicas de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C. D: diámetro (expresado en mm); D37°C: diámetro en CYA a 37°C (expresado en mm); Anv: anverso; Rev: reverso; T: textura; Den: densidad de la colonia; E: exudado; P: pigmento difusible; Es: esclerocios.

Cepa	CYA						MEA						CYA20S												
	D	D37°C	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es	D	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es	D	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es
A14	7,1	5,2	M	MA	F	D	-	-	-	5,2	VO	I	AT	d	-	-	-	7,4	VC	A	F	d	-	-	-
A15	7,1	4,3	MV	AM	AT(F)	d	-	-	-	4,7	NC	I	AT(F)	d	-	-	-	7,4	VC	A	F	D	-	-	-
A78	7,3	4,6	MO	V	AT	d	-	-	-	4,4	VON	AC	AT	d	-	-	-	7,3	VOM	A	F	DD	-	-	-
A81	7,3	6,6	M	A	AT	d	-	-	-	5,5	CN	AC	AT	d	-	-	-	7,3	VCN	A	F	d	-	-	-
A86	7,3	7,1	VO	AM	AT	d	-	-	-	4,2	NGV	I	AT(F)	d	-	-	-	7,3	CVC	A	F	D	-	-	-
A88	7,2	5,8	MN	A	F	d	-	-	-	5,6	GVON	I	F	d	-	-	-	7,3	VG	A	L	d	-	-	-
A89	7,3	6,2	M	MA	F	d	-	-	-	5,8	VN	BA	F	d	-	-	CR	7,3	VC	A	L	d	-	-	-
A174	7,3	4,8	VO	MC	AT	d	-	-	-	4,9	VO	AC	AT	d	-	-	-	7,4	C	A	F	d	-	-	-
A175	7,1	4,4	V	M	F	D	-	-	-	5,3	V	I	AT	d	-	-	-	7,3	V	A	F	DD	-	-	-
A176	7,3	4,2	VO	AM	AT	D	-	-	-	4,8	VO	AC	AT	d	-	-	-	7,3	VO	AC	F	DD	-	-	-
A180	7,3	5,6	VO	AM	AT	D	-	-	-	5,7	C	AC	AT	d	-	-	-	7,3	VC	A	F	D	-	-	-
A190	7,3	6,3	MVO	MA	AT	D	-	-	-	5,8	C	AC	AT(F)	d	-	-	-	7,3	VG	A	F	D	-	-	-
A197	7,5	4,7	VO	MC	AT	d	-	-	-	4,8	VO	A	AT	d	-	-	-	7,4	VO	A	L	d	-	-	-
A198	7,2	4,6	VO	A	AT	d	-	-	-	4,3	V	AC	AT	d	-	-	-	7,4	VC	A	F	d	-	-	-
A223	7,0	7,0	VON	GV	AT	d	-	-	-	5,5	NVG	G	AT	d	-	-	-	7,0	NVO	GV	AT	d	-	-	-
A250	7,2	7,1	NVO	AG	AT	d	-	-	-	4,9	NVO	G	AT	d	-	-	-	6,1	N	G	F(L)	d	-	-	-
A266	7,1	7,2	NVG	AC	AT	d	-	-	-	5,2	NVG	AC	AT	d	-	-	-	7,3	VGN	AC	AT	d	-	-	-
A308	6,6	7,1	NC	AG	AT	d	-	-	-	4,5	NVO	AC	AT	d	-	-	-	7,1	VN	AG	AT	d	-	-	-
A312	7,4	7,4	NGV	GA	AT	d	-	-	-	5,7	NGV	GA	AT	d	-	-	-	7,4	GVN	A	AT	d	-	-	-
A325	7,2	7,3	VM	AG	AT	d	-	-	-	5,2	MV	AC	AT	d	-	-	-	7,5	VGN	A	AT	d	-	-	-
A348	7,2	7,1	MO	VG	AT	d	-	-	-	4,9	MVN	A	AT	d	-	-	-	7,5	VON	VA	AT	d	-	-	-
A391	7,0	6,8	NMO	AG	AT	d	-	-	-	5,5	NVO	I	AT	d	-	-	-	7,4	CG	A	AT	d	-	-	-
A486	7,0	7,0	MON	AC	AT	D	-	-	-	5,3	MON	AC	AT	d	-	-	-	7,0	VMO	A	AT	DD	-	-	-
A487	7,3	7,3	NMO	I	AT	d	-	-	-	5,0	VON	AC	AT	d	-	-	-	7,4	GVO	A	AT	D	-	-	-

Tabla 20. Características macroscópicas de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C. D: diámetro (expresado en mm); D37°C: diámetro en CYA a 37°C (expresado en mm); Anv: anverso; Rev: reverso; T: textura; Den: densidad de la colonia; E: exudado; P: pigmento difusible; Es: esclerocios (sigue).

Cepa	CYA					MEA					CYA20S											
	D	D37°C	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es	D	Anv	Rev	T	Den	E	P	Es					
A488	7,1	6,8	N	V	AT	D	-	-	-	5,0	N	VG	AT	d	-	-	-	7,4	N	VA	AT	DD
A505	7,1	4,6	VO	AM	F	d	-	-	-	4,4	V	AC	F	d	-	-	-	7,3	V	A	L	d
A614	7,5	7,3	VO	A	AT	D	-	-	-	4,7	NMV	I	AT	d	-	-	-	7,4	VO	A	AT	DD
A615	7,4	7,0	V	A	AT	D	-	-	-	5,6	NVO	I	F	d	-	-	-	7,2	V	A	AT	DD
A628	7,3	6,9	CN	AC	AT	D	-	-	-	5,3	NVM	I	AT	d	-	-	-	7,4	C	A	AT	DD
A630	7,5	6,8	M	A	AT	D	I	-	-	4,3	MON	I	AT	d	-	-	-	7,2	C	AM	AT	DD
A631	7,3	6,9	MC	AC	AT	D	-	-	-	5,1	NC	I	AT	d	-	-	-	7,3	CN	A	AT(F)	DD
A632	6,6	7,1	C	A	AT	D	-	-	-	6,8	MON	I	AT	d	-	-	-	7,1	CN	A	F	DD
A634	7,4	6,5	C	A	AT	D	-	-	-	5,5	NC	I	AT	d	-	-	-	7,1	CN	A	AT	DD
A639	7,3	6,0	MVO	M	AT	d	-	-	-	4,5	V	I	AT	d	-	-	-	7,3	VCN	A	F	d
A650	7,4	6,0	MV	M	AT	D	-	-	-	4,4	V	BA	AT(F)	d	-	-	-	7,2	CGN	A	AT(F)	D
A651	7,4	4,2	VO	A	AT	D	-	-	-	4,6	C	AC	AT	d	-	-	-	7,3	C	A	AT	DD
A652	7,3	4,2	GVO	A	AT	d	-	-	-	4,9	C	AC	AT	d	-	-	-	7,4	VGN	A	AT	DD
A653	7,3	4,0	VOM	AM	AT	D	-	-	-	4,7	VN	A	AT	d	-	-	-	7,3	C	A	AT(F)	DD
A654	7,3	4,2	VON	A	AT(F)	D	-	-	-	5,1	V	I	AT(F)	d	-	-	-	7,2	CN	A	F	D
A656	7,2	4,0	VM	A	AT	D	-	-	-	4,8	VN	AC	F	d	-	-	-	7,3	C	A	AT	DD
A657	7,3	4,3	VM	AMC	AT	D	-	-	-	5,1	C	AC	AT	d	-	-	-	7,4	CVO	A	F	DD
CBS 134.48	7,3	7,2	B	A	AT	d	-	-	-	7,3	BGN	A	L	d	-	-	-	7,4	B	A	L	d
CBS 558.65	7,2	6,7	VO	A	F(L)	d	-	-	-	4,3	VO	BA	F(L)	d	-	-	-	7,3	VO	A	L	d
CBS 117.32	7,0	7,0	BN	A	AT	d	-	-	-	6,8	N	A	F	d	-	-	-	7,2	GV	A	L	d
IMI 172296	7,3	7,1	MCN	MC	L	d	-	-	-	6,4	V	AC	F(L)	d	-	-	-	7,4	C	M	L	d
IMI 63764	7,2	7,2	MCN	MR	AT(F)	d	-	-	-	7,1	VG	BA	F	d	-	-	-	7,3	VG	A	L	d
ATCC 26036	7,3	7,1	NVO	A	F	d	-	-	CR	5,5	BVO	B	AT(F)	d	-	-	-	7,4	M	A	L	d
CBS 121.55	7,3	6,7	NV	MA	L	d	-	-	-	5,9	VG	A	L	d	-	-	-	7,2	GA	A	L	d

Tabla 20 (cont). Características macroscópicas de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C. D: diámetro (expresado en mm); D37°C: diámetro en CYA a 37°C (expresado en mm); Anv: anverso; Rev: reverso; T: textura; Den: densidad de la colonia; E: exudado; P: pigmento difusible; Es: esclerocios.

	total (n= 92)						cepas tipo N (n= 44)						cepas tipo T (n= 48)					
	C YA		M EA		C YA 20S		C YA		M EA		C YA 20S		C YA		M EA		C YA 20S	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
mín	3,7	4,0	2,5	4,3	3,7	4,3	2,5	2,5	3,7	4,0	4,2	5,8	4,0	4,2	5,5			
Máx	8,0	7,9	7,5	8,0	8,0	7,8	7,0	8,0	8,0	7,9	7,5	8,0	7,9	7,5	8,0			
Media	7,2	6,2	5,2	7,3	7,1	6,3	5,2	7,2	7,2	6,1	5,2	7,2	6,1	5,2	7,3			
DT	0,5	1,1	0,8	0,9	0,6	0,9	0,9	0,6	0,9	1,2	0,7	0,3	1,2	0,7	0,3			

Tabla 21. Media de los diámetros obtenidos (expresados en mm) en los distintos medios a los 7 días de incubación a las temperaturas indicadas junto con los valores mínimos (mín), máximos (Máx) y su desviación típica (DT) del total de las cepas estudiadas y de los dos grupos N y T obtenidos a partir del análisis de sus patrones de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

Cepa	Estipe			Vesícula		Métula			Fíalide			Conidio			
	Long	Anch	T	Color	D	Color	Long	Anch	Color	Long	Anch	Color	D	Om	Color
A74	2295,0	15,3	L	IM	55,4	MO	20,0	5,8	MO	6,7	2,9	MO	4,0	RC	MO
A75	1045,0	16,6	L	IA	49,7	M	23,4	5,1	M	7,2	2,9	M	3,8	R	M
A76	2062,5	16,4	L	IMC	52,7	MO	28,7	6,2	MO	7,3	2,8	MO	4,0	RP	MO
A77	1932,0	15,8	L	MC	50,1	MC	33,7	5,9	MC	8,4	3,1	MC	4,0	RP	MC
A79	1190,0	15,1	L	IA	49,3	MO	27,0	5,0	MO	7,0	3,1	MO	3,7	RP	MO
A80	1862,5	14,5	L	IA	48,0	MO	24,3	5,2	MO	7,3	3,0	MO	3,9	RC	G
A82	1670,5	14,9	L	IA	56,5	MO	33,3	6,2	MO	7,1	3,0	MO	3,7	RC	M
A83	1362,5	17,2	L	IA	39,1	MO	19,0	5,4	MO	6,8	2,8	MO	4,0	R	M
A84	2112,5	14,2	L	IMC	51,6	MO	25,1	5,2	MO	7,5	3,0	MO	3,8	R	MC
A85	1152,5	15,7	L	I	49,8	MC	33,4	5,6	MC	7,0	2,9	MC	3,9	R	MC
A87	2692,5	15,4	L	IA	45,4	MO	16,9	4,6	MO	6,4	2,8	MO	3,9	R	MC
A136	2272,5	14,4	L	IA	44,0	MO	19,7	4,8	MO	7,7	3,0	MO	4,0	R	MG
A219	2265,0	13,5	L	A	53,9	M	17,7	5,8	M	5,8	3,0	M	3,1	R	N
A220	2112,5	14,4	L	M	70,9	M	13,7	4,9	M	8,6	3,6	M	4,6	R	MN
A251	2134,0	13,8	L	I	47,9	I	42,5	7,3	I	9,8	3,5	I	4,1	RP	MC
A306	1317,5	14,0	L	A	67,1	G	26,4	5,7	G	6,3	2,5	G	4,1	R	N
A307	1907,5	13,5	L	IMC	60,4	MN	21,4	5,6	MN	6,5	2,8	MN	3,6	R	MG
A388	1327,5	17,9	L	IMC	56,5	MO	19,3	5,3	MO	7,0	2,2	MO	3,9	R	G
A390	1525,0	16,1	L	IMC	56,8	MO	18,4	4,5	MO	7,3	2,7	MO	4,3	RC	MO
A484	1560,0	12,1	L	IM	48,0	N	18,2	4,2	N	5,3	2,4	N	5,0	RC	N
A510	2620,0	12,7	L	IMC	47,7	MO	21,0	4,5	MO	7,2	3,0	MO	3,2	R	MC
A623	948,0	13,5	L	A	64,6	MO	37,4	4,8	MO	7,8	2,6	MO	3,8	RP	ANM
A624	1350,0	15,9	L	IA	48,7	M	21,1	5,0	M	7,5	2,4	M	3,9	R	MGN
A629	1836,8	14,6	L	IMC	48,3	I	14,7	4,3	I	7,1	2,6	M	3,9	RP	AG
A635	1922,5	16,2	L	IMC	53,5	MO	16,0	4,7	MO	6,7	2,9	MO	4,1	RC	MONG
A636	2315,0	16,4	L	IMC	54,7	MO	20,6	5,2	MO	7,3	2,6	MO	4,3	RC	AGN
A638	2038,1	14,9	L	AG	54,4	MO	18,8	4,6	MO	7,3	2,8	MO	3,7	RC	AGN
A643	2772,5	18,6	L	IMC	55,4	MO	22,8	5,1	MOM	7,3	2,7	MO MC	3,9	RC	AGMO
A644	1982,5	17,7	L	IMC	52,6	MO	28,8	5,2	MO	7,5	2,7	MO	3,9	RP	AGM
A645	2206,3	16,1	L	IA	46,8	MO	18,0	5,1	MO	7,2	2,7	MO	4,0	RC	MO
A655	2360,0	17,5	L	IM	64,5	MO	40,7	7,2	MO	9,3	3,1	MO	4,3	RP	M
A658	2117,5	14,2	L	IM	49,6	MO	38,7	6,5	MO	7,9	3,2	M	4,1	RP	M
A659	2135,0	17,0	L	IA	57,1	M	32,0	6,4	MC	7,2	3,0	MC	3,3	R	MC
A660	888,0	14,7	L	IA	45,8	M	14,5	4,1	MC	6,3	2,2	MC	4,0	R	MC
CBS 554.65	2097,5	17,4	L	IM	54,5	MO	21,6	5,1	MO	6,8	2,6	MO	4,0	RC	M
CBS 118.35	1682,5	12,4	L	A	34,0	MO	14,9	4,4	MO	6,2	2,6	MO	3,7	R	MO
CBS 126.49	2217,5	12,7	L	IA	45,3	MO	15,8	4,4	MO	6,1	2,9	MO	4,2	RC	M
CBS 139.52	1075,5	16,2	L	IA	42,1	MO	22,1	5,0	MO	6,1	2,6	MO	3,4	RC	MO
CBS 618.78	741,0	14,1	L	A	41,0	MO	14,8	4,3	MO	6,7	2,2	MO	4,6	R	MC
ATCC 22343	1088,0	13,3	L	IM	50,1	MO	18,8	4,8	MO	6,0	2,2	MO	4,5	RC	MO
IMI 211394	1330,0	11,3	L	MO	41,3	MO	17,8	5,1	MO	7,4	2,4	MO	3,9	RP	MO
NRRL 3122	481,0	10,6	L	IA	30,9	C	17,1	5,0	C	7,0	2,9	C	4,2	R	C
NRRL 3112	528,1	13,9	L	IA	41,2	MO	15,0	4,2	MO	6,1	2,2	MO	4,6	RP	MO
607 (JC)	1257,0	12,3	L	A	37,9	MO	19,0	4,5	MO	6,3	2,3	MO	4,0	R	MO

Tabla 22. Características microscópicas de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C en el medio MEA. Long: longitud; Anch: anchura; D: diámetro; Om: ornamentación ;T: textura.

Cepa	Estipe				Vesícula		Métula			Fiálide			Conidio		
	Long	Anch	T	Color	D	Color	Long	Anch	Color	Long	Anch	Color	D	Orn	Color
A14	1175,0	13,6	L	I	41,3	MO	21,1	5,3	MO	7,1	2,7	MO	3,7	R	M
A15	1122,5	12,8	L	IMC	50,9	MO	25,4	5,5	MO	7,4	2,9	MO	3,7	R	MO
A78	3791,0	13,7	L	IA	43,1	MO	27,0	5,4	MO	9,0	3,2	MO	3,7	RP	MC
A81	2027,5	15,2	L	IA	54,2	MO	28,1	6,3	MO	7,6	3,0	MO	3,7	R	MO
A86	1515,0	14,7	L	I	54,4	MO	30,8	6,8	MO	6,5	3,0	MO	3,8	R	MMO
A88	639,0	14,2	L	IA	46,6	MO	18,0	5,2	MO	6,6	2,8	MO	3,8	R	MG
A89	1785,0	16,1	L	IMC	57,2	MO	24,2	5,4	MO	8,5	3,0	MO	3,5	R	MC
A174	1727,0	15,7	L	IMC	58,1	MO	20,4	4,5	MO	7,1	3,0	MO	3,5	R	MO
A175	1001,0	13,3	L	IMC	46,9	MO	28,8	5,1	MO	7,6	2,8	MO	3,8	R	C
A176	1555,0	13,1	L	IMC	42,3	MO	19,6	4,7	MO	7,3	2,3	MO	3,8	R	M
A180	1950,0	14,2	L	IA	45,9	MC	23,2	4,9	MC	7,3	2,8	MC	3,8	R	MC
A190	1748,0	14,1	L	IA	50,5	MC	23,2	4,7	MC	7,4	3,0	MC	3,6	R	MC
A197	1738,0	14,2	L	A	45,6	M	21,6	5,6	M	7,3	2,8	M	3,8	R	M
A198	1186,0	12,9	L	IA	44,8	M	23,1	5,1	M	6,7	2,9	M	3,6	R	MC
A223	1727,5	13,3	L	IA	59,5	M	25,9	4,7	M	11,2	2,8	M	3,2	R	N
A250	1917,5	11,7	L	IA	47,5	N	11,6	4,6	N	5,8	2,6	N	3,6	RP	N
A266	1292,5	15,0	L	G	47,8	G	29,0	6,9	G	9,1	3,0	G	3,8	R	G
A308	1584,0	14,0	L	MC	63,6	MN	20,1	4,5	MN	7,3	2,6	MN	3,1	R	N
A312	1930,0	13,5	L	MC	60,4	I	19,1	4,6	I	7,3	2,8	I	3,2	R	G
A325	1395,5	13,6	L	A	58,8	MO	17,8	5,1	MO	7,0	2,6	MO	3,1	R	M
A348	1283,5	12,8	L	A	47,4	I	14,8	4,2	I	6,7	2,5	MO	3,5	R	MG
A391	1575,5	12,5	L	A	55,3	MO	19,7	5,0	MO	6,6	2,4	MO	3,2	RC	MO
A486	1535,0	16,5	L	MC	53,0	G	17,4	5,0	A	6,1	2,3	GN	3,8	R	GN
A487	761,0	16,8	L	A	64,0	MO	23,9	7,3	MO	7,0	3,2	MO	3,9	R	G
A488	1787,5	12,1	L	I	52,3	MO	15,0	4,0	VO	5,3	2,5	C	2,9	R	C
A505	1552,5	13,2	L	I	40,7	MO	15,1	4,5	MO	6,8	2,5	MO	3,8	R	M
A614	1575,0	17,6	L	A	58,0	MG	14,8	4,9	MG	8,0	3,0	MG	3,6	RP	AG
A615	700,0	13,7	L	I	50,4	I	27,5	6,1	I	8,1	2,9	I	4,0	RP	M
A628	1041,9	18,3	L	MC	61,0	M	19,3	4,6	M	6,5	2,5	M	3,6	R	MC MO
A630	1355,0	15,6	L	A MC	57,8	M	19,0	4,5	M	7,2	2,7	M	3,4	RC	MC
A631	1612,5	14,7	L	IA	57,7	MO	19,5	5,0	MO	6,9	2,7	MO	3,8	RP	AG N
A632	1091,0	15,5	L	IMC	49,1	MO	21,2	4,7	MO	7,6	2,8	MO	3,7	RC	MO
A634	2368,5	18,5	L	IMC	57,8	MO MC	18,0	4,5	MO MC	6,9	2,5	MO MC	3,4	RP	A M
A639	2081,0	15,7	L	IA	54,8	MO	22,2	5,5	MO	7,4	2,6	MO	3,7	RP	MO
A650	1120,0	16,0	L	A	49,1	MO	18,8	4,7	M	7,8	2,3	MO	3,8	R	M
A651	1923,0	14,7	L	IMC	51,3	MO	23,0	5,5	MO	7,4	2,7	MO	3,4	R	M
A652	2220,0	15,1	L	IMC	54,1	M	20,9	5,5	M	6,7	2,3	M	3,4	R	M
A653	2057,5	14,1	L	A	47,2	MO	20,9	5,0	MO	7,2	2,3	MO	3,8	R	M
A654	1990,0	14,2	L	IA	47,9	MO	21,4	5,1	MO	7,7	2,9	MO	3,6	R	A
A656	2160,0	14,4	L	A	54,6	MO	21,6	5,3	MO	7,6	3,0	MO	3,6	R	MO
A657	2510,0	13,9	L	IMC	44,5	MO	16,7	4,3	MO	6,6	2,8	MO	3,8	R	M

Tabla 23. Características microscópicas de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C en el medio MEA. Long: longitud; Anch: anchura; D: diámetro; Orn: ornamentación; T: textura (sigue).

Cepa	Estipe				Vesícula		Métula			Fiálide			Conidio		
	Long	Anch	T	Color	D	Color	Long	Anch	Color	Long	Anch	Color	D	Orn	Color
CBS 134.48	1642,5	11,9	L	I	41,7	MC	26,0	3,8	MC	6,0	3,0	MC	4,0	R	MC
CBS 558.65	1060,0	16,1	L	IA	51,9	MO	24,5	5,0	MO	7,0	2,2	MO	3,6	R	M
CBS 117.32	2925,0	18,1	L	IMC	45,2	MO	19,9	4,2	MO	6,6	2,8	MO	3,6	RC	MO
IMI 172296	1687,5	12,4	L	IA	44,5	M	18,2	4,3	M	5,8	2,6	M	3,3	R	M
IMI 63764	3240,0	12,7	L	A	40,1	M	14,3	4,2	M	6,0	2,0	M	3,6	RC	M
ATCC 26036	1399,5	13,7	L	IM	39,9	NMO	17,8	5,0	NMO	6,6	2,9	NMO	3,6	R	M
CBS 121.55	2020,0	12,4	L	IA	34,0	MC	10,1	3,9	MC	5,4	2,1	MC	3,6	RP	MC

Tabla 23 (cont). Características microscópicas de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los 7 días de incubación a 25°C en el medio MEA. Long: longitud; Anch: anchura; D: diámetro; Orn: ornamentación; T: textura.

Cepas		Estipe		Vesícula	Métula		Fiálide		Conidio
		Long	Anch	Diámetro	Long	Anch	Long	Anch	Diámetro
Total (n= 92)	min	300,0	7,0	25,0	7,0	3,0	4,0	1,5	2,0
	Máx	4800,0	26,0	85,0	54,0	11,0	13,0	52,7	5,0
	Media	1705,1	14,6	50,4	21,6	5,1	7,1	2,7	3,8
	DT	705,1	2,4	9,6	7,2	1,0	1,2	0,5	0,5
Tipo N (n= 44)	min	300,0	8,0	26,0	7,0	3,0	4,0	1,5	3,0
	Máx	4525,0	26,0	85,0	54,0	9,0	11,0	5,0	5,0
	Media	1722,0	14,9 ^a	50,3	22,4 ^b	5,2 ^c	7,1	2,7	4,0 ^d
	DT	693,8	2,5	10,2	8,5	1,0	1,1	0,5	0,5
Tipo T (n= 48)	min	350,0	7,0	25,0	7,0	3,0	4,0	2,0	2,0
	Máx	4800,0	23,0	81,0	41,0	11,0	13,0	4,0	5,0
	Media	1689,2	14,4 ^a	50,5	20,8 ^b	5,0 ^c	7,1	2,7	3,6 ^d
	DT	715,7	2,3	9,1	5,7	1,0	1,3	0,5	0,5

^{a, b, c, d} La presencia de la misma letra indica la presencia de diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las medidas obtenidas en las cepas de los grupos N y T

Tabla 24. Media y su desviación típica (DT), valores mínimos (mín) y máximos (Máx) de las mediciones (expresadas en μm) de los estipes, las vesículas, las métulas, las fiálides y los conidios en las preparaciones microscópicas realizadas a partir de las colonias desarrolladas en medio MEA a los 7 días de incubación a 25°C del total de las cepas estudiadas, y los tipos N y T, definidos según el patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

5.2.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN.

Los resultados correspondientes al estudio del comportamiento de las cepas desarrolladas a cada temperatura y tiempo de incubación están resumidos en las Tablas 25 a 32 y en las Figuras 6 a 12.

A las temperaturas extremas ensayadas (5°C y 55°C) no se desarrolló ninguna de las cepas en estudio (Figuras 6 a 8).

En el estudio realizado a 10°C ninguna cepa se desarrolló a los tres días de incubación. El 51,1% de las cepas iniciaron su crecimiento a los siete días y las restantes a los 10 días (41,3%) y a los 14 días (7,6%). En el estudio realizado a 15°C dos cepas (2,2%) no se desarrollaron a los 3 días de incubación, desarrollándose todas las cepas ensayadas a los siete días (Figuras 6 a 8).

En las Tablas 25 a la 28 se representan los diámetros obtenidos (expresados en mm) para cada una de las cepas ensayadas a cada temperatura y tiempo de incubación. En dichas tablas, "nc" indica que no se desarrolló el inóculo e "ic" indica el inicio de crecimiento (germinación del inóculo).

Los resultados correspondientes a los valores medios (expresados en mm) de los diámetros obtenidos para el total de las cepas estudiadas, así como para las cepas clasificadas en los grupos N y T desarrolladas a cada temperatura y tiempo de incubación están detallados en las Tablas 29 a la 31. En cada caso se indica el número de cepas desarrolladas (n), los valores mínimos (mín) y máximos (Máx) de los diámetros, la media de éstos y su desviación típica (DT).

En algún caso, algunas de las cepas desarrolladas a las temperaturas de 30°C y 35°C alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación. Tres cepas (dos del tipo N y una del tipo T) invadieron toda la superficie de la placa de Petri a los seis días de incubación a 30°C. En el ensayo realizado a 35°C, una cepa del tipo T, siete cepas (una del tipo N y siete del tipo T) y 22 cepas (12 del tipo N y 10 del tipo T) alcanzaron el diámetro máximo a los cuatro, cinco y seis días de incubación, respectivamente.

Con el fin de determinar la temperatura óptima de crecimiento de las cepas estudiadas a los tres y siete días de incubación, se realizó un análisis de la varianza (prueba de Student-Newman-Keuls) de los

diámetros de las colonias desarrolladas a las distintas temperaturas ensayadas cuyos resultados se detallan en las Tablas 29 a la 31.

Las cepas ensayadas en la presente memoria se agruparon, en función de los patrones de restricción obtenidos mediante el análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA, en los grupos N y T. Con el fin de comparar los resultados obtenidos por las cepas de ambos grupos en las distintas temperaturas de incubación se realizó una prueba de t de Student, cuyos resultados se detallan en la Tabla 32. Con respecto al número de cepas desarrolladas por ambos grupos en las distintas temperaturas ensayadas, mediante la prueba de Chi cuadrado se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en el ensayo realizado a los siete días de incubación a 10°C, en el que el número de cepas desarrolladas pertenecientes al tipo T fue mayor.

En la Figura 9 se indica la media de los diámetros del total de cepas estudiadas desarrolladas a las distintas temperaturas ensayadas a los tres y siete días de incubación. En las Figuras 10 y 11 se representan, para las distintas temperaturas ensayadas, la media de los diámetros obtenidos a los tres y siete días de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N y tipo T, respectivamente. En la Figura 12 se muestran las medias de los diámetros de las cepas de los dos grupos N y T, definidos en función del patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

Cepa	Temperatura (°C)									
	5		10		15		20		25	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
A74	nc	nc	nc	ic	6,8	14,5	24,0	60,5	33,3	56,8
A75	nc	nc	nc	ic	7,0	15,0	20,0	38,0	31,3	47,0
A76	nc	nc	nc	ic	7,3	15,0	27,3	57,5	51,0	82,0
A77	nc	nc	nc	5,8	9,0	22,0	28,0	62,3	56,3	86,0
A79	nc	nc	nc	nc	7,0	18,0	20,5	43,5	36,8	61,5
A80	nc	nc	nc	nc	7,3	16,0	21,0	44,0	36,8	63,0
A82	nc	nc	nc	nc	9,0	20,5	24,5	47,5	38,5	64,0
A83	nc	nc	nc	nc	6,0	18,0	18,8	38,3	35,8	60,5
A84	nc	nc	nc	nc	7,3	15,0	19,5	41,5	34,8	59,5
A85	nc	nc	nc	nc	5,5	15,5	20,5	44,0	32,3	57,0
A87	nc	nc	nc	nc	5,0	16,2	21,5	46,9	37,8	59,6
A136	nc	nc	nc	nc	7,5	14,8	18,3	39,0	31,5	52,0
A219	nc	nc	nc	nc	7,0	14,0	14,0	33,5	32,5	57,0
A220	nc	nc	nc	nc	5,0	14,1	19,8	46,8	32,5	55,6
A251	nc	nc	nc	nc	5,5	13,6	18,5	42,7	33,5	60,6
A306	nc	nc	nc	nc	6,5	14,8	21,0	47,0	35,0	67,2
A307	nc	nc	nc	nc	6,5	14,5	18,3	44,9	34,0	54,9
A388	nc	nc	nc	nc	6,0	14,3	19,8	55,0	33,0	53,5
A390	nc	nc	nc	nc	5,5	16,4	20,3	46,9	40,0	65,2
A484	nc	nc	nc	nc	5,0	14,7	20,0	48,7	36,5	58,4
A510	nc	nc	nc	nc	6,0	14,3	17,5	39,0	30,0	52,3
A623	nc	nc	nc	9,9	5,5	18,3	18,3	44,2	32,5	53,9
A624	nc	nc	nc	nc	7,0	14,5	18,0	53,0	39,0	65,6
A629	nc	nc	nc	5,8	5,5	14,6	18,0	43,0	34,5	55,1
A635	nc	nc	nc	nc	6,3	14,8	17,0	41,0	33,0	51,9
A636	nc	nc	nc	nc	4,0	17,2	19,7	50,4	30,6	55,8
A638	nc	nc	nc	nc	3,8	16,6	20,8	48,6	31,0	51,0
A643	nc	nc	nc	nc	5,1	17,4	19,8	48,0	32,5	66,7
A644	nc	nc	nc	3,5	4,2	16,5	19,9	53,2	33,7	65,6
A645	nc	nc	nc	nc	5,5	18,2	19,3	47,9	33,4	61,8
A655	nc	nc	nc	nc	4,9	17,1	18,9	49,7	34,2	63,1
A658	nc	nc	nc	nc	4,2	17,5	19,3	47,6	32,4	56,1
A659	nc	nc	nc	6,8	5,6	23,1	17,3	47,8	31,3	73,9
A660	nc	nc	nc	nc	5,1	16,7	19,9	47,8	28,2	53,5
CBS 554.65	nc	nc	nc	nc	6,6	17,6	24,5	62,2	42,5	80,1
CBS 118.35	nc	nc	nc	nc	5,2	13,4	20,1	45,6	35,3	77,0
CBS 126.49	nc	nc	nc	nc	7,1	17,4	20,9	52,7	30,1	51,7
CBS 139.52	nc	nc	nc	nc	3,7	12,5	20,2	50,5	34,9	63,6
CBS 618.78	nc	nc	nc	nc	7,4	18,3	19,5	40,1	26,4	70,4
ATCC 22343	nc	nc	nc	nc	6,0	20,1	23,2	62,6	39,7	78,6
IMI 211394	nc	nc	nc	nc	4,5	20,3	18,1	56,3	32,7	86,0
NRRL 3122	nc	nc	nc	nc	nc	5,2	11,8	31,1	20,3	47,9
NRRL 3112	nc	nc	nc	nc	5,1	13,9	14,6	39,1	23,9	50,8
607 (JC)	nc	nc	nc	6,0	nc	15,5	25,3	63,5	43,7	84,2

Tabla 25. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los tres y siete días de incubación. nc, no crecimiento de la cepa; ic, inicio de crecimiento de la cepa (germinación del inóculo).

Cepa	Temperatura (°C)											
	30		35		40		45		50		55	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
A74	62,3	86,0	46,5	79,0	31,0	61,8	12,5	24,5	nc	nc	nc	nc
A75	41,0	59,0	49,5	86,0	33,5	68,8	15,5	18,5	nc	nc	nc	nc
A76	72,0	86,0	66,3	86,0	38,5	86,0	11,5	29,0	nc	nc	nc	nc
A77	69,5	86,0	60,5	86,0	31,8	62,5	12,5	26,5	nc	nc	nc	nc
A79	44,5	71,5	45,5	75,5	36,0	69,5	12,0	23,0	nc	nc	nc	nc
A80	46,5	73,0	50,0	86,0	33,8	69,8	12,5	24,0	nc	nc	nc	nc
A82	47,5	73,8	35,0	64,5	33,5	64,8	12,0	25,0	nc	nc	nc	nc
A83	49,5	72,5	57,5	78,5	32,8	72,3	14,5	20,0	nc	nc	nc	nc
A84	42,5	65,5	42,5	69,5	30,3	61,8	14,8	24,5	nc	nc	nc	nc
A85	41,3	65,3	40,0	69,5	35,0	68,3	15,0	26,5	nc	nc	nc	nc
A87	42,0	66,9	49,8	82,1	35,3	70,3	10,5	22,0	nc	nc	nc	nc
A136	40,5	58,5	44,0	86,0	32,5	66,8	15,5	32,5	7,1	7,1	nc	nc
A219	41,5	60,0	45,5	71,0	26,3	63,5	12,0	22,3	4,4	5,1	nc	nc
A220	43,5	65,3	47,8	74,1	25,8	55,3	12,8	28,5	nc	nc	nc	nc
A251	41,5	67,4	46,8	75,9	22,3	38,0	9,5	17,7	nc	nc	nc	nc
A306	46,5	77,6	47,5	81,4	30,0	64,4	9,3	18,9	nc	nc	nc	nc
A307	42,8	67,3	39,8	68,0	22,3	58,0	13,0	22,3	nc	nc	nc	nc
A388	37,8	66,3	33,8	64,3	26,0	52,6	12,8	28,6	nc	nc	nc	nc
A390	47,0	75,8	47,0	79,2	32,3	63,1	9,5	23,0	nc	nc	nc	nc
A484	41,0	67,8	57,5	81,0	40,5	70,9	16,0	27,5	nc	nc	nc	nc
A510	39,0	60,3	51,0	67,9	37,3	63,4	12,0	26,7	nc	nc	nc	nc
A623	39,5	65,1	51,0	70,1	28,5	58,5	12,8	26,7	nc	nc	nc	nc
A624	45,0	76,9	44,3	73,7	32,0	73,7	14,0	37,2	nc	nc	nc	nc
A629	43,0	72,7	42,0	76,1	29,0	63,2	14,5	23,4	nc	nc	nc	nc
A635	39,0	60,1	39,5	65,5	28,0	61,1	14,5	23,9	nc	nc	nc	nc
A636	41,4	83,4	36,2	63,4	32,7	64,6	9,4	13,2	nc	6,9	nc	nc
A638	37,9	52,0	36,7	61,2	27,8	52,3	8,5	23,5	nc	nc	nc	nc
A643	44,4	73,7	46,3	76,2	35,9	68,9	11,6	32,0	nc	nc	nc	nc
A644	49,6	75,0	54,6	84,2	31,4	66,1	6,9	21,6	nc	nc	nc	nc
A645	45,9	71,6	42,6	70,5	26,6	66,1	10,4	24,8	nc	nc	nc	nc
A655	48,0	78,2	40,1	77,8	29,4	60,7	11,8	21,7	nc	nc	nc	nc
A658	43,8	64,1	38,9	67,0	24,7	49,0	4,8	20,8	nc	nc	nc	nc
A659	41,5	73,3	43,1	75,5	25,0	63,4	13,4	26,4	nc	nc	nc	nc
A660	47,8	83,5	51,2	82,4	33,1	69,5	7,5	17,4	nc	nc	nc	nc
CBS 554.65	55,3	84,6	47,7	81,7	27,8	65,3	10,2	19,7	nc	nc	nc	nc
CBS 118.35	47,1	80,6	45,9	80,4	24,0	55,2	4,0	8,3	nc	nc	nc	nc
CBS 126.49	42,8	84,9	39,0	73,3	26,1	57,9	9,2	13,1	nc	nc	nc	nc
CBS 139.52	42,7	66,3	45,6	76,1	26,1	52,7	12,2	24,2	nc	nc	nc	nc
CBS 618.78	42,7	71,6	43,5	86,0	19,1	54,1	10,6	16,0	nc	nc	nc	nc
ATCC 22343	64,2	86,0	63,4	86,0	28,1	50,9	13,7	23,7	nc	nc	nc	nc
IMI 211394	50,1	86,0	44,1	85,2	28,9	69,9	6,9	15,5	nc	nc	nc	nc
NRRL 3122	28,6	59,7	28,4	62,5	15,1	27,8	6,5	7,1	nc	nc	nc	nc
NRRL 3112	34,0	67,4	34,1	66,7	23,8	48,0	5,9	7,6	nc	nc	nc	nc
607 (JC)	61,5	86,0	64,2	86,0	24,5	49,5	5,5	11,9	nc	nc	nc	nc

Tabla 26. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los tres y siete días de incubación. nc, no crecimiento de la cepa; ic, inicio de crecimiento de la cepa (germinación del inóculo).

Cepa	Temperatura (°C)											
	5		10		15		20		25		30	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
A14	nc	nc	nc	ic	6,3	17,0	21,5	46,3	31,5	58,0	37,3	64,5
A15	nc	nc	nc	7,0	8,8	19,0	19,8	43,3	33,8	59,8	46,0	74,5
A78	nc	nc	nc	7,3	8,5	19,5	19,5	39,5	28,8	47,5	40,3	60,0
A81	nc	nc	nc	7,5	8,0	20,0	18,0	38,5	23,5	50,0	42,0	70,5
A86	nc	nc	nc	9,3	9,0	21,8	18,3	39,0	29,0	51,5	39,0	71,0
A88	nc	nc	nc	6,5	7,0	19,0	14,8	33,0	14,8	46,0	34,0	57,0
A89	nc	nc	nc	9,0	7,8	19,8	14,8	34,0	25,5	46,5	31,3	52,8
A174	nc	nc	nc	nc	5,5	20,0	18,5	47,5	25,8	47,5	35,0	68,0
A175	nc	nc	nc	6,5	7,8	19,8	17,3	39,0	30,0	54,8	37,0	64,5
A176	nc	nc	nc	8,0	6,8	18,5	16,3	38,8	27,8	51,5	39,0	70,8
A180	nc	nc	nc	8,0	7,5	19,3	14,5	35,8	31,0	55,0	41,0	71,0
A190	nc	nc	nc	7,5	8,0	21,0	16,5	38,0	29,3	55,0	41,0	69,5
A197	nc	nc	nc	7,5	5,3	19,0	15,8	36,5	26,3	48,8	35,5	65,0
A198	nc	nc	nc	nc	5,5	16,5	17,5	42,0	31,5	55,0	39,3	69,0
A223	nc	nc	nc	7,8	7,0	18,8	16,0	36,8	31,0	54,8	42,5	83,0
A250	nc	nc	nc	6,3	6,5	18,5	17,0	42,8	27,0	49,5	33,3	56,5
A266	nc	nc	nc	nc	6,0	13,5	18,5	44,2	35,5	58,0	42,3	62,5
A308	nc	nc	nc	7,4	7,0	20,5	16,8	40,0	30,0	57,1	41,8	81,4
A312	nc	nc	nc	7,2	6,5	21,2	19,0	41,6	32,0	58,7	37,8	72,3
A325	nc	nc	nc	6,6	6,8	22,1	21,0	49,5	37,3	68,4	46,5	78,7
A348	nc	nc	nc	6,8	8,0	21,5	17,0	42,2	28,0	53,8	38,5	71,1
A391	nc	nc	nc	5,5	6,0	18,0	15,5	36,6	28,0	53,5	39,0	79,2
A486	nc	nc	nc	nc	3,5	16,4	18,0	41,0	31,5	51,7	43,8	69,9
A487	nc	nc	nc	9,2	7,5	19,1	17,0	44,8	33,0	63,7	40,0	75,4
A488	nc	nc	nc	6,9	7,0	22,3	18,0	40,3	34,0	58,6	42,5	70,0
A505	nc	nc	nc	7,9	7,5	16,5	15,8	35,4	26,0	47,4	30,8	54,2
A614	nc	nc	nc	7,5	6,0	20,2	16,3	36,6	26,8	47,2	32,8	59,9
A615	nc	nc	nc	6,1	5,5	16,7	14,0	34,4	30,0	57,7	36,0	74,9
A628	nc	nc	nc	7,4	8,0	22,0	15,3	37,9	30,5	61,6	38,3	72,9
A630	nc	nc	nc	7,9	7,0	16,9	16,3	42,2	32,5	60,2	37,8	77,8
A631	nc	nc	nc	9,6	6,3	16,9	14,0	32,2	26,3	46,4	32,0	65,1
A632	nc	nc	nc	6,0	4,3	13,4	15,3	45,7	34,0	79,8	44,0	86,0
A634	nc	nc	nc	8,0	5,5	20,3	16,5	38,2	30,0	57,8	32,8	60,8
A639	nc	nc	nc	6,0	5,1	19,0	15,4	32,8	23,9	43,9	28,1	58,3
A650	nc	nc	nc	5,9	5,6	21,1	17,7	32,4	19,3	39,7	23,9	53,7
A651	nc	nc	nc	6,6	6,5	22,9	21,6	56,9	32,1	78,1	44,1	71,3
A652	nc	nc	nc	7,9	7,0	21,1	19,9	46,0	29,2	58,4	34,2	59,9
A653	nc	nc	nc	6,6	6,0	20,3	22,0	50,4	30,9	68,9	39,0	66,9
A654	nc	nc	nc	6,5	6,1	21,4	19,4	45,7	30,1	63,5	38,8	68,8
A656	nc	nc	nc	5,5	6,3	18,9	13,3	31,3	19,9	41,1	28,9	50,4
A657	nc	nc	nc	7,0	7,4	20,4	17,3	48,4	32,7	71,4	44,4	75,0

Tabla 27. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los tres y siete días de incubación. nc, no crecimiento de la cepa; ic, inicio de crecimiento de la cepa (germinación del inóculo) (sigue).

Cepa	Temperatura (°C)											
	5		10		15		20		25		30	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
CBS 134.48	nc	nc	nc	8,9	8,3	22,0	21,4	60,0	37,5	86,0	47,9	86,0
CBS 558.65	nc	nc	nc	6,0	6,5	19,1	24,0	47,4	35,4	60,3	48,2	73,1
CBS 117.32	nc	nc	nc	5,1	7,7	21,9	21,8	59,9	42,4	86,0	57,6	86,0
IMI 172296	nc	nc	nc	5,3	6,6	19,8	18,9	46,4	37,2	83,3	48,4	86,0
IMI 63764	nc	nc	nc	6,5	7,7	19,6	23,9	67,4	38,5	86,0	52,2	86,0
ATCC 26036	nc	nc	nc	nc	6,5	19,8	24,1	55,5	36,4	66,7	50,8	82,7
CBS 121.55	nc	nc	nc	nc	5,5	17,5	23,3	50,2	35,8	64,1	49,8	72,7

Tabla 27 (cont). Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los tres y siete días de incubación. nc, no crecimiento de la cepa; ic, inicio de crecimiento de la cepa (germinación del inóculo).

Cepa	Temperatura (°C)									
	35		40		45		50		55	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
A14	38,5	68,5	27,3	59,0	13,0	26,5	nc	nc	nc	nc
A15	46,0	84,0	29,5	62,5	14,3	28,3	nc	nc	nc	nc
A78	42,5	71,0	28,5	58,0	14,0	27,0	nc	nc	nc	nc
A81	44,5	86,0	27,0	58,5	11,0	20,5	nc	nc	nc	nc
A86	46,3	86,0	26,0	51,0	10,0	16,5	nc	nc	nc	nc
A88	48,5	86,0	26,3	63,8	12,8	25,5	nc	nc	nc	nc
A89	38,5	81,5	26,3	61,3	12,5	26,5	nc	nc	nc	nc
A174	42,3	79,0	24,5	49,5	12,8	19,5	nc	nc	nc	nc
A175	41,0	74,0	27,0	58,5	13,0	24,3	nc	nc	nc	nc
A176	41,5	86,0	23,3	46,0	11,3	17,5	nc	nc	nc	nc
A180	45,5	86,0	27,3	63,0	12,8	24,8	nc	nc	nc	nc
A190	46,5	86,0	22,3	62,5	16,5	40,0	5,8	6,6	nc	nc
A197	42,3	76,8	25,0	52,5	11,3	18,0	5,5	6,7	nc	nc
A198	45,5	86,0	27,8	60,8	12,3	20,0	7,1	7,4	nc	nc
A223	43,0	86,0	25,0	51,5	13,0	21,3	nc	nc	nc	nc
A250	43,0	86,0	25,5	58,3	12,0	21,0	nc	nc	nc	nc
A266	47,0	80,9	20,8	38,6	10,0	17,5	nc	nc	nc	nc
A308	46,5	85,8	20,3	47,9	13,0	20,8	nc	nc	nc	nc
A312	39,5	81,3	20,8	48,2	8,8	17,2	nc	nc	nc	nc
A325	39,8	67,7	26,0	44,7	11,3	19,7	nc	nc	nc	nc
A348	44,0	82,1	28,0	52,7	13,0	24,1	nc	nc	nc	nc
A391	50,5	86,0	27,8	52,2	13,5	19,2	nc	nc	nc	nc
A486	51,0	78,0	31,0	60,8	10,8	22,9	nc	nc	nc	nc
A487	55,0	82,0	25,8	50,7	14,0	26,6	nc	nc	nc	nc
A488	56,5	80,7	27,8	55,9	16,0	26,2	nc	nc	nc	nc
A505	39,5	68,9	25,0	44,7	11,8	22,9	nc	nc	nc	nc
A614	45,0	86,0	33,5	65,2	12,8	28,1	nc	nc	nc	nc
A615	48,0	81,8	34,8	58,5	14,0	14,0	nc	nc	nc	nc
A628	44,0	75,8	26,5	58,3	14,8	30,4	nc	nc	nc	nc
A630	49,0	70,5	30,0	63,3	15,0	32,1	nc	nc	nc	nc
A631	40,5	69,2	23,0	48,3	11,0	26,1	nc	nc	nc	nc
A632	49,5	75,8	30,0	55,9	12,3	24,8	5,0	5,9	nc	nc
A634	36,5	62,5	30,3	65,3	14,5	27,6	nc	nc	nc	nc
A639	27,2	49,3	21,8	55,7	8,8	23,6	nc	nc	nc	nc
A650	32,7	56,9	22,4	56,0	9,4	24,4	nc	nc	nc	nc
A651	42,4	64,2	22,9	50,3	13,8	30,6	nc	nc	nc	nc
A652	34,1	63,1	26,7	56,5	12,9	27,0	nc	nc	nc	nc
A653	37,2	65,2	27,8	57,8	11,1	23,7	nc	nc	nc	nc
A654	36,5	63,6	27,3	60,8	9,7	25,3	nc	nc	nc	nc
A656	29,7	63,2	15,1	32,6	9,6	21,8	4,9	7,1	nc	nc
A657	46,1	79,4	24,5	59,4	9,1	24,0	3,1	4,0	nc	nc

Tabla 28. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los tres y siete días de incubación. nc, no crecimiento de la cepa; ic, inicio de crecimiento de la cepa (germinación del inóculo) (sigue).

Cepa	Temperatura (°C)									
	35		40		45		50		55	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
CBS 134.48	43,7	86,0	20,9	43,9	11,0	20,7	nc	nc	nc	nc
CBS 558.65	53,6	86,0	21,6	40,6	5,1	9,7	nc	nc	nc	nc
CBS 117.32	53,3	86,0	18,6	33,7	4,8	9,0	nc	nc	nc	nc
IMI 172296	44,7	86,0	21,2	52,1	13,3	23,1	nc	nc	nc	nc
IMI 63764	41,9	86,0	12,2	24,0	5,3	10,0	nc	nc	nc	nc
ATCC 26036	49,3	81,8	17,8	21,7	6,7	13,4	nc	nc	nc	nc
CBS 121.55	60,3	86,0	31,6	60,0	13,6	24,8	5,9	6,9	nc	nc

Tabla 28 (cont). Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los tres y siete días de incubación. nc, no crecimiento de la cepa; ic, inicio de crecimiento de la cepa (germinación del inóculo).

		Temperatura (°C) ¹																	
		10		15		20		25		30		35		40		45		50	
		3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n		0	47	90	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	92	9	10
mín		0	3,5	3,5	5,2	11,8	31,0	19,3	39,7	23,9	50,4	27,2	49,3	12,2	21,7	4,0	7,1	3,1	4,0
Máx		0	9,9	9,0	23,1	28,0	67,4	56,3	86,0	72,0	86,0	66,3	86,0	40,5	86,0	16,5	40,0	7,1	7,4
Media		0	7,0 ^b	6,4 ^a	17,8	18,9	45,0	32,4	60,3	42,6	71,0 ²	44,9	76,9 ²	27,2	56,9	11,4	22,4	5,4 ^a	6,4 ^b
DT		-	1,3	1,3	3,0	3,1	8,2	5,8	11,3	8,2	9,5	7,5	8,6	5,2	10,9	2,9	6,1	1,3	1,1

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 5°C y a 55°C.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias incubadas a distintas temperaturas

Tabla 29. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de todas las cepas estudiadas a los tres y siete días a las temperaturas ensayadas. n: número de cepas desarrolladas; mín: diámetro mínimo; Máx: diámetro máximo; DT: desviación típica.

		Temperatura (°C) ¹																	
		10		15		20		25		30		35		40		45		50	
		3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n	0	6	42	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44	2	3
min	0	3,5	3,7	5,2	11,8	31,1	20,3	47,0	28,6	52,0	61,2	28,5	61,2	15,1	27,8	4,0	7,1	4,4	5,1
Máx	0	9,9	9,0	23,1	28,0	63,5	56,3	86,0	72,0	86,0	86,0	66,3	86,0	40,5	86,0	16,0	37,2	7,1	7,1
Media	0	6,3 ^c	5,9 ^a	16,1	19,9	47,6	34,5	62,2 ^d	45,8 ^b	72,2 ^{2e}	46,0 ^b	75,9 ^{2e}	29,4	61,4 ^d	11,1	22,2	5,7 ^a	6,3 ^c	
DT	-	2,1	1,3	2,9	3,1	7,7	6,0	10,5	8,6	9,3	8,3	7,8	7,8	5,2	10,0	3,1	6,5	1,9	1,1

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 5°C y a 55°C.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias incubadas a distintas temperaturas

Tabla 30. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas tipo N estudiadas a los tres y siete días a las temperaturas ensayadas. n: número de cepas desarrolladas; mín: diámetro mínimo; Máx: diámetro máximo; DT: desviación típica.

		Temperatura (°C) ¹																	
		10		15		20		25		30		35		40		45		50	
		3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n	0	41	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	48	7	7
min	0	5,1	3,5	13,4	13,3	31,3	19,3	39,7	23,9	50,4	27,2	49,3	12,2	21,7	4,8	9,0	3,1	4,0	
Máx	0	9,6	9,0	22,9	24,1	67,4	42,4	86,0	57,6	86,0	60,3	86,0	34,8	65,3	16,5	40,0	7,1	7,4	
Media	0	7,1 ^b	6,7 ^a	19,4 ^c	18,0	42,6	30,4	58,5	39,7	69,9 ²	44,0	77,9 ²	25,2	52,7	11,7	22,7 ^c	5,3 ^a	6,4 ^b	
D.T.	-	1,1	1,2	2,1	2,8	7,9	4,8	11,8	6,7	9,6	6,5	9,4	4,4	10,1	2,6	5,9	1,2	1,2	

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 5°C y a 55°C.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias.

Tabla 31. Valor medio de los diámetros (mm) de las colonias de las cepas tipo T estudiadas a los tres y siete días a las temperaturas ensayadas. n: número de cepas desarrolladas; mín: diámetro mínimo; Máx: diámetro máximo; DT: desviación típica.

	Temperatura (°C) ¹								
	10	15	20	25	30	35	40	45	50
3d	-	*	*	**	**	NDS	**	NDS	NDS
7d	NDS	**	*	NDS	NDS	NDS	**	NDS	NDS

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 5°C y a 55°C

-: no se desarrolló ninguna cepa a dicha temperatura

Diferencias significativas entre los diámetros medios de ambos grupos *: $p < 0,01$; **: $p < 0,05$

NDS: no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de ambos grupos

Tabla 32. Comparación entre los diámetros medios de las cepas tipo N y tipo T.

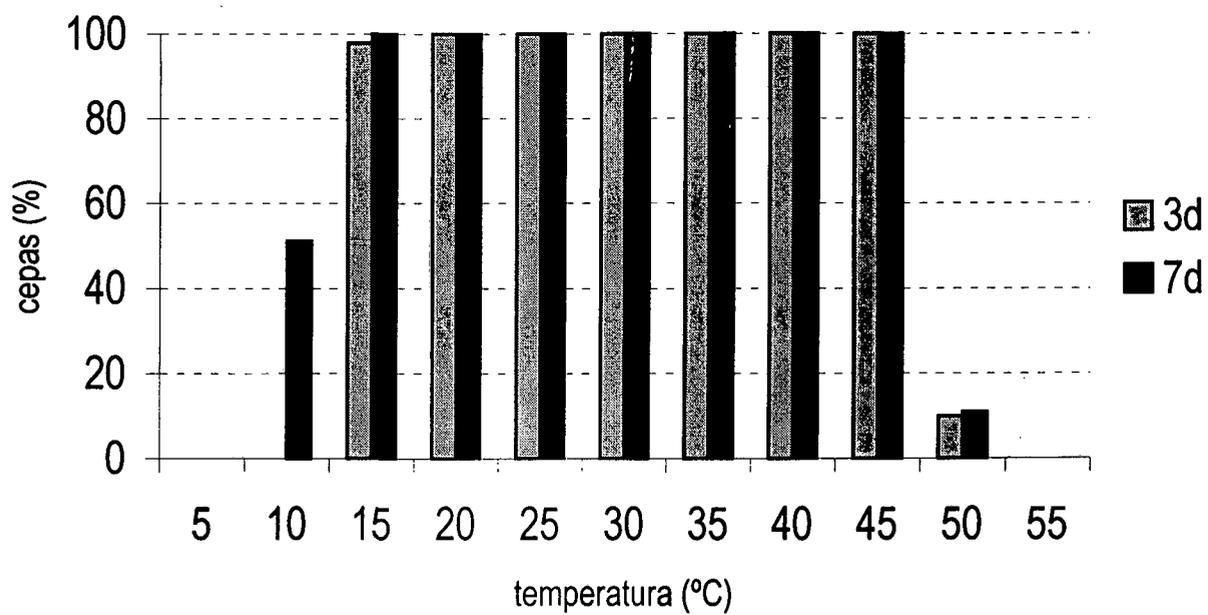


Figura 6. Porcentaje de cepas del agregado *A. niger* desarrolladas a los tres y siete días de incubación a las distintas temperaturas ensayadas.

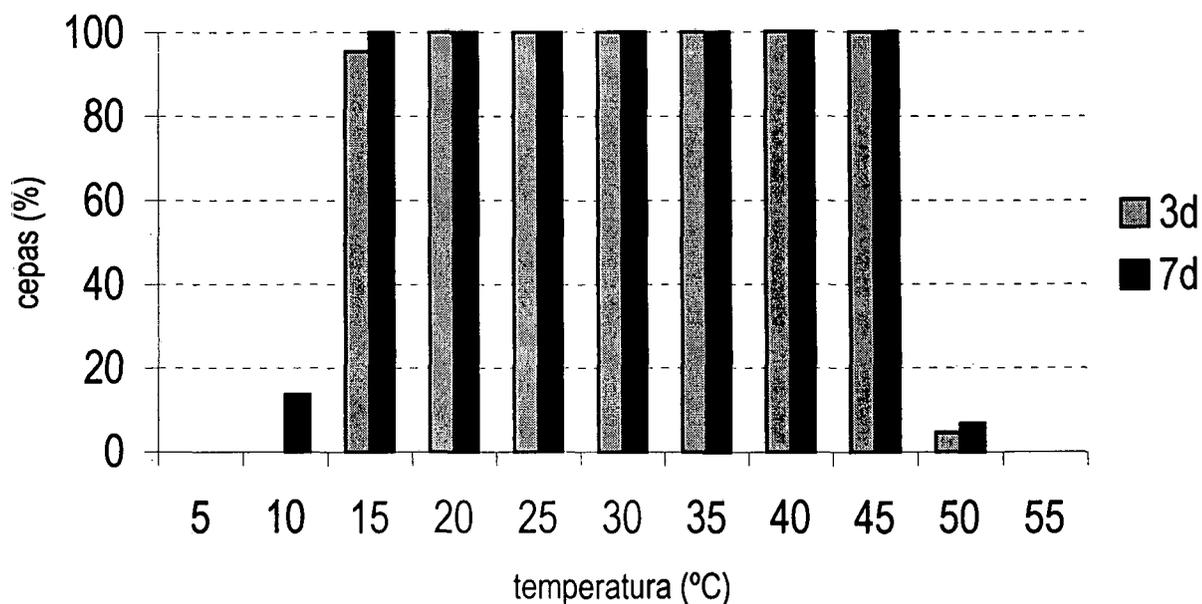


Figura 7. Porcentaje de cepas del agregado *A. niger* con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a las distintas temperaturas ensayadas a los tres y siete días de incubación.

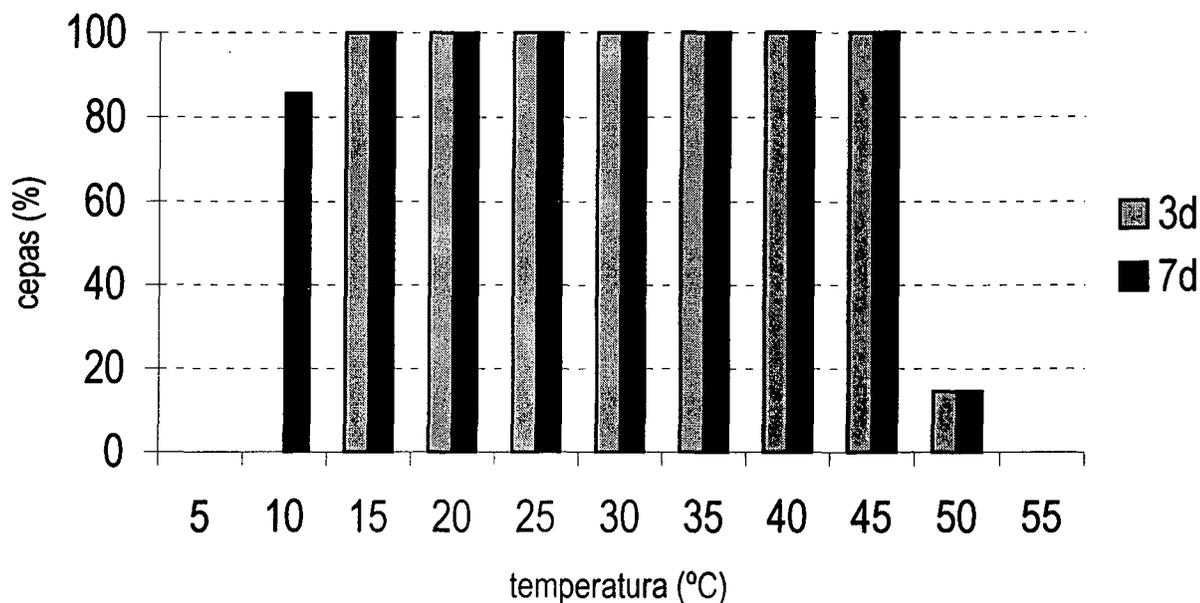


Figura 8. Porcentaje de cepas del agregado *A. niger* con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a las distintas temperaturas ensayadas a los tres y siete días de incubación.

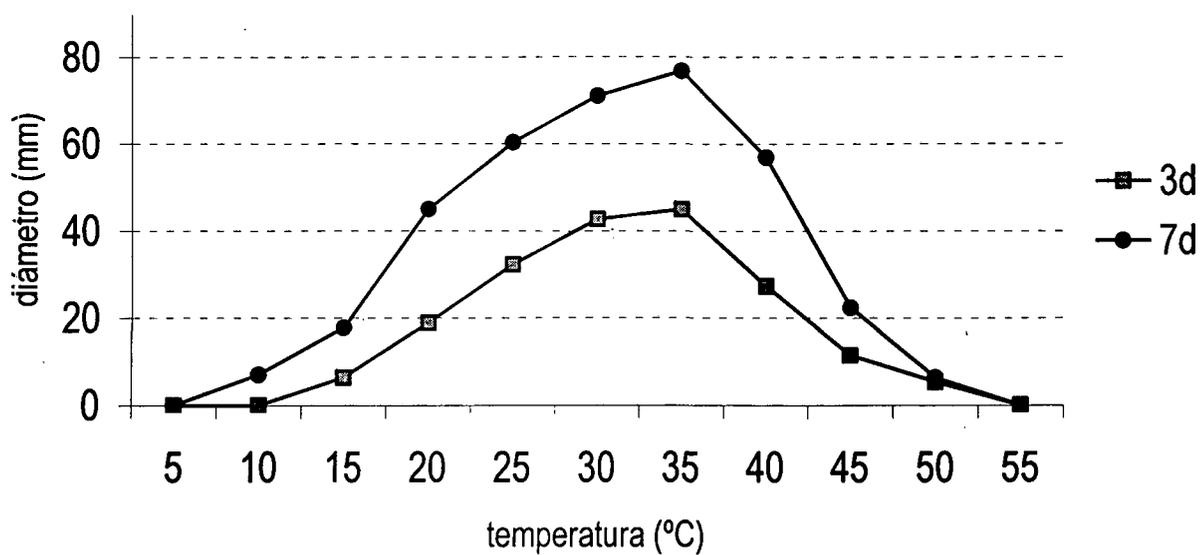


Figura 9. Valor medio de los diámetros de las cepas estudiadas a las distintas temperaturas ensayadas a los 3 y 7 días de incubación.

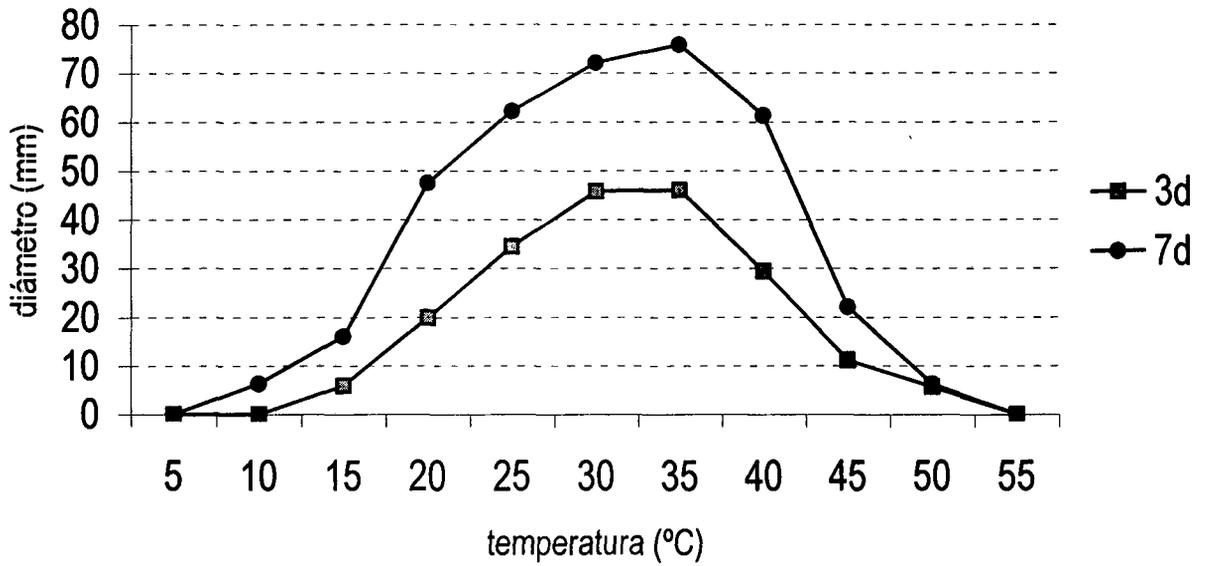


Figura 10. Valor medio de los diámetros de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N a las distintas temperaturas ensayadas a los tres y siete días de incubación.

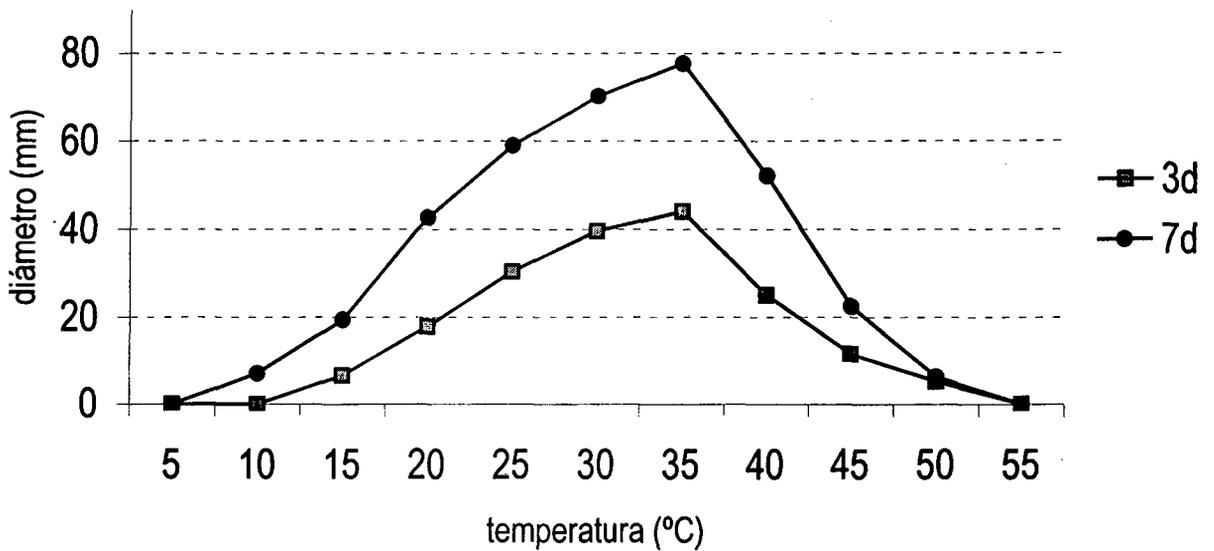


Figura 11. Valor medio de los diámetros de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T a las distintas temperaturas ensayadas a los tres y siete días de incubación.

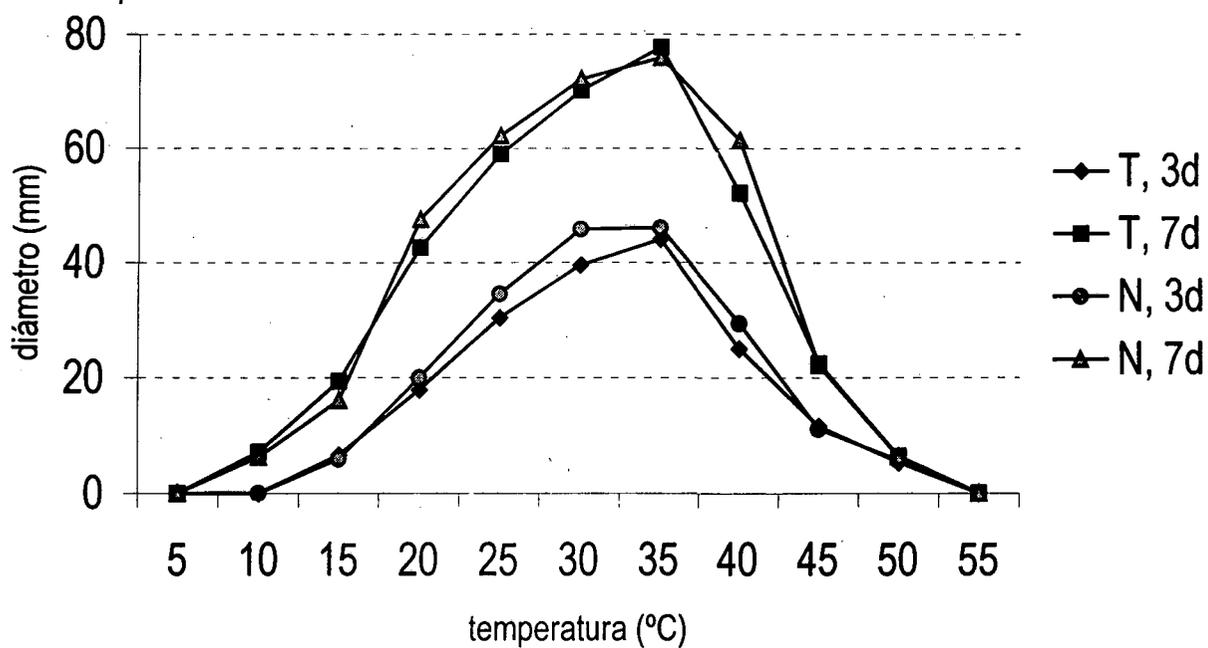


Figura 12. Valor medio de los diámetros de las cepas estudiadas a las distintas temperaturas ensayadas a los tres y siete días de incubación, según su patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

5.2.3.1 Resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a las temperaturas mínima y máxima de crecimiento.

Los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias desarrolladas a los siete días de incubación a las temperaturas mínima y máxima de crecimiento se resumen en las Tablas 33 a 36.

En las tablas 33 y 34 se detallan las características macroscópicas y microscópicas de cada una de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los siete días de incubación a las temperaturas mínima y máxima de crecimiento, respectivamente.

En las tablas 34 y 36 se detallan las características macroscópicas y microscópicas de cada una de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los siete días de incubación a las temperaturas máxima y mínima de crecimiento, respectivamente.

Las coloraciones de las colonias o de los pigmentos difusibles se indican según las siguientes abreviaciones (ver Anexo 2):

A: amarillo

MC: Marrón claro

V: verde

B: blanco

MO: marrón oscuro

VC: verde claro

BE: beige

N: negro

VO: verde oscuro

M: Marrón

NA: naranja

En muchos casos, la coloración tanto del anverso como del reverso no fue uniforme. En estos casos, la variedad de color se expresa mediante las abreviaciones de cada uno de los colores que presentó la colonia. El orden de las coloraciones se corresponde con la importancia que éstos presentaban en la colonia.

La textura de las colonias (T) se indica de la siguiente forma:

AT: aterciopelada

F: flocosa

LA: lanosa

En el caso de que la colonia presentara más de un tipo de textura, la textura o texturas no predominantes se indicaron entre paréntesis.

La presencia de micelio blanco aéreo (Aer), de pigmento difusible (P) y de exudado (E) se presenta de la siguiente forma:

- : ausencia

(+): poca cantidad

+ :presencia

++ : abundancia

La ausencia de surcos en la colonia se expresa con el signo -, y la presencia se expresa con la descripción del tipo de surcos presentados, surcos de tipo radial (R), de tipo concéntrico (C) o ambos. En el caso de que la colonia presentase un aspecto cerebriforme, se expresa con las iniciales CE.

El aspecto microscópico de las colonias (Micro) se indicó de la siguiente forma:

NO: normal

ME: micelio estéril

En el caso de que una característica microscópica anormal (CA) destacase en la preparación ésta se indicó de la siguiente forma:

EA: estipes anormales

MA: métulas anormales

VA: vesículas sin métulas ni fiálides.

En varios casos no se presentó ninguna característica destacable. Estos casos se indican mediante el signo: -. En algún caso se presentó más de una anomalía, expresándose éstas mediante las abreviaciones correspondientes, ordenadas según la importancia que presentaron en la preparación microscópica realizada a partir de la colonia.

Cepa	Características Observadas									
	D	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
A74	14,5	A	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A75	15,0	B	AB	F	-	-	-	-	NO	VA
A76	15,0	A	A	AT (F)	-	-	-	-	NO	VA
A77	5,8	A	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A79	18,0	BA	A	AT (F)	-	-	-	-	NO	-
A80	16,0	BA	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A82	20,5	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A83	18,0	B	A	AT (F)	-	-	-	-	ME	-
A84	15,0	A	A	AT (F)	-	-	-	-	NO	-
A85	15,5	B	A	AT (F)	-	-	-	-	ME	-
A87	16,2	B	BA	LA	-	-	-	-	NO	VA
A136	14,8	B	A	AT (F)	-	-	-	-	NO	-
A219	14,0	B	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A220	14,1	BA	A	F	-	-	-	-	ME	-
A251	13,6	B	A	F (LA)	-	-	-	-	ME	-
A306	14,8	B	A	F (LA)	-	-	-	-	ME	-
A307	14,5	B	A	F (LA)	-	-	-	-	ME	-
A388	14,3	B	A	F	-	-	-	-	NO	-
A390	16,4	B	A	F (LA)	-	-	-	-	ME	-
A484	14,7	B	A	LA	-	-	-	-	ME	-
A510	14,3	B	A	F (LA)	-	-	-	-	NO	-
A623	9,9	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A624	14,5	B	A	F	-	-	-	-	NO	-
A629	5,8	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A635	14,8	B	A	F	-	-	-	-	ME	-
A636	17,2	A	A	F (+)	-	-	-	-	ME	-
A638	16,6	A	A	AT (F)	-	-	-	-	ME	-
A643	17,4	BA	B	F	-	-	-	-	ME	-
A644	16,5	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A645	18,2	B	A	F (LA)	-	-	-	-	ME	-
A655	17,1	B	A	F	-	-	-	-	NO	-
A658	17,5	BA	A	F	-	-	-	-	ME	-
A659	6,8	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A660	16,7	BA	A	AT (F)	-	-	-	-	ME	-
CBS 554,65	17,6	B	B	F	-	-	-	-	ME	-
CBS 118,35	13,4	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 126,49	17,4	BA	A	AT (F)	-	-	-	-	ME	-
CBS 139,52	12,5	AB	A	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 618,78	18,3	A	A	AT	-	-	-	-	ME	-
ATCC 22343	20,1	B	BA	LA (F)	-	-	-	-	NO	-
IMI 211394	20,3	B	BA	F	-	-	-	-	ME	-
NRRL 3122	5,2	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
NRRL 3112	13,9	BA	ANA	AT	-	-	-	-	ME	-
607 (JC)	6,0	B	B	AT (F)	-	-	-	-	ME	-

Tabla 33. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a las temperaturas mínimas de crecimiento a los siete días de incubación. D: diámetro, T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

Cepa	Características Observadas									
	D	Anverso	Reverso	T	MA	Surcos	P	E	Micro	CA
A74	24,5	N	A	AT	-	R	-	-	NO	EA VA MA
A75	18,5	NB	AB	AT	-	R	-	-	NO	-
A76	29,0	NB	A	AT (F)	-	R	-	-	NO	EA VA
A77	26,5	G	A	F	-	R	-	-	NO	-
A79	23,0	N	A	AT (F)	+	R	-	-	NO	VA
A80	24,0	N	A	F	-	R	-	-	NO	-
A82	25,0	NB	A	F	-	R	-	-	NO	-
A83	20,0	N	A	AT (F)	-	R	-	-	NO	EA VA
A84	24,5	N	A	F (AT)	-	R	-	-	NO	-
A85	26,5	N	A	AT (F)	-	R	-	-	NO	-
A87	22,0	BA	A	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-
A136	7,1	B	BA	AT	-	-	-	-	NO	-
A219	5,1	B	BA	AT	-	-	-	-	NO	-
A220	28,5	BN	BA	F	-	RC	-	-	NO	-
A251	17,7	B	BA	AT	-	RC	-	-	ME	-
A306	18,9	B	BA	AT	-	RC	-	-	ME	-
A307	22,3	BN	B	AT (F)	-	R	-	-	NO	-
A388	28,6	BV	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-
A390	23,0	B	BA	F (LA)	-	RC	-	-	NO	-
A484	27,5	BN	BA	F (LA)	-	RC	-	-	NO	-
A510	26,7	BA	A	AT	-	RC	-	-	ME	-
A623	26,7	VO	AMO	F	-	RC	-	-	NO	-
A624	37,2	VN	AMC	AT	-	C	-	-	NO	-
A629	23,4	BN	BA	AT (F)	-	R	-	-	NO	VA
A635	23,9	BN	A	AT (F)	-	R	-	-	ME	-
A636	6,9	B	B	AT	-	-	-	-	ME	VA
A638	23,5	BA VO	A	F	-	RC	-	-	NO	-
A643	32,0	MCB	BA	F	-	RC	-	-	NO	-
A644	21,6	BMCN	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-
A645	24,8	BMCN	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-
A655	21,7	BMC	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	VA
A658	20,8	VON	A	F	-	C	-	-	NO	-
A659	26,4	B	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-
A660	17,4	BMC	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-
CBS 554.65	19,7	B	BA	F (LA)	-	RC	-	-	ME	VA
CBS 118.35	8,3	BG	A	AT (F)	-	-	-	-	NO	VA EA
CBS 126.49	13,1	B	A	LA	-	-	-	-	ME	-
CBS 139.52	24,2	B	BA	F (LA)	-	RC	-	-	ME	-
CBS 618.78	16,0	BG	A	AT	-	CE	-	-	ME	-
ATCC 22343	23,7	B	BA	AT	-	RC	-	-	ME	-
IMI 211394	15,5	B	BA	AT	-	CE	-	-	ME	-
NRRL 3122	7,1	NA A	NA A	AT	-	-	-	-	ME	VA
NRRL 3112	7,6	B	ANA	AT	-	-	-	-	ME	VA
607 (JC)	11,9	B	A	AT	-	R	-	-	ME	-

Tabla 34. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a las temperaturas máximas de crecimiento a los siete días de incubación. D: diámetro, T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

Cepa	Características Observadas									
	D	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
A14	17,0	A MC	A	AT	+	-	-	-	NO	VA
A15	7,0	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A78	7,3	B A	A	AT	-	-	-	-	NO	VA
A81	7,5	A	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A86	9,3	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A88	6,5	B	B	AT	-	-	-	-	NO	VA
A89	9,0	B	A	AT	-	-	-	-	NO	VA
A174	20,0	B	A	F (AT)	-	-	-	-	NO	-
A175	6,5	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A176	8,0	B	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A180	8,0	B	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A190	7,5	B	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A197	7,5	B	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A198	16,5	B A	A	AT (F)	-	-	-	-	NO	-
A223	7,8	B	A	AT	-	-	-	-	NO	-
A250	6,3	B	A	AT	-	-	-	-	NO	VA
A266	13,5	B	A	F (LA)	-	-	-	-	ME	-
A308	7,4	B	B A	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A312	7,2	B	A	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A325	6,6	B	B A	AT	-	-	-	-	ME	-
A348	6,8	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A391	5,5	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A486	16,4	B	A	LA	-	-	-	-	ME	-
A487	9,2	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A488	6,9	B	B A	AT	-	-	-	-	ME	-
A505	7,9	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A614	7,5	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A615	6,1	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A628	7,4	B	B A	AT	-	-	-	-	ME	-
A630	7,9	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A631	9,6	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A632	6,0	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A634	8,0	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A639	6,0	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A650	5,9	B	B A	AT	-	-	-	-	ME	-
A651	6,6	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A652	7,9	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A653	6,6	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A654	6,5	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A656	5,5	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A657	7,0	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-

Tabla 35. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a las temperaturas mínimas de crecimiento a los siete días de incubación. D: diámetro, T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales (sigue).

Cepa	Características Observadas									
	D	Anverso	Reverso	T	AER	Surcos	P	E	Micro	CA
CBS 134,48	8,93	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 558,65	6,03	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 117,32	5,12	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
IMI 172296	5,3	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
IMI 63764	6,45	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
ATCC 26036	19,78	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 121,55	17,53	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-

Tabla 35 (cont). Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a las temperaturas mínimas de crecimiento a los siete días de incubación. D: diámetro, T: textura, Aer micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

Cepa	Características Observadas										
	D	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA	
A14	26,5	N	A	AT	-	R	-	-	NO	EA	
A15	28,25	N	BE MC	AT	-	R	-	-	NO	-	
A78	27	N	A	F	-	R	-	-	NO	-	
A81	20,5	N	A	F	-	R	-	-	NO	-	
A86	16,5	B	B	AT	-	CE	-	-	NO	-	
A88	25,5	N	B	AT	-	R	-	-	NO	-	
A89	26,5	N	A	F (AT)	-	R	-	-	NO	-	
A174	19,5	B	B	AT	-	R	-	-	ME	-	
A175	24,25	N	A	F (AT)	-	R	-	-	NO	-	
A176	17,5	N	A	AT	-	R	-	-	NO	-	
A180	24,75	N	A	AT (F)	-	R	-	-	NO	-	
A190	6,61	B	B	AT	-	-	-	-	NO	-	
A197	6,72	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-	
A198	7,43	B	BA	AT	-	CE	-	-	NO	-	
A223	21,25	B	BA	AT	-	R	-	-	NO	-	
A250	21	N VO	A	F	-	R	-	-	NO	-	
A266	17,48	B	BA	AT	-	CE	-	-	ME	-	
A308	20,8	B	BA	AT	-	CE	-	-	ME	-	
A312	17,18	B	BA	AT	-	CE	-	-	ME	-	
A325	19,67	AN	BA	AT (F LA)	-	RC	-	-	ME	-	
A348	24,08	VMC	AM	F	-	RC	-	-	NO	-	
A391	19,22	B	BA	AT	-	CE	-	-	ME	-	
A486	22,94	BA	BA	F (LA)	-	RC	-	-	ME	-	
A487	26,58	V MO MC	AM	F	-	RC	-	-	NO	-	
A488	26,17	B MC	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-	
A505	22,88	VMC	BA	LA	-	CE	-	-	NO	-	
A614	28,06	VOB	A MC	AT (F)	-	R	-	-	NO	-	
A615	14	BN	A	AT	-	CE	-	-	ME	-	
A628	30,44	BA VC	A	F	-	RC	-	-	NO	-	
A630	32,07	B VC	BA	F (LA)	-	RC	-	-	NO	-	
A631	26,13	V VO	VM	AT (F)	-	R	-	-	NO	-	
A632	5,89	B	BA	AT	-	-	-	-	ME	-	
A634	27,64	B MC	BA	AT (F)	-	RC	-	-	NO	-	
A639	23,55	VON	AB	F	-	R	-	-	NO	-	
A650	24,37	VO MO	AVC	F	-	RC	-	-	NO	-	
A651	30,64	VO MO	VC A	F (LA)	-	RC	-	-	NO	-	
A652	26,98	VC	AB	F (LA)	-	RC	-	-	NO	VA	
A653	23,66	BA	BA	AT	-	CE	-	-	NO	-	
A654	25,28	VC B M	BA	F	-	CE	-	-	NO	-	
A656	7,12	B	B	AT	-	-	-	-	NO	-	
A657	4,03	B	BA	AT	-	-	-	-	NO	-	

Tabla 36. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a las temperaturas máximas de crecimiento a los siete días de incubación. D: diámetro, T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales (sigue).

Cepa	Características Observadas									
	D	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
CBS 134.48	20,73	B	A	AT	-	R	-	-	ME	-
CBS 558.65	9,71	B	AB	AT (F)	+	RC	-	-	NO	-
CBS 117.32	9	B G	BA	AT (F)	-	-	-	-	ME	-
IMI 172296	23,12	B VC	BA	AT	-	CE	-	-	ME	-
IMI 63764	9,96	B G	AMC	AT (F)	-	-	-	-	NO	VA
ATCC 26036	13,36	B G	A	AT (F)	-	R	-	-	NO	VA
CBS 121.55	6,93	B	BA	AT	-	-	-	-	ME	-

Tabla 36 (cont). Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a las temperaturas máximas de crecimiento a los siete días de incubación. D: diámetro, T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

5.2.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL NaCl.

En las Tablas 37 y 38 se indican los valores medios de los diámetros de las colonias (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de las cepas del agregado *A. niger* estudiadas a las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a las temperaturas de 25°C y 35°C, respectivamente.

En las Tablas 39 y 40 se indican los valores medios de los diámetros de las colonias (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de las cepas ensayadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a las temperaturas de 25 y 35°C, respectivamente.

En las Tablas 41 y 42 se indican los valores medios de los diámetros de las colonias (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de las cepas ensayadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a las temperaturas de 25 y 35°C, respectivamente.

En la Figura 13 se representan los porcentajes de cepas del agregado *A. niger* desarrolladas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a las temperaturas de 25°C y 35°C. En las Figuras 14 y 15 se representan los porcentajes de cepas con patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N y tipo T, respectivamente, desarrolladas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a las temperaturas de 25°C y 35°C.

En la Figura 16 se representan los diámetros medios expresados en mm obtenidos a cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación por el total de las cepas estudiadas.

En las Figuras 17 y 18 se representan los diámetros medios expresados en mm obtenidos a cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación por las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N y tipo T, respectivamente.

En las Figuras 19 y 20 se comparan las medias de los diámetros obtenidos a los tres y siete días de incubación por las cepas desarrolladas de los dos grupos N y T (definidos en función del análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA) a las temperaturas de 25 y 35°C, respectivamente.

En algún caso, a concentraciones bajas de NaCl, algunas de las cepas desarrolladas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación. Los porcentajes de estas cepas con respecto al total de las cepas estudiadas están expresados en la Tabla 43 y la Figura 21.

En las Tablas 44 a 51 se indica, para cada grupo de cepas (N y T) a los tres y siete días de incubación a 25°C y 35°C, respectivamente, el porcentaje de reducción del diámetro obtenido respecto al diámetro medio determinado en el medio control (sin NaCl) a cada concentración de NaCl ensayada. En los casos en que se determinó un mayor desarrollo que el control, el porcentaje del incremento se indicó mediante un asterisco (*). El cálculo de dichos porcentajes se efectuó del modo siguiente:

$$\% \text{ Reducción diámetro} = 100 - \frac{\text{diámetro de la colonia} \times 100}{\text{diámetro de la colonia control}}$$

Los valores medios de los porcentajes de reducción del diámetro de todas las cepas ensayadas y de las agrupadas los tipos N y T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25°C y 35°C se resumen en las Tablas 52 y 53.

En las Tablas 54 y 55 se muestran, para el total de las cepas y los dos grupos N y T, a la temperatura de 25°C y 35°C, respectivamente, los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), expresados en porcentajes de NaCl, indicándose, para cada tiempo de lectura, el rango de dichas CMI, las CMI₅₀ y CMI₉₀ (concentraciones mínimas a las que fueron inhibidas el 50% y el 90% de las cepas, respectivamente) y los valores de la media geométrica (MG) de las CMI.

Con el fin de determinar el porcentaje de NaCl óptimo para el crecimiento de las cepas estudiadas a los tres y siete días de incubación a las temperaturas de 25°C y 35°C, se realizó un análisis de la varianza

(prueba de Student-Newman-Keuls) de los diámetros de las colonias desarrolladas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas cuyos resultados se detallan en las Tablas 37 a la 42.

Con el fin de observar el efecto que la temperatura producía en la resistencia a la sal, se realizó una prueba de t de Student entre los valores de los diámetros de las colonias desarrolladas a los tres y siete días a las dos temperaturas ensayadas. Entre los diámetros de las colonias obtenidas a 25°C y 35°C, se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) en todas las concentraciones de sal ensayadas en la lectura realizada a los tres días. En la lectura realizada a los siete días se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en las concentraciones de sal del 6% al 14%, mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los ensayos realizados a las concentraciones de 2%, 4% y 16% NaCl. Con respecto al número de cepas desarrolladas a 25°C y a 35°C se realizó una prueba de Chi cuadrado con la que no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), excepto en los ensayos realizados a las concentraciones de NaCl del 8% (a los tres y siete días de incubación), 10% y 12% (siete días de incubación) en los que el número de cepas desarrollado a 25°C fue significativamente mayor ($p < 0,01$).

Mediante la prueba de t de Student no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los diámetros obtenidos por las cepas de los grupos N y T (definidos en función del análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA) en las distintas concentraciones de sal ensayadas. Con respecto al número de cepas desarrolladas por ambos grupos en cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) excepto en los ensayos realizados a 10% y 12% de sal, en los que el número de cepas del grupo N fue significativamente mayor ($p < 0,01$).

		Concentración de NaCl (%) ¹																	
		0		2		4		6		8		10		12		14		16	
	n	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
	n	92	92	92	92	92	92	92	92	89	92	48	81	33	51	20	35	0	11
	mín	19,9	39,7	14,4	36,4	9,2	24,8	4,5	18,1	4,1	10,7	3,8	3,6	3,8	4,4	3,7	5,0	-	4,1
	Máx	56,3	86,0	57,0	86,0	41,5	86,0	27,8	86,0	18,0	60,8	12,0	38,4	9,9	38,4	5,7	17,4	-	7,4
	Media	33,0	63,4	41,8	84,9 ²	27,1	77,3 ²	15,9	54,7	9,8 ^a	33,3	8,2 ^{a,b,c}	19,4 ^f	6,5 ^{c,d,e}	15,0 ^f	4,7 ^e	9,3 ^g	-	5,87 ^g
	DT	6,2	12,5	8,3	5,8	4,4	11,9	5,6	15,4	3,6	10,7	2,1	10,6	1,1	6,9	0,6	3,9	-	1,2

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 18% de NaCl.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e, f, g La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias desarrolladas a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 37. Valores medios (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de los diámetros de las colonias obtenidas de las cepas desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a la temperatura de 25°C.

		Concentración de NaCl (%) ¹																	
		0		2		4		6		8		10		12		14		16	
	n	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
	n	92	92	92	92	91	91	91	91	65	78	37	45	26	32	14	25	1	5
	mín	27,2	49,3	20,7	69,0	11,8	46,1	4,5	20,6	1,5	0,8	3,7	2,5	4,4	3,0	4,2	5,6	3,6	3,6
	Máx	66,7	86,0	80,6	86,0	65,9	86,0	40,3	86,0	29,7	86,0	21,3	60,8	15,8	43,3	7,4	20,4	3,6	7,1
	Media	46,3	78,8 ^{2,a}	50,8	85,0 ^{2,b}	34,3	80,1 ^{2,d}	20,4	62,8 ²	13,7 ^a	39,8 ^e	12,8 ^{a,b}	33,6 ^e	8,5 ^{b,c}	24,9	5,5 ^c	12,5 ^f	3,6	6,2 ^f
	DT	8,2	8,5	14,6	3,2	11,0	9,7	8,8	16,4	7,4	20,6	4,1	17,2	3,0	8,9	1,0	4,6	-	1,4

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 18% de NaCl.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e, f La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias desarrolladas a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 38. Valores medios (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de los diámetros de las colonias obtenidas de las cepas desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a la temperatura de 35°C.

	Concentración de NaCl (%) ¹																	
	0		2		4		6		8		10		12		14		16	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n	44	44	44	44	44	44	44	44	42	44	28	44	15	31	8	17	0	6
min	20,3	47,0	14,4	36,4	9,2	24,8	4,5	18,1	4,2	10,7	3,8	3,6	5,0	4,4	4,1	5,0	-	5,2
Máx	56,3	86,0	57,0	86,0	39,5	86,0	27,8	86,0	18,0	60,8	12,0	37,5	9,9	30,1	5,6	17,4	-	7,4
Media	34,8	65,1	40,8	84,1 ²	26,8	76,4 ²	15,8	56,1	9,8 ^a	34,0	7,6 ^a	20,1 ^b	6,5 ^a	14,0 ^{b,c}	4,9 ^a	10,0 ^c	-	6,3 ^c
DT	6,4	11,3	10,0	8,3	7,9	11,9	6,4	16,8	3,8	11,7	2,0	10,1	1,4	7,8	0,5	4,6	-	0,9

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 18% de NaCl.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e, f. La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias desarrolladas a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 39. Valores medios (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de los diámetros de las colonias obtenidas de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a la temperatura de 25°C.

	Concentración de NaCl (%) ¹																	
	0		2		4		6		8		10		12		14		16	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n	44	44	44	44	44	44	44	44	34	39	18	22	13	14	7	11	0	2
min	28,4	61,2	20,7	70,6	15,5	46,1	4,5	20,6	1,5	0,8	3,7	5,0	3,0	14,8	4,2	5,8	-	6,9
Máx	66,3	86,0	80,6	86,0	65,9	86,0	40,3	86,0	29,7	86,0	21,3	60,8	15,8	43,3	7,4	20,4	-	7,1
Media	47,1 ^a	78,3 ^{2,d}	50,6 ^a	84,8 ^{2,d}	33,4	80,4 ^{2,d}	19,9 ^b	62,8	13,9 ^{b,c}	41,0 ^e	13,1 ^{b,c}	32,8 ^e	9,0 ^c	28,3 ^e	5,7 ^c	13,1 ^f	-	7,0 ^f
DT	8,4	8,0	16,6	3,5	12,3	8,9	9,9	17,5	8,1	21,9	5,1	18,8	3,4	8,4	1,2	5,5	-	0,2

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 18% de NaCl.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e, f. La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias desarrolladas a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 40. Valores medios (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de los diámetros de las colonias obtenidas de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a la temperatura de 35°C.

	Concentración de NaCl (%) ¹																	
	0		2		4		6		8		10		12		14		16	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n	48	48	48	48	48	48	48	48	47	48	20	37	18	20	12	18	0	5
mín	19,9	39,7	26,0	77,7	12,5	47,9	5,4	22,9	4,1	12,7	5,3	3,9	4,8	7,1	3,7	5,1	-	4,1
Máx	44,5	86,0	55,2	86,0	41,5	86,0	25,2	79,1	17,2	53,4	11,9	38,4	7,9	25,7	5,7	16,8	-	7,1
Media	31,4	61,8	42,8	85,7 ²	27,4	78,1 ²	16,0	54,1	9,8 ^a	33,3	9,0 ^a	18,4	6,5 ^{a,b}	16,8	4,5 ^b	8,6 ^c	-	5,3 ^c
DT	5,5	13,5	6,3	1,4	7,1	11,0	4,9	13,4	3,5	9,4	1,9	11,2	0,8	4,7	4,5	3,1	-	1,3

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 18% de NaCl.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias desarrolladas a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 41. Valores medios (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de los diámetros de las colonias obtenidas de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a la temperatura de 25°C.

	Concentración de NaCl (%) ¹																	
	0		2		4		6		8		10		12		14		16	
	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d
n	48	48	48	48	48	48	47	47	31	39	19	23	13	18	7	14	1	3
mín	27,2	49,3	24,0	69,0	11,8	47,8	4,7	25,5	2,0	3,9	6,4	2,5	4,4	6,7	4,5	5,6	3,6	3,6
Máx	66,7	86,0	73,7	86,0	55,7	86,0	34,3	86,0	23,6	70,0	19,4	55,4	12,8	35,4	6,7	19,1	3,6	6,6
Media	45,6	79,3 ^c	50,9	85,1 ^{2,c}	35,1	79,9 ^{2,c}	20,8	62,9	13,6 ^a	38,5 ^d	12,6 ^a	34,4 ^d	8,0 ^{a,b}	22,5	5,4 ^b	12,0 ^e	3,6	5,6 ^e
DT	8,0	9,0	12,7	2,9	9,7	10,4	7,7	15,6	6,8	19,5	3,0	16,0	2,5	8,5	0,9	3,9	-	1,7

¹ No se desarrolló ninguna cepa a 18% de NaCl.

² Algunas de las cepas alcanzaron el diámetro máximo antes de los siete días de incubación.

a, b, c, d, e La presencia de la misma letra indica que no existen diferencias significativas entre los diámetros medios de las colonias desarrolladas a distintas concentraciones de NaCl.

Tabla 42. Valores medios (expresados en mm) y las desviaciones típicas (DT) de los diámetros de las colonias obtenidas de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas en las distintas concentraciones de NaCl a los tres y siete días de incubación a la temperatura de 35°C.

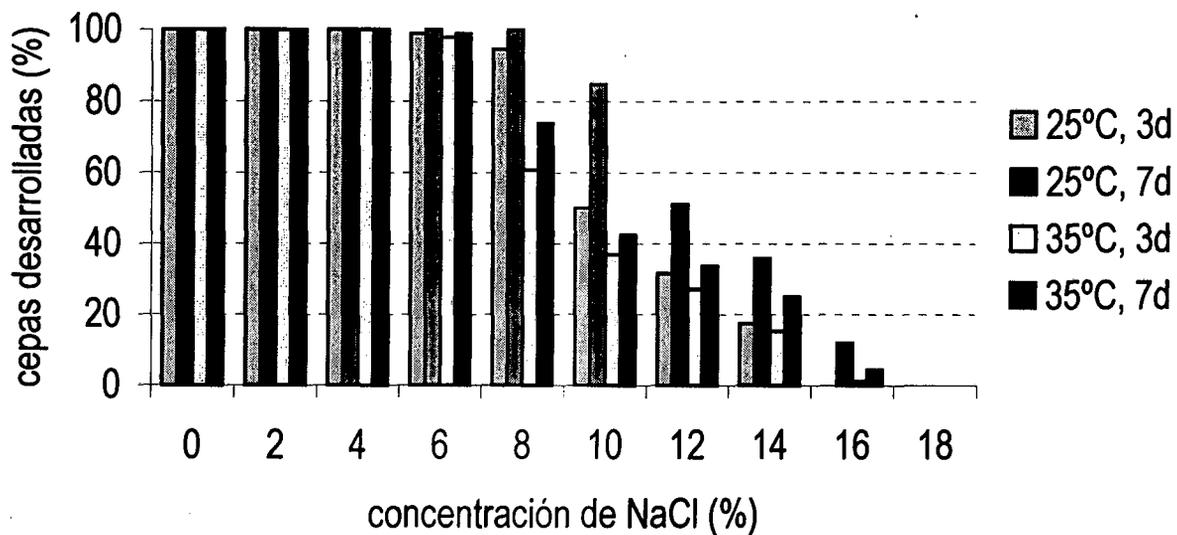


Figura 13. Porcentaje de cepas del agregado *A. niger* desarrolladas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25°C y 35°C.

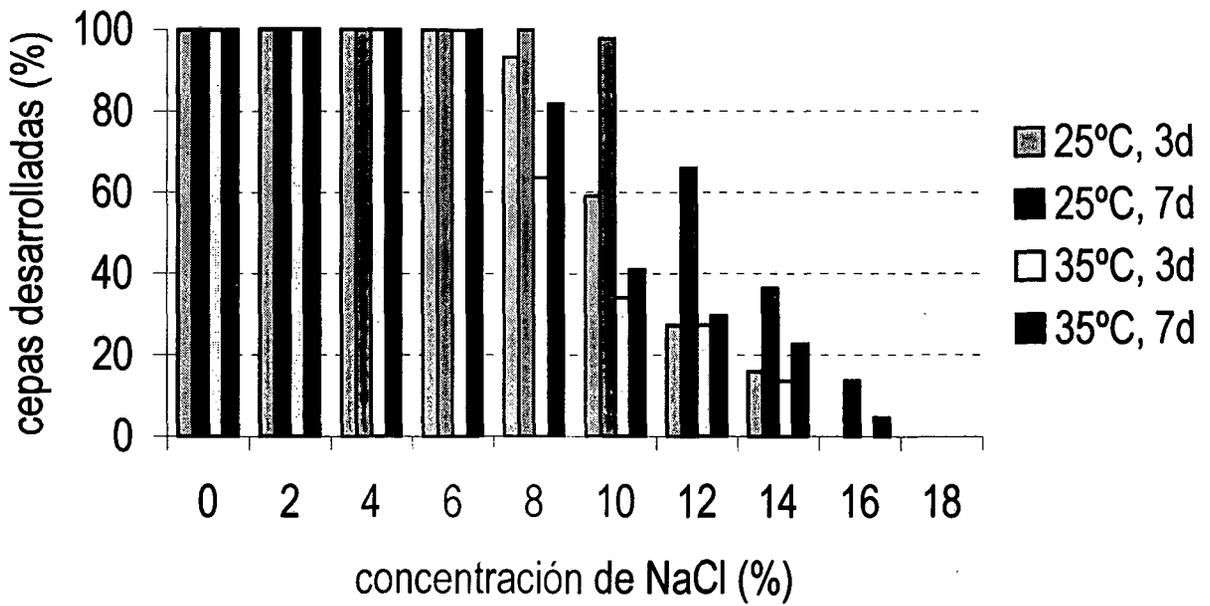


Figura 14. Porcentaje de cepas del agregado *A. niger* con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25°C y 35°C.

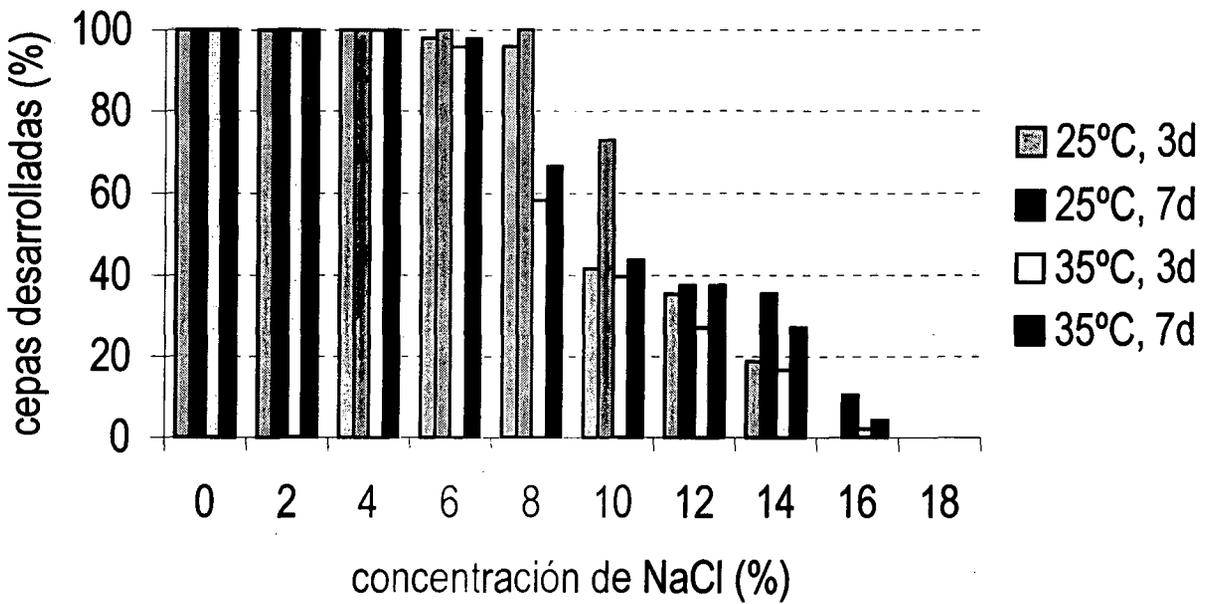


Figura 15. Porcentaje de cepas del agregado *A. niger* con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25°C y 35°C.

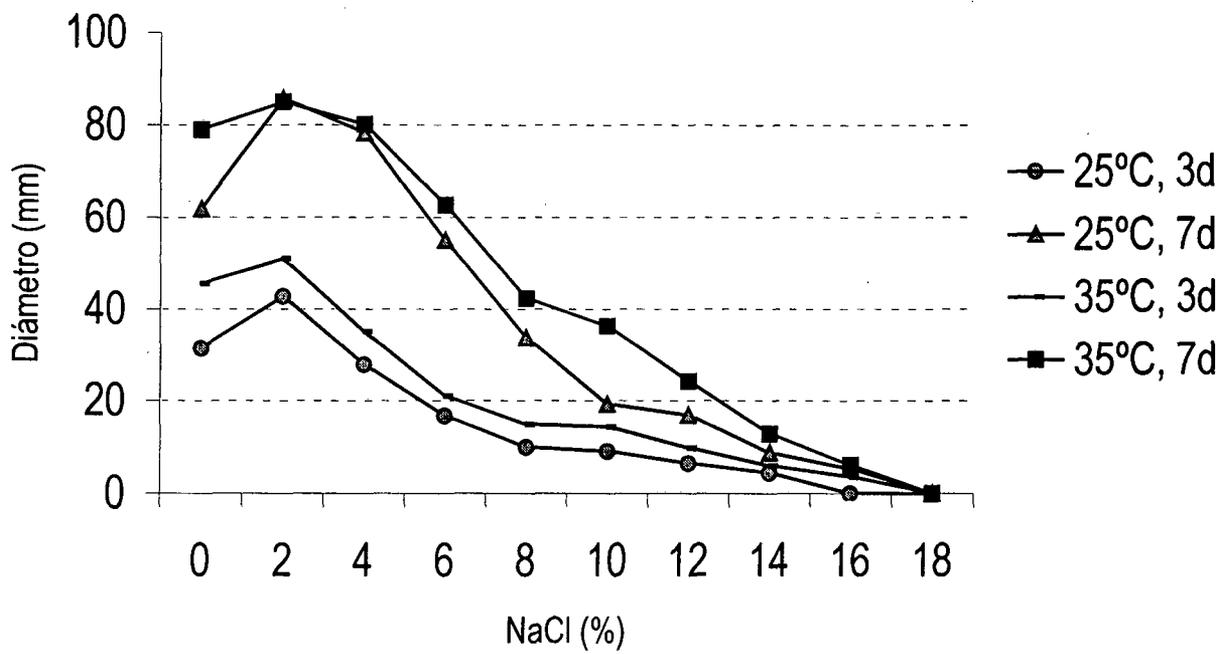


Figura 16. Diámetros medios (en mm) del total de las cepas estudiadas en cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25 y 35°C.

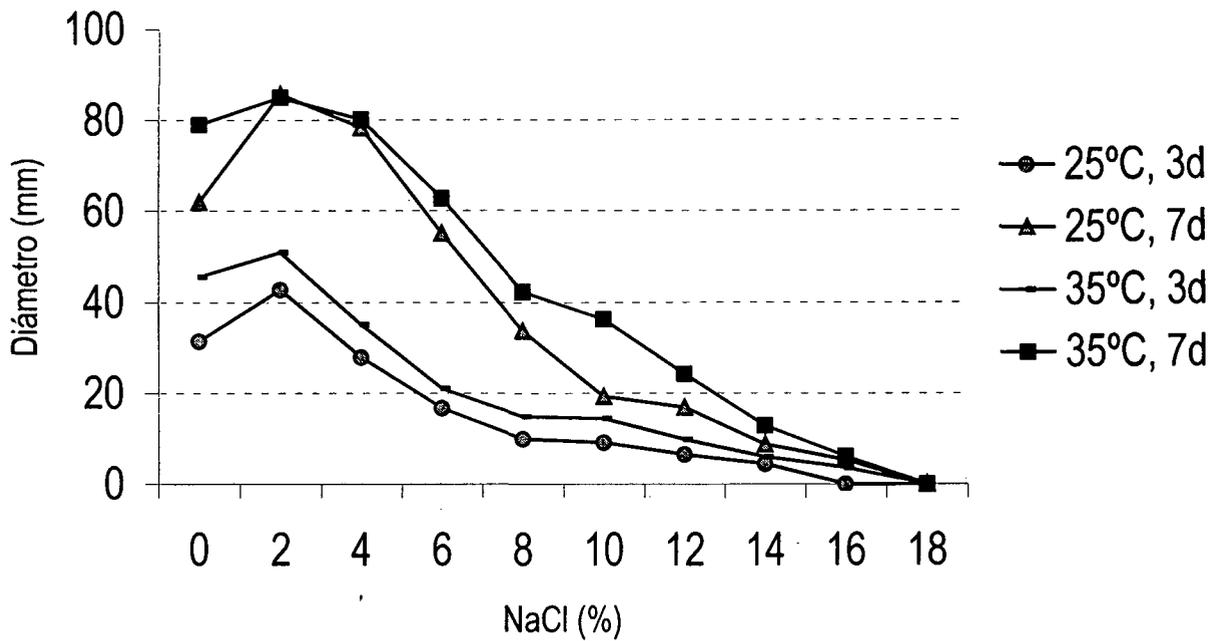


Figura 17. Diámetros medios (en mm) del total de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N en cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25 y 35°C.

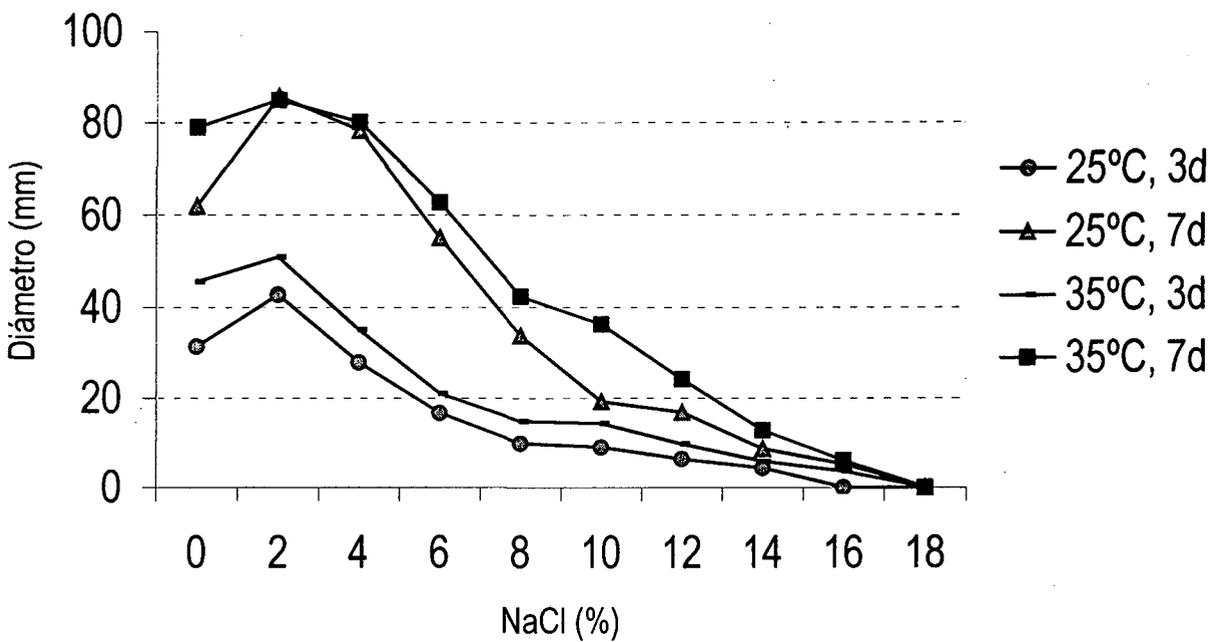


Figura 18. Diámetros medios (en mm) del total de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T en cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25 y 35°C.

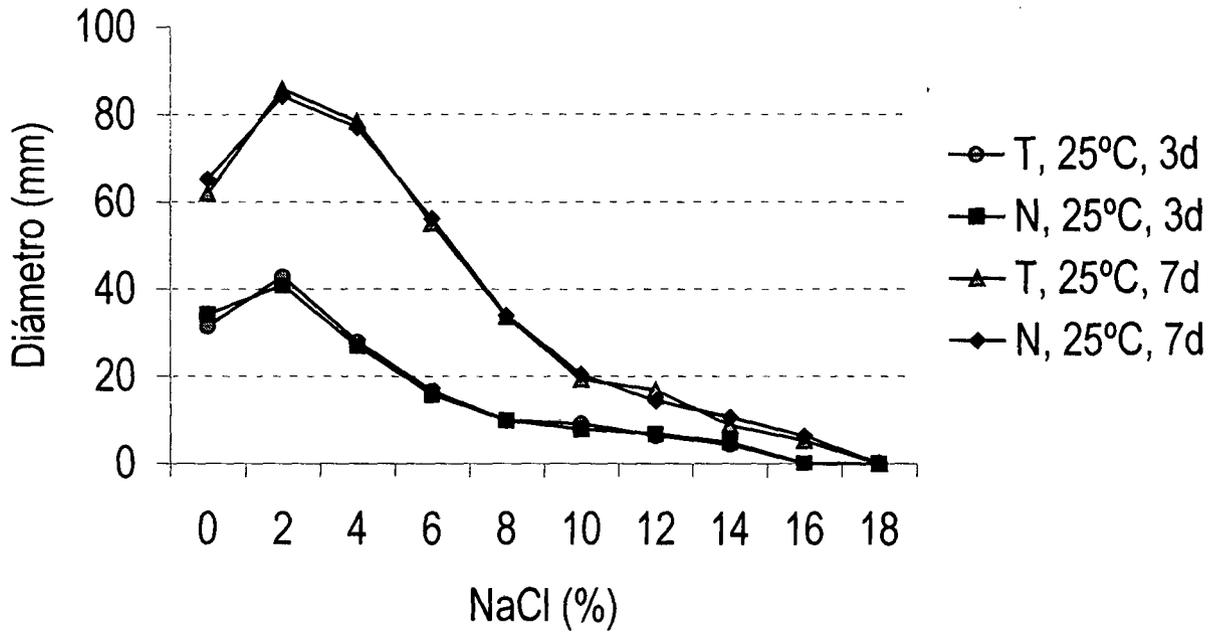


Figura 19. Diámetros medios (en mm) del total de las cepas estudiadas en cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25°C, según su patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

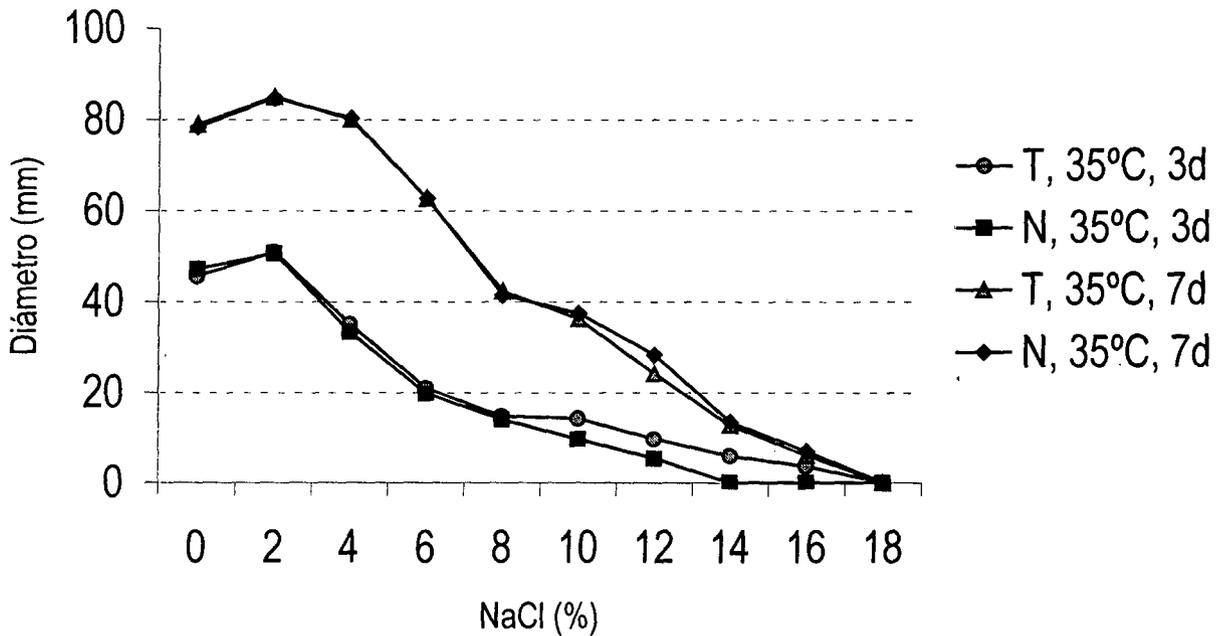


Figura 20. Diámetros medios (en mm) del total de las cepas estudiadas en cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 35°C, según su patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA.

		Concentración de sal (%)											
		0			2			4			6		
		4d	5d	6d	4d	5d	6d	4d	5d	6d	4d	5d	6d
	total	-	-	-	-	21,7	21,7	-	-	21,7	-	-	-
25°C	N	-	-	-	-	25,0	22,7	-	-	20,5	-	-	-
	T	-	-	-	-	35,4	20,8	-	-	22,9	-	-	-
	total	1,1	7,6	23,9	22,8	31,5	18,5	1,1	16,3	19,6	-	-	1,1
35°C	N	-	2,3	27,3	22,7	18,2	27,3	2,3	13,6	13,6	-	-	2,3
	T	2,1	12,5	20,8	22,9	43,8	10,4	-	18,8	25	-	-	-

Tabla 43. Porcentajes del total de cepas estudiadas y de los grupos N y T (definidos en base al análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA) que invadieron toda la superficie del medio de cultivo a los cuatro, cinco y seis días de incubación a la temperatura de 25°C y 35°C a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas.

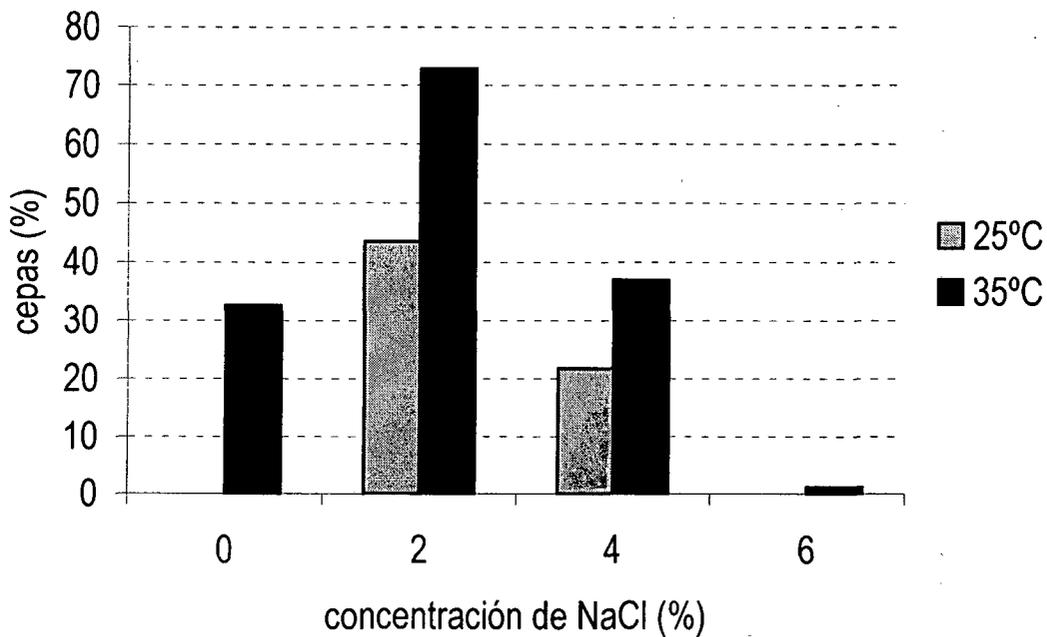


Figura 21. Porcentajes del total de cepas estudiadas que invadieron toda la superficie del medio de cultivo a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas antes de siete días de incubación a las temperaturas de 25°C y 35°C.

Cepa	Concentración de NaCl (%)								CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16		18
A74	71,4*	19,5	44,4	59,4	77,4	100,0				12
A75	58,4*	18,4	47,2	66,4	86,4	84,0	100,0			14
A76	7,6*	38,2	57,8	76,5	86,3	100,0				12
A77	18,2	35,1	62,7	78,7	89,3	100,0				12
A79	19,7*	9,5	63,3	78,2	85,0	100,0				12
A80	42,9*	7,5	64,6	72,8	78,2	100,0				12
A82	27,3*	14,3	55,8	76,0	80,5	100,0				12
A83	24,5*	16,1	54,5	69,9	86,0	100,0				12
A84	61,9*	2,9	46,8	64,0	74,8	100,0				12
A85	53,5*	13,2	49,6	57,4	80,6	100,0				12
A87	23,0*	27,0	37,8	62,5	80,5	83,0	100,0			14
A136	47,6*	17,5*	37,3	60,3	74,6	84,1	100,0			14
A219	17,7*	30,0	53,8	73,1	100,0					10
A220	4,5*	5,3	30,0	52,0	69,4	75,0	86,5	100,0		16
A251	70,4*	2,2*	24,5	67,4	69,4	100,0				12
A306	62,0*	19,9*	32,5	69,2	70,0	79,8	85,4	100,0		16
A307	27,4*	3,1*	26,3	58,0	81,3	85,6	100,0			14
A388	43,2*	23,3	43,9	55,4	71,7	83,9	87,6	100,0		16
A390	0,6*	33,8	65,0	75,9	81,4	81,4	100,0			14
A484	10,3*	9,7	39,4	71,3	80,2	81,9	86,9	100,0		16
A510	10,2*	18,5	46,6	60,2	73,4	78,1	87,6	100,0		16
A623	51,8*	11,0	34,5	46,7	69,7	80,5	100,0			14
A624	2,0	36,2	65,3	70,9	80,3	100,0				12
A629	18,4*	7,2	46,1	69,9	75,9	85,3	87,7	100,0		16
A635	39,0*	4,3	31,1	67,0	75,7	81,6	87,2	100,0		16
A636	2,7*	41,0	69,9	79,6	87,5	100,0				12
A638	16,8*	28,6	66,5	79,7	100,0					10
A643	6,1*	40,3	66,9	81,2	100,0					10
A644	8,4	46,9	70,8	84,1	100,0					10
A645	1,5*	34,4	66,9	81,5	100,0					10
A655	4,7*	44,8	67,7	83,0	100,0					10
A658	12,7*	22,0	74,2	80,6	100,0					10
A659	6,5*	26,1	67,7	86,4	100,0					10
A660	7,0*	47,7	70,5	84,0	100,0					10

Tabla 44. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas tipo N estudiadas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 25°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)*: Porcentaje de incremento de diámetro (sigue).

Cepa	Concentración de NaCl (%)								CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16		18
CBS 554.65	4,7	36,4	66,0	82,1	100,0					10
CBS 118.35	24,3*	3,1	22,2	58,8	73,3	81,5	85,1	100,0		16
CBS 126.49	4,8	38,4	73,2	80,2	100,0					10
CBS 139.52	2,7	44,0	78,4	100,0						8
CBS 618.78	0,5	19,7	53,6	82,5	82,9	100,0				12
ATCC 22343	41,6	65,6	88,6	100,0						8
IMI 211394	2,8	37,7	68,1	83,4	100,0					10
NRRL 3122	29,1	54,8	65,1	78,6	100,0					10
NRRL 3112	1,2	29,6	75,7	82,3	100,0					10
607 (JC)	21,3*	16,3	42,8	74,2	82,7	85,1	100,0			14

Tabla 44 (cont). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas tipo N estudiadas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 25°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro.

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
A14	46,0*	22,2	49,2	69,8	100,0					10
A15	40,7*	46,7	43,7	70,4	100,0					10
A78	53,9*	21,7*	40,0	71,3	100,0					10
A81	114,9*	21,3*	39,4	59,6	100,0					10
A86	75,9*	6,9	40,5	77,6	100,0					10
A88	98,8*	0,0	42,7	70,7	100,0					10
A89	63,7*	11,8	49,0	70,6	100,0					10
A174	78,6*	14,6	39,8	70,9	100,0					10
A175	50,0*	13,3	41,7	71,7	100,0					10
A176	41,4*	15,3*	49,5	73,0	100,0					10
A180	51,6*	29,0	54,0	67,7	100,0					10
A190	69,2*	6,8	45,3	72,6	100,0					10
A197	61,9*	16,2*	44,8	70,5	100,0					10
A198	37,3*	49,2	54,0	71,4	100,0					10
A223	43,5*	17,7*	50,8	72,6	100,0					10
A250	45,4*	36,1	61,1	82,4	100,0					10
A266	60,0*	16,2*	21,7	61,8	62,3	75,8	82,0	100,0		16
A308	49,5*	10,7*	23,9	46,6	72,7	79,7	88,4	100,0		16
A312	21,4*	20,0	47,9	69,3	77,5	84,3	89,0	100,0		16
A325	17,7*	13,9	39,3	61,6	86,4	100,0				12
A348	30,8*	1,9	55,5	67,5	77,6	82,5	88,3	100,0		16
A391	24,9*	19,6	45,3	60,9	69,9	81,6	87,5	100,0		16
A486	3,9*	26,4	51,5	72,3	79,8	83,4	89,8	100,0		16
A487	20,6*	30,8	66,7	74,8	81,3	86,0	88,7	100,0		16
A488	50,0*	2,7*	40,4	59,9	100,0					10
A505	28,4*	12,4	52,2	63,1	83,2	78,9	100,0			14
A614	52,3*	20,8*	31,8	56,4	65,1	73,5	82,3	100,0		16
A615	41,9*	4,1	44,3	57,1	73,9	79,1	86,5	100,0		16
A628	12,8*	24,3	57,9	83,5	69,8	79,6	86,4	100,0		16
A630	33,3*	1,0	41,3	59,6	71,8	79,0	86,4	100,0		16
A631	43,3*	10,4*	29,6	59,5	79,5	80,3	100,0			14
A632	8,5*	12,6	40,9	66,7	76,7	100,0				12
A634	66,5*	14,4*	28,8	53,6	58,3	69,2	84,2	100,0		16
A639	46,7*	16,8	53,7	65,9	100,0					10
A650	86,5*	1,4*	48,1	75,4	100,0					10
A651	17,2*	39,5	63,5	80,5	100,0					10
A652	33,4*	19,4	65,2	69,7	100,0					10
A653	25,5*	18,9	69,5	85,7	100,0					10
A654	32,2*	26,0	65,3	78,7	100,0					10
A656	31,9*	29,0	59,7	67,6	100,0					10
A657	17,1*	24,6	69,9	77,3	100,0					10

Tabla 45. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas tipo T estudiadas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 25°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)*: Porcentaje de incremento de diámetro (sigue).

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
CBS 134.48	30,7	66,7	85,7	87,0	100,0					10
CBS 558.65	50,7*	17,3*	33,4	63,1	73,0	82,3	100,0			14
CBS 117.32	29,6*	16,6	46,1	65,2	75,6	85,0	100,0			14
IMI 172296	23,4	53,9	69,6	100,0						8
IMI 63764	17,2*	5,8	44,9	56,9	70,3	81,7	100,0			14
ATCC 26036	38,3*	10,1*	30,7	54,6	70,0	86,9	100,0			14
CBS 121.55	3,3	31,8	64,0	88,5	100,0					10

Tabla 45 (cont.). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas tipo T estudiadas a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 25°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro.

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
A74	51,5*	32,2*	1,3	33,9	56,8	85,9	100,0			14
A75	83,0*	53,2*	9,6*	22,3	63,8	76,6	83,0	100,0		16
A76	4,9	4,9	21,3	51,8	71,3	81,4	100,0			14
A77	0,0	0,0	25,3	53,2	77,9	89,5	100,0			14
A79	39,8*	39,8*	9,8	54,5	66,3	80,5	100,0			14
A80	36,5*	36,5*	18,3	48,4	58,7	91,3	100,0			14
A82	34,4*	34,4*	6,3	48,4	65,2	84,4	91,4	100,0		16
A83	42,1*	31,4*	7,4*	41,3	61,6	90,9	100,0			14
A84	44,5*	37,8*	0,0	38,7	60,5	86,6	100,0			14
A85	50,9*	38,6*	4,4	32,5	53,5	86,8	100,0			14
A87	35,2*	20,9*	14,3*	36,9	60,5	61,4	81,4	91,9	100,0	18
A136	65,4*	65,4*	15,4*	24,0	56,7	73,6	90,4	100,0		16
A219	50,9*	24,6*	20,6	46,5	68,9	90,4	100,0			14
A220	22,7*	22,7*	6,5*	20,1	48,7	64,7	77,4	89,5	100,0	18
A251	40,4*	40,4*	27,2*	40,2	45,1	77,1	90,2	88,6	100,0	18
A306	24,2*	24,2*	15,4*	41,5	52,1	62,7	74,9	100,0		16
A307	29,1*	29,1*	29,1*	8,6	47,9	75,9	91,4	100,0		16
A388	54,1*	33,7*	1,1*	22,6	50,2	68,6	80,6	100,0		16
A390	6,9	3,5	38,0	64,4	56,0	70,3	92,1	100,0		16
A484	28,6*	28,6*	14,9*	39,2	58,1	65,0	78,6	91,8	100,0	18
A510	0,0	0,0	10,8	33,8	56,4	65,0	81,6	92,8	100,0	18
A623	83,1*	62,4*	19,6*	4,2	46,9	64,8	85,7	100,0		16
A624	26,0*	3,1	44,2	58,2	65,7	90,8	100,0			14
A629	8,0*	8,0*	1,3*	31,1	56,5	69,1	78,7	91,3	100,0	18
A635	20,0*	20,0*	13,8*	34,3	58,6	68,4	84,1	100,0		16
A636	54,2*	44,4*	7,1	54,5	77,7	91,6	100,0			14
A638	68,6*	59,5*	7,6*	36,3	73,6	100,0				12
A643	28,9*	19,4*	15,3	49,2	78,7	100,0				12
A644	31,1*	18,2*	17,3	58,1	82,1	93,3	100,0			14
A645	39,2*	21,8*	25,6	54,2	78,7	100,0				12
A655	36,3*	26,5*	10,3	49,8	73,6	100,0				12
A658	53,2*	48,7*	32,9	53,1	91,4	100,0				12
A659	23,0*	16,2*	31,4	66,9	93,1	100,0				12
A660	60,7*	31,8*	27,1	54,4	90,0	100,0				12

Tabla 46. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo N a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los siete días de incubación a 25°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro (sigue).

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
CBS 134.48	9,7	39,0	73,3	79,0	100,0					10
CBS 558.65	42,7*	42,7*	31,4*	24,7	55,3	77,5	91,4	100,0		16
CBS 117.32	0,0	0,0	26,1	55,1	68,7	84,7	90,9	100,0		16
IMI 172296	2,2	23,2	54,8	84,7	100,0					10
IMI 63764	0,0	0,0	29,2	48,9	63,1	80,4	89,3	100,0		16
ATCC 26036	29,0*	29,0*	17,3*	26,0	48,3	83,3	92,4	100,0		16
CBS 121.55	34,2*	32,7*	4,1	54,2	70,5	100,0				12

Tabla 47 (cont). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los siete días de incubación, a 25°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro.

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
A74	17,2*	26,9	49,5	76,9	100,0					10
A75	2,5*	58,6	53,5	100,0						8
A76	17,7	43,4	65,3	86,4	100,0					10
A77	26,4	43,0	56,6	81,4	88,4	100,0				12
A79	3,3	26,4	53,8	87,9	100,0					10
A80	10,0	42,0	74,0	100,0						8
A82	72,9*	1,4	24,3	73,6	100,0					10
A83	12,2	44,3	58,7	77,4	100,0					10
A84	51,8*	2,9	49,4	74,1	100,0					10
A85	27,5*	13,1	40,0	67,5	90,0	100,0				14
A87	34,9*	32,8	72,6	64,5	76,0	80,2	90,2	100,0		16
A136	28,4*	15,3	62,5	100,0						8
A219	9,9	51,6	72,5	89,0	100,0					10
A220	73,4*	23,4*	13,4	37,1	59,0	75,1	100,0			14
A251	57,0*	14,2*	28,4	78,2	59,1	89,3	100,0			14
A306	40,3*	26,0	36,8	51,6	70,4	77,9	86,9	100,0		16
A307	58,9*	32,4*	22,1	46,2	71,9	87,8	100,0			14
A388	48,1*	3,5	28,8	42,6	61,5	75,4	100,0			14
A390	20,1	38,2	64,2	82,8	82,1	100,0				12
A484	24,5*	13,5	40,4	67,3	71,9	81,1	92,4	100,0		16
A510	47,8*	1,2	34,0	42,2	58,6	69,3	85,7	100,0		16
A623	13,1*	24,9	48,5	54,2	79,2	86,2	100,0			14
A624	30,8	45,0	75,6	43,2	100,0					10
A629	11,2*	23,3	46,4	63,3	71,6	83,2	91,0	100,0		16
A635	62,9*	6,8*	39,5	58,7	71,4	77,5	91,1	100,0		16
A636	12,3*	31,3	66,6	84,3	89,7	100,0				12
A638	10,7*	32,7	64,2	84,0	100,0					10
A643	23,5	48,3	70,6	77,5	100,0					10
A644	46,5	61,2	78,9	100,0						8
A645	17,5	39,2	68,4	82,6	100,0					10
A655	5,4	35,3	66,4	86,5	100,0					10
A658	24,5*	27,7	71,3	89,1	100,0					10
A659	7,9*	37,7	66,3	100,0						8
A660	41,7	64,2	82,0	97,1	100,0					10

Tabla 48. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo N a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro (sigue).

Cepa	Concentración de NaCl (%)								CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16		18
CBS 554.65	21,6	44,3	67,6	81,3	100,0					10
CBS 118.35	56,1*	23,5*	26,1	56,3	73,5	82,0	87,3	100,0		16
CBS 126.49	12,4	44,6	87,0	100,0						8
CBS 139.52	24,3	49,6	88,8	100,0						8
CBS 618.78	20,3	60,3	77,6	100,0						8
ATCC 22343	42,5	66,6	91,9	100,0						8
IMI 211394	0,6	29,2	60,6	77,4	100,0					10
NRRL 3122	27,4	45,5	84,1	81,9	100,0					10
NRRL 3112	4,8	40,0	72,3	100,0						8
607 (JC)	4,6*	27,6	51,8	68,7	79,7	90,9	100,0			14

Tabla 48 (cont.). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo N a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). *: Porcentaje de incremento de diámetro.

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
A14	46,8*	13,0	50,6	84,4	100,0					10
A15	6,0*	32,6	60,9	82,6	100,0					10
A78	27,1*	5,9*	43,5	100,0						8
A81	19,7*	15,7	48,3	92,1	100,0					10
A86	12,4*	15,7	67,6	100,0						8
A88	29,9	51,5	83,0	100,0						8
A89	15,6	40,3	71,4	100,0						8
A174	36,1*	5,3*	57,4	100,0						8
A175	28,0*	22,0	52,4	82,9	100,0					10
A176	2,4	2,4*	62,7	100,0						8
A180	7,1*	25,3	52,7	100,0						8
A190	21,5*	20,4	50,0	69,9	100,0					10
A197	4,1	32,5	65,1	100,0						8
A198	12,1*	33,0	59,3	80,2	100,0					10
A223	1,7*	9,3*	61,6	100,0						8
A250	32,6	61,6	74,4	100,0						8
A266	41,2*	6,7*	34,3	79,8	62,9	75,7	87,2	100,0		16
A308	44,8*	6,3*	28,5	50,7	72,3	84,4	90,0	100,0		16
A312	9,5*	49,2	60,1	72,3	81,9	88,0	100,0			14
A325	11,7*	13,2	37,1	55,5	100,0					10
A348	0,5*	31,2	58,1	73,9	79,7	89,9	100,0			14
A391	37,3*	9,8	46,7	65,6	74,5	81,5	91,3	100,0		16
A486	2,0*	42,9	57,8	62,5	72,6	80,9	91,3	100,0		16
A487	5,3	52,2	60,2	69,0	75,8	83,8	100,0			14
A488	25,6*	36,7	39,5	64,0	100,0					10
A505	16,2*	31,0	51,3	71,4	84,2	100,0				12
A614	14,0*	22,7	46,5	59,7	79,3	91,6	100,0			14
A615	26,2*	18,1	54,1	57,1	73,6	83,6	89,8	93,0	100,0	18
A628	14,1*	8,1*	35,7	85,9	67,5	84,2	100,0			14
A630	33,6*	11,1	42,2	67,0	71,4	87,9	100,0			14
A631	40,4*	8,0	34,3	69,5	78,9	84,9	100,0			14
A632	20,8*	4,4*	32,0	56,9	68,7	100,0	86,5	100,0		16
A634	66,5*	15,0*	31,2	57,7	67,0	83,1	88,8	100,0		16
A639	10,1*	19,8	56,5	88,0	100,0					10
A650	15,2*	13,6	62,2	100,0						8
A651	11,5*	24,6	69,9	100,0						8
A652	28,6*	16,7	69,5	100,0						8
A653	27,5*	17,5	58,4	94,5	100,0					10
A654	24,1*	18,2	55,9	100,0						8
A656	19,3	41,1	66,0	80,1	100,0					10
A657	2,8	33,9	74,7	95,4	100,0					10

Tabla 49. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Cepa	Concentración de NaCl (%)								CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16		18
CBS 134.48	38,5	72,9	100,0							6
CBS 558.65	15,5*	29,1	52,5	74,0	82,2	100,0				12
CBS 117.32	23,8*	21,7	48,9	64,5	80,4	100,0				12
IMI 172296	20,7	40,6	89,6	100,0						8
IMI 63764	4,9*	33,7	50,7	65,5	73,6	100,0				12
ATCC 26036	29,3*	16,8	36,0	61,6	78,8	100,0				12
CBS 121.55	21,5	44,5	68,9	100,0						8

Tabla 49 (cont.). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Cepa	Concentración de NaCl (%)								CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16		18
A74	8,9*	8,9*	12,7	44,9	100,0					10
A75	0,0	15,7	14,5	100,0						8
A76	0,0	0,0	21,5	60,5	94,2	95,5	100,0			14
A77	0,0	0,0	11,0	48,8	70,9	100,0				12
A79	13,9*	11,9*	4,6	62,9	85,4	100,0				12
A80	0,0	7,0	35,5	100,0						8
A82	33,3*	33,3*	12,0*	31,0	100,0					10
A83	9,6*	9,6*	7,0	40,4	100,0					10
A84	23,7*	23,7*	1,4	38,8	100,0					10
A85	23,7*	23,7*	3,6*	36,7	73,4	100,0				12
A87	0,0	12,2	59,3	44,1	56,1	71,5	82,1	91,7	100,0	18
A136	0,0	0,0	25,6	100,0						8
A219	21,1*	0,7*	37,3	71,8	100,0					10
A220	19,4*	19,4*	19,4*	15,9*	20,3	50,0	100,0			14
A251	8,6*	8,6*	8,6*	59,7	41,0	80,0	100,0			14
A306	0,0	0,0	3,3	12,7	44,0	56,7	76,2	100,0		16
A307	3,6*	3,6*	3,6*	7,2	46,1	75,7	91,5	100,0		16
A388	29,4*	16,8*	1,6*	4,9	30,4	56,8	87,9	100,0		16
A390	0,0	11,7	27,4	52,1	60,6	100,0				12
A484	0,0	0,0	0,0	41,6	47,0	65,6	79,3	100,0		16
A510	5,0*	5,0*	5,0*	5,0*	25,8	47,2	75,7	100,0		16
A623	2,3*	2,6	17,6	18,9	51,2	67,9	93,1	100,0		16
A624	18,0	26,0	62,4	27,4	100,0					10
A629	0,0	0,0	9,8	30,6	46,1	66,5	82,1	100,0		16
A635	2,1*	2,1*	4,0	28,4	41,7	57,1	80,1	100,0		16
A636	35,6*	31,6*	3,6	55,1	89,4	100,0				12
A638	35,5*	40,6*	13,3	62,6	100,0					10
A643	12,9*	5,1*	20,1	50,0	100,0					10
A644	8,9	13,8	35,2	88,0	100,0					10
A645	19,3*	8,2*	19,2	52,1	91,3	100,0				12
A655	9,6*	4,9*	24,2	66,1	100,0					10
A658	28,3*	28,3*	24,0	59,8	90,6	100,0				12
A659	13,8*	9,7*	19,1	77,0	100,0					10
A660	4,4*	21,5	45,4	82,1	100,0					10

Tabla 50. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo N a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los siete días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro (sigue).

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16	18		
CBS 554.65	5,3*	1,9	29,7	66,9	100,0						10
CBS 118.35	7,0*	7,0*	7,0*	32,9	65,6	81,6	88,1	91,4	100,0		18
CBS 126.49	17,3*	17,3*	53,9	82,8	100,0						10
CBS 139.52	13,1*	13,1*	41,3	98,9	100,0						10
CBS 618.78	5,5	30,8	55,7	100,0							8
ATCC 22343	0,0	4,6	60,3	93,5	100,0						10
IMI 211394	1,0*	1,0*	18,6	48,7	90,9	100,0					12
NRRL 3122	14,7*	26,2	67,0	73,9	100,0						10
NRRL 3112	22,7*	0,5	35,5	100,0							8
607 (JC)	0,0	0,0	0,0	20,4	42,5	70,0	91,1	100,0			16

Tabla 50 (cont.). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo N a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los siete días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro.

Cepa	Concentración de NaCl (%)								CMI	
	2	4	6	8	10	12	14	16		18
A14	25,5*	14,6*	21,9	57,7	100,0					10
A15	25,5*	14,6*	37,5	66,7	100,0					10
A78	25,5*	14,6*	0,7*	100,0						8
A81	0,0	0,0	20,9	65,1	100,0					10
A86	0,0	0,0	34,9	70,9	100,0					10
A88	0,0	28,5	70,3	90,7	100,0					10
A89	5,5	23,3	54,0	83,7	100,0					10
A174	8,9*	8,9*	26,6	100,0						8
A175	16,2*	16,2*	20,9	60,8	100,0					10
A176	0,0	0,0	37,8	100,0						8
A180	0,0	8,7	20,9	100,0						8
A190	0,0	0,0	20,9	49,1	100,0					10
A197	12,1*	4,9*	23,5	89,6	100,0					10
A198	0,0	0,0	36,3	69,5	91,3	100,0				12
A223	0,0	0,0	30,8	100,0						8
A250	2,9	44,5	68,0	100,0	100,0					10
A266	0,0	0,0	0,0	63,5	38,9	64,1	79,4	92,3	100,0	18
A308	10,9*	10,9*	10,9*	9,7	43,3	68,2	84,6	100,0		16
A312	0,0	14,8	26,0	33,5	47,9	65,5	88,2	100,0		16
A325	0,0	0,0	3,8	20,8	100,0					10
A348	0,0	0,0	22,2	45,2	53,7	74,8	93,5	100,0		16
A391	1,5*	1,5*	2,9	40,3	55,9	73,8	89,2	95,7	100,0	18
A486	0,0	0,0	20,8	34,3	57,2	76,1	81,3	100,0		16
A487	0,0	9,3	15,1	35,0	50,6	64,7	80,7	100,0		16
A488	17,1*	1,4*	2,0	27,3	86,7	100,0				12
A505	15,1*	9,5	34,9	58,1	80,3	100,0				12
A614	0,0	0,0	13,3	19,0	49,0	76,2	87,5	100,0		16
A615	0,0	0,0	27,8	20,9	52,1	72,4	89,8	92,3	100,0	18
A628	2,2*	2,2*	20,4	60,3	34,2	57,9	85,4	100,0		16
A630	14,9*	14,9*	11,1*	35,6	36,3	62,2	86,9	100,0		16
A631	17,5*	17,5*	17,5*	34,8	49,1	67,2	85,7	100,0		16
A632	3,2*	6,3*	2,8*	17,7	42,8	78,9	88,2	100,0		16
A634	15,4*	15,4*	8,5*	20,5	28,0	53,3	74,4	100,0		16
A639	62,2*	27,7*	9,5	66,3	94,9	100,0				12
A650	42,1*	13,2*	17,2	93,1	100,0					10
A651	14,0*	14,0*	18,4	100,0						8
A652	36,3*	36,3*	13,0	69,8	100,0					10
A653	31,9*	31,9*	0,4	56,0	100,0					10
A654	35,1*	35,1*	1,8*	93,3	100,0					10
A656	9,2*	10,5	37,3	58,7	100,0					10
A657	8,4*	8,4*	29,8	57,0	100,0					10

Tabla 51. Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los siete días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI). *: Porcentaje de incremento de diámetro (sigue).

Cepa	Concentración de NaCl (%)									CMI
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	
CBS 134.48	9,0	40,4	100,0							6
CBS 558.65	0,0	0,0	10,0	42,1	62,5	90,9	100,0			14
CBS 117.32	1,2*	1,2*	19,4	49,1	70,0	92,1	100,0			14
IMI 172296	0,0	8,4	64,5	100,0						8
IMI 63764	1,2*	16,6	35,7	53,3	63,5	87,6	100,0			14
ATCC 26036	5,2*	5,2*	2,6*	24,7	50,4	81,3	100,0			14
CBS 121.55	0,0	0,0	19,2	77,0	94,1	100,0				12

Tabla 51 (cont.). Porcentaje de reducción del diámetro de cada una de las cepas del grupo T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los siete días de incubación a 35°C, y las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).*: Porcentaje de incremento de diámetro.

		Concentración de sal (%)																										
		2			4			6			8			10			12			14			16			18		
		3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d			
Total		29,2*	38,9*	17,1	25,6*	51,6	11,6	71,3	46,0	87,4	73,6	87,1	85,8	91,9	90,9	100,0	97,4	-	100,0									
Tipo N		17,7*	32,2*	23,1	19,8*	54,9	13,1	73,2	47,1	85,8	69,1	90,4	85,2	92,9	92,1	100,0	96,8	-	100,0									
Tipo T		39,7*	45,0*	11,6	30,9*	48,6	10,3	69,4	45,0	88,8	77,7	82,4	86,4	91,1	89,0	100,0	97,9	-	100,0									

Tabla 52. Valores medios de los porcentajes de reducción del diámetro de todas las cepas ensayadas y de las agrupadas los tipos N y T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los tres y siete días de incubación a 25°C.*: Porcentaje de incremento de diámetro

		Concentración de sal (%)																										
		2			4			6			8			10			12			14			16			18		
		3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d	3d	7d			
Total		10,3*	9,1*	25,4	2,7*	56,8	20,5	79,6	56,9	85,8	76,4	87,6	78,9	94,4	88,2	99,5	98,5	100,0	100,0									
N		8,4*	9,4*	28,7	3,6*	58,0	19,6	77,6	53,5	86,9	77,0	85,6	79,2	94,2	87,7	100,0	98,5	-	100,0									
T		12,1*	8,8*	22,3	1,9*	55,6	21,5	81,6	60,0	84,7	75,8	89,4	78,6	94,6	88,6	99,0	98,6	100,0	100,0									

Tabla 53. Valores medios de los porcentajes de reducción del diámetro de todas las cepas ensayadas y de las agrupadas los tipos N y T a las distintas concentraciones de NaCl ensayadas a los 3 y 7 días de incubación a 35°C.*: Porcentaje de incremento de diámetro

		CMI			MG
		Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	
Total cepas	3 días	8-16	10	14	11,9
	7 días	10-18	12	16	13,6
Tipo N	3 días	8-16	10	14	12,9
	7 días	12-18	12	16	14,3
Tipo T	3 días	8-16	10	14	11,8
	7 días	10-18	12	16	13,1

Tabla 54. Rango de la concentración mínima inhibitoria de NaCl (CMI), CMI₅₀ y CMI₉₀ y el valor de la media geométrica (MG) de las CMI determinadas en el total de las cepas estudiadas y en los dos grupos N y T, obtenidas a 25°C de incubación.

		CMI			MG
		Rango	CMI ₅₀	CMI ₉₀	
Total cepas	3 días	6-18	10	14	10,7
	7 días	6-18	10	16	11,6
Tipo N	3 días	8-16	8	14	10,9
	7 días	8-18	10	16	11,7
Tipo T	3 días	6-18	8	14	10,6
	7 días	6-18	10	16	11,6

Tabla 55. Rango de la concentración mínima inhibitoria de NaCl (CMI), CMI₅₀ y CMI₉₀ y el valor de la media geométrica (MG) de las CMI determinadas en el total de las cepas estudiadas y en los dos grupos N y T, obtenidas a 35°C de incubación.

5.2.4.1. Resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a 25°C y 35°C.

Los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a los siete días de incubación a 25°C y 35°C se resumen en las Tablas 56 a 59.

En las Tablas 50 y 57 se detallan las características macroscópicas y microscópicas de cada una de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a los siete días de incubación a las temperaturas de 25 y 35°C, respectivamente.

En las Tablas 58 y 59 se detallan las características macroscópicas y microscópicas de cada una de las cepas estudiadas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a los siete días de incubación a las temperaturas de 25 y 35°C, respectivamente.

Las coloraciones de las colonias o de los pigmentos difusibles se indican según las siguientes abreviaciones (ver Anexo 2):

A: amarillo	MC: Marrón claro	V: verde
B: blanco	MO: marrón oscuro	VC: verde claro
BE: beige	N: negro	VO: verde oscuro
M: Marrón	NA: naranja	

En muchos casos, la coloración tanto del anverso como del reverso no fue uniforme. En estos casos, la variedad de color se expresa mediante las abreviaciones de cada uno de los colores que presentó la colonia. El orden de las coloraciones se corresponde con la importancia que éstos presentaban en la colonia.

La ausencia de pigmento difusible (P) en el medio de cultivo se expresa con el signo -, y la presencia se expresa con la descripción del color de dicho pigmento.

La textura de las colonias (T) se indica de la siguiente forma:

LA: lanosa	F: flocosa	AT: aterciopelada
------------	------------	-------------------

En el caso de que la colonia presentara más de un tipo de textura, la textura o texturas no predominantes se indican entre paréntesis.

La presencia de micelio aéreo blanco (Aer) y de exudado (E) se presenta de la siguiente forma:

: ausencia	(+): poca cantidad
+ :presencia	++ : abundancia

La ausencia de surcos en la colonia se expresa con el signo -, y la presencia se expresa con la descripción del tipo de surcos presentados, surcos de tipo radial (R), de tipo concéntrico (C) o

ambos. En el caso de que la colonia presentase un aspecto cerebriforme, se expresa con las iniciales CE.

El aspecto microscópico (Micro) se indicó de la siguiente forma:

NO: normal

ME: micelio estéril

En el caso de que una característica microscópica anormal (CA) destacase en la preparación esta se indicó de la siguiente forma:

FA: fiálides anormales

MA: métulas anormales

HR: hifas retorcidas

VA: vesículas sin métulas ni fiálides.

HE: aparición de cabezas conidiales secundarias sobre las vesículas

En varios casos no se presentó ninguna característica destacable. Estos casos se indican mediante el signo: -. En algún caso se presentó más de una alteración morfológica, expresándose éstas mediante las abreviaciones correspondientes, ordenadas según la importancia que presentaron en la preparación microscópica realizada a partir de la colonia.

Cepa	Características Observadas								
	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
A74	B	BA	AT	-	-	-	-	ME	-
A75	B	B	AT	-	-	-	-	NO	VA
A76	A	A	AT	+	RC	A	-	ME	-
A77	BA	BA	AT	+	RC	-	-	ME	-
A79	BA	A	AT	+	RC	A	-	ME	-
A80	B	BA	AT	+	-	-	-	ME	-
A82	B	B	AT	(+)	R	A	-	ME	-
A83	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A84	BA	ANA	AT	(+)	-	ANA	-	ME	-
A85	B	BA	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A87	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A136	B	B	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A219	B	B	AT	(+)	RC	-	-	ME	-
A220	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A251	B	BA	AT	(+)	C	A	-	ME	-
A306	MA	BA	AT	+	RC	ANA	-	NO	-
A307	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A388	B BE	MC BE	AT	-	-	-	-	ME	-
A390	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A484	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A510	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A623	B	B	AT	+	RC	-	-	ME	-
A624	B	B	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A629	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A635	A	AB	AT	(+)	R	A	-	NO	VA
A636	A	BA	AT	-	-	A	-	NO	-
A638	A	A	AT	++	-	A	-	NO	VA
A643	A	AB	AT	-	-	A	-	ME	-
A644	BA	BA	AT	-	RC	-	-	ME	-
A645	AB	BA	AT	(+)	RC	ANA	-	ME	-
A655	A	BA	AT	+	-	ANA	-	NO	MA
A658	B	B	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A659	MC B	B	LA	++	-	-	-	NO	-
A660	B	B	AT	(+)	-	-	-	ME	-
CBS 554.65	B	BA	AT	-	-	ANA	-	ME	-
CBS 118.35	ANA	NA	AT	-	RC	NA	-	ME	-
CBS 126.49	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 139.52	BA	A	F	(+)	-	ANA	-	ME	-
CBS 618.78	BA	BA	AT	-	-	A	-	NO	-
ATCC 22343	B	B	AT	+	-	-	-	ME	-
IMI 211394	A	BA	AT	(+)	-	A	-	ME	-
NRRL 3122	A	A	AT	-	CE	-	-	ME	-
NRRL 3112	A	A	AT	-	R	ANA	-	ME	-
607 (JC)	B	B	AT	-	-	-	-	ME	HR

Tabla 56. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a 25°C a los siete días de incubación. T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

Cepa	Características Observadas								
	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
A74	M VC	A	F	+	R	-	-	NO	-
A75	N MO VC	A MC	LA	++	R	-	-	NO	-
A76	A	A	AT	(+)	R C	A	-	NO	-
A77	B A	BE	AT	++	-	-	-	ME	-
A79	B A	A NA	AT	+	R C	A NA	-	ME	-
A80	VC M	A NA	LA	+	R	NA A	-	NO	-
A82	MO VC	B A	AT	++	R	A	-	NO	-
A83	VC B	B A	LA	+	R	-	-	NO	VA
A84	VM	A NA	F	++	R	A NA	-	NO	-
A85	B	B A	AT	(+)	R	-	-	ME	-
A87	B A	B A	AT	-	-	-	-	ME	-
A136	B A	VM	LA	++	R	-	-	NO	-
A219	B	B A	AT	+	R	-	-	NO	VA
A220	A B MC	B A	LA	-	R	-	-	NO	-
A251	A	A	AT	-	R C	A	-	ME	-
A306	M A NA	B A	AT	-	R	A NA	-	NO	-
A307	A	A	AT	-	R C	A	-	ME	-
A388	B	A	AT	-	-	-	-	ME	-
A390	M	B A	AT	+	R	-	-	NO	-
A484	A	B A	AT	+	-	-	-	ME	-
A510	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A623	B A	A	AT	+	R	-	-	NO	VA
A624	M MC B	B MC	AT	-	R	-	-	NO	-
A629	MC	NA A	LA	-	R	A NA	-	NO	-
A635	M MO	A B	F	-	R	A	-	NO	-
A636	A	A	AT	++	R	A	-	NO	-
A638	A MC	A	LA	++	R	A	-	NO	-
A643	A MC	A B	LA	+	R	A	-	NO	-
A644	A	A	F	(+)	R C	A	-	ME	-
A645	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A655	MC NA	NA A	F	+	R	NA A	-	NO	-
A658	A	A	AT	(+)	-	A	-	NO	-
A659	MC	B A	LA	+	R	-	-	NO	-
A660	A MC	A NA	AT	(+)	R	A NA	-	NO	-
CBS 554.65	MC A NA	A NA	LA	++	-	A NA	-	NO	MA
CBS 118.35	A NA	A NA	AT	-	-	NA	-	ME	-
CBS 126.49	A	A NA	AT	(+)	-	A NA	-	ME	-
CBS 139.52	MC VC NA	NA	F (LA)	+	-	A NA	-	NO	VA
CBS 618.78	MC NA	NA	AT (F)	-	-	NA	-	NO	CA
ATCC 22343	B	B	AT	-	-	-	-	NO	VA
IMI 211394	A	A	AT	-	R	A	-	ME	-
NRRL 3122	A B	A	AT	-	R C	A	-	ME	-
NRRL 3112	G A NA	NA	AT (F)	-	R C	NA	-	NO	-
607 (JC)	B A	A	AT	-	R C	-	-	NO	VA

Tabla 57. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo N desarrolladas a 35°C a los siete días de incubación. T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

Cepa	Características Observadas								
	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
A14	VC A B	B	AT (F)	+	RC	-	-	NO	-
A15	B	B	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A78	B	B	AT	-	-	-	-	NO	HR
A81	B	BA	AT	-	-	-	-		MA
A86	BA	A	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A88	B	BA	AT	+	RC	-	-	ME	
A89	BA	BE	AT	+	RC	-	-		
A174	B	B	AT	+	RC	-	-	NO	MA VA
A175	V G B A	B	AT	+	RC	-	-	NO	-
A176	MC A	B	AT	++	-	-	-	NO	-
A180	MC A B	A B	AT	++	R	-	-	NO	MA
A190	BA	A	AT	(+)	RC	-	-	NO	-
A197	BA	A	AT	+	R	-	-	NO	HR VA
A198	VC B A	BE	AT (F)	(+)	-	-	-	NO	-
A223	B	A	AT	(+)	R	-	-	ME	-
A250	BA	A	AT	(+)	R	-	-	ME	-
A266	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A308	B	B	AT (F)	-	RC	-	-	ME	-
A312	B	B	AT	+	-	-	-	ME	-
A325	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A348	B	B A NA	AT	-	-	A NA	-	ME	-
A391	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A486	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A487	B	NA	AT (F)	-	RC	A NA	-	ME	-
A488	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A505	MC NA	A	F	(+)	R	NA	-	NO	VA
A614	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A615	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A628	MC	B	LA	+	-	-	-	NO	VA
A630	B	BA	AT	(+)	-	-	-	ME	-
A631	B	B	AT	-	R	-	-	ME	-
A632	B	BA	LA	-	R	-	-	ME	-
A634	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A639	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
A650	MC	BA	LA	++	-	A	-	ME	-
A651	MC B	BA	LA	++	-	-	-	NO	MA
A652	VC N	B	LA	++	-	-	-	NO	-
A653	MC B	BA	LA	++	-	-	-	NO	VA MA FA
A654	MC B	BA	LA	++	-	-	-	ME	-
A656	VC B	A NA	LA	-	-	A NA	-	NO	MA
A657	MC	BA	LA	++	-	-	-	NO	MA

Tabla 58. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a 25°C a los siete días de incubación. T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales (sigue).

Cepa	Características Observadas								
	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
CBS 134.48	B	B A	LA	-	-	-	-	ME	-
CBS 558.65	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 117.32	B	B	AT	-	-	-	-		
IMI 172296	B	B	LA	++	-	-	-	NO	VA
IMI 63764	B	B A	AT	-	R	-	-	ME	-
ATCC 26036	B	B	AT	-	-	-	-	ME	-
CBS 121.55	A	A B	AT (F)	+	R C	A	-	NO	-

Tabla 58 (cont). Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a 25°C a los siete días de incubación. T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

Cepa	Características Observadas								
	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
A14	VC A B	B	F	+	R C	-	-	NO	-
A15	VC N	BE	F	(+)	R	-	-	NO	-
A78	VC N A	NA	F	-	R	-	-	NO	HR
A81	VC N	NA A	AT	+	R	-	-	NO	VA HR
A86	VM N	NA	AT	++	-	-	-	NO	-
A88	B	B	LA	-	R	-	-	NO	HE
A89	B MC	BE	AT	+	R C	-	-	NO	VA MA
A174	B A MC	B	AT	+	R	-	-	NO	-
A175	VM	B	F	+	R	-	-	NO	-
A176	VC N	NA	LA	+	R	-	-	NO	HR
A180	VC A	NA	LA	++	R	-	-	NO	-
A190	VM N	NA	F	(+)	R	-	-	NO	HR
A197	B A	A	AT	+	R	-	-	NO	HR VA
A198	A MC	A	AT	++	R	-	-	NO	VA
A223	VC N	NA A	F (LA)	++	R	-	-	NO	-
A250	B MC	B	LA	+	R	-	-	NO	VA
A266	A	A	AT	-	-	A	-	ME	-
A308	B MC	B MC	AT (F)	-	R C	-	-	NO	MA
A312	A MO N	NA	F	-	R C	A NA	-	NO	VA
A325	M	A NA	LA	-	R	A NA	-	ME	-
A348	B	B A	AT	-	-	A NA	-	ME	-
A391	MC BE	MC BE	AT	+	R	-	-	NO	-
A486	A	B A	AT	-	-	-	-	ME	-
A487	A	A	AT	-	R C	A NA	-	NO	VA
A488	B	B MC	AT	-	R	-	-	NO	-
A505	VM NA	NA	AT (F)	(+)	R	NA	-	NO	-
A614	B MC	B MC	AT (F)	-	R C	-	-	ME	-
A615	B	B	AT	-	R C	-	-	ME	-
A628	MC	B MC	LA	+	R C	-	-	NO	VA
A630	B MC	B A	AT	+	R C	-	-	NO	-
A631	A NA	A NA	AT	-	R	NA	-	ME	-
A632	B	B A	AT	-	-	-	-	NO	VA
A634	VC MC	B VC	F	-	R	-	-	NO	-
A639	MC B	B A	F (LA)	-	R	-	-	NO	-
A650	B	B	AT	(+)	-	-	-	NO	MA FA
A651	MC	B MC	LA	++	-	-	-	NO	-
A652	VC	B A	LA	+	-	-	-	NO	-
A653	VC B	B A	LA	+	-	-	-	NO	-
A654	B	B	AT	(+)	-	-	-	NO	-
A656	VC	NA	F	+	R	NA	-	NO	VA
A657	VC	B A	LA	++	R	-	-	NO	HR MA

Tabla 59. Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a 35°C a los siete días de incubación. T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales (sigue).

Cepa	Características Observadas								
	Anverso	Reverso	T	Aer	Surcos	P	E	Micro	CA
CBS 134.48	B MC	B NA	LA	-	-	NA	-	NO	-
CBS 558.65	B	B	AT	-	R C	-	-	ME	-
CBS 117.32	B	B	AT	-	R	-	-		
IMI 172296	B A MC	B	LA	++	-	-	-	NO	-
IMI 63764	B	A	AT	-	R	-	-	ME	-
ATCC 26036	MC	B	F	-	C	-	-	NO	-
CBS 121.55	A MC	A NA	AT (F)	(+)	R	A NA	-	NO	VA

Tabla 59 (cont). Características macroscópicas y microscópicas observadas en cada una de las cepas con un patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA tipo T desarrolladas a 35°C a los siete días de incubación. T: textura, Aer: micelio aéreo, P: pigmento difusible, E: exudado, Micro: aspecto microscópico de la colonia, CA: Características microscópicas anormales.

5.2.5. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A.

La producción de OA fue detectada mediante TLC en seis de las 92 cepas del agregado *A. niger* estudiadas. En todos los casos la producción de OA se detectó a partir de los extractos de cloroformo-ácido fórmico de los bocados practicados en las colonias desarrolladas en los medios CYA y agar YES.

La producción de OA fue confirmada mediante HPLC. Todas las cepas ocratoxigénicas detectadas mediante TLC fueron detectadas mediante HPLC. El nivel de OA producida se estimó a partir de los cultivos de las cepas ocratoxigénicas obtenidos en caldo YES. Las concentraciones obtenidas en cada una de las cepas están expresadas en la Tabla 60.

Cepa	OA (ng/ml)
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> A75 ^a	486,7
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> A136 ^a	1124,3
<i>A. niger</i> var. <i>niger</i> A220	963,0
<i>A. foetidus</i> CBS 618.78 ^b	146,7
<i>A. awamori</i> NRRL 3112 ^b	30,9
<i>A. usamii</i> CBS 139.52	26,1

^a Cepa descrita como ocratoxigénica por Abarca *et al.* (1994).

^b Cepa descrita como ocratoxigénica por Téren *et al.* (1996).

Tabla 60. Concentración de OA determinada mediante HPLC en los cultivos de caldo YES de las cepas productoras de OA estudiadas.

En la Figura 22 se muestra el cromatograma en el que se puede observar la OA detectada en el extracto realizado a partir de los bocados de agar de un cultivo de una cepa ocratoxigénica.

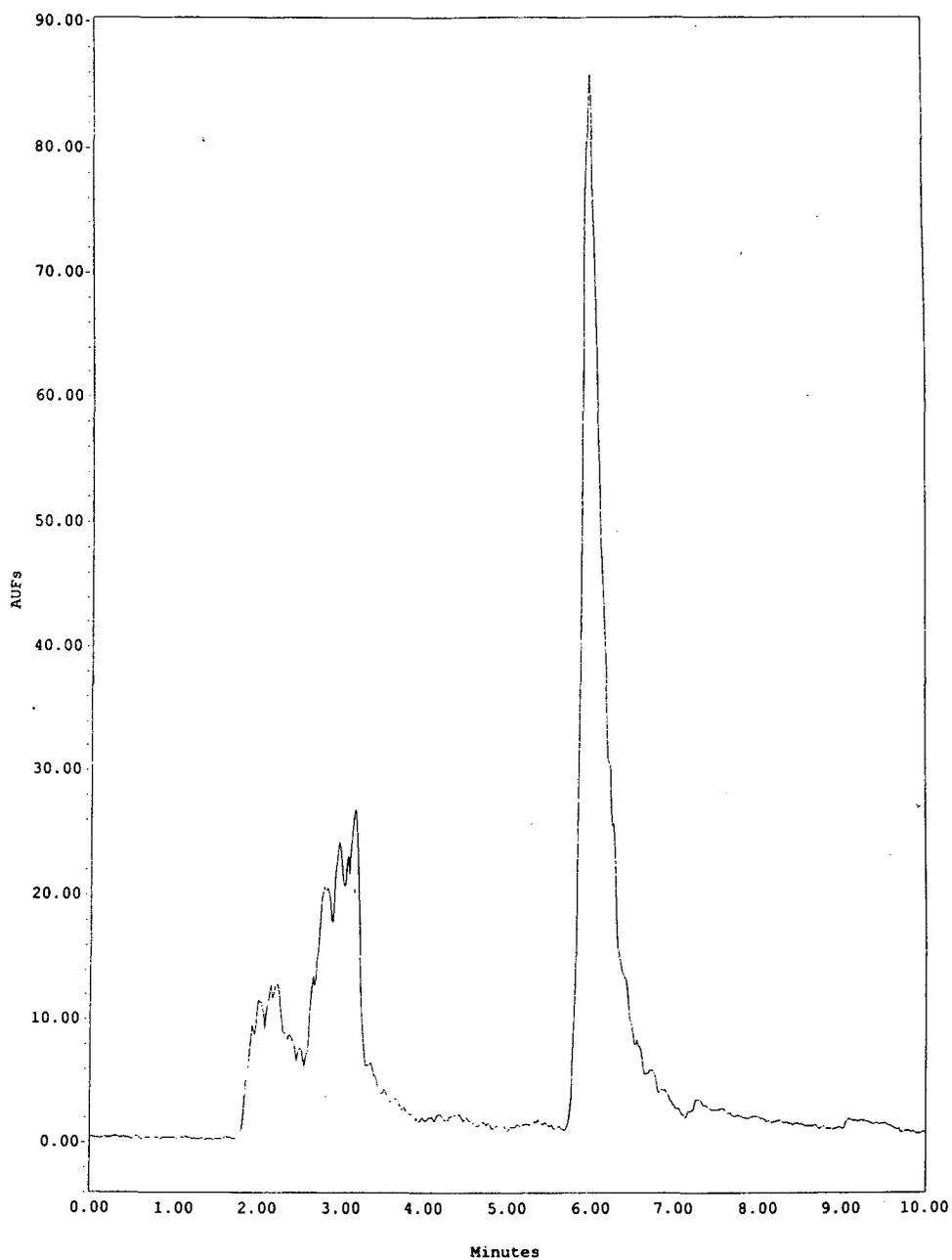


Figura 22. Cromatograma (HPLC) del extracto de los bocados de agar obtenidos a partir del cultivo en medio YES de la cepa A136.

DISCUSIÓN

6.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN MUESTRAS DE PIENSOS Y MATERIAS PRIMAS.

En el total de las muestras estudiadas en la presente memoria, los recuentos fúngicos totales oscilaron entre 30 y $5,3 \times 10^6$ UFC/g, con un recuento total medio de $1,4 \times 10^5$ UFC/g. Los recuentos totales medios más altos se obtuvieron en las muestras de cereales ($2,5 \times 10^5$ UFC/g) mientras que los más bajos se presentaron en las muestras de leguminosas ($4,9 \times 10^4$). Los recuentos totales oscilaron entre 230 y $4,3 \times 10^6$ UFC/g en las muestras de cereales y entre 9×10^2 y $1,1 \times 10^6$ UFC/g en las de leguminosas. Estos resultados fueron similares a los presentados por otros investigadores (40, 57). En las muestras de piensos analizadas, los recuentos totales oscilaron entre 30 y $5,3 \times 10^6$ UFC/g, presentado un recuento total medio de $7,9 \times 10^4$ UFC/g. Estos rangos coincidieron con los presentados en otros estudios (2, 20, 27, 57, 60, 61, 167, 242, 247, 259). El recuento fúngico total es un buen indicador de la calidad de piensos y materias primas. Este recuento, según Chelkowski (1991), no debería superar las 1×10^5 UFC/g. Los recuentos medios obtenidos en los distintos tipos de muestras ensayadas están rondando o, en el caso de los cereales, rebasando este límite máximo.

Con respecto al recuento parcial del género *Aspergillus* y sus teleomorfos, los resultados obtenidos en la presente memoria oscilaron entre la ausencia y $5,3 \times 10^6$ UFC/g. El recuento parcial medio de *Aspergillus* fue de $2,2 \times 10^4$ UFC/g, lo que representó un 15,6% del recuento fúngico total medio. Analizando los resultados según el tipo de muestra, en cereales los recuentos parciales de *Aspergillus* oscilaron entre la ausencia y $1,4 \times 10^5$ UFC/g, con un recuento parcial medio de $4,2 \times 10^3$ UFC/g. En estas muestras, *Aspergillus* representó un 1,7% de los recuentos fúngicos totales obtenidos, coincidiendo con los resultados presentados por otros autores (40). Sin embargo, otros estudios realizados en países con un clima más cálido y seco que el nuestro, como Egipto, presentaron resultados muy superiores, de hasta un 46,8% (4). En el ensayo realizado con las muestras de cereales, las especies de *Aspergillus* con mayores recuentos parciales fueron *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus*. Los recuentos parciales de *Aspergillus* observados en las muestras de leguminosas oscilaron entre la ausencia y $2,4 \times 10^4$ UFC/g. El recuento parcial medio, similar al obtenido en las muestras de cereales, fue de 3×10^3 UFC/g y supuso un 6,1% del recuento fúngico total medio. Los recuentos parciales más altos fueron presentados por especies de *Eurotium* y *A. flavus*. En el caso de las muestras de pienso, los recuentos parciales de *Aspergillus* variaron entre la ausencia y $5,3 \times 10^6$ UFC/g, datos que son

similares a los obtenidos por Magnoli *et al.* (1998) y superiores a los presentados por otros investigadores (46). El recuento parcial medio del género fue de $4,1 \times 10^4$ UFC/g, lo que representó un 52,6% del recuento fúngico total medio, un resultado similar al obtenido en otros estudios (27). Este elevado porcentaje se debió, prácticamente, a los altos recuentos parciales presentados por *E. chevalieri*, que representaron un 88,4% del recuento parcial de *Aspergillus*.

El género *Aspergillus*, incluyendo sus teleomorfos *Eurotium* y *Emericella*, se aisló en un 77,7% del total de las muestras estudiadas. La mayor incidencia de *Aspergillus*, con una frecuencia de aislamiento de un 94,4% y un 89,8%, se observó en las muestras de leguminosas y piensos, respectivamente. La incidencia de *Aspergillus* obtenida en las muestras de leguminosas coincidió con las publicadas en otros estudios (40, 187). Otros autores presentaron incidencias de *Aspergillus* inferiores, del orden del 57% (168). En el caso de las muestras de piensos otros investigadores obtuvieron porcentajes similares (2, 27, 61, 247) o inferiores, en un rango del 52-58% (40, 46, 60). La incidencia más baja de *Aspergillus* se obtuvo en las muestras de cereales, con un 57,3%, lo que coincidió con los resultados obtenidos en otros estudios (4, 14, 37, 41, 168, 243, 290).

En la presente memoria se han identificado 14 especies distintas de *Aspergillus* y sus teleomorfos. Las especies con mayor frecuencia de aislamiento fueron *A. flavus* (43%), *E. chevalieri* (36,7%), *E. amstelodami* (36,3%) y *E. rubrum* (35,7%). Con una frecuencia menor se aisló *A. candidus* (27%), *A. fumigatus* (24,7%) y *A. niger* (23%). El resto de especies aisladas fueron *A. versicolor* (11,3%), *A. terreus* (8,7%), *A. ochraceus* (7,3%), *E. nidulans* (4%), *A. tamaritii* (0,7%), *A. clavatus* (0,3%) y *A. restrictus* (0,3%). La presencia de todas estas especies en los substratos estudiados en la presente memoria ha sido descrita en la literatura consultada (68, 142, 216, 227). *Aspergillus flavus* fue la especie más aislada en cereales y leguminosas, a semejanza de los resultados presentados en otros estudios (41, 216, 218, 243). Coincidiendo con otros investigadores (2, 27, 55, 171, 247, 259, 270), las especies del género *Eurotium* fueron las más aisladas en las muestras de piensos (Tabla 16, Figuras 3 y 4).

Las especies del género *Aspergillus* y sobretodo las de su teleomorfo *Eurotium* forman parte de la flora fúngica que se desarrolla típicamente durante el almacenamiento de substratos con una baja a_w , tales como piensos o granos. Las especies más aisladas en la presente memoria han sido citadas como xerófilas: *Eurotium spp.* como extremadamente xerófilos; *A. flavus* y *A. candidus* como moderadamente xerófilos y *A. fumigatus* como ligeramente xerófilo (161). Cabe

destacar que los piensos, además de presentar una baja a_w , sufren un tratamiento térmico durante su fabricación. Las ascosporas de *Eurotium*, particularmente las de *E. chevalieri*, son muy resistentes a elevadas temperaturas. Estos hechos explicarían la elevada presencia de *Eurotium spp.* en las muestras de pienso estudiadas. Otras especies de *Aspergillus* que presentaron una importante incidencia en piensos en la presente memoria, como *A. flavus*, *A. candidus*, *A. niger* y *A. fumigatus* presentan una cierta resistencia a temperaturas altas (68, 161). La especie más aislada en cereales y leguminosas, *A. flavus*, fue considerada tradicionalmente como un típico integrante de la micoflora de almacenamiento. Sin embargo, posteriormente se comprobó su capacidad de desarrollarse antes de la cosecha en diversos substratos, tales como cacahuetes, maíz, pistachos, soja, sorgo y trigo, entre otros. (216). Este hecho explicaría su elevada incidencia en las muestras estudiadas.

Entre las especies de *Aspergillus* aisladas en la presente memoria consistentemente descritas como ocratoxigénicas, la incidencia de *A. niger* (23%) en el total de las muestras estudiadas fue superior a la presentada por *A. ochraceus* (7,3%). Al analizar la incidencia de *A. ochraceus* y *A. niger* según las muestras analizadas, *A. niger* se aisló en un 15,4% de las muestras de cereales estudiadas, frente al 4,3% de incidencia de *A. ochraceus* en el mismo substrato. En las muestras de pienso, *A. niger* se presentó en un 27,9% y *A. ochraceus* solamente en un 6,1%. Coincidiendo con los resultados presentados en la presente memoria, la incidencia de *A. niger* es mayor a la de *A. ochraceus* en la bibliografía consultada en muestras de cereales (4, 9, 14, 100, 171, 195, 216-218, 243, 318) y pienso (27, 55, 61, 247). Con respecto a las muestras de leguminosas, las frecuencias de aislamiento fueron parecidas mientras que, en la bibliografía consultada (187, 218), la incidencia de *A. ochraceus* fue menor que la de *A. niger*. Los recuentos parciales medios de estas dos especies fueron similares.

6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL AGREGADO

A. niger.

6.2.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio molecular de las cepas del agregado *A. niger*.

6.2.1.1. Discusión de los resultados correspondientes a la secuenciación del DNA que codifica el gen 5.8S del RNA ribosómico y los ITS1 y 2.

Las secuencias de las regiones que no codifican son de uso frecuente en estudios taxonómicos en los que se trata de diferenciar entre taxones a diferentes niveles (183).

Las secuencias del ITS1, el gen 5.8S y el ITS2 de las cepas *A. niger* CBS 554.65 y *A. tubingensis* CBS 134.48 son muy similares. Entre las dos secuencias existen siete diferencias, de las que dos son deleciones (una en cada secuencia) y cinco son transiciones. Entre las secuencias del ITS1 hay sólo cinco diferencias (una deleción y cuatro transiciones) y entre las del ITS2, dos (una deleción y una transición). En base a los resultados obtenidos, cinco transiciones y dos deleciones puntuales, podemos concluir que las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991) están muy próximas en términos filogenéticos.

La división del agregado *A. niger* en dos especies, *A. niger* y *A. tubingensis*, se propuso (KvS, 1991) basándose en los distintos patrones de RFLP del rDNA obtenidos en cepas de colección y confirmada mediante análisis de RFLP del rDNA (178, 206, 309, 310, 315) y del mtDNA (309, 310). La diferencia observada en la secuencia del ITS1 (posición 75) permitió establecer un sistema de discriminación entre *A. niger* y *A. tubingensis* basándonos en el análisis de RFLP del 5.8S-ITS rDNA. O'Connell *et al.* (1990) estudiaron los mapas de restricción de los genes del rDNA de una cepa de *A. nidulans* y una de *A. niger*, concluyendo que las dianas de una serie de enzimas de restricción estaban muy conservadas. Basándose en dicho estudio (198) Magnégneau *et al.* (1993) y Visser *et al.* (1996) especularon con la posibilidad de que las diferencias entre las dos especies propuestas por Kusters van Someren (1991) se encontraban localizadas a nivel de las regiones no codificantes

del rDNA. Los resultados obtenidos en la presente memoria demuestran que así es, ya que la diferencia entre los grupos N y T se halló en la secuencia del ITS1.

Por otra parte, la elevada semejanza entre las dos secuencias también podría indicar que las dos cepas formasen parte de una misma especie. No obstante, para confirmar esta hipótesis, deberían realizarse otras pruebas, tales como análisis cladísticos, secuenciación de otras regiones del rDNA, etc. Las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991) fueron descritas como morfológicamente iguales. Es más, las cepas tipo (*A. niger* CBS 554.64 y *A. tubingensis* CBS 134.48) de dichas especies fueron incluidas en un mismo taxón (*A. niger* var. *niger*) en el estudio en el que Al Musallam (1980) definió, basándose en criterios morfológicos, el agregado *A. niger*. Hasta ahora, en los estudios realizados con cepas de dicho agregado sólo se han descrito diferencias a nivel molecular, mediante análisis de RFLP del rDNA y del mtDNA (158, 178, 206, 309, 310, 315).

6.2.1.2. Discusión de los resultados correspondientes a la digestión enzimática de los fragmentos del 5.8S-ITS rDNA mediante PCR.

Los dos patrones obtenidos, N y T, han sido definidos a partir de los RFLP generados por la digestión con *RsaI* de los fragmentos amplificados mediante PCR del 5.8S-ITS rDNA de las cepas *A. niger* CBS 554.65 y *A. tubingensis* CBS 134.48.

Para comprobar el la validez del método se incluyeron en el estudio algunas cepas de colección que habían sido clasificadas como *A. niger* o *A. tubingensis* en estudios moleculares del agregado *A. niger* realizados por otros investigadores (158, 310). También se incluyó una cepa aislada de suelo del Brasil que presentó un patrón de RFLP distinto de los de *A. niger* y *A. tubingensis* denominada "*A. brasiliensis*" por parte de los autores que la describen (309).

Todas las cepas que previamente (158, 310) mostraron patrones de rDNA tipo I o I' o patrones de mtDNA tipo 1a, 1b o 1c (propios de *A. niger*) han sido clasificadas en el presente estudio como tipo N y las cepas que mostraron unos patrones de rDNA tipo II o II' o un patrón de mtDNA tipo 2a (propios de *A. tubingensis*) han sido clasificadas en el presente estudio como tipo T (Tabla 61). La cepa de "*A. brasiliensis*", descrita por Varga *et al.* (1994) como una posible nueva especie o subespecie dentro

del agregado *A. niger*, basándose en sus patrones de rDNA tipo III y mtDNA tipo 3, fue descrita como más próxima a *A. niger* que a *A. tubingensis*. Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con esta afirmación ya que la cepa de "*A. brasiliensis*" tiene un patrón N (Tabla 61).

Cepa	patrón de RFLP de rDNA ^a	patrón de RFLP de mtDNA ^b	patrón de RFLP de ITS-5.8S rDNA
CBS 554.65	I	1a	N
CBS 118.35	I	1b	N
CBS 126.49	I'	1a	N
CBS 139.52	I'	1a	N
ATCC 22343	I'	1a	N
IMI 211394	I	1c	N
NRRL 3122	I	1a	N
CBS 618.78	I'	1a	N
CBS 134.48	II	-	T
CBS 558.65	II	2a	T
CBS 117.32	II	2a	T
IMI 172296	II	2a	T
IMI 63764	II	2a	T
ATCC 26036	II	2a	T
607 (J. Varga)	III	3	N

^aLos distintos patrones de RFLP de rDNA han sido obtenidos por Kusters van Someren *et al.* (1991), y Varga *et al.* (1993 y 1994).

^bLos distintos patrones de RFLP de mtDNA han sido obtenidos por Varga *et al.* (1993 y 1994).

Tabla 61. Patrones de RFLP obtenidos en distintos estudios con cepas de colección del agregado *A. niger*.

En el ensayo realizado con las cepas de colección previamente estudiadas por otros investigadores los dos patrones de RFLP de ITS-5.8S rDNA fueron muy homogéneos. Con el fin de confirmar la validez de la técnica se amplió a 92 el número de cepas ensayadas. En ninguna de las 92 cepas estudiadas se observó ningún tipo de variación dentro de los patrones N y T. Esta homogeneidad dentro de los patrones de restricción no se observó en los patrones obtenidos mediante otros métodos de RFLP descritos para clasificar especies en el agregado *A. niger* (178, 309, 310). Utilizando estos métodos se observó una alta variabilidad dentro de los patrones de RFLP obtenidos del análisis del rDNA (178) y del mtDNA (309, 310) o mediante el análisis de RAPD (178). En estos estudios se mostraron diferentes perfiles intraespecíficos en las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991), llegándose a describir cuatro patrones distintos mediante análisis de RFLP del rDNA (178) y hasta once en RFLP de mtDNA (309). Este elevado nivel de variación

puede ser interesante para diferenciar entre cepas o variedades pero los patrones obtenidos son de difícil interpretación debido al gran número de bandas que presentan. Por el contrario, los patrones N y T descritos en el presente estudio son de fácil interpretación al presentar sólo dos o una banda, respectivamente.

La técnica de RFLP del ITS-5.8S rDNA descrita en el presente trabajo es muy adecuada para estudios en los que se han de clasificar un gran número de cepas, debido al tipo de técnica de extracción de DNA utilizada y al uso de la PCR. En la técnica de extracción de DNA empleada partimos de una cantidad inicial de micelio muy pequeña. Este hecho nos permite realizar muchas extracciones simultáneamente y disminuir de forma considerable las cantidades utilizadas de reactivos, con lo que se logra un ahorro de tiempo y dinero. El uso de esta técnica de extracción es factible si se utiliza la PCR. La PCR permite trabajar con pequeñas cantidades de DNA como las obtenidas mediante dicha extracción. Otra de las ventajas de utilizar la PCR es la de poder trabajar con fragmentos específicos del rDNA sin tener que recurrir a técnicas de hibridación que necesitan el uso de marcadores fluorescentes o radioactivos. El análisis de RAPD, al igual que la PCR, necesita cantidades pequeñas de DNA, pero por el contrario precisa un gran número de cebadores que eleva el coste del proceso.

La distribución de los aislamientos en los dos grupos resultó ser muy similar, clasificándose un 52,2% como tipo T y 47,8% como tipo N. La mayoría de los aislamientos procedentes de muestras de piensos presentaron un patrón tipo T (74,1%). En el caso de los aislamientos de materias primas, éstos se distribuyeron aproximadamente al 50%, excepto aquellos realizados a partir de muestras de maíz que fueron mayoritariamente de tipo N (75%). El 71,4% de los aislamientos de muestras de suelo se agruparon como N y el 28,6% como T, resultados que, a pesar de la diferencia en el número de cepas estudiadas, son similares a los obtenidos por Varga *et al.* (1994). Las cepas de origen animal o humano presentaron distribuciones bastante homogéneas. Los aislamientos realizados de muestras de lavados de bolsas gutrales de caballos fueron tipo T en un 80% de los casos y las tres cepas aisladas de esputo humano tipo N. La única cepa aislada de un proceso patológico (otomicosis humana, CBS 121.55) presentó un patrón tipo T.

6.2.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CEPAS DEL AGREGADO *A. niger*.

El aspecto de las colonias y la morfología macroscópica y microscópica de las estructuras de reproducción son caracteres taxonómicos muy importantes en la clasificación de las distintas especies del género *Aspergillus* (139, 227) así como en la diferenciación de los distintos integrantes del agregado *A. niger*, tal y como fueron descritos por Al Musallam (1980).

Raper y Fennell (1965), en su clasificación del grupo *A. niger*, valoraron el color de las colonias en agar Czapek, la longitud de los conidióforos y el tamaño y ornamentación de los conidios para diferenciar las especies que más adelante formarían el agregado *A. niger* (11). Al Musallam (1980), al establecer el agregado *A. niger*, restó importancia al color presentado por las colonias y se basó en su diámetro en agar Czapek para diferenciar las dos especies (*A. niger* y *A. foetidus*) que formaron dicho agregado. La diferenciación entre las variedades que formaban parte de la especie *A. niger* se basó principalmente en la ornamentación de los conidios. Otras características menos utilizadas fueron el color de la colonia (para diferenciar entre *A. niger* var. *awamori* y *A. niger* var. *intermedius* o *A. niger* var. *nanus*) y la longitud de los estipes (para discriminar entre *A. niger* var. *phoenicis* y *A. niger* var. *phoenicis* f. *pulverulentus*).

Algunas de las cepas ensayadas en el presente estudio, fueron utilizadas en la descripción de las especies del grupo *A. niger* por Raper y Fennell (1965) y en la descripción de las especies y variedades incluidas en el agregado *A. niger* por Al Musallam (1980). Raper y Fennell (1965) utilizaron las cepas CBS 554.65, CBS 558.65 y CBS 134.48 para las descripciones de *A. niger*, *A. pulverulentus* y *A. tubingensis*, respectivamente. Las cepas CBS 554.65 y CBS 134.48 formaron parte del material utilizado por Al Musallam (1980) en la descripción de *A. niger* var. *niger* y la cepa CBS 118.35 en la de *A. niger* var. *niger* f. *hennebergii*; las cepas CBS 126.49 y CBS 558.65 fueron utilizadas en la descripción de *A. niger* var. *phoenicis* y *A. niger* var. *phoenicis* f. *pulverulentus*, respectivamente; las cepas CBS 139.52 y CBS 121.55 en la descripción de *A. niger* var. *usamii* y las cepas CBS 117.32 y IMI 172296 en la de *A. niger* var. *intermedius*. La cepa CBS 618.78 se utilizó en la descripción de *A. foetidus*.

El diámetro medio de las colonias desarrolladas en las placas de CYA incubadas durante 7 días a 25°C fue de 7,2 mm. En este medio, el 85,9% de las cepas ensayadas desarrollaron coloraciones entre el marrón y el negro, y el 68,5% presentaron unos reversos amarillentos. Las

texturas de las colonias fueron mayoritariamente aterciopeladas (75%) o flocosas (13%). El valor medio de los diámetros de las colonias desarrolladas en las placas de CYA incubadas a 37°C fue de 6,2 mm. Las colonias desarrolladas en MEA presentaron un diámetro medio de 5,2 mm. El 78,3% de las cepas desarrolladas en este medio mostraron anversos con tonalidades oscuras, entre marrón y negro. Los reversos fueron amarillentos en un 55,4% e incoloros en un 25% de los casos. La mayoría de las colonias presentaron texturas aterciopeladas (68%) o flocosas (15,2%). En las placas de CYA20S, las colonias presentaron un diámetro medio de 7,3 mm, con coloraciones mayoritariamente verdosas (55,5%) o marrón negruzcas (51,1%) y reversos amarillentos en un 92,4% de las cepas. En este medio, las colonias presentaron texturas aterciopeladas en un 42,4% de los casos, flocosas en un 27,2% y lanosas en un 22,8%. El aspecto de las colonias desarrolladas se ajustó al descrito en la literatura consultada (11, 68, 139, 216, 227). Coincidiendo con Klich & Pitt (1988) las colonias desarrolladas en el medio CYA fueron más densas que las desarrolladas en medio MEA pero menos que las desarrolladas en el medio CYA20S. La producción ocasional de gotas de exudado y de esclerocios fue descrita en la mayoría de los estudios previamente citados (11, 68, 139, 227). En la presente memoria tan sólo una cepa produjo exudado, que fue incoloro y solamente dos cepas formaron esclerocios, de color crema. Los colores de los esclerocios y del exudado coincidieron con los publicados previamente (11, 139, 227). Una de las cepas ensayadas produjo un pigmento difusible en el medio de cultivo de color amarillo no característico del agregado *A. niger*.

Las colonias de las cepas de colecciones internacionales presentaron, por norma general, unas coloraciones más claras que las de las restantes cepas, probablemente, debido a la fecha de aislamiento. Así, la cepa *A. niger* CBS 554.65, por ejemplo, fue aislada en 1913.

Los diámetros de las colonias desarrolladas en los distintos medios ensayados fueron bastante variables. Así, se encontraron diferencias significativas en los diámetros desarrollados por el total de las cepas en cada uno de los medios utilizados: MEA, CYA (incubado a 25°C y a 37°C) y CYA20S. Al estudiar los dos grupos N y T por separado, en las cepas tipo N se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en los diámetros de las cepas en cada uno de los distintos medios. En cambio, las cepas tipo T presentaron unos diámetros muy homogéneos ($p > 0,05$) en las placas de CYA incubadas a 37°C y en las de CYA20S, mientras que en las de CYA y MEA incubadas a 25°C los diámetros presentaron una mayor variabilidad ($p < 0,01$). Sin embargo, mediante una prueba de t de Student no se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diámetros obtenidos por ambos grupos de cepas.

Con respecto a las características microscópicas observadas en la presente memoria, algunas de las estructuras presentaron unos valores muy poco homogéneos, como por ejemplo la longitud de los estipes, mientras que otras, como el diámetro de los conidios presentó muy poca variabilidad. Se detectaron diferencias significativas ($p < 0,01$) mediante un análisis de la varianza realizado entre las medidas de cada una de las estructuras estudiadas de las cepas ensayadas. La longitud media de los estipes en el total de las cepas estudiadas fue de $1705,1 \mu\text{m}$ y su anchura media fue de $14,6 \mu\text{m}$. Las paredes de los estipes fueron lisas en todas las cepas y la mayoría (60,9%) fueron incoloros, con tonalidades amarillentas o marrones al acercarse a la vesícula. Las vesículas presentaron un diámetro medio de $50,4 \mu\text{m}$ con tonalidades oscuras en la mayoría (80,4%) de las cepas. Las métulas y las fiálides presentaron unos tamaños medios de $21,6 \times 5,1 \mu\text{m}$ y $7,1 \times 2,7 \mu\text{m}$, respectivamente; en ambos casos se presentaron mayoritariamente coloraciones oscuras, en un 77,2% y un 79,3% de las cepas, respectivamente. Los conidios, esféricos y con un diámetro medio de $3,8 \mu\text{m}$, presentaron colores marrones o negros en un 75% de las cepas. Todas las cepas produjeron conidios con texturas rugosas y, en 41,3% de las cepas, ornamentados con crestas o protuberancias. Los resultados obtenidos en el total de las cepas son compatibles con los descritos en la bibliografía consultada (11, 139, 216, 227) para cepas del agregado *A. niger*.

A los 7 días de incubación a 25°C , todas las cepas presentaron conidios rugosos. Un 41,3% de las cepas ensayadas en la presente memoria presentaron, a este mismo tiempo y temperatura de incubación, una evidente ornamentación de los conidios. En el 50% de los casos, la ornamentación estaba formada por crestas dispuestas longitudinalmente y en el 50% restante, por protuberancias. En el estudio realizado por Al Musallam (1980) la diferenciación de los componentes del agregado *A. niger* se realizó, en la mayoría de los casos, basándose en la observación de la ornamentación de los conidios tras 7-14 días de incubación a 25°C . Al Musallam (1980) describió hasta nueve tipos distintos de ornamentación de los conidios. Según Kozakiewicz (1989), la maduración de los conidios de las especies de la sección *Nigri* es lenta y en el caso de las cepas pertenecientes al agregado *A. niger*, puede tardar hasta 5 semanas de incubación a condiciones óptimas. Debido a esta lenta maduración de los conidios de los integrantes del agregado *A. niger*, Kozakiewicz (1989) desestimó la clasificación de dicho agregado realizada por Al Musallam (1980). En la presente memoria, las cepas estudiadas fueron agrupadas en dos tipos, N y T, según el patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA presentado.

Teniendo en cuenta la división de las cepas ensayadas en los dos grupos N y T, la ornamentación se presentó en un 56,8% de las cepas tipo N y en un 27,1% de las cepas tipo T. Mediante la prueba de Chi cuadrado se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre ambos porcentajes. Así pues, las cepas tipo N parecieron presentar una maduración de los conidios más rápida que las cepas clasificadas como tipo T. En las cepas tipo N, un 56% presentaron una ornamentación formada por estrias longitudinales, y el 44% restante, presentó una ornamentación formada por protuberancias. Por el contrario, en el caso de las cepas tipo T, un 38,5% de las cepas presentaron conidios con ornamentación longitudinal y el 61,5% restante presentaron una ornamentación a base de protuberancias.

Kusters van Someren *et al.* (1991) propusieron la división del agregado *A. niger* en dos especies morfológicamente idénticas, denominadas *A. niger* y *A. tubingensis*, basándose en criterios moleculares. Curiosamente, las dos cepas que se utilizaron como representativas de los dos grupos propuestos por Kusters van Someren *et al.* (1991) fueron agrupadas por Al Musallam (1980) dentro de una misma subespecie (*A. niger* var. *niger*) del agregado *A. niger*. En la presente memoria se dividieron las cepas ensayadas en dos grupos N y T, definidos basándose en los distintos patrones de RFLP del 5.8S ITS-rDNA. Estos dos grupos N y T se correspondieron con las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991). Las estructuras estudiadas en las cepas de ambos grupos presentaron medidas muy variables. Con el fin de comparar los resultados obtenidos por las cepas de los grupos N y T, se realizó una prueba de t de Student entre las medidas de cada una de las estructuras estudiadas de las cepas ensayadas. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre las medidas de la anchura de los estipes, la longitud y anchura de las métulas y el diámetro de los conidios. Entre los resultados del resto de las estructuras estudiadas no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos N y T. En el caso de las medidas de las anchuras de los estipes, las cepas tipo N presentaron una media de 14,9 μm mientras que las cepas tipo T, 14,4 μm . En el caso de las métulas los valores medios fueron de 22,4 x 5,2 μm y de 20,8 x 5,0 μm , para las cepas tipo N y tipo T, respectivamente. La media de los diámetros de los conidios las cepas tipo N fue de 4,0 μm y los de las cepas tipo T, 3,6 μm . Este dato concordó con la existencia de un mayor porcentaje (significativamente diferente) de cepas con conidios ornamentados en el grupo N (56,8%), que en las cepas del grupo T (27,1%). Estas pequeñas diferencias no constituyen una característica práctica para diferenciar los grupos N y T ya que los rangos de valores mínimos y máximos obtenidos por ambos grupos de cepas son muy similares.

6.2.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS A DISTINTAS TEMPERATURAS DE INCUBACIÓN.

En el presente estudio se han ensayado las siguientes temperaturas de incubación: 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C y 55°C. Ninguna de las cepas en estudio se desarrolló a las temperaturas de 5°C y 55°C (Figura 6).

Klich y Pitt, en su manual de identificación (1988) ya comentan la incapacidad de *A. niger* para desarrollarse a 5°C. La temperatura mínima de desarrollo de las cepas del agregado *A. niger* ensayadas en nuestro estudio fue de 10-15°C. Ninguna cepa fue capaz de desarrollarse a 10°C a los 3 días de incubación, el 51,1% de las cepas estudiadas se desarrolló a los 7 días de incubación y las restantes a los 10 (41,3%) y a los 14 días (7,6%). Coincidiendo con nuestros resultados, las temperaturas mínimas de crecimiento citadas para *A. niger* por Ayerst (1969) y Domsch *et al.* (1980) oscilaron entre 10-12°C y 11-13°C, respectivamente. Otros investigadores citan rangos de temperaturas mínimas ligeramente superiores, de 6-8°C (205).

En las placas incubadas a 15°C un 97,7% de las cepas fue capaz de desarrollarse a los 3 días y todas crecieron a los 7 días. A los 3 días de incubación todas las cepas ensayadas fueron capaces de crecer a temperaturas comprendidas entre 20°C y 45°C.

Con respecto a la temperatura óptima de crecimiento, al comparar la media de los diámetros obtenidos a las distintas temperaturas estudiadas, se observó que tanto a los 3 como a los 7 días de incubación, los valores máximos se obtuvieron en las placas incubadas a 30°C y 35°C. La temperatura óptima de crecimiento obtenida en nuestro estudio fue la de 35°C ya que, a esta temperatura, las cepas estudiadas obtuvieron un desarrollo máximo a los dos tiempos de incubación ensayados, significativamente ($p < 0,01$) superior. Este resultado coincide con los obtenidos por otros investigadores, que sitúan la temperatura óptima entre 30°C y 35°C (13, 286) o entre 35°C y 37°C (205). Por el contrario, a diferencia de los resultados obtenidos en la presente memoria, Broncato y Golding (1953) indican que el diámetro máximo se obtiene entre 27°C y 33°C sin que existan diferencias con el diámetro obtenido a 25°C. Además, en dicho trabajo (29) se indica asimismo que las temperaturas superiores a 25°C no favorecen la esporulación, hecho no observado en nuestro estudio a 30°C, 35°C y 40°C.

En el presente estudio, se determinó la temperatura de 45-50°C como la temperatura máxima de crecimiento para las cepas del agregado *A. niger* ensayadas. A 50°C se desarrollaron el 9,8% de las cepas a los 3 días y el 10,9% de las cepas a los 7 días. Los hongos considerados como termotolerantes pueden desarrollarse a la temperatura de 50°C (o superior) y crecen bien a temperaturas inferiores a 20°C, a diferencia de los hongos termófilos, cuya temperatura mínima de crecimiento es de 20°C (o superior) y su temperatura máxima se sitúa por encima de los 50°C (199). En el género *Aspergillus* hay buenos ejemplos de hongos termotolerantes, en especial *A. fumigatus* y el teleomorfo *Neosartorya fischeri* (62, 73, 74, 159, 188). Las temperaturas máximas de crecimiento citadas por otros autores para *A. niger*, similares a la obtenida en la presente memoria, oscilaron entre 43°C y 45°C (13), entre 45°C y 47°C (205) y entre 47°C y 48°C (68).

Algunos estudios mencionaron su aislamiento a 45°C a partir de diversos substratos naturales (159), así como su capacidad de resistir temperaturas de 45°C durante el almacenamiento (233) o de 65°C durante el compostaje (68). Asimismo, *A. niger* fue aislado de sorgo tratado a 80°C durante 12 minutos (186). Cabe destacar que se aislaron cepas de *A. niger* de ambientes expuestos a altas temperaturas como saunas y arena del desierto (68). El punto de muerte térmica de los conidios de *A. niger* citado por varios autores (17, 47, 68) oscila entre los 50°C y 60°C, dependiendo de la a_w y la duración de la aplicación del calor.

La capacidad de crecimiento a temperaturas extremas se utilizó en la diferenciación de especies dentro de la Sección *Flavi* (153). Así, la capacidad de desarrollarse a 42°C permite distinguir entre *A. flavus* y *A. nomius*, dos especies morfológicamente muy similares. En el presente trabajo se han clasificado las cepas ensayadas en dos grupos (tipo N y tipo T) según el patrón de RFLP del 5.8S-ITS rDNA mediante el método descrito en el apartado 4.2.2.4. El total de las cepas se ha desarrollado de forma muy homogénea, salvo en los casos de las temperaturas mínima y máxima de crecimiento. De las 10 cepas desarrolladas a 50°C, un 70% fueron clasificadas como tipo T y un 30% como tipo N. Mediante la prueba de Chi cuadrado, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre el número de cepas desarrolladas de ambos grupos. Por otra parte, de las 47 cepas desarrolladas a 10°C, un 87,23% fueron clasificadas como tipo T y un 12,77% como tipo N. El 85,4% de las cepas tipo T crecieron a los 10 días de incubación a 10°C, mientras que tan sólo se desarrolló un 6,8% de las cepas tipo N (Figuras 6 y 7). Una prueba de Chi cuadrado demostró la existencia de diferencias significativas ($p<0,01$) entre el número de cepas desarrolladas de ambos grupos. Los diámetros de las colonias desarrolladas en el ensayo

realizado a 10°C fueron similares en ambos grupos y no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre ellos. Así pues, el estudio de la capacidad de crecimiento a los siete días de incubación a 10°C de las cepas del agregado *A. niger* puede ser de utilidad para diferenciar entre las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991), con un cierto margen de error, debido a que existen cepas tipo N capaces de desarrollarse a dichas condiciones.

En el total de las cepas ensayadas no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los diámetros de las colonias obtenidas a las temperaturas extremas de crecimiento; es decir, en la lectura realizada a los 3 días de incubación, entre las temperaturas de 15°C y 50°C y en la lectura realizada a los 7 días de incubación, entre las temperaturas de 10°C y 50°C. Siendo significativamente diferentes ($p<0,01$) los diámetros obtenidos en las placas incubadas durante 3 y 7 días en el resto de temperaturas. Sin embargo, al dividir las cepas ensayadas en los dos grupos N y T, en las cepas tipo N no se encontraron diferencias significativas entre los diámetros de las colonias desarrolladas a los 3 y 7 días de incubación a 30°C y 35°C ni en las desarrolladas a los 3 días de incubación a 25°C y 40°C. Así, en las cepas tipo T, la temperatura óptima fue de 35°C y en las cepas tipo N, de 30-35°C (Figuras 10 a 12). En el ensayo realizado a 15°C, la media de los diámetros obtenidos por las cepas del tipo T fueron ligeramente superiores a los desarrollados por las cepas del tipo N, tanto a los 3 ($p<0,05$) como a los 7 días ($p<0,01$) de incubación. Los diámetros de las colonias de las cepas del tipo N fueron ligeramente superiores a los 3 días de incubación a 20°C ($p<0,05$), 25°C ($p<0,01$), 30°C ($p<0,01$) y 40°C ($p<0,01$) y a los 7 días de incubación a 20°C ($p<0,05$), y 40°C ($p<0,01$). En el resto de los ensayos realizados no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre ambos grupos de cepas.

Teniendo en cuenta la mayor capacidad de desarrollarse a 10°C y los mayores diámetros presentados por las colonias desarrolladas a 15°C, parece ser que las cepas tipo T inician antes su desarrollo a bajas temperaturas que las tipo N.

6.2.3.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a las temperaturas mínima y máxima de crecimiento.

Respecto a las características macroscópicas determinadas en las colonias desarrolladas a las temperaturas mínimas y máximas de crecimiento, cuyos resultados están detallados en las Tablas 33 a 36 cabe destacar que en ninguno de los casos se observó la presencia de pigmento difusible

en el medio de cultivo ni la formación de gotas de exudado.

A la temperatura mínima de crecimiento ninguna de las colonias desarrolladas mostró su típica coloración negra, sino que mayoritariamente presentaron coloraciones blanquecinas (90,2% de las cepas) o amarillentas (21,7%). Las coloraciones presentadas en el reverso fueron mayoritariamente amarillentas (70,7%) o blancas (39,1%). La textura presentada en la mayoría de las cepas fue la aterciopelada (76,1%) si bien algún caso mostró texturas ligeramente flocosas (33,7%) o lanosas (11,9%). El 4,4% de las cepas presentaron micelio aéreo blanquecino. En ninguno de los casos se observó la formación de surcos. Si tenemos en cuenta la división de las cepas ensayadas en los grupos N y T basada en las diferencias existentes en los patrones de RFLP del 5.8S-ITS rDNA, no se observan diferencias entre las características morfológicas estudiadas.

Las colonias desarrolladas en las placas incubadas a las temperaturas extremas superiores (45°C y 50°C) presentaron, de forma mayoritaria, las siguientes coloraciones: blanco (67,4%); negro (33,7%); marrón claro (10,9%); verde oscuro (9,8%); amarillento (8,6%). Las coloraciones presentadas en el reverso fueron mayoritariamente amarillentas (89,1%) o blanquecinas (54,4%), siendo las texturas de las colonias aterciopeladas (70,7%), flocosas (57,6%) o lanosas (11,9%). Solamente el 2,2% de las cepas presentaron micelio aéreo. Un 67,4% de las colonias desarrolladas a la temperatura máxima de crecimiento presentaron la formación de surcos radiales y un 36,9% la de surcos concéntricos. Un 14,1% de las cepas presentaron un aspecto cerebriforme. Los resultados obtenidos fueron prácticamente iguales en los grupos N y T, a excepción del aspecto cerebriforme de la colonia, que se presentó en un 22,9% de las cepas tipo T, mientras que sólo en un 4,6% de las cepas tipo N.

Respecto a las características microscópicas determinadas en las colonias desarrolladas a las temperaturas mínimas y máximas de crecimiento (Tablas 33 a 36), cabe destacar que, en el caso de las temperaturas mínimas de crecimiento mayoritariamente se presentó la formación de micelio estéril (72,8%), al contrario de lo que pasó con las temperaturas máximas de crecimiento en las que, mayoritariamente se mostró un aspecto microscópico normal (69,6%). Las alteraciones en la microscopía normal observadas fueron la presencia de vesículas sin métulas ni fiálides (8,7%) en las preparaciones realizadas a partir de las placas incubadas a las temperaturas mínimas de crecimiento. Con respecto a las preparaciones obtenidas a partir de las colonias desarrolladas a las

temperaturas máximas de crecimiento las alteraciones observadas fueron la presencia de vesículas sin méulas ni fiálides (15,2%) o de alteraciones en el estipe (5,4%) o, en menor grado, en las méulas.

6.2.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL NaCl.

En el presente estudio, realizado para determinar la resistencia al NaCl de las cepas del agregado *A. niger*, se observó que, aunque existió una cierta variabilidad en los diámetros de las cepas ensayadas, a bajas concentraciones de NaCl, los diámetros de las colonias aumentaron para, seguidamente, al aumentar la cantidad de sal, disminuir de forma progresiva hasta la total inhibición del desarrollo.

Se han realizado varios estudios sobre la tolerancia a altas concentraciones de sal por parte de especies fúngicas tanto saprofitas como patógenas para el hombre y los animales domésticos (10, 34, 69, 106, 131, 132, 205, 251). En el género *Aspergillus* se ha realizado también algún estudio sobre la tolerancia a elevadas concentraciones de NaCl (12, 251, 298). *Aspergillus* ha sido descrito como muy resistente a altas concentraciones de sal (298) e incluso algunos autores añaden un 6% o un 8% de NaCl al medio de aislamiento utilizado para aislar especies tales como *A. flavus* o *A. niger* (123, 299).

En la presente memoria, en el ensayo realizado a 16% de NaCl se desarrolló un 11,9% de las cepas incubadas a la temperatura de 25°C mientras que, de las cepas incubadas a 35°C sólo se desarrolló un 4%. Ninguna cepa se desarrolló a un 18% de NaCl, a las dos temperaturas de incubación ensayadas (Figura 13). Estos resultados concuerdan con los del estudio realizado por Schöborn (1981) que, a una temperatura de incubación intermedia (30°C), presentó un resultado intermedio a los obtenidos en la presente memoria a 25°C y 35°C. En dicho estudio (251) *A. niger* fue, junto con *A. fumigatus*, una de las especies del género *Aspergillus* menos resistentes al NaCl. Otros investigadores (12, 298) en cambio indican que las cepas del agregado *A. niger* pueden llegar a desarrollarse a concentraciones de hasta un 20% de sal.

La determinación de la resistencia al NaCl en la presente memoria ha sido realizada a dos temperaturas, a 25°C (temperatura de identificación de las cepas) y a 35°C (temperatura óptima de crecimiento, ver el apartado 6.2.3.). Ritchie (1957), refiriéndose a hongos marinos, indica que, en algunos de ellos, un aumento de la temperatura de incubación favorece el crecimiento a concentraciones elevadas de NaCl. En el presente estudio se observó que las medias de los diámetros de las colonias desarrolladas por las cepas a las distintas concentraciones de NaCl en el estudio realizado a 35°C fueron superiores a las desarrolladas a 25°C (Figura 16). Mediante una prueba de t de Student se compararon los diámetros de las colonias desarrolladas a las dos temperaturas de incubación ensayadas. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$) entre los resultados obtenidos a los 3 días de incubación a 25°C y a 35°C en todas las concentraciones de NaCl ensayadas. A los 7 días de incubación, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los ensayos realizados a las concentraciones de 2%, 4% y 16% NaCl. En el resto de ensayos realizados a 35°C, los diámetros de las colonias desarrolladas tras los 7 días de incubación a las dos temperaturas ensayadas fueron significativamente diferentes ($p < 0,01$). El hecho de no encontrar diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el caso de los ensayos realizados a un 2% y un 4% de NaCl, se debió, probablemente, al gran número de cepas que invadieron la totalidad de la superficie del medio de cultivo antes de los 7 días de incubación, limitando así su crecimiento (Tabla 43 y Figura 21). Pese a obtenerse unos mayores diámetros en las colonias desarrolladas a 35°C, el número de cepas desarrolladas a 25°C fue significativamente ($p < 0,01$) superior en los ensayos realizados a las concentraciones de NaCl del 8% (a los 3 y 7 días de incubación), 10% y 12% (7 días de incubación) (Tablas 37 y 38). Asimismo, la media geométrica de las CMI obtenidas en el ensayo realizado a 25°C, fue superior a la obtenida en el ensayo realizado a 35°C (Tablas 54 y 55). Estos resultados parecen indicar una mayor resistencia a la sal por parte de las cepas del agregado *A. niger* a 25°C.

Los diámetros coloniales medios obtenidos en las placas que contenían un 2% y un 4% de NaCl fueron mayores que los obtenidos en las placas control sin NaCl añadido, lo que indica que bajas concentraciones de NaCl estimulan el crecimiento de las cepas del agregado *A. niger*. Esta estimulación del crecimiento fúngico a bajas concentraciones de sal ha sido descrita por otros autores dentro del género *Aspergillus* (298) y en *A. niger* (50, 68). A partir de una concentración del 6% de NaCl, se observó una reducción progresiva de la media de los diámetros coloniales hasta que, a la concentración del 18% se produjo una inhibición total del desarrollo.

En el presente trabajo los diámetros máximos obtenidos a los 7 días de incubación a las dos temperaturas ensayadas se obtuvieron a una concentración del 2% de NaCl, seguidos de los obtenidos al 4% de NaCl y de los de las placas control. En el estudio realizado a 25°C se obtuvieron diferencias significativas (Tabla 37) entre los diámetros medios obtenidos de las placas con un 2%, 4% NaCl y las placas control sin NaCl añadido. En el estudio realizado a 35°C, no se detectaron diferencias significativas (Tabla 38) entre estos diámetros medios, probablemente debido a la limitación del crecimiento de la cepa anteriormente mencionado. Dichos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, que indicaron que el crecimiento óptimo de *A. niger* se produjo a la concentración de 3% de NaCl (68) o a la de 3,4% NaCl (50).

Aspergillus niger ha sido aislado de productos tales como jamones (110, 197) o pescados en salazón (12, 215) con concentraciones de sal que oscilan entre un 5% y un 10% o entre un 10% y un 33%, respectivamente. Cabe destacar que *A. niger* se aisló de salinas, estuarios, marismas y otros ambientes marinos (68). Dzawachiznili *et al.* (1964) indicaron que el mar podría ser un posible reservorio para hongos patógenos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que *A. niger* puede desarrollarse perfectamente en ambientes marinos, ya que la concentración de sal del agua de mar (3,4%) es cercana a la concentración de NaCl óptima para su desarrollo. Dada su capacidad patogénica y la descripción de *A. fumigatus* como causante de procesos infecciosos en mamíferos marinos (67, 228, 327) y en abanicos de mar (*Gorgonia* spp.) (272, 273) no debe descartarse la posible implicación de *A. niger* en aspergilosis en hábitats marinos.

Algunos autores destacan que, debido a lo constante de la tolerancia al NaCl dentro de una misma especie, la determinación de la resistencia al NaCl puede ser una característica de interés taxonómico (131, 132, 298). Los valores de los diámetros de las colonias desarrolladas por las cepas pertenecientes a los dos grupos N y T (descritos a partir de las diferencias entre sus patrones de RFLP del 5.8S-ITS rDNA) fueron muy similares (Figuras 19 y 20), no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre estos resultados presentados por ambos grupos. Con respecto al número de cepas desarrolladas a cada una de las concentraciones de NaCl ensayadas, sólo se encontraron diferencias significativas ($p < 0,01$) en los ensayos realizados a 10% y 12% de sal, en los que las cepas pertenecientes al tipo N presentaron una resistencia ligeramente superior (Tablas 39 a 42 y Figuras 14 y 15).

6.2.3.1. Discusión de los resultados correspondientes al estudio de las características macroscópicas y microscópicas a la máxima concentración de NaCl a 25°C y 35°C.

Respecto a las características macroscópicas de las colonias desarrolladas a concentraciones extremas de NaCl únicamente un 14,1% de las cepas incubadas a 35°C presentaron un color negro o marrón oscuro que puede ser considerado típico de las colonias del agregado *A. niger* crecidas en agar extracto de malta al 2%. Las coloraciones de la mayoría de las colonias fueron amarillentas (40,2%), blancas (38,04%) o marrón claro (29,35%). A 25°C, los colores predominantes en los anversos fueron el blanco (79,34%) y el amarillo (36,45%). Con la excepción de las tonalidades anaranjadas aparecidas en un 5,4% y en un 28,3% de las cepas incubadas a 25°C y 35°C respectivamente, los reversos no difirieron de las coloraciones típicas.

A concentraciones extremas de sal, la formación de surcos radiales se produjo en el 31,5% y la de surcos concéntricos en un 20,7% de las colonias desarrolladas a 25°C y en un 58,6% de las colonias desarrolladas a 35°C. A la temperatura de 25°C, los surcos presentados fueron radiales y centrales, mientras que a 35°C un 71,7% de los surcos fueron radiales, y sólo 9,8% centrales. A 25°C, las texturas fueron aterciopeladas (84,8%) frente a texturas flocosas (7,6%) y lanosas (13%) y a 35°C las texturas fueron aterciopeladas (57,6%), lanosas (27,2%) y flocosas (23,9%). A medida que aumentaba la concentración de NaCl en el medio de cultivo en las placas incubadas a 25°C y 35°C se observaron coloraciones más claras en las colonias, un incremento de la producción de micelio aéreo blanco (en un 53,26% y un 57,6% de las cepas incubadas a 25°C y 35°C, respectivamente) y la producción de pigmentos carotenoides (en un 37% y un 54,3% de las cepas incubadas a 25°C y 35°C). Esta alteración en la pigmentación ha sido descrita en hongos sometidos a altas concentraciones de NaCl (34, 69, 298). En algún caso, como sucedió en otros estudios (34), esta pigmentación desaparecía al llegar a la concentración máxima de NaCl.

Respecto a las características microscópicas determinadas a las concentraciones extremas de NaCl a las temperaturas de 25°C y 35°C (Tablas 56 a 59), cabe destacar que las colonias desarrolladas a 25°C mayoritariamente presentaron la formación de micelio estéril (67,4%), al contrario de lo que pasó con las colonias desarrolladas a 35°C, que mayoritariamente mostraron un aspecto microscópico normal (71,7%). Las alteraciones en la microscopía observadas en las preparaciones realizadas a partir de las placas incubadas a 25°C fueron la presencia de vesículas sin méulas ni fiálides (9,8%) alteraciones en las méulas (8,7%). Con respecto a las preparaciones

obtenidas a partir de las colonias desarrolladas a 35°C fueron la presencia de vesículas sin métulas ni fiálides (18,5%), alteraciones en las métulas (8,7%) y hifas (6,5%) y en una cepa, la presencia de heteromorfismo. Las alteraciones en las hifas inducidas por el NaCl han sido descritas en estudios realizados por otros autores en hongos dermatofitos (34) y en el agregado *A. niger* (208). La presencia de heteromorfismo, la aparición de cabezas conidiales con métulas anormalmente alargadas con el ápice hinchado y recubierto por métulas y fiálides normales, ha sido descrita con anterioridad en la Sección *Nigri* (11, 217, 277). Esta característica se presentó en la especie *A. heteromorphus* descrita a partir de una cepa contaminante de un cultivo de *Trichophyton* (11, 217) y en una cepa aislada en un estudio realizado con muestras de suelo de las proximidades del Mar Muerto, un ambiente con una elevada concentración de NaCl (277). Dicha cepa fue descrita como una nueva especie, llamada *A. pseudo-heteromorphus*, por parte de los autores del mencionado estudio (277).

6.2.5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A.

La técnica de extracción a partir de los bocados de cultivos en agar ha resultado ser rápida, sencilla y limpia. Bragulat *et al.* (1998) describieron la extracción a partir de los bocados de agar, combinándola con la detección de la OA mediante HPLC. En la presente memoria, se combinó el método de extracción a partir de los bocados de agar con la detección de la OA mediante TLC. Así, con la asociación de estas dos técnicas, se obtuvo un buen método de criba para detectar cepas productoras de OA. La técnica de TLC es adecuada en estudios en los que se analiza un gran número de cepas debido a su sencillez y bajo coste de realización. No obstante, para la cuantificación de los niveles de OA producidos es aconsejable la utilización de HPLC.

Existen otros métodos parecidos que utilizan la técnica de TLC, como el descrito por Filtenborg y Frisvad (1980), en el que se realizan improntas de los bocados de agar directamente sobre los cromatofolios. Esta técnica de criba (78, 79), si bien es tan rápida como la empleada en nuestro estudio, presenta una serie de desventajas. Primero, hay que tener una cierta habilidad y precisión en el manejo de los bocados de agar. Una vez retirado el bocado de agar del cultivo, hay que colocarlo en el punto de la placa que nos interese, presionar y luego retirarlo (en el caso de utilizar el medio CYA, hemos de inocular unas gotas de una mezcla de cloroformo y metanol en el lado

con crecimiento fúngico antes de realizar la impronta). Esta operación debe repetirse unas dos veces más, procurando realizar la impronta siempre en el mismo punto. El manejo de los bocados de agar en el método usado en el presente estudio es mucho más sencillo, ya que sólo hay que introducirlos en los viales en los que se realizará la extracción. Segundo, es muy difícil controlar el diámetro del inóculo que se produce al realizar las improntas sobre el cromatofolio. Los inóculos producidos con los bocados de agar son mucho más grandes e irregulares que los obtenidos al inocular un extracto con una microjeringa. Así, las carreras que se producen al desarrollarse mediante TLC los inóculos obtenidos con nuestra técnica son más claras y definidas. Tercero, si pasado un tiempo interesase repetir la prueba o realizar otras determinaciones, tendríamos que volver a realizar la siembra en CYA y agar YES. Por el contrario, los extractos obtenidos con el método utilizado en el presente trabajo pueden conservarse a 4°C el tiempo que nos interese e incluso los podemos inyectar en un HPLC.

La fórmula del medio de cultivo agar YES utilizada en la presente memoria, siguiendo las indicaciones de Bragulat *et al.* (1998), contiene 0,5 g/l de sulfato de magnesio. La adición de sulfato de magnesio al medio de cultivo YES mejora la producción de micotoxinas (79). En la técnica de Filtenborg y Frisvad (1980), el medio de cultivo recomendado para la detección de una micotoxina extracelular como la OA fue el YES agar, mientras que para metabolitos intracelulares se recomendó el medio CYA (82, 210). Por el contrario, otros investigadores (6) aconsejan el uso del medio CYA para la detección de la OA. En la presente memoria la producción de OA por parte de las seis cepas ocratoxigénicas se ha podido observar en ambos medios de cultivo.

Mediante el método de RFLP del 5.8S ITS-rDNA descrito en el apartado 4.2.2.4., las 92 cepas ensayadas en el presente estudio han sido divididas en tipo N y tipo T, correspondientes a *A. niger* y a *A. tubingensis*, respectivamente; las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991). Las seis cepas productoras de OA fueron clasificadas como tipo N, mientras que ninguno de los aislamientos clasificados como tipo T produjeron OA. Así pues, parece ser que los aislamientos de *A. tubingensis* no son capaces de producir OA. Hasta el momento todas las cepas ocratoxigénicas del agregado *A. niger* cuyo patrón de RFLP es conocido pertenecen a *A. niger*. Este hecho, de confirmarse en próximos estudios, es de gran importancia, ya que permitiría la discriminación de las cepas posiblemente ocratoxigénicas. Segundo, por ser una diferencia que proporcionaría una aplicación práctica a la división del

agregado *A. niger* en dos especies propuesta por Kusters van Someren *et al.* (1991), hasta la fecha solamente justificada mediante análisis de RFLP del rDNA (158, 178, 309, 310) y mtDNA (309, 310) y análisis de RAPD (178). Al proponerse la separación del agregado *A. niger*, Kusters van Someren *et al.* (1991) sugirieron que las cepas de *A. tubingensis* deberían tener también la categoría GRAS de la FDA. A la luz de los resultados expuestos en este estudio, quizá se debería tener en cuenta esta sugerencia, y revisar la concesión de la categoría GRAS que poseen las cepas pertenecientes al agregado *A. niger* que, mediante alguna de las técnicas moleculares descritas (7, 158, 178, 309, 310) se clasifiquen como *A. niger*.

La concentración de OA producida por las seis cepas ocratoxigénicas estudiadas en nuestro estudio es similar a la obtenida por cepas del agregado *A. niger* en otros estudios (200, 296). Además, la producción de OA por parte de cepas del agregado *A. niger* ha demostrado ser muy estable, ya que algunos aislamientos (A75 y A136) continúan produciendo niveles muy parecidos de OA (3) incluso después de más de siete años de mantenimiento a 4°C en nuestra propia colección de cultivos. Por otra parte, la cepa ATCC 22343, descrita como productora de pequeñas cantidades de OA por Téren *et al.* (1996) mediante técnicas ELISA no ha sido detectada como ocratoxigénica en nuestro estudio. Esta cepa ha sido clasificada en el presente trabajo como tipo N.

Desde la primera descripción de la capacidad ocratoxigénica de *A. niger* var. *niger* (3), el número de estudios dedicados a la producción de OA por parte de especies de la sección *Nigri* ha ido en aumento (109, 115, 200, 295, 296, 322). Las especies ocratoxigénicas de la sección *Nigri* son las pertenecientes al agregado *A. niger* y *A. carbonarius*. Pese a que *A. carbonarius* presenta unos porcentajes muy altos de cepas ocratoxigénicas, de entre un 42% (296) y un 91% (109), la producción de OA por parte del agregado *A. niger* tiene una especial importancia debido a la mayor frecuencia de aislamiento de sus especies (227) y a la utilización industrial de las mismas. Los porcentajes de producción de OA por parte de cepas del agregado *A. niger* varían considerablemente entre los distintos estudios publicados. En un trabajo realizado con 27 cepas de colección es del 18.5% (200); en un estudio con 30 aislamientos de muestras de granos de café es del 6.6% (191); en un trabajo realizado con 100 cepas (procedentes de colecciones de cultivo y aislamientos de campo) es de un 3% (296) y en otro con 115 aislamientos de pasas es de un 1.7% (109). El porcentaje de producción de OA por parte de las cepas estudiadas en el presente estudio es del 6,5% pero si sólo tenemos en cuenta las cepas de tipo N, este

porcentaje alcanza un 13.6%. La elevada variabilidad de los resultados obtenidos entre los distintos estudios, dejando de lado las diferencias entre los números de cepas ensayadas, puede deberse a la distribución de las mismas entre las dos especies propuestas por Kusters van Someren *et al.* (1991) *A. niger* y *A. tubingensis*, hasta ahora desconocida.

Desde la descripción de la OA en 1965 (179), la producción de OA por parte de *A. ochraceus* ha resultado ser bastante variable en los distintos estudios publicados. Los porcentajes de cepas ocratoxigénicas de *A. ochraceus* observados varían entre los siguientes valores: 54,5% (111); alrededor de un 30% (42, 51, 226, 310); entre un 20% y un 10% (1, 126) y porcentajes inferiores a un 10% (175, 182, 216). Algunos de estos porcentajes pueden resultar engañosos puesto que están extraídos de estudios realizados con un bajo número de cepas. A medida que se incrementa el número de cepas en dichos estudio, el porcentaje de cepas productoras de OA disminuye. Así pues, el estudio (111) que obtiene el máximo porcentaje de cepas de *A. ochraceus* ocratoxigénicas (54,5%) está realizado solamente sobre 11 cepas y los estudios que comprenden números de cepas como 60 o 59 obtienen unos porcentajes de cepas productoras bastante menores, como un 8,3% y 3,3%, respectivamente (182, 216). Por el contrario, se han publicado estudios en los que no se detectaron cepas de *A. ochraceus* ocratoxigénicas (37, 244) o en los que la cantidad de OA producida resultó ser muy baja (175, 310) y sólo detectable en la mayoría de las cepas ensayadas mediante técnicas de ELISA (310). La producción de OA por parte de *A. ochraceus* en la bibliografía consultada (1, 51, 111, 226, 311) resultó ser muy variable. La concentración de OA estimada por parte de la mayoría de cepas de *A. ochraceus* ensayadas se situó en un rango de entre 0,07 y 9,0 $\mu\text{g/ml}$ (1, 51, 175, 226), resultados similares a los obtenidos en el presente estudio con cepas del agregado *A. niger*. Sin embargo, se han descrito algunas cepas con una producción de OA muy superior, de 240 $\mu\text{g/ml}$ (51, 311) o incluso de hasta 1497 $\mu\text{g/g}$ (111). Teniendo en cuenta además que no es una especie demasiado frecuente, algunos autores (175, 216) han puesto en duda la importancia real de la producción de OA por parte de *A. ochraceus*. En cambio, parece probable que las especies ocratoxigénicas de la sección *Nigri* sean las principales implicadas de la contaminación por OA en zonas tropicales o ecuatoriales donde *A. ochraceus* no parece estar muy extendido y *P. verrucosum* no tiene su nicho ecológico (216). Así pues, parece factible que *A. niger* sea el responsable del origen de la OA presente en productos procedentes de esas zonas como, por ejemplo, el café. Se han realizado estudios en los que se intentó relacionar la contaminación por OA en productos como café (30, 191, 295), piensos (282) y materias primas (145, 175) con la

micoflora existente en dichos substratos. En algunos de estos estudios se aislaron cepas ocratoxigénicas de *A. niger* en muestras de café contaminado por OA (191, 295). Sin embargo, en otros trabajos, pese a aislar cepas de *A. niger* de las muestras estudiadas, al no aislar cepas de *P. verrucosum* o de *A. ochraceus* ocratoxigénicas, los autores concluyeron que el origen de la contaminación por OA era incierto (175, 282) y, en el caso del café, que ésta se produjo antes de la cosecha (30). Cabe la posibilidad que las cepas aisladas de *A. niger* contribuyeran a la contaminación por OA de las muestras analizadas en estos estudios.