

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL GENERO ASPERGILLUS

Memoria presentada para
aspirar al grado de
licenciado en Farmacia.

Lourdes Abarca

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701740813

LOURDES ABARCA SALAT



UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA

Dña. M^a de los ANGELES CALVO TORRAS, doctor en Farmacia, director de la Tesina presentada por Dña. LOURDES ABARCA SALAT con el título: "Contribución al estudio del género Aspergillus"

C E R T I F I C A:

Que la mencionada Memoria ha sido realizada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Barcelona y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Licenciado.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente en Barcelona a 5 de Junio de mil novecientos ochenta.

CATEDRA DE
MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE
BARCELONA

Fdo.: Dra. M^a de los ANGELES CALVO

Expreso mi agradecimiento al Dr. D. Manuel Ventín Hernández, prof. adjunto Numerario de la Cátedra de Microbiología aplicada y Técnica bacteriológica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por su apoyo e interés en los estudios realizados.

A la Dra. Dña. M^{ra} Angeles Calvo Torras, profesora de la Cátedra de Microbiología aplicada y Técnica bacteriológica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, por su orientación, estímulo, colaboración y dirección en la elaboración de la presente memoria.

A la Dra. María Morgado, del Laboratorio de Bacteriología de la Balme (Francia), por su desinteresada colaboración que ha permitido la realización de parte de esta tesis.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona , por su interés y colaboración.

1. INTRODUCCION	1
1.1 Género <u>Aspergillus</u>	1
1.2 Características macroscópicas y microscópicas.....	2
1.3 Grupos del género <u>Aspergillus</u>	13
1.4 Ecología e importancia clínica	16
1.5 Características bioquímicas y capacidad inhibi- dora del crecimiento de otros microorganismos.....	18
2. OBJETO E INTERES	20
3. PLAN DE TRABAJO	22
4. MATERIAL Y METODOS	23
4.1 Material	23
4.2 Métodos	24
4.2.1 Caracterización morfológica	24
4.2.1.1 Método para la clasificación has- ta nivel género	24
4.2.1.2 Microcultivos	25
4.2.1.3 Método para la clasificación has- ta nivel especie	26
4.2.2 Caracterización bioquímica	26
4.2.2.1 Reacciones enzimáticas	26
Método semicuantitativo	26
Método cualitativo	29
4.2.2.2 Otras pruebas bioquímicas	33
4.2.3 Producción de sustancias inhibitoras	41

	pag.
4.3 Medios de cultivo y reactivos utilizados.....	42
4.3.1 Medios de cultivo para la caracteri- zación morfológica.....	42
4.3.2 Medios de cultivo para la caracteri- zación bioquímica.....	43
4.3.3 Medio de cultivo para la producción de sustancias inhibidoras	53
4.3.4 Reactivos utilizados	54
5. RESULTADOS	58
5.1 Resultados correspondientes a la caracteri- zación morfológica	58
5.2 Resultados correspondientes a la caracteri- zación bioquímica	70
5.2.1 Reacciones enzimáticas	70
5.2.2 Otras pruebas bioquímicas	79
5.3 Resultados correspondientes a la producción de sustancias inhibidoras	92
6. DISCUSION!	97
7. CONCLUSIONES	103
8. BIBLIOGRAFIA	111

1. INTRODUCCION

1.1 GENERO ASPERGILLUS

La actual denominación de *Aspergillus* se menciona por vez primera en la "Nova Plantarum Genera" de Micheli, en 1729, pero hasta mediados del siglo XIX este género no empieza a considerarse como agente causal de procesos de deterioro, y como productor de enfermedades en hombres y animales, reconociéndose así mismo su capacidad de elaborar metabolitos secundarios útiles para el hombre.

Debido a que algunas especies del género Aspergillus presentan estado ascospórico, mientras que otras carecen de él, existe una confusión con respecto al nombre que debería ser aplicado al género.

Tal como mencionan Raper y Fennell (102), Micheli en 1729, aplicó el nombre al estado asexual de ciertas especies comunes. Más tarde Link (1809) introdujo el nombre de Aspergillus glaucus para designar a las cabezas conidiales de un hongo encontrado en especímenes de un herbario, y no dándose cuenta de su origen común, aplicó el nombre de Eurotium herbariorum al cleistotecio amarillo formado por el mismo hongo. El origen común de estas estructuras fue demostrado por De Bary en 1854.

Según Thom y Church (1926) y Thom y Raper (1945), el nombre genérico de Aspergillus debería ser utilizado para to-

dos estos hongos tanto si se produce como si no un estado ascospórico. Su opinión se basaba en la tesis de que encontrando y describiendo el estado sexual, se completaba la caracterización de un hongo ya conocido, y que esto permitiría separar un número limitado de Aspergillus que desarrollan un estado sexual, de la mayoría de especies que no lo hacen.

Entre los principales sinónimos aplicados a este género destacan los siguientes : Eurotium Link (1809) ; Sterigmatocystis Cramer (1859) ; Euaspergillus Ludwig (1892) ; Aspergillopsis Spegazzini (1911) ; Diplostephanus Langeon (1922) ; Inzengaea Borzi (1984) ; Sartoya Vuillemin (1955).

1.2. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Debido a que son poco numerosas las especies del género Aspergillus que dan lugar a cleistotecio y ascosporas, la clasificación según Raper y Fennell (102) debe basarse en las características de la colonia y los detalles y morfología de sus estructuras fundamentales.

Para hacer la descripción de una colonia del género Aspergillus, debe especificarse la composición del medio de cultivo sobre el que se ha desarrollado, la temperatura, el tiempo de incubación y las condiciones de iluminación. Bajo condiciones conocidas y uniformes de cultivo, las características de la colonia han sido consideradas (102) como datos significativos en la identificación y descripción de las especies del género Aspergillus

CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS

COLOR .- El color del micelio aéreo de una colonia del género Aspergillus , incluyendo el del micelio vegetativo , de las cabezas conidiales, del clestotecio y del esclerocio cuando están presentes, es normalmente un dato significativo en la caracterización de las especies.

Existe un rango propio de coloración en el micelio aéreo de cada uno de los grupos del género Aspergillus y un rango más estrecho para las especies en particular. Así mismo, puede o no haber pigmentación en los conidios, esterigmas, vesícula y conidióforo.

PIGMENTACION .- La pigmentación del micelio basal o del sustrato proporciona un dato adicional, pero no absoluto en la caracterización de las especies. Ello es debido a que el color es el resultado de un Aspergillus en particular que se ha desarrollado bajo ciertas condiciones nutricionales y ambientales. La mayor objeción con respecto al uso del color como carácter diagnóstico estriba en la diferencia individual en la interpretación de los colores , aunque puede ser subsanado con la utilización de códigos internacionales de colores.

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO .- La velocidad de crecimiento y el diámetro de la colonia en un tiempo determinado y en un medio de cultivo específico difiere de unas especies a otras y de un grupo a otro.

COREMIO .- Los coremios son agrupaciones especializadas erectas de conidióforos que han sido observadas únicamente en A. vitellina Ridley . En A. clavato-flavus Raper y Fennell se han descrito también estructuras semejantes al verdadero coremio.

OLOR .- Aunque a veces es marcado, nunca es un carácter de diagnóstico, y debe utilizarse únicamente como comprobación en la identificación de especies.

CARACTERISTICAS MICROSCOPICAS

CABEZA CONIDIAL .- El color, forma , tamaño y disposición de las cabezas conidiales pueden ser considerados rasgos característicos de las especies y de los grupos a los que pertenecen.

CELULA BASAL .- La primera indicación en el desarrollo de una estructura conidial en el género Aspergillus es el alargamiento de ciertas células del micelio que desarrollan una pared gruesa, a partir de las cuales emerge el conidióforo. Pueden estar sumergidos en el sustrato o surgir de la hifa basal. La presencia de la célula basal es una evidencia de que el hongo aislado es una especie del género Aspergillus, pero su ausencia no puede utilizarse para excluir a un microorganismo del género.

Las colonias pueden alcanzar su diámetro máximo, grande o pequeño, bien sea rápida o lentamente. El crecimiento puede cesar bruscamente tras un corto periodo de tiempo o continuar durante algunas semanas. En condiciones estandarizadas el diámetro de las colonias puede ser un dato eficaz en el diagnóstico de las especies.

MARGEN DE LAS COLONIAS .- Los márgenes de las colonias pueden ser gruesos y delimitados o delgados y difusos, lisos o lobulados y sumergidos o aéreos.

MICELIO BASAL .- El micelio basal puede ser delgado o denso, fuerte o quebradizo y plano o surcado.

TEXTURA .- La textura de la superficie de las colonias bajo condiciones uniformes de cultivo, es un dato eficaz en el diagnóstico de las especies del género Aspergillus . Así, algunas colonias se describen como algodonosas, otras como flocosas, aterciopeladas etc.

ZONACION .- La zonación es debida a la producción alternativa de cabezas conidiales y esclerocio, o de cabezas conidiales y cleistotecio, o a la formación de anillos concéntricos de esclerocio y cleistotecio alternando con anillos de estricto crecimiento micelial. En contraste con estas zonas concéntricas, algunas especies desarrollan característicamente cabezas sólo en áreas localizadas, debido principalmente a la sequedad y concentración del medio de cultivo utilizado.

CONIDIOFORO .- En la mayoría de las especies del género Aspergillus los conidióforos no presentan ramificaciones, y de cada uno nace una sola cabeza conidial.

La longitud y diámetro de la sección del conidióforo entre el pie celular y la base de la vesícula es un dato taxonómico diferencial según Raper y Fennell (102), para la descripción de las especies. Los conidióforos son mononematosos y macronematosos (35,59) y poseen las paredes gruesas, de tamaño uniforme en toda la longitud del conidióforo o más acentuado en la base y menos en la zona cercana a la vesícula.

El conidióforo puede estar o no septado. El septo si se presenta es delgado y tenue, pero en algunas especies es bastante aparente.

Atendiendo a las características de la pared del conidióforo observado a gran aumento, pueden distinguirse dos grupos generales. En el primero, la superficie externa de la pared es lisa, bastante homogénea al microscopio, y al no absorber los colorantes protoplasmáticos, su estructura es difícil de distinguir. Al romperse, muchos conidióforos muestran el extremo irregular como un tubo de cristal roto, o en forma de astillas como ocurre en el grupo A,niger .

En el segundo grupo la pared aparece irregularmente equinulada. Esta equinulación se debe a la acumulación de material cristalino que puede ser o no pigmentado entre la

membrana externa de la célula y la pared hialina.

Los conidióforos pueden ser hialinos o coloreados en tonos verdes, amarillos o marrones. El grado, extensión y localización de la pigmentación varía con las especies y cepas. En el grupo A. niger por ejemplo, la pigmentación del conidióforo es progresiva desde la vesícula hasta la base.

VESÍCULA . - El conidióforo da lugar a una estructura globosa, hemisférica o elíptica conocida con el nombre de vesícula en la que se formarán las células conidiógenas. La vesícula se sitúa en el mismo eje del conidióforo , pero en algunas especies de los grupos A.cervinus, A. restrictus y A. fumigatus se dispone en un ángulo del mismo, y en este caso las vesículas pueden aparecer bifurcadas.

Las vesículas pueden ser hialinas o pigmentadas en la misma tonalidad del conidióforo. Su forma y tamaño son caracteres importantes en el diagnóstico, y deben incluirse en la descripción de todas las especies. El tamaño de las vesículas varía con la composición del medio de cultivo, por lo que debe especificarse el sustrato sobre el que se ha desarrollado. Las vesículas pueden ser fértiles en toda su superficie o no, y este carácter está influido por el tamaño de la cabeza conidial, por lo que debe describirse.

CELULA CONIDIOGENA .- La célula conidiógena o esterigma es aquella que se caracteriza por ser productora de

conidios. En el género Aspergillus normalmente se desarrolla de forma perpendicular a su punto de origen. Puede ser hialino o pigmentado como la vesícula, y según Raper y Fennell (102), disponerse en una única serie o en dos.

En la mayoría de las especies con esterigmas biserialados, cuando los esterigmas primarios han alcanzado su máximo desarrollo, aparecen los secundarios. En algunas especies del grupo A. niger los esterigmas primarios aumentan su longitud incluso después de que se hayan formado los secundarios y hayan dado lugar a los conidios. En A. niger los esterigmas primarios pueden ser septados.

Cada célula conidiógena soporta una única cadena de conidios. Los esterigmas son normalmente característicos en forma y tamaño, pero de cara a la identificación son más significativos los primarios. En la reciente clasificación del género Aspergillus (39), el esterigma primario recibe el nombre de métula y el secundario de esterigma, siendo esta nueva nomenclatura la adoptada en la presente memoria.

CONIDIO . - En la mayoría de las especies del género Aspergillus los conidios son uninucleados y de ellos más que considerar medidas exactas, debe anotarse un rango de tamaños. El color de las paredes de los conidios es un dato significativo ya que determina el color de la cabeza conidial. Puede aparecer más o menos difuso en un conidio liso o condensado entre las paredes externas e internas originando ornamentaciones típicas. Este último carácter es importante en algunas especies de A. niger.

ASCOSPORAS , ASCAS Y CLEISTOTECIO . - La existencia de un estado ascospórico ha sido descrito en algunas especies del grupo A. fumigatus, y en otros grupos del género Aspergillus . Las ascosporas o esporas sexuales en estado de madurez presentan la forma de una lente biconvexa y su tamaño y características externas son criterios esenciales para la clasificación. Las ascosporas se reúnen generalmente en número de ocho, originando las ascas, que a su vez pueden agruparse dando lugar a unas estructuras conocidas con el nombre de cleistotecios.

CELULAS DE HULLE .- Las células de Hülle son estructuras especializadas de tamaño y forma característica, cuya función se desconoce y aparecen en ciertos grupos del género Aspergillus .

ESCLEROCIO .- El esclerocio es un conjunto de células de pared gruesa, de tamaño y forma característica que aparecen regularmente en algunos miembros de los grupos A.niger, A.candidus, A. flavus y A. ochraceus . La producción de esclerocio se favorece con una concentración elevada de nitratos y sacarosa (pero no glucosa o lactosa) y una temperatura óptima de crecimiento.(20-25°C). Su presencia o ausencia no puede considerarse un criterio eficaz de diagnóstico.

Las características hasta ahora mencionadas se observan en la figura 1.

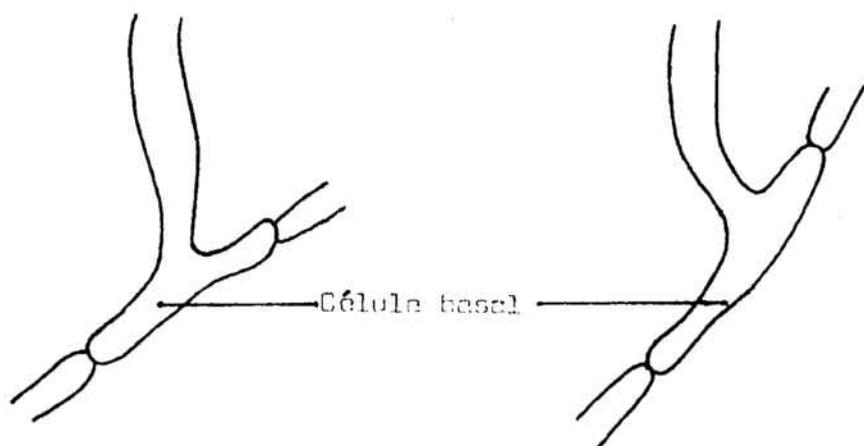
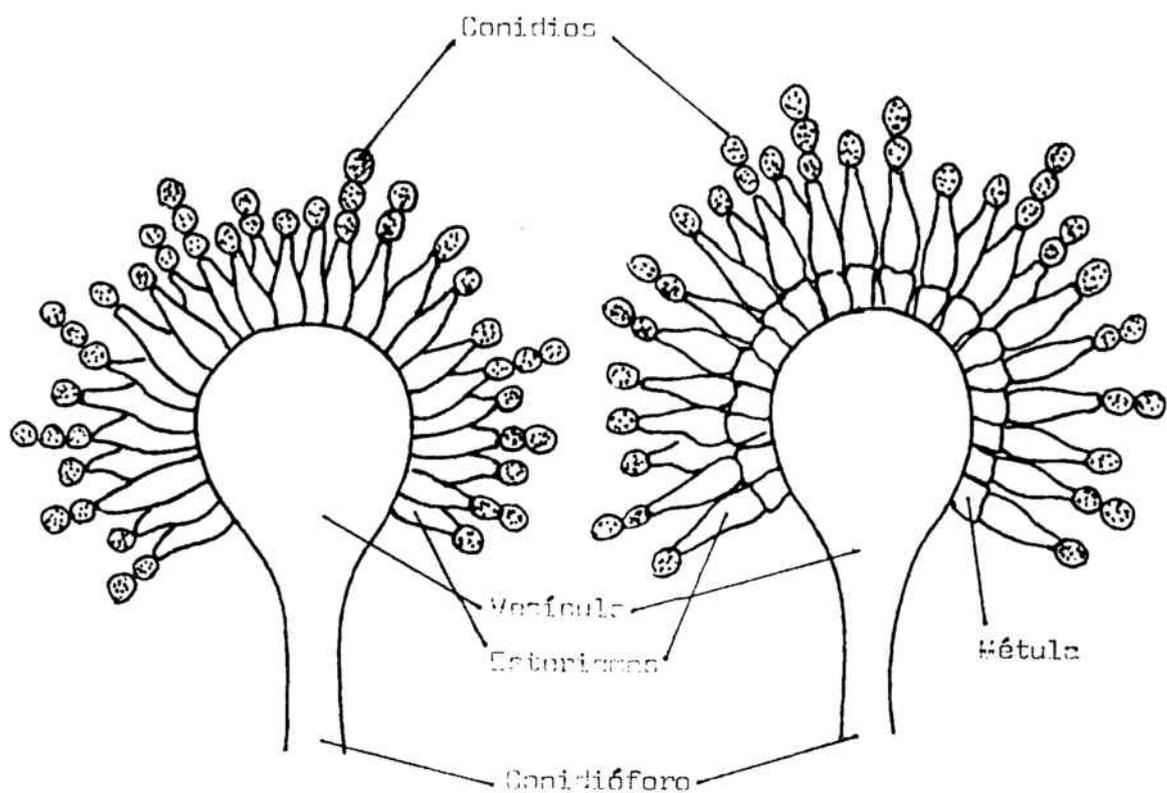


FIGURA 1. Esquema de los elementos microscópicos del género Aspergillus

Para una correcta identificación de las cepas del género Aspergillus hasta el nivel especie, Raper y Fennell (102) consideran las siguientes características :

Nº o designación.		Procedencia
Medio de cultivo.	Temperatura.	Tiempo de incubación

Características de la colonia

Velocidad de crecimiento

Forma de crecimiento

Color y textura

Micelio basal

Micelio superficial

Abundancia relativa de las cabezas conidiales, esclerocio y cleistotecio

Color del reverso

Estado conidial

Cabezas conidiales :

Forma de nacimiento

Color

Forma

Dimensiones

Vesícula :

Forma

Dimensiones

Color

Area fértil

Métula :

Desarrollo
Dimensiones
Color

Esterigma :

Desarrollo
Dimensiones
Color

Conidióforo :

Longitud
Diámetro
Características de la pared

Conidio :

Dimensiones
Características de la pared
Color

Células de Hülle y otros elementos de las hifas:

Forma
Dimensiones

Esclerocio y estructuras relacionadas :

Forma y estructura
Dimensiones
Color

Estado ascospórico

Cleistotecio :

Origen
Forma y estructura
Cantidad presente y Dimensiones
Color

Ascas :

Forma

Dimensiones

Ascosporas :

Forma

Dimensiones

Color.

1.3 . GRUPOS DEL GENERO ASPERGILLUS

Las cepas del género Aspergillus se clasifican primariamente atendiendo a sus características morfológicas en los siguientes grupos que incluyen varias especies :

A. clavatus , A.glaucus , A. ornatus , A. cervinus ,
A. restrictus , A. fumigatus , A. ochraceus , A. niger ,
A. candidus , A. flavus , A. wentii , A. cremeus , A.sparsus,
A. versicolor , A. nidulans , A. ustus , A. flavipes y
A. terreus .

De todos ellos centraremos nuestro estudio en los grupos A. niger y A. fumigatus, cuyas características diferenciales se detallan a continuación.

Grupo Aspergillus niger :

Las especies de este grupo se distinguen por poseer cabezas conidiales de tonalidades marrón oscuro o negruzcas, globosas, radiadas o formando columnas irregulares o

bien definidas. Los conidióforos son hialinos o marrones, típicamente lisos, pero en algunas especies son granulados o punteados. Normalmente posee paredes gruesas pero pueden también ser delgadas, dividiéndose longitudinalmente cuando están aglomerados.

Las vesículas son globosas, hialinas o coloreadas de marrón oscuro o claro. Pueden presentar mótulas y esterigma o solo esterigmas según las especies, a menudo muy coloreadas o incluso llenas de pigmento.

Los conidios son globosos, subglobosos, elípticos o horizontalmente aplanados. Lisos, equinulados, verrucosos o con estrías longitudinales.

Los esclerocios son de aspecto globoso o subgloboso, de color crema cuando son jóvenes y tostados o gris-marrón al madurar.

Las especies pertenecientes al grupo A. niger se clasifican en dos grandes apartados atendiendo al tipo de células conidiógenas, que como ya se ha indicado anteriormente pueden ser mótulas y esterigmas o sólo esterigmas.

Con mótula y esterigma se incluyen las especies siguientes : A. carbonarius , A. ficuum , A. phoenicis , A. niger , A. pulverulentus , A. tubingensis , A. awamori , A. flavofurcatis , A. ellipticus , A. heteromorphus , A. foetidus.

Careciendo de mótula se consideran dos especies :

A. japonicus , A. aculeatus.

Grupo Aspergillus fumigatus :

Las especies de este grupo se diferencian por poseer cabezas conidiales típicamente columnares y a menudo compactas. Su coloración varía desde verde-azul al verde-oscuro.

Vesículas en forma de matraz y fértiles en la mitad o las tres cuartas partes de su superficie. Presentan normalmente coloración verdosa. Los esterigmas son muy numerosos y a menudo pigmentados como las vesículas.

Los conidióforos son de pared lisa y generalmente de color verdosa, principalmente en el área terminal. Los conidios son globosos o subglobosos, equinulados y raramente elípticos.

En algunas especies aparece cleistotecio, que al principio es de color blanco o crema y con el tiempo pasa a anaranjado. Las ascosporas carecen de coloración. Son bivalvas con crestas ecuatoriales y las superficies convexas están diversamente ornamentadas .

La mayoría de las especies se desarrollan óptimamente a 37° C , pero algunas pueden presentar una amplia gama de termofilia.

El grupo A. fumigatus se divide en dos series atendiendo a la aparición de cleistotecio y ascosporas (serie

A. fischeri) o a su ausencia (serie A. fumigatus). En la serie A. fischeri se encuentran clasificadas las siguientes especies :

A. fischeri , A. fischeri var. glaber , A. fischeri var. spinosus , A. quadricinctus , A. aureolus , A. stramenius , A. auratus .

En la serie A. fumigatus consideramos las especies siguientes : A. fumigatus , A. fumigatus var. ellipticus , A. unilateralis , A. viridi-nutans , A. duricaulis , A. brevipes.

1.4. ECOLOGIA E IMPORTANCIA CLINICA

La capacidad que poseen las cepas del género Aspergillus para crecer en distintos tipos de sustrato bajo una amplia gama de condiciones ambientales (5, 23, 102), ha hecho posible que alguna de ellas pueda colonizar tejidos animales vivos y muertos. La invasión de tejidos vivos es responsable de varios tipos de enfermedades en el hombre y en animales de sangre fría y caliente, pero este parasitismo debe considerarse siempre accidental en su ciclo saprofito normal en la naturaleza, lo que incluye germinación de conidios (11,80), colonización de sustratos (15, 17, 23, 102, 116) fructificación y diseminación por el aire (14, 16, 18, 19, 79, 80, 102, 111).

Ni la producción de metabolitos tóxicos para animales

cuando son ingeridos, o alérgicos cuando se inhalan (14, 23, 48, 52, 102, 108), ni la colonización en el huésped (23, 102) son esenciales para la supervivencia de las especies.

Las enfermedades que desencadenan son de diversa índole, y de considerable importancia tanto médica como veterinaria.

En relación con los dos grupos del género Aspergillus estudiados, podemos destacar la importancia del grupo A.niger como agente etiológico de otomicosis, principalmente (23, 102).

Desde el punto de vista clínico es indudable la importancia del grupo A. fumigatus como productor de numerosas afecciones localizadas fundamentalmente en el aparato respiratorio (23, 33, 40, 58, 68, 69, 70, 76, 102) . Generalmente se encuentra como saprófito en las cavidades residuales de los pulmones, produciendo una aspergilosis secundaria. Rara vez invade los tejidos, aprovechando para la infestación una disminución de las defensas del organismo producida tras una enfermedad debilitante, tratamientos prolongados con antibióticos, antimitóticos o corticoides.

Junta a estas afecciones de tipo sistémico, se ha demostrado la capacidad por parte de varias especies de estos dos grupos, de desencadenar procesos alérgicos, como consecuencia de la inhalación o contacto con los conidios

y fragmentos de hifas (14, 20, 23, 102, 108). Del mismo modo, algunas especies del grupo A. fumigatus son agentes desencadenantes de la fiebre del heno, asma y aspergilosis broncopulmonar alérgica (14, 23, 68, 69, 70, 82). También se ha descrito como agente causal de mastitis bovina (37, 104).

1.5. CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y CAPACIDAD INHIBIDORA DEL CRECIMIENTO DE OTROS MICROORGANISMOS

Durante los últimos años se han realizado numerosas investigaciones con el fin de poner de manifiesto las características bioquímicas de diversos hongos, demostrándose su capacidad de elaborar un gran número de metabolitos secundarios útiles para el hombre (2, 109). Entre los diversos estudios citados en la bibliografía podemos destacar aquellos destinados a evidenciar la producción o presencia de determinados enzimas: producción de celulasas, especialmente en Trichoderma viride (9, 86, 87, 88, 109, 114, 115) y en otros muchos hongos imperfectos (22, 26, 49, 94, 98, 102, 109, 121), capacidad de hidrolizar la urea (8, 45, 102, 105, 124), producción del enzima fosfatasa (22, 24, 45) , capacidad pectolítica (22, 35, 45, 51, 57, 74, 81, 89, 102, 109, 120), DNAsica (45, 105), RNAsica (22, 45), proteolítica (22, 60, 61, 74, 81, 102, 109, 120), lipolítica (29, 45, 55, 57, 90, 91, 102, 109, 119), amilolítica (26, 45, 101, 102, 106, 109, 119), catalasa (21, 109), peroxidasa (21, 73) y galactosidasa (107).

Es sobradamente conocido el importante papel que han desempeñado los hongos en el avance de la quimioterapia desde que en 1929, como mencionan Stanier y colaboradores en su tratado (113), Fleming observó la inhibición del crecimiento de las bacterias en la proximidad de las colonias de Penicillium notatum . Este descubrimiento representó el nacimiento de una nueva industria basada en el uso de los microorganismos para la síntesis de agentes quimioterápicos.

Debido a la resistencia que adquieren los microorganismos por el uso indiscriminado de estas sustancias antimicrobianas no ha cesado el interés de los investigadores en la búsqueda de nuevos metabolitos capaces de inhibir el desarrollo de otros microorganismos, tal como demuestran recientes estudios (4, 10, 33, 41, 44, 50, 54, 66, 72, 85, 93, 99, 100, 118, 123) .

2 . O B J E T O E I N T E R E S

Uno de los capítulos más discutidos en el campo de la Micología es la Taxonomía de los Hongos Imperfectos. Al intentar clasificar las cepas de los hongos filamentosos, los investigadores centran sus estudios en la observación de las características macroscópicas y microscópicas que presentan las colonias al desarrollarse en medios de cultivo artificiales, por lo que pueden sufrir alteraciones diversas, existiendo la posibilidad de que los caracteres anotados sean poco objetivos.

En el intento de facilitar la identificación de las diversas especies del género Aspergillus incluidos en dos de los grupos establecidos por Raper y Fennell (102) , a saber Aspergillus fumigatus y Aspergillus niger, se ha llevado a cabo la completa caracterización de 50 cepas de cada uno de los dos grupos desde el punto de vista taxonómico y bioquímico, estableciendo diferencias no sólo a nivel macroscópico y microscópico, sino también desde el punto de vista enzimático y de vías metabólicas que facilite la identificación de las especies y colabore a un mejor estudio de los hongos filamentosos.

Debido a la notable incidencia, plenamente demostrada de las especies constituyentes de los grupos A. niger y A. fumigatus en los más diversos hábitats, y su relación con la posible aparición de afecciones clínicas en el

hombre y en los animales, consideramos de interés centrar nuestra investigación en los dos grupos anteriormente citados.

3. PLAN DE TRABAJO .

- Selección de las cepas

- Clasificación y estudio taxonómico de las cepas del grupo Aspergillus niger.

- Clasificación y estudio taxonómico de las cepas del grupo Aspergillus fumigatus.

- Realización de pruebas enzimáticas.

- Realización de otras pruebas bioquímicas.

- Estudio de la producción de sustancias inhibitoras.

- Lectura y tabulación de los resultados obtenidos.

4 . M A T E R I A L Y M E T O D O S

4.1 MATERIAL

Se han estudiado las características de 50 cepas correspondientes al grupo Aspergillus niger, y de 50 cepas del grupo Aspergillus fumigatus .

La procedencia de cada una de las cepas se detalla en el medio siguiente.

PROCEDENCIA	Nº CEPAS A. NIGER	Nº CEPAS A. FUMIGATUS
ALIMENTOS	9	14
EXCIPIENTES FARMACEUTICOS	3	5
SUELOS	7	--
CLINICA	2	9
ATMOSFERA	29	22
	TOTAL 50	TOTAL 50

Tabla Nº 1 .- Distribución de las cepas estudiadas según su procedencia.

4.2 MÉTODOS

4.2.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

4.2.1.1. Método para la clasificación hasta nivel de género.

Una vez desarrolladas las colonias se separa un pequeño fragmento con dos agujas estériles y se sitúa sobre un portaobjetos.

Posteriormente se procede a fraccionarlo con ayuda de las agujas y se coloca en un tubo de ensayo que contiene 1 cc. de una dilución al 0.01 % de Tween 80. Se separan las esporas sometiendo la suspensión a la acción de un agitador para poder observar con claridad las características del conidióforo del género a estudiar. A continuación se pasa la suspensión a un vidrio de reloj y se realiza la preparación entre portaobjetos y cubreobjetos.

Puede añadirse una gota de lactofenol, para una mejor observación al microscopio.

Con el estudio de las características observadas a partir de las preparaciones así realizadas y las que presentan las colonias macroscópicamente se lleva a cabo su inclusión en un determinado género.

4.2.1.2. Microcultivos.

Para lograr la clasificación hasta género de algunas cepas que no han podido ser identificadas por la observación directa al microscopio de las colonias desarrolladas según la técnica descrita en el apartado 4.2.1.1. se utilizan los denominados microcultivos.

En una placa de Petri estéril se sitúa un tubo doblado en forma de uve, sobre el que se coloca un portaobjetos y sobre éste se deposita una fina capa de medio de cultivo. La siembra se lleva a cabo a partir de un cultivo puro realizando una fina estría sobre el portaobjetos.

Se mantienen las condiciones de humedad adecuadas, colocando unas gotas de glicerol al 30 % estéril en la placa y empapando con él un papel de filtro previamente esterilizado.

La incubación se realiza a 27° C durante 2-3 días , transcurridos los cuales se observa al microscopio. A bajos aumentos este método permite conocer la forma típica de crecimiento de los hongos, y seguir su desarrollo en el medio de cultivo. Para visualizarlo a mayor aumento se coloca sobre el cultivo un portaobjetos procurando no alterar las estructuras.

4.2.1.3. Método para la clasificación hasta nivel especie.

Una vez conocido el género al que pertenecen las cepas aisladas y conservadas en cultivos puros, se procede a su clasificación hasta nivel especie.

Se realiza una suspensión de un pequeño fragmento de la colonia en 1 cc. de Tween 80 al 0.01 %, y se somete a la acción de un agitador durante 15 minutos, con el fin de separar las esporas. A continuación se lleva a cabo la siembra en una placa de Petri que contiene un medio de cultivo adecuado. Con un asa de platino humedecida con la suspensión se dibujan los vértices de un triángulo equilátero, sobre la placa.

Posteriormente se incuban las placas a 26° C durante 10-12 días.

4.2.2 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

4.2.2.1 Reacciones enzimáticas

Método semicuantitativo

Con el fin de conseguir una mejor caracterización de las especies estudiadas, se ha realizado la investigación de sus actividades enzimáticas.

La técnica utilizada es un micrométodo semicuantitativo que permite determinar diecinueve enzimas. Se basa en facilitar el desarrollo de la especie investigada sobre los sustratos adecuados a los que se ha enlazado un radical naftol (α -naftol, β -naftol y naftilamina).

Si el enzima estudiado ha sido elaborado por el microorganismo, se liberan los radicales naftol. Este fenómeno puede al añadir los reactivos, ya que se produce una reacción colorimétrica.

El método empleado consiste en preparar una suspensión densa de un cultivo reciente de la especie en estudio que se adiciona a 20 microtubos de la galería API ZYM^R (5) conteniendo cada uno de ellos un sustrato distinto que permitirá determinar la capacidad enzimática y manteniendo un tubo control como referencia colorimétrica.

Preparada la galería, se incuba durante 4-5 horas a 28° C y transcurrido este tiempo se procede a la lectura de las reacciones. Para ello se añaden 2 gotas del reactivo A y 2 del reactivo B, cuya composición se describe en el apartado 4.3.4. Transcurridos 5 minutos se procede a la lectura del color desarrollado, comparándolo con una escala colorimétrica que corresponde a las concentraciones expresadas en nanomoles de los enzimas presentes.

La relación de los enzimas y sustratos ensayados se detallan a continuación.

Nº	ENZIMA ENSAYADO	SUSTRATO
1	Fosfatasa alcalina	2-naftil-fosfato
2	Esterasa	2-naftil-butilato
3	Esterasa Lipasa	2-naftilcaprilato
4	Lipasa	2-naftilmiristato
5	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida
6	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida
7	Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida
8	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
9	Quimiotripsina	N-glutaril-fenil-alanina-2-naftilamida
10	Fosfatasa ácida	2-naftil-fosfato
11	Fosfamidasa	Naftol-AS-BI-fosfodiamida
12	α -galactosidasa	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosido
13	β -galactosidasa	2-naftil- β D-galactopiranosido
14	β -glucuronidasa	Naftol-AS-BI- β D-glucuronato
15	α -glucosidasa	2-naftil- α D-glucopiranosido.
16	β -glucosidasa	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosido
17	N-acetil β -glucosaminidasa	1-Naftil-N-acetil- β D-glucosaminido
18	α -manosidasa	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosido
19	α -fucosidasa	2-Naftil- α L-fucopiranosido
20	Control	

Método cualitativo

Las siglas utilizadas corresponden a los siguientes conceptos:

- Mc : Medio de cultivo
- Fd : Fundamento
- Tc : Técnica
- Rc : Reactivo
- Lc : Lectura

Actividad Pectolítica

- Mc.- Medio de Hankin, Zucker y Sands (46) a pH 5 o pH 7.
- Fd.- A pH 7 se detecta la producción de pectatoliasa (pectato transeliminasa (53)) .
A pH 5 se detecta la actividad poligalacturonasa (pectina depolimerasa, pectinasa (53)).
- Tc.- Sembrar las placas e incubar de 3 a 5 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Solución acuosa al 1% de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio.
- Lc.- Inundar las placas con el reactivo. Aparecen zonas claras alrededor de la colonia, y el resto del medio permanece opaco, indicando la degradación de la pectina.

Actividad amilolítica

- Mc.- Agar nutritivo adicionado de un 0.2 % de almidón soluble (45).
- Fd.- Producción de enzimas amilolíticas.
- Tc.- Sembrar las placas e incubar de 3 a 5 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Lugol.
- Lc.- Inundar las placas con lugol. Si existe producción de enzimas amilolíticos aparecerá una zona amarilla alrededor de la colonia, y el resto del cultivo azul oscuro.

Actividad Lipolítica

- Mc.- Medio de Sierra (107).
- Fd.- Producción de enzimas lipolíticas.
- Tc.- Sembrar las placas e incubar de 3 a 5 días a la temperatura adecuada.
- Lc.- La producción de enzimas lipolíticos se observa al producirse un precipitado visible debido a la formación de cristales de sal cálcica del ácido Láurico liberado por el enzima, o bien una zona clara, y el precipitado alrededor de la colonia debido a la completa degradación de la sal del ácido graso.

Actividad Proteolítica

- Mc.- Agar nutritivo adicionado de un 0.4 % de gelatina (45).
- Fd.- Producción de enzimas proteolíticas.
- Tc.- Se siembran las placas y se incuban de 3 a 5 días a la temperatura adecuada.
- Lc.- En caso positivo aparecen zonas claras alrededor de la colonia y el resto del medio permanece opaco. Si se añade una solución de Sulfato amónico saturada, se produce un precipitado que permite visualizar mejor la zona clara alrededor de la colonia.

Actividad DNAsica

- Mc.- Agar DNAsa (92).
- Fd.- Producción de enzimas capaces de degradar el DNA.
- Tc.- Sembrar las placas e incubar de 3 a 5 días a la Temperatura adecuada.
- Rc.- Solución de H Cl 1N.
- Lc.- Se inundan las placas con el reactivo y se observa una zona más clara alrededor de la colonia, y el resto del medio permanece opaco.

Producción de Fosfatasa

- Mc.- Agar "Plate Count" adicionado de 2 ml de difosfato de fenolftaleina 0.01 M (7).
- Fd.- Producción de Fosfatasa.
- Tc.- Se siembran las placas y se incuban de 3 a 5 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Hidróxido amónico.
- Lc.- Las placas se invierten sobre un recipiente que contiene hidróxido amónico. Si las colonias enrojecen , indicará una degradación del sustrato.

Producción de Ureasa

- Mc.- Agar-urea según Christensen adicionado de una solución de urea al 40 % (74).
- Fd.- Producción de ureasa.
- Tc.- Se siembran los tubos y se incuban de 5 a 7 días a la temperatura adecuada.
- Lc.- La ureasa es capaz de hidrolizar la urea, produciendo dióxido de Carbono y amoníaco. El amoníaco confiere reacción alcalina al medio, por lo que en caso positivo, observamos un viraje de amarillo a rojo púrpura.

Producción de Catalasa

- Mc.- Agar extracto de Malta al 2 % (102).
- Fd. Producción del enzima catalasa.
- Tc.- Sembrar los tubos e incubar a la temperatura adecuada durante 7 días.
- Rc.- Agua Oxigenada (concentración de 10 volúmenes).
- Lc.- Se vierte 1 ml de agua oxigenada en la superficie del cultivo. La catalasa descompone el agua oxigenada en agua y oxígeno, por lo que en caso positivo se observará efervescencia, producida por el oxígeno liberado.

4.2.2.2. Otras pruebas Bioquímicas.

Producción de Amoníaco

- Mc.- Agua de peptona (47).
- Fd.- Producción de amoníaco a partir de peptona.
- Tc.- Se siembra un tubo de agua de peptona y se incuba junto con un tubo control a la temperatura óptima durante un periodo de 2 a 7 días.
- Rc.- Reactivo de Nessler.
- Lc.- Se añade 1 ml. de cultivo a 1 ml. de reactivo de Nessler en un tubo limpio. La aparición de un color entre anaranjado y marrón indica la presencia de amoníaco.

El tubo sin sembrar, que sirve de testigo, se debe ensayar al mismo tiempo, y debe adquirir un color amarillo pálido o permanecer incoloro.

Producción de SH_2 y degradación de los azúcares.

Mc.- Agar-hierro-tres azúcares (75).

Fd.- Degradación de los azúcares con formación de ácido y formación de SH_2 .

Tc.- Se siembra tanto en la superficie inclinada, por estría, como también en el mismo medio de cultivo por picadura en la parte columnar.

Se incuba a la temperatura óptima durante un periodo de hasta 7 días.

Lc.- Si se forma SH_2 , se produce un ennegrecimiento del medio. La degradación de azúcar con formación de ácido se comprueba por un viraje del indicador Rojo de fenol del medio de cultivo hasta amarillo.

La degradación de glucosa a ácido produce cambio de color sólo en la parte columnar del medio de cultivo.

Si se degrada lactosa y sacarosa, se produce un viraje tanto en la parte columnar como en la superficie inclinada del agar.

Una formación de cavidades y grietas en el medio de cultivo se considera signo de formación de gas en la degradación de azúcar.

Reducción de Nitratos

- Mc.- Agua de peptona-nitrato. (47)
- Fd.- Reducción de los nitratos a nitritos.
- Tc.- Sembrar el tubo e incubar a la temperatura óptima junto con un tubo control durante un periodo de 2 a 7 días.
- Rc.- Reactivos de Griess-Ilosvay.
- Lc.- Se añade al cultivo y al control 1 ml. de cada uno de los dos reactivos. La presencia de nitrito se manifiesta al formarse un color rojo en pocos minutos. El tubo testigo deberá presentar poca o ninguna coloración. Si se produce un resultado negativo, debe confirmarse añadiendo al tubo una pulgarada de polvo de Zinc, que reducirá a nitrito cualquier residuo de nitrato. Si no se produce ningún cambio de color, esto significa que no queda nitrato al haber sido reducido éste más allá del estado de nitrito. La presencia de gas en el tubo de Durham indica la formación de Nitrogeno gas.

Diferenciación entre la oxidación y la fermentación de Carbohidratos.

Mc.- Medio de Hugh y Leifson (75).

Fd.- Reconocimiento del metabolismo oxidativo o fermentativo de los microorganismos en el proceso de degradación de carbohidratos.

Tc.- Se siembran por picadura dos tubos de medio por cada carbohidrato y se tapa uno de los tubos con agar estéril. Se incuba a la Temperatura óptima de crecimiento durante un período de hasta 14 días.

Lc.- La producción de ácido se aprecia mediante un cambio de color en el medio, que pasa de verde a amarillo. La coloración amarilla tanto en los tubos "abiertos" como en los protegidos por la capa de agar significa degradación fermentativa, mientras que la coloración amarilla únicamente en los tubos "abiertos" se interpreta como degradación oxidativa del carbohidrato añadido.

Producción de Indol

Mc.- Agua de peptona (47).

Fd.- Producción de Indola partir de triptófano.

Tc.- Se siembra como si se tratara de un caldo nutritivo, y se incuba a la temperatura óptima durante un período de 2 a 7 días.

Rc.- Reactivo de Kovacs.

Lc.- Se añaden 0.5 ml. del reactivo de Kovacs, se agita suavemente el tubo y se deja reposar. En presencia de indol se produce un anillo de color rojo intenso.

Prueba del Rojo Metilo

Mc.- Caldo Glucosa-fosfato (47).

Fd.- Producción de ácido a partir de la glucosa.

Tc.- Inocular e incubar a la temperatura óptima durante 2 a 7 días.

Rc.- Solución de Rojo de Metilo.

Lc.- Se añaden unas gotas del indicador a 5 ml. del cultivo. Si el medio toma color rojo, la reacción es positiva, lo que indica un pH de 4,5 o menos. En caso contrario aparecerá un color amarillo.

Prueba de Voges-Proskauer

Mc.- Caldo Glucosa-Fosfato (47).

Fd.- Producción de Acetil-metil-carbinol a partir de glucosa.

Tc.- Inocular e incubar a la temperatura óptima de crecimiento durante un periodo de 2 a 7 días.

Rc.- Solución de KOH al 40 % y α -naftol.

Lc.- Añadir 0.5 ml. de KOH al 40 % y 0.5 ml. de α -naftol. En caso positivo se forma un anillo rojo a los 15'.

Prueba del Citrato

- Mc.- Citrato de Simmons (75).
- Fd.- Utilización del citrato como única fuente de Carbono.
- Tc.- El medio inclinado se siembra en superficie. Se incuba a la temperatura óptima de crecimiento durante un período de hasta 7 días.
- Lc.- La utilización del citrato, y el crecimiento sobre el agar-citrato, producen una reacción alcalina y el indicador de azul de bromotimol cambia su color verde por un azul fuerte. Si no hay crecimiento y no se utiliza citrato, no se producen cambios de color.

Utilización de glucosa

- Mc.- Medio para Fermentaciones (65).
- Fd.- Producción de ácido a partir de la glucosa.
- Tc.- Sembrar los tubos e incubar 5-7 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Solución de Rojo de Metilo.
- Lc.- Añadir unas gotas de Rojo de Metilo, y en caso positivo aparecerá color rojo, indicando un pH de 4,5 o menos. En caso negativo, aparecerá color amarillo. La producción de gas se observará en las campanas de Durham.

Utilización de Galactosa

- Mc.- Medio para fermentaciones (65).
- Fd.- Producción de ácido a partir de galactosa.
- Tc.- Sembrar los tubos e incubar 5-7 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Solución de Rojo de Metilo.
- Lc.- Añadir unas gotas de Rojo de Metilo y en caso positivo aparecerá color rojo, indicando un pH de 4.5 o inferior. En caso negativo aparecerá color amarillo. La producción de gas se observará en las campanas de Durham.

Utilización de Maltosa

- Mc.- Medio para fermentaciones (65).
- Fd.- Producción de ácido a partir de maltosa.
- Tc.- Sembrar los tubos e incubar 5-7 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Solución de Rojo de Metilo.
- Lc.- Añadir unas gotas de Rojo de Metilo, y en caso positivo aparecerá color rojo, indicando un pH de 4,5 o inferior. En caso negativo aparecerá color amarillo. La producción de gas se observará en las campanas de Durham.

Utilización de Lactosa

- Mc.- Medio para fermentaciones (65).
- Fd.- Producción de ácido a partir de lactosa.
- Tc.- Sembrar los tubos e incubar 5-7 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Solución de Rojo de Metilo.
- Lc.- Añadir unas gotas de Rojo de Metilo, y en caso positivo aparecerá color rojo, indicando un pH de 4.5 o inferior. En caso negativo aparecerá color amarillo. La producción de gas se observará en las campanas de Durham.

Utilización de Sacarosa

- Mc.- Medio para fermentaciones (65).
- Fd.- Producción de ácido a partir de sacarosa.
- Tc.- Sembrar los tubos e incubar 5-7 días a la temperatura adecuada.
- Rc.- Solución de Rojo de Metilo.
- Lc.- Añadir unas gotas de Rojo de Metilo, y en caso positivo aparecerá color rojo, indicando un pH de 4.5 o inferior. En caso negativo aparecerá color amarillo. La producción de gas se observará en las campanas de Durham.

4.2.3 PRODUCCION DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS

Con el fin de poder poner de manifiesto la producción de sustancias inhibitoras, se ha utilizado el Método de Wickerham.

Este ensayo ha sido descrito (103) con el fin de observar la producción de antibióticos por distintas cepas del género Penicillium y otros saprófitos,

En una placa de Petri que contiene 20 ml. del Medio de Wickerham (103), cuya composición se detalla en el apartado correspondiente, se siembra a modo de inoculo una línea vertical de la cepa estudiada. Se incuba a 28° C durante 48 horas, y una vez transcurrido este tiempo se siembran los microorganismos a ensayar perpendicularmente a la cepa del género Aspergillus ya desarrollada. En nuestro caso, hemos elegido cuatro microorganismos, cuya importancia en clínica es sobradamente manifiesta. Dos Gram negativos (Escherichia coli y Serratia marcescens), un Gram positivo (Staphylococcus aureus) y una levadura (Candida albicans).

Una vez sembrados se incuban las placas a 37° C. La lectura se realiza a las 24 horas $\frac{1}{2}$ 2 horas.

Si la cepa del género Aspergillus ensayada ha sido capaz de elaborar sustancias activas inhibitoras de crecimiento de estas bacterias y levadura, observaremos que el microorganismo en cuestión inicia su crecimiento más allá del punto del inóculo.

4.3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS UTILIZADOS

4.3.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA LA CARACTERIZACION MORFOLOGICA.

Agar Extracto de Malta al 2 % (102)

Glucosa	20.0 g
Peptona	1.0 g
Extracto de Malta	20.0 g
Agar	25.0 g
Agua destilada	1 l.

pH = 5.4

Se disuelven todos los componentes en el agua destilada, calentando a ebullición hasta disolución completa.

Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Agar Czapek- Dox (102)

NO ₃ Na	3.0 g
Cl K	0.5 g
Mg SO ₄ · 7 H ₂ O	0.5 g
Fe SO ₄ · 7 H ₂ O	0.01 g
PO ₄ HK ₂	1.0 g
Sacarosa	30.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 l.

pH = 7.3

Los ingredientes se disuelven en el agua destilada, calentando hasta disolución completa.

Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

4.3.2 MEDIOS DE CULTIVO PARA LA CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA.

- Medio de Cultivo para detectar la actividad pectolítica -
Medio de Hankin, Zucker y Sands (46)

Extracto de levadura	1.0 g
Pectina.....	5.0 g
Solución de sales *	500 ml.
Agar	15.0 g
Agua destilada	500 ml.

pH = 7

Se disuelven todos los componentes y se esterilizan en autoclave 15 minutos a 121° C.

Solución de sales *

$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$	2.0 g
$\text{PO}_4 \text{H}_2 \text{K}$	4.0 g
$\text{PO}_4 \text{HNa}_2$	6.0 g
$\text{SO}_4 \text{Fe} \cdot 7 \text{H}_2 \text{O}$	0.2 g
$\text{Cl}_2 \text{Ca}$	1 mg
$\text{H}_3 \text{BO}_3$	10 ug
Mn SO_4	10 ug
Zn SO_4	70 ug
Cu SO_4	50 ug
Mo O_3	10 ug
Agua destilada.....	1 l.

pH = 7 o pH= 5

- Medio para detectar la actividad amilolítica (45)-

Se disuelven 0.2 gramos de almidón soluble en 100 ml. de Agar nutritivo *, y se esteriliza en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. El pH de la solución final ha de ser 6.

* Agar nutritivo (34)

Extracto de carne 1.0 g
Extracto de levadura 2.0 g
Peptona 5.0 g
Cl Na 5.0 g
Agar-agar 15.0 g
Agua destilada..... 1 l.

pH = 7,4

Se disuelven los ingredientes en el agua, calentando a ebullición. Se ajusta el pH y se esteriliza a 121° C durante 15 minutos.

- Medio para detectar la actividad lipolítica -
Medio de Sierra (107)

Peptona10.0 g
Cl Na 5.0 g
Ca Cl₂ · 2 H₂O..... 0.1 g
Agar 20.0 g
Agua destilada.... 1 l.

pH = 6

El medio se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Antes de verberlo en las placas se le añade una solución de Tween 20 (Monolaurato de Sorbitan) previamente esterilizado y en la proporción de 1 ml. por 100 ml. de medio base.

- Medio de cultivo para detectar la actividad proteolítica -

Se prepara una solución de gelatina al 8 % que se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente se añade al agar estéril en la proporción de 5 ml por cada 100 ml de medio. El pH final debe ser de 6.

- Medio de cultivo para detectar la actividad DNAsica -

Agar DNAsa (Oxoid) (92)

Triptosa	20.0 g
ADN	2.0 g
Cl Na	5.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada.....	1 l.

pH = 7.3

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y calentar hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

- Medio de cultivo para la producción de Fosfatasa (7)-

Se preparan 96 ml de Agar "Plate Count" * (Difco) a pH 6, se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos y una vez enfriado se le añaden 2 ml de difosfato de fenolftaleína 0.01 N , previamente esterilizado por filtración.

* Agar "Plate Count" (34)

Extracto de levadura	2.5 g
Triptona	5.0 g
Glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 l.

pH = 7

Se ñaden los ingredientes al agua destilada y se calienta hasta ebullición para disolver el medio por completo. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

- Medio de cultivo para la producción de Ureasa -

Agar urea según Christensen (basal) (75)

Peptona especial	1.0 g
D (+)- Glucosa	1.0 g
Cl Na	5.0 g
PO ₄ H ₂ K	2.0 g
Rojo de fenol	0.012 g
Agar-agar	12.0 g

pH = 6.9

21 gramos del producto se suspenden en 250 ml de agua destilada y se dejan remojar 15 minutos. A continuación, se hierve hasta solución total. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Antes de su empleo se añaden al medio de cultivo fundido y enfriado hasta unos 55° C, bajo condiciones estériles, 50 ml de una solución de urea al 40 % esterilizada por filtración y se mezcla. Se distribuye en tubos el medio de cultivo, y se deja solidificar en posición inclinada.

Caldo nutritivo (47)

Extracto de carne 3.0 g
Peptona10.0 g
Cl Na 5.0 g
Agua destilada 1 l.

pH = 7.6

Se disuelven los ingredientes en el agua, se ajusta el pH y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Agua de peptona (47)

Peptona 10.0 g
Cl Na 5.0 g
Agua destilada ... 1 l.

pH = 7.2

Se añade la peptona y el cloruro sódico al agua destilada y se calienta hasta total disolución. Se ajusta el pH y se reparte en tubos de ensayo a razón de 5 ml por tubo. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Agar Hierro- tras azúcares (75) (TSI)

Extracto de carne	3.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Peptona de caseína	15.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Sacarosa	10.0 g
D (+)-Glucosa	1.0 g
Citrato amónico férrico	0.5 g
Cloruro sódico	5.0 g
Tiosulfato sódico	0.5 g
Rojo de fenol	0.024 g
Agrar-agar	12.0 g
Agua destilada	1 l.

pH = 7.4

Se disuelven los ingredientes en 1 litro de agua destilada y se hierven hasta solución completa. Se distribuye en tubos y se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Tras la esterilización se colocan los tubos en posición inclinada hasta la solidificación del medio de cultivo, de forma que se consiga una parte columnar de unos 3 cm de longitud, y sobre ella, una superficie inclinada de la misma longitud por lo menos.

Medio de cultivo de Hugh Leifson (75)

Peptona de caseína	2.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Cl Na	5.0 g
PO ₄ H K ₂	0.3 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar-agar	2.5 g
Agua destilada	1 l.

pH = 7.1

Se disuelven los ingredientes en el agua hirviendo. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Después de que se enfríe a unos 50° C, se añaden, bajo condiciones asépticas 10 ml de una solución acuosa al 10 % del carbohidrato que se ensaye por cada 100 ml de medio de cultivo basal. A continuación, bajo precauciones de esterilidad se distribuye en tubos y se deja solidificar en posición derecha.

Agua de Peptona Nitrato (47)

Nitrato potásico 0.2 g
Agua de peptona 1 l.

pH = 7.2

Se disuelve el nitrato potásico en el agua de peptona y se reparte a razón de 5 ml, en tubos de ensayo con campana de Durham. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Caldo Glucosa-Fosfato (47)

Peptona 5.0 g
D-glucosa 5.0 g
Fosfato dipotásico. 5.0 g
Agua destilada 1 l.

pH = 7.5

Se disuelven los ingredientes en el agua. Se ajusta el pH a 7.5 y se reparte a razón de 5 ml en tubos de ensayo. Se esteriliza en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Agar Citrato de Simmons (75)

Amonio dihidrogenofosfato	1.0 g
Hidrogenofosfato dipotásico	1.0 g
Cloruro sódico	5.0 g
Citrato sódico	2.0 g
Sulfato magnésico	0.2 g
Azul de bromotimol	0.03 g
Agar-agar	12.0 g
Agua destilada	1 l.

pH = 6.9

Los ingredientes se añaden al agua y se calientan lentamente hasta ebullición, agitando con frecuencia hasta solución total. La esterilización se efectúa en autoclave 15 minutos a 121° C. Se deja solidificar en posición inclinada.

Medio de cultivo para fermentaciones (65)

Carbohidrato	20.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Agua destilada	1 l.

Se disuelven los ingredientes en el agua, y se calienta hasta solución total. Se reparte en tubos de ensayo con campana de Durham y se esterilizan en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

4.3.3. MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE
SUSTANCIAS INHIBIDORAS.

Medio de Wickerham (103)

Extracto de levadura	2.00 g
Peptona	3.00 g
Glucosa	2.00 g
Sacarosa	30.00 g
"Corn-steep" conc.....	5.00 g
NO ₃ Na.....	2.00 g
PO ₄ H K ₂ · 3 H ₂ O	1.00 g
SO ₄ Mg	0.50 g
Cl K	0.20 g
SO ₄ Fe · 7H ₂ O	0.01 g
Agar	20.00 g
Agua destilada	1 l.

Disolver los ingredientes en el agua, y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

4.3.4. REACTIVOS UTILIZADOS

Lactofenol (47)

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

Se disuelve el fenol en agua, sin calentar y luego se añade el glicerol y el ácido láctico.

Lactofenol-Azul Algodón (47)

Solución saturada de azul algodón 10 ml
Glicerina 10 ml
Agua 80 ml

Mezclar esta solución con lactofenol a partes iguales.

- Reactivos utilizados en el método semicuantitativo de determinación enzimática (Reactivos A y B) -

Reactivo A

Tris (hidroximetil)aminometano 250 g
Acido clorhídrico al 37 % 110 ml
Laurilsulfato 100 g
Agua destilada 1000 ml

pH = 7,6-7,8

Reactivo B

"Fast Blue BB " 3.5 g
2-metoxietanol 1000 ml

Reactivo de lugol (47)

Yodo 1 g
Yoduro potásico..... 2 g
Agua destilada..... 300 ml

Reactivo de Nessler (47)

Yoduro potásico 7 g
Yoduro mercúrico 10 g
Hidróxido potásico... 10 g
Agua destilada 100 ml

Ambos yoduros se disuelven en 40 ml de agua destilada. Se disuelve la potasa en 50 ml de agua destilada y se enfría. Se mezclan ambas soluciones y se añade agua destilada hasta 100 ml. Se deja sedimentar el precipitado, se decanta el sobrenadante claro en un frasco de reactivos, y el sedimento se desecha.

Reactivo de Griess-Ilosvay (25)

Griess I : Acido sulfanílico 8 g
 Acido acético 5 N..... 1 l.

Griess II : α - naftilamina 5 g
 Acido acético 5 N 1 l.

Reactivo de Kovacs para el Indol (47)

Alcohol amílico o isoamílico..... 150 ml
p-dimetilaminobenzaldehido..... 10 g
Acido clorhídrico concentrado..... 50 ml

Se disuelve el aldehido en el alcohol y entonces se añade lentamente al ácido. Se guarda en nevera.

Solución Rojo de Metilo (47)

Rojo de metilo..... 0.1 g
Etanol al 95 % 300 ml
Agua destilada..... 500 ml

Se disuelve el rojo de metilo en el etanol y se lleva a 500 ml con agua destilada.

Reactivo para la prueba de Voges-Proskauer (47)

- Hidróxido potásico en solución al 40 %
- α -naftol solución al 6 % en etanol al 95 %.

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA CARACTERIZACION MORFOLOGICA

En la tabla Nº 2 se detallan las especies identificadas del grupo Aspergillus niger , siguiendo las técnicas descritas en el apartado 4.2.1 , así como el número de cepas pertenecientes a cada una de ellas.

ESPECIE	Nº CEPAS
<u>Aspergillus heteromorphus</u> Batista y Maia	15
<u>Aspergillus tubingensis</u> (Schöber) Mosseray	33
<u>Aspergillus phoenicis</u> (Cda.) Thom	2

TABLA Nº 2.- Relación de las especies del grupo Aspergillus niger identificadas

Las características de las tres especies identificadas son las siguientes :

Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom en The Aspergilli p. 175 (1926).

Figura N° 2

Sinónimos :

Ustilago phoenicis Cda

Sterigmatocystis phoenicis (Cda.) Pat. y Delacr.

Aspergillus ustilago Beck

Aspergillus saitoi Sakaguchi

Aspergillus saitoi var. kagosima Saka

Aspergillus awamori var. hominis Batista y Waia

Dentro del grupo A. niger la característica diferencial de esta especie se basa en que las colonias desarrolladas en Czapek presentan color negruzco y sus conidios poseen las paredes ornamentadas con la formación de estrías típicas.

Las colonias en agar Czapek cultivadas a 27-28° C presentan un diámetro de 40 a 45 mm a los 12-14 días de cultivo. Poseen aspecto aterciopelado y se caracterizan por formar surcos radiales. Poseen abundante esporulación, excepto en las zonas terminales de las colonias que permanecen blancas. Posee olor característico. Las cepas estudiadas carecen de la formación de esclerocios. Las cabezas conidiales

son de color variable, al principio son de color marrón oscuro y con el tiempo maduran y pasan a ser negruzcas. En cuanto a su forma, son de aspecto globosos. Miden de 300 a 500 μ de diámetro. Los conidióforos son de tamaño variable generalmente de 1 a 2,5 mm de longitud y de 10 a 20 μ de diámetro. Las vesículas son globosas, generalmente miden de 45 a 60 μ de diámetro. Los esterigmas son de tamaño variable miden de 6,5 a 11 μ por 2,8 a 3,5 μ . Las mótulas son de longitudes que oscilan entre las 40 y 60 μ y de anchura 5,5 a 7,5 μ . Los conidios son globosos y de paredes lisas cuando son jóvenes pero al madurar forman ornamentaciones características. Miden de 3 a 3,5 μ por 4 μ .

En agar extracto de malta al 2% crecen rápidamente. Son de aspecto aterciopelado y poseen abundante esporulación. Las restantes características de las cepas coinciden con las descritas en agar Czapek.

Las cepas estudiadas e incluidas en esta especie coinciden prácticamente con la totalidad de los márgenes establecidos, por lo que podemos considerarlas como pertenecientes a esta especie.

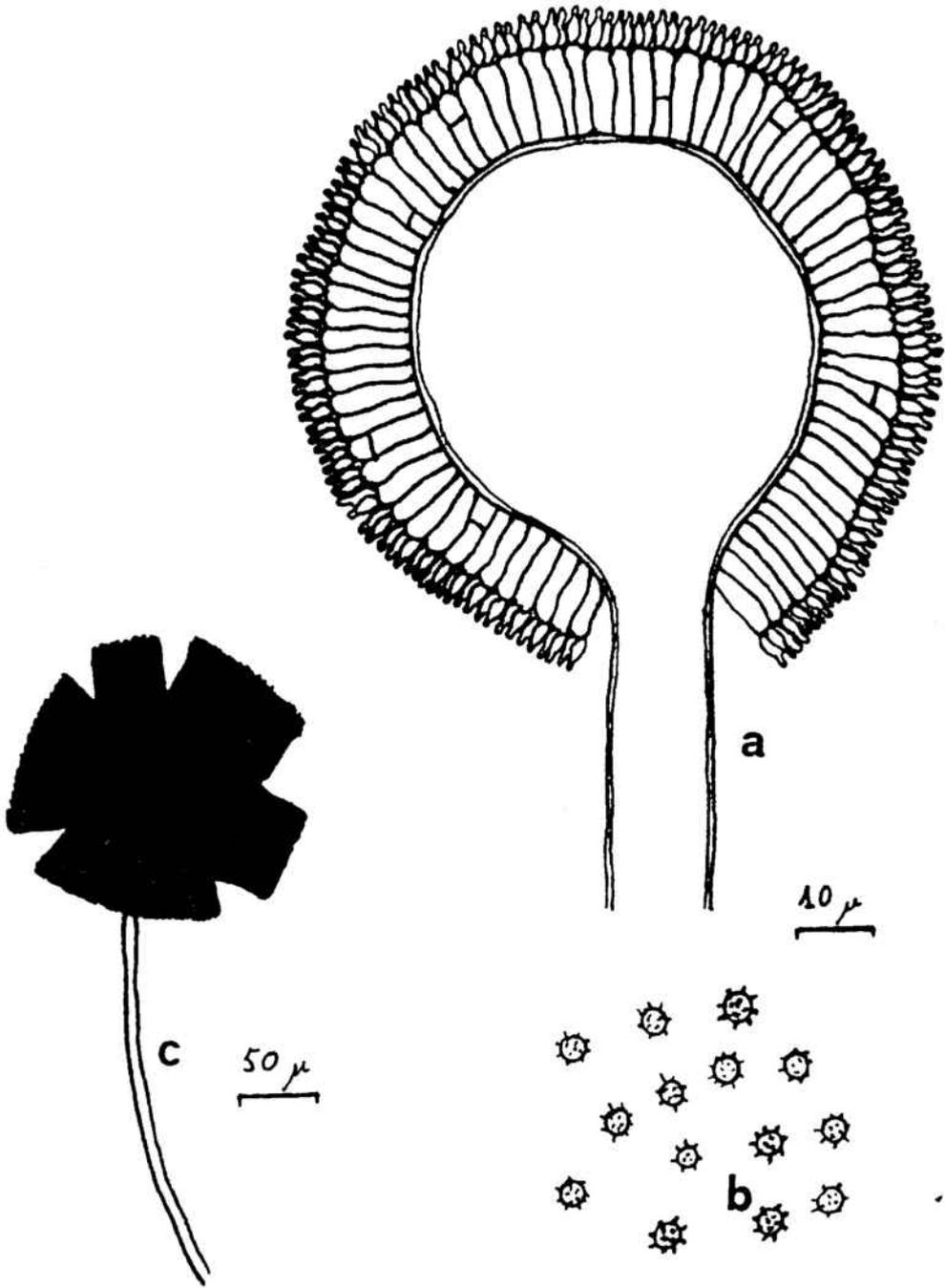


Figura Nº 2.- *Aspergillus phoenicis* (Cda.) Thom.

a.- Conidióforo

b.- Conidios

c.- Hábitat típico

Aspergillus tubingensis (Schöber) Mosseray en La Cellule 43 : 245-247 (1934)

Figura Nº 3

Sinónimo :

Aspergillus niger forma Tuebingen

Si seguimos las características establecidas por Raper y Fennell (102) , las colonias de esta especie se caracterizan por poseer color marrón-verdoso que al madurar los conidios se transforma en marrón oscuro.

Las colonias en agar Czapek poseen a los 10-12 días de cultivo a 27-28° C un desarrollo de 40-50 mm. Son de aspecto aterciopeladas, zonadas, poseen abundante esporulación en el centro de las colonias y permanecen estériles en los bordes de la misma. El reverso de las colonias es de color blanquecino. Las cabezas conidiales son típicamente de color marrón negruzco. Son de aspecto globoso y miden de 200 a 300 μ . Los conidióforos son de paredes lisas y miden de 2 a 3 mm de longitud y alcanzan un diámetro de 30 μ . Las vesículas son globosas y de tamaño variable, midiendo de 40 a 60 μ . Son fértiles en toda su superficie. Los esterigmas miden de 7,5 a 10 μ por 2,8 a 3,0 μ . Los conidios son globosos y poseen ornamentaciones típicas, miden de 3,0 a 3,5 μ de diámetro. No forman esclerocio ninguna de las cepas estudiadas.

En agar extracto de malta al 2% y cultivadas en las condicio-

nes previamente indicadas crecen más rápidamente y son de aspecto plano y aterciopelado. Poseen abundante esporulación en tonalidades marrón muy oscuras. El reverso es incoloro.

Las cepas identificadas como pertenecientes a esta especie cumplen con los criterios indicados por Raper y Fennell en su Tratado (102).

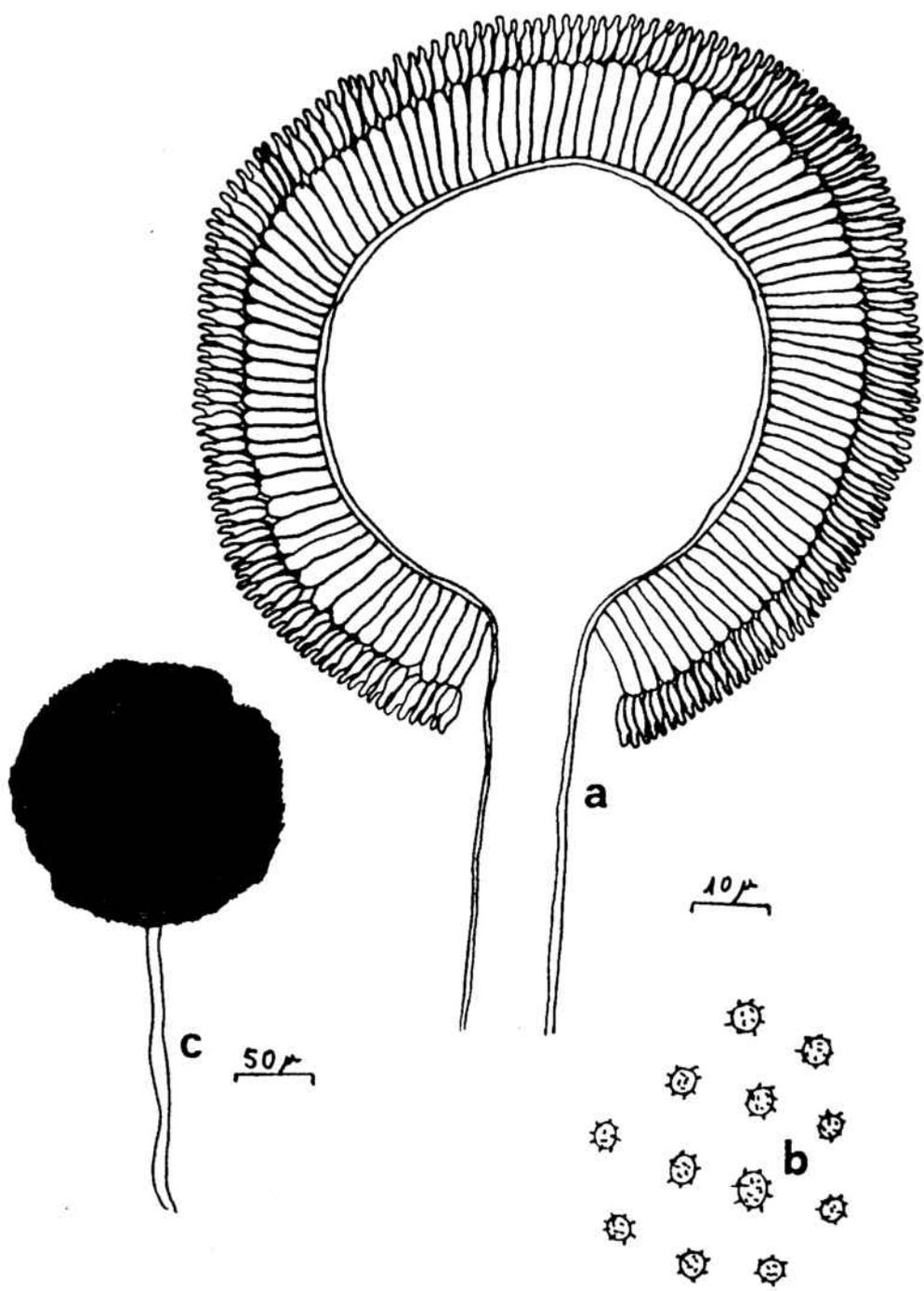


Figura Nº 3.- Aspergillus tubingensis (Schöber) Mosseray

- a.- Conidióforo
- b.- Conidios
- c.- Hábitat típico

Aspergillus heteromorphus Batista y Mata en Anais Soc. Biol. Pernambuco 15 (1): 200-201, (1957).

Figura N^o 4

La característica diferencial de esta especie según Reper y Fennell (102), se basa en que no existe variación del color de las colonias al madurar los conidios, permaneciendo marrón verdoso a lo largo de todo su desarrollo.

Las colonias en agar Czapek crecen a temperaturas de 27-28° C alcanzando a los 10-12 días de crecimiento un desarrollo de 50-60 mm. Presenta surcos radiales característicos. El color de las colonias es marronáceo. El reverso es de color amarillo-verdoso. No posee olor característico. Las cabezas conidiales son globosas y miden de 100 a 200 μ de diámetro. Los conidióforos son de paredes lisas e incoloros, miden más de 500 μ por 4,5 a 6,5 μ . Las vesículas son globosas y miden de 15 a 30 μ de diámetro. Son fértiles en más de la mitad de las mismas. Los esterigmas miden de 4,5 a 6,5 por 2,5 a 3,5 μ . Las métulas miden de 10 a 15 por 6,5 a 8 μ . Los conidios son globosos y de tamaño variable presentan paredes lisas, y con el tiempo pasan a ser equinuladas. Miden de 3,0 a 5 μ de diámetro.

En agar extracto de malta al 2% crecen rápidamente. Poseen el reverso incoloro. Las restantes características coinciden con las descritas en agar Czapek.

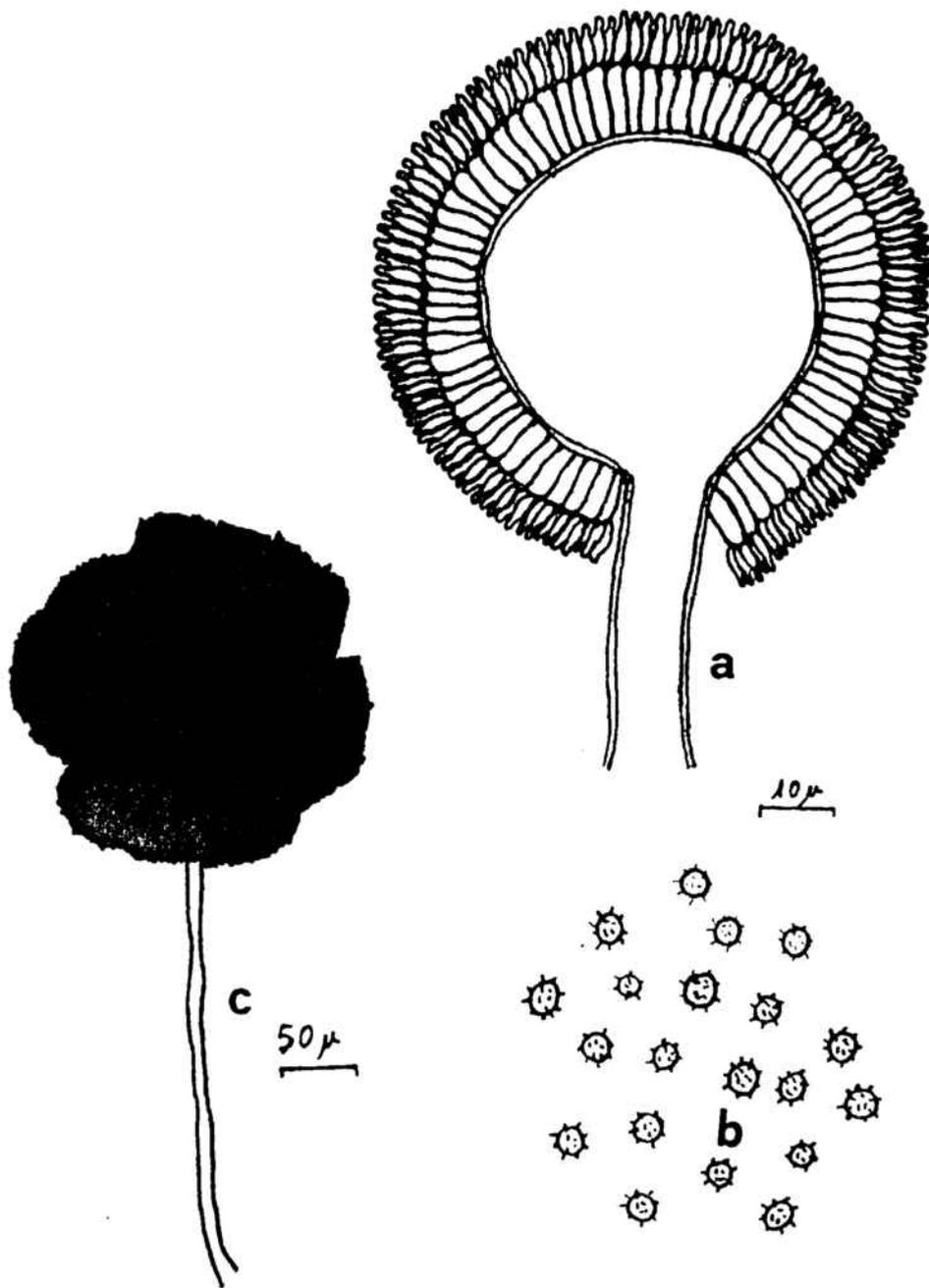


Figura Nº 4.- Aspergillus heteromorphus Batista y Maia

a.- Conidióferos

b.- Conidios

c.- Hábitat típico

En relación con las 50 cepas pertenecientes al grupo Aspergillus fumigatus podemos destacar que por las características macroscópicas y microscópicas observadas y detalladas a continuación, todas pueden incluirse en la serie Aspergillus fumigatus por carecer de cleistotecio y concretamente en la especie Aspergillus fumigatus Fresenius

Aspergillus fumigatus Fresenius en Beiträge zur Mycologie p. 81 (1863).

Figura Nº 5

Las colonias en agar Czapek alcanzan a los 10-12 días de cultivo un diámetro de 50-60 mm en la mayoría de las colonias observadas. La temperatura de cultivo oscila entre los 27-29° C aunque se desarrollan adecuadamente a 37° C. La mayoría de las colonias poseen aspecto aterciopelado y tonalidades verde-grisáceas. El reverso es incoloro en la mayoría de las cepas, pero en el caso de la cepa nº19 el color rojizo difunde en el medio de cultivo. No posee olor característico ni forman esclerocios. Las cabezas conidiales son típicamente compactas y miden más de 400 μ por 50 μ . Los conidióforos son cortos, midiendo más de 300 μ por 5-8 μ de diámetro. Las vesículas poseen un diámetro de 20 a 30 μ y son fértiles en la mitad de su superficie. Los esterigmas miden de 6 a 8 μ por 2 a 3 μ . Los conidios. Los conidios poseen color verdoso y son de aspecto globoso, formando equinulaciones típicas. M₁ den de 2,5 a 3 μ de diámetro. No forman ni esclerocios ni cleistotecios.

La cepa nº 20 se caracteriza por carecer por completo de esporulación, originando colonias típicamente flocosas y de color blanquecino. La cepa nº 24 posee características intermedias entre la anterior y la descrita como cepa tipo dado que junto a las características citadas posee la formación de abundantes flóculos blancos carentes de esporulación. La cepa nº 28 se caracteriza por presentar un crecimiento muy difuso en el que se aprecia una abundante esporulación. Las colonias desarrolladas poseen un diámetro mucho menor.

En agar extracto de malta al 2% las características de las colonias son por completo superponibles a las mencionadas en agar Czapek.

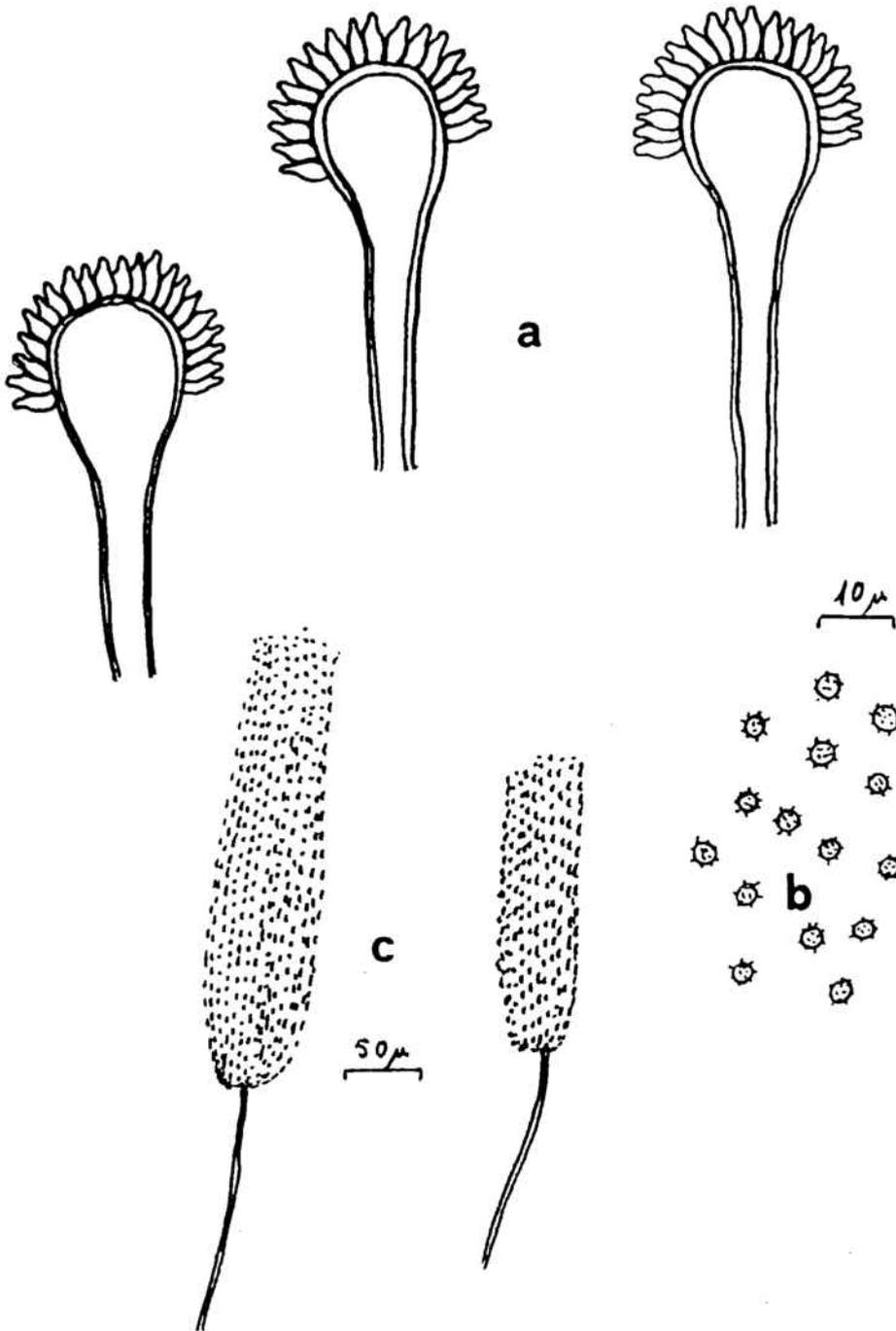


Figura Nº 5.- Aspergillus fumigatus Fresenius

a.- Conidióforo

b.- Conidios

c.- Hábitat típico



Aspecto de cuatro cepas de Aspergillus fumigatus Fres. desarrolladas en Agar Czapek-Dox.



Cabezas conidiales de Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom. (X 1000)

5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA CARACTERIZACION
BIOQUIMICA

5.2.1. REACCIONES ENZIMATICAS

- Método semicuantitativo -

En el estudio semicuantitativo de los 19 enzimas detallados en el apartado 4.2.2.1 se ha observado que las 33 cepas pertenecientes a la especie Aspergillus tubingensis (Scöber) Mosseray, poseen los enzimas detallados en la tabla Nº 3.

ENZIMAS	% DE CEPAS	CONCENTRACION DEL ENZIMA
Estearasa lipasa	60,6 %	0-5 nm
Fosfatasa alcalina	100 %	5 nm
Fosfatasa ácida	100 %	5 nm
Fosfamidasa	33,3 %	0-5 nm
β -galactosidasa	21,2 %	0-5 nm
β -glucosidasa	100 %	5-30 nm
N-acetil- β -glucosaminidasa	100 %	5-10 nm
α - fucosidasa	33,3 %	0-5 nm

Tabla Nº 3.- Relación de los enzimas presentes en las cepas de Aspergillus tubingensis, indicando la concentración de las mismas y el porcentaje que las presentan.

En la tabla Nº 4, se exponen los enzimas presentes en las 15 cepas de Aspergillus heteromorphus Batista y Maia detectadas por el método semicuantitativo.

ENZIMAS	% DE CEPAS	CONCENTRACION DEL ENZIMA
Fosfatasa alcalina	100 %	5 nm
Estearasa Lipasa	46,6 %	0-5 nm
Fosfatasa ácida	100 %	5 nm
Fosfamidasa	46,6 %	0-5 nm
α -galactosidasa	6,6 %	0-5 nm
β -galactosidasa	26,6 %	0-5 nm
β -glucosidasa	100 %	10-20 nm
N-acetil- β -glucosaminidasa	100 %	5-10 nm

Tabla Nº 4.- Relación de los enzimas presentes en las cepas de Aspergillus heteromorphus indicando la concentración de las mismas y el porcentaje que las presentan.

Las dos cepas de Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom, presentan los siguientes enzimas :

- Fosfatasa alcalina
- Fosfatasa ácida
- β -glucosidasa
- N-acetil- β -glucosaminidasa

Una de ellas presentó además los enzimas :

- α -galactosidasa
- β -galactosidasa

La concentración para todas ellos fue de 5nm. , excepto para β -glucosidasa, que osciló entre 5 y 30 nm y el N-acetil- β -glucosaminidasa, que varió entre 5 y 10 nm.

Las 50 cepas pertenecientes a la especie Aspergillus fumigatus Fresenius estudiadas, se caracterizan por poseer los enzimas que se detallan en la tabla N° 5

ENZIMAS	% DE CEPAS	CONCENTRACION DEL ENZIMA
Fosfatasa alcalina	100 %	5-10 nm
Estearasa	96 %	0-10 nm
Estearasa Lipasa	84 %	0-10 nm
Cistina arilamidasa	5 %	0-5 nm
Fosfatasa ácida	100 %	5-10 nm
Fosfamidasa	100 %	5-10 nm
α -glucosidasa	4 %	0-5 nm
β -glucosidasa	100 %	5-30 nm
N-acetil- β -glucosaminidasa	100 %	5-10 nm

Tabla N 5.- Relación de los enzimas presentes en las cepas de Aspergillus fumigatus indicando la concentración de las mismas y el porcentaje que las presentan.

- Método cualitativo -

Los resultados correspondientes a las actividades enzimáticas ensayadas de las cepas en estudio, siguiendo los métodos descritos en el apartado 4.2.2.1 , se detallan en la tabla Nº 6, para las cepas del grupo Aspergillus niger , y la tabla Nº 7 para las cepas del grupo Aspergillus fumigatus.

Para la adecuada interpretación de los resultados obtenidos, exponemos a continuación la equivalencia de las siglas utilizadas.

- A : Actividad amilolítica
- L : Actividad lipolítica
- D : Actividad DNAsica
- Pr: Actividad proteolítica
- Po: Actividad poligalacturonásica o pectinodepolimerásica o pectinásica.
- Pe : Actividad pectatoliásica o pectatotranseliminásica
- U : Actividad ureásica
- F : Actividad fosfatásica
- C : Catalasa

	A	L	D	Pr	Ps	Ph	U	F	C
1	+	+	-	-	+	+	+	+	+
2	+	+	-	-	+	+	+	+	+
3	+	+	-	-	+	+	+	+	+
4	+	+	-	-	+	+	+	+	+
5	+	+	-	-	+	+	+	+	+
6	+	+	-	-	+	+	+	+	+
7	+	+	-	-	+	+	+	+	+
8	+	+	-	-	+	+	+	+	+
9	+	+	-	-	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	+	+	+	+	+
11	+	+	-	-	+	+	+	+	+
12	+	+	-	-	+	+	+	+	+
13	+	+	-	-	+	+	+	+	+
14	+	+	-	-	+	+	+	+	+
15	+	+	-	-	+	+	+	+	+
16	+	+	-	-	+	+	+	+	+
17	+	+	-	-	+	+	+	+	+
18	+	+	-	-	+	+	+	+	+
19	+	+	-	-	+	+	+	+	+
20	+	+	-	-	+	+	+	+	+
21	+	+	-	-	+	+	+	+	+
22	+	+	-	-	+	+	+	+	+
23	+	+	-	-	+	+	+	+	+
24	+	+	-	-	+	+	+	+	+
25	+	+	-	-	+	+	+	+	+

	A	L	D	Pr	Po	Pa	U	F	C
25	+	+	-	-	+	+	+	+	+
27	+	+	-	-	+	+	+	+	+
28	+	+	-	-	+	+	+	+	+
29	+	+	-	-	+	+	+	+	+
30	+	+	-	-	+	+	+	+	+
31	+	+	-	-	+	+	+	+	+
32	+	+	-	-	+	+	+	+	+
33	+	+	-	-	+	+	+	+	+
34	+	+	-	-	+	+	+	+	+
35	+	+	-	-	+	+	+	+	+
36	+	+	-	-	+	+	+	+	+
37	+	+	-	-	+	+	+	+	+
38	+	+	-	-	+	+	+	+	+
39	+	+	-	-	+	+	+	+	+
40	+	+	-	-	+	+	+	+	+
41	+	+	-	-	+	+	+	+	+
42	+	+	-	-	+	+	+	+	+
43	+	+	-	-	+	+	+	+	+
44	+	+	-	-	+	+	+	+	+
45	+	+	-	-	+	+	+	+	+
46	+	+	-	-	+	+	+	+	+
47	+	+	-	-	+	+	+	+	+
48	+	+	-	-	+	+	+	+	+
49	+	+	-	-	+	+	+	+	+
50	+	+	-	-	+	+	+	+	+

1 a 33 = Aspergillus tubingensis (Schöber) Mosseray
34 a 48 = Aspergillus heteromorphus Batista y Maia
49 y 50 = Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom.

Tabla Nº 6.- Relación de los enzimas presentes en 50 cepas del grupo Aspergillus niger ensayadas

	A	L	D	Pr	Po	Pe	U	F	C
1	+	-	+	-	+	+	+	+	+
2	+	-	+	-	+	+	+	+	+
3	+	-	+	-	+	+	+	+	+
4	+	-	+	-	+	+	+	+	+
5	+	-	+	-	+	+	+	+	+
6	+	-	+	-	+	+	+	+	+
7	+	-	+	-	+	+	+	+	+
8	+	-	+	-	+	+	+	+	+
9	+	-	+	-	+	+	+	+	+
10	+	-	+	-	+	+	+	+	+
11	+	-	+	-	+	+	+	+	+
12	+	-	+	-	+	+	+	+	+
13	+	-	+	-	+	+	+	+	+
14	+	-	+	-	+	+	+	+	+
15	+	-	+	-	+	+	+	+	+
16	+	-	+	-	+	+	+	+	+
17	+	-	+	-	+	+	+	+	+
18	+	-	+	-	+	+	+	+	+
19	+	-	+	-	+	+	+	+	+
20	+	-	+	-	+	+	+	+	+
21	+	-	+	-	+	+	+	+	+
22	+	-	+	-	+	+	+	+	+
23	+	-	+	-	+	+	+	+	+
24	+	-	+	-	+	+	+	+	+
25	+	-	+	-	+	+	+	+	+

	A	L	D	Pr	Pa	Pe	U	F	C
26	+	-	+	-	+	+	+	+	+
27	+	-	+	-	+	+	+	+	+
28	+	-	+	-	+	+	+	+	+
29	+	-	+	-	+	+	+	+	+
30	+	-	+	-	+	+	+	+	+
31	+	-	+	-	+	+	+	+	+
32	+	-	+	-	+	+	+	+	+
33	+	-	+	-	+	+	+	+	+
34	+	-	+	-	+	+	+	+	+
35	+	-	+	-	+	+	+	+	+
36	+	-	+	-	+	+	+	+	+
37	+	-	+	-	+	+	+	+	+
38	+	-	+	-	+	+	+	+	+
39	+	-	+	-	+	+	+	+	+
40	+	-	+	-	+	+	+	+	+
41	+	-	+	-	+	+	+	+	+
42	+	-	+	-	+	+	+	+	+
43	+	-	+	-	+	+	+	+	+
44	+	-	+	-	+	+	+	+	+
45	+	-	+	-	+	+	+	+	+
46	+	-	+	-	+	+	+	+	+
47	+	-	+	-	+	+	+	+	+
48	+	-	+	-	+	+	+	+	+
49	+	-	+	-	+	+	+	+	+
50	+	-	+	-	+	+	+	+	+

1 a 50 = Aspergillus fumigatus Fresenius

Tabla Nº 7.- Relación de los enzimas presentes en las 50 cepas del grupo Aspergillus fumigatus ensayadas.

5.2.2. OTRAS PRUEBAS BIOQUIMICAS

Los resultados obtenidos tras la realización de las pruebas bioquímicas descritas en el apartado 4.2.2.2 , se detallan en la tabla Nº 8 para las cepas del grupo Aspergillus niger, y la Nº 9 para las cepas del grupo Aspergillus fumigatus.

Para la mejor interpretación de los resultados obtenidos, especificamos a continuación la equivalencia de las siglas utilizadas.

- I : Producción de Indol
- M : Prueba del Rojo de Metilo
- V : Prueba de Voges Proskauer
- C : Utilización del citrato como única fuente de Carbono
- NH₃ : Producción de amoníaco a partir de peptona
- OF : Prueba de oxidación-fermentación
- SH₂: Producción de SH₂ en TSI
- Glu: Degradación de glucosa en TSI
- Lac: Degradación de la lactosa en TSI
- Sac: Degradación de sacarosa en TSI
- Gas: Producción de gas en TSI
- N : Reducción de Nitratos a Nitritos
- Ut. Glu : Utilización de glucosa
- Ut. Gal : Utilización de galactosa
- Ut. Mal : Utilización de Maltosa
- Ut. Sac : Utilización de Sacarosa
- Ut. Lac : Utilización de Lactosa

	I	M	V	C	NH ₃	OF
1	-	+	-	+	-	F
2	-	-	-	-	-	F
3	-	-	-	-	-	F
4	-	-	-	-	-	F
5	-	-	-	-	-	F
6	-	-	-	-	-	F
7	-	-	-	-	-	F
8	-	+	-	+	-	F
9	-	-	-	+	-	F
10	-	+	-	-	-	F
11	-	+	-	+	-	F
12	-	+	-	+	-	F
13	-	-	-	+	-	F
14	-	-	-	-	-	F
15	-	-	-	+	-	F
16	-	+	-	+	-	F
17	-	+	-	+	-	F
18	-	-	-	-	-	F
19	-	+	-	+	-	F
20	-	-	-	+	-	F
21	-	+	-	-	-	F
22	-	+	-	+	-	F
23	-	+	-	+	-	F
24	-	+	-	-	-	F
25	-	+	-	+	-	F

	I	M	V	C	NH ₃	CF
26	-	+	-	-	-	F
27	-	-	-	+	-	F
28	-	+	-	-	-	F
29	-	+	-	+	-	F
30	-	+	-	-	-	F
31	-	+	-	+	-	F
32	-	+	-	-	-	F
33	-	+	-	+	-	F
34	-	+	-	+	-	F
35	-	+	-	+	-	F
36	-	-	-	+	-	F
37	-	+	-	+	-	F
38	-	-	-	+	-	F
39	-	+	-	+	-	F
40	-	+	-	+	-	F
41	-	+	-	+	-	F
42	-	+	-	-	-	F
43	-	+	-	+	-	F
44	-	+	-	+	-	F
45	-	+	-	-	-	F
46	-	-	-	-	-	F
47	-	+	-	+	-	F
48	-	+	-	-	-	F
49	-	+	-	-	-	F
50	-	+	-	-	-	F

	SH ₂	Glu	Lac	Sac	Gas	N
1	-	+	+	+	-	-
2	-	+	+	+	-	-
3	-	+	+	+	-	-
4	-	+	+	+	-	-
5	-	+	+	+	-	-
6	-	+	+	+	-	-
7	-	+	+	+	-	-
8	-	+	+	+	-	-
9	-	+	+	+	-	-
10	-	+	+	+	-	-
11	-	+	+	+	-	-
12	-	+	+	+	-	-
13	-	+	+	+	-	-
14	-	+	+	+	-	-
15	-	+	+	+	-	-
16	-	+	+	+	-	-
17	-	+	+	+	-	-
18	-	+	+	+	-	-
19	-	+	+	+	-	-
20	-	+	+	+	-	-
21	-	+	+	+	-	-
22	-	+	+	+	-	-
23	-	+	+	+	-	-
24	-	+	+	+	-	-
25	-	+	+	+	-	-

	SH ₂	Glu	Lac	Sac	Gas	N
25	-	+	+	+	-	-
27	-	+	+	+	-	-
28	-	+	+	+	-	-
29	-	+	+	+	-	-
30	-	+	+	+	-	-
31	-	+	+	+	-	-
32	-	+	+	+	-	-
33	-	+	+	+	-	-
34	-	+	+	+	-	-
35	-	+	+	+	-	-
36	-	+	+	+	-	-
37	-	+	+	+	-	-
38	-	+	+	+	-	-
39	-	+	+	+	-	-
40	-	+	+	+	-	-
41	-	+	+	+	-	-
42	-	+	+	+	-	-
43	-	+	+	+	-	-
44	-	+	+	+	-	-
45	-	+	+	+	-	-
46	-	+	+	+	-	-
47	-	+	+	+	-	-
48	-	+	+	+	-	-
49	-	+	+	+	-	-
50	-	+	+	+	-	-

	Ut. Glu	Ut. Gal	Ut. Mal	Ut. Sac	Ut. Lac
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	-
7	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	-
16	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	-
18	+	+	+	+	-
19	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	-
22	+	+	+	+	-
23	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+
25	+	+	+	+	-

	Ut. Glu	Ut. Gal	Ut. Mal	Ut. Sac	Ut Lac
26	+	+	+	+	-
27	+	+	+	+	-
28	+	+	+	+	-
29	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	-
32	+	+	+	+	-
33	+	+	+	+	-
34	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	-
37	+	+	+	+	-
38	+	+	+	+	-
39	+	+	+	+	-
40	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	-
42	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+
44	+	+	+	+	-
45	+	+	+	+	-
46	+	+	+	+	-
47	+	+	+	+	-
48	+	+	+	+	-
49	+	+	+	+	-
50	+	+	+	+	-

1 a 33 = Aspergillus tubingensis (Scöber) Mosseray
34 a 48 = Aspergillus heteromorphus Batista y Maia
49 y 50 = Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom

Tabla Nº 0.- Resultados correspondientes a las pruebas bioquímicas realizadas en las cepas de Aspergillus niger

	I	M	V	C	NH ₃	OF
1	-	-	-	+	-	-
2	-	-	-	+	-	-
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-
5	-	-	-	+	-	-
6	-	-	-	+	-	-
7	-	-	-	+	-	-
8	-	-	-	+	-	-
9	-	-	-	+	-	-
10	-	-	-	+	-	-
11	-	-	-	+	-	-
12	-	-	-	+	-	-
13	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	+	-	-
15	-	-	-	+	-	-
16	-	-	-	+	-	-
17	-	-	-	+	-	-
18	-	-	-	+	-	-
19	-	-	-	+	-	-
20	-	-	-	+	-	-
21	-	-	-	+	-	-
22	-	-	-	+	-	-
23	-	-	-	+	-	-
24	-	-	-	+	-	-
25	-	-	-	+	-	-

	I	II	V	Q	NH ₃	OF
26	-	-	-	+	-	-
27	-	-	-	+	-	-
28	-	-	-	+	-	-
29	-	-	-	+	-	-
30	-	-	-	+	-	-
31	-	-	-	+	-	-
32	-	-	-	+	-	-
33	-	-	-	+	-	-
34	-	-	-	+	-	-
35	-	-	-	+	-	-
36	-	-	-	+	-	-
37	-	-	-	+	-	-
38	-	-	-	+	-	-
39	-	-	-	+	-	-
40	-	-	-	+	-	-
41	-	-	-	+	-	-
42	-	-	-	+	-	-
43	-	-	-	+	-	-
44	-	-	-	+	-	-
45	-	-	-	+	-	-
46	-	-	-	+	-	-
47	-	-	-	+	-	-
48	-	-	-	+	-	-
49	-	-	-	+	-	-
50	-	-	-	+	-	-

	SH ₂	Glu	Lac	Sac	Sas	N
1	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	+
3	-	-	-	-	-	+
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	+
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-	+
15	-	-	-	-	-	+
16	-	-	-	-	-	+
17	-	-	-	-	-	+
18	-	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-

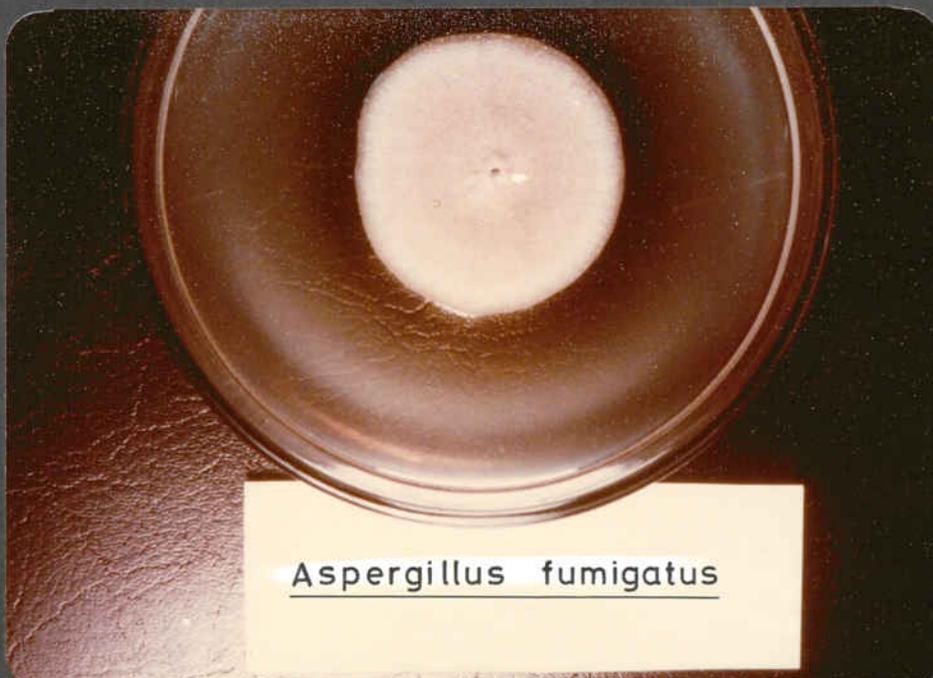
	SH ₂	Glu	Lac	Sac	Gas	N
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	+
30	-	-	-	-	-	+
31	-	-	-	-	-	+
32	-	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	+
34	-	-	-	-	-	+
35	-	-	-	-	-	+
36	-	-	-	-	-	+
37	-	-	-	-	-	+
38	-	-	-	-	-	+
39	-	-	-	-	-	+
40	-	-	-	-	-	+
41	-	-	-	-	-	+
42	-	-	-	-	-	+
43	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	+
46	-	-	-	-	-	+
47	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-

	Ut. Glu	Ut. Gal	Ut. Mal	Ut. Sac	Ut. Lec
1	+	-	+	-	-
2	+	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-
5	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	+	-	+	-
15	-	-	-	+	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	+	-	-
18	+	-	+	-	-
19	+	-	-	-	-
20	+	-	-	+	-
21	+	-	-	-	-
22	+	+	+	-	-
23	+	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-

	Ut. Glu	Ut. Gal	Ut. Mal	Ut. Sac	Ut. Lac
26	+	-	+	+	-
27	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-
30	-	-	-	+	-
31	-	-	-	+	-
32	-	-	+	-	-
33	+	-	-	-	-
34	-	-	-	+	-
35	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-
38	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-
42	-	-	-	+	-
43	+	-	-	-	-
44	-	-	-	+	-
45	-	-	-	-	-
46	+	-	-	-	-
47	-	-	-	+	-
48	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-
50	+	-	-	+	-

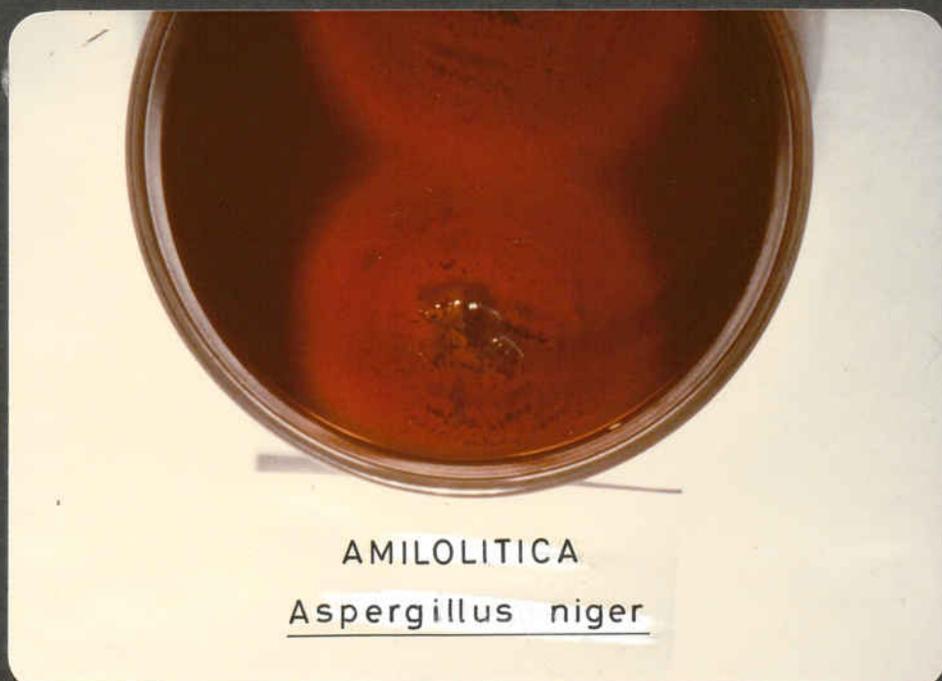
1 a 50 = Aspergillus fumigatus Fresenius

Tabla N° 9 .- Resultados correspondientes a las pruebas bioquímicas realizadas en las cepas de Aspergillus fumigatus



Aspergillus fumigatus

Actividad DNAsica de Aspergillus fumigatus



AMILOLITICA
Aspergillus niger

Actividad Amilolítica de Aspergillus niger

5.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA PRODUCCION DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS

Los resultados obtenidos al estudiar la elaboración de sustancias inhibidoras por parte de las cepas pertenecientes al grupo Aspergillus niger , se resumen en la tabla N° 10 , y los relativos al grupo Aspergillus fumigatus , se detallan en la tabla N° 11.

El método utilizado ha sido descrito en el apartado 4.2.2.3, y los microorganismos sobre los que se ha ensayado la capacidad inhibidora de su crecimiento corresponden a los siguientes números en las tablas.

- 1.- Escherichia coli
- 2.- Staphylococcus aureus
- 3.- Serratia marcescens
- 4.- Candida albicans

	1	2	3	4
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	-	-
4	+	+	+	-
5	+	+	+	-
6	+	+	+	+
7	+	+	+	-
8	+	+	+	-
9	+	+	+	-
10	+	+	+	-
11	+	+	+	-
12	-	+	+	-
13	+	+	-	-
14	+	+	+	-
15	-	+	+	-
16	+	+	+	-
17	+	+	+	-
18	+	+	+	-
19	+	+	+	-
20	+	+	+	-
21	+	+	+	-
22	-	+	-	-
23	+	+	+	-
24	-	+	+	-
25	+	+	+	-

	1	2	3	4
26	-	+	-	-
27	+	+	+	-
28	-	+	+	-
29	+	+	+	-
30	+	+	+	+
31	-	-	+	-
32	+	-	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	-
35	+	+	+	-
36	+	+	+	-
37	-	+	-	-
38	-	+	-	-
39	+	+	+	-
40	+	+	+	+
41	+	+	+	-
42	+	+	+	-
43	+	+	+	-
44	+	+	+	-
45	-	+	-	+
46	+	+	+	+
47	+	+	-	+
48	+	+	-	-
49	+	+	+	-
50	+	+	+	-

1 a 33 = Aspergillus tubingensis (Schöber) Mosseray
34 a 48 = Aspergillus heteromorphus Batista y Maia
49 y 50 = Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom

Tabla N^o 10.- Resultados correspondientes a la producción de sustancias inhibitoras por las cepas del grupo Aspergillus niger

	1	2	3	4
1	-	+	-	+
2	+	-	-	-
3	-	-	-	+
4	+	-	-	-
5	-	+	-	-
6	-	+	-	-
7	-	+	-	-
8	-	+	-	+
9	+	+	+	-
10	-	+	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	-	-	-	-
14	+	+	-	-
15	+	-	-	-
16	+	-	-	-
17	-	-	-	-
18	+	+	-	-
19	-	+	-	-
20	-	-	-	-
21	-	+	-	-
22	-	+	-	-
23	-	+	-	-
24	-	+	-	-
25	-	+	-	-

	1	2	3	4
26	-	+	-	-
27	-	+	-	-
28	-	+	-	-
29	+	+	-	-
30	-	-	-	-
31	-	+	-	-
32	-	+	-	+
33	-	+	-	-
34	-	+	-	-
35	+	+	-	-
36	-	+	-	-
37	-	+	-	-
38	-	+	-	-
39	-	+	-	-
40	-	+	-	-
41	-	+	-	-
42	-	+	-	-
43	-	+	-	-
44	-	+	-	-
45	-	+	-	-
46	-	+	-	-
47	-	+	-	-
48	-	+	-	-
49	-	+	-	-
50	-	+	-	-

1 a 50 = Aspergillus fumigatus Fresenius

Tabla N° 11 .- Resultados correspondientes a la producción de sustancias inhibitoras Por las cepas del grupo Aspergillus fumigatus

6 . D I S C U S I O N

Siguiendo los criterios de clasificación descritos por Raper y Fennell (102), se han identificado las 50 cepas del grupo Aspergillus niger y las 50 del grupo Aspergillus fumigatus , incluyéndose en las especies expuestas en el apartado 5.1 : Aspergillus tubingensis (Schöber) Mossery , Aspergillus heteromorphus Batista y Maia , Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom , y Aspergillus fumigatus Fresenius .

Los criterios morfológicos utilizados hasta el momento como único punto de referencia para la clasificación de los hongos imperfectos, pueden considerarse hasta un cierto punto subjetivos, debido a la gran variabilidad existente incluso dentro de una misma especie. (78, 83, 122). Por este motivo durante los últimos años, numerosos grupos de investigadores han orientado sus esfuerzos a la búsqueda de otros criterios significativos que ayuden a la elaboración de una nueva taxonomía. Tal es el trabajo realizado por De Bertoldi (30) , que ante la dificultad de clasificar muchas de las cepas aisladas del género Humicola siguiendo los criterios morfológicos, ha centrado su investigación en los aspectos genéticos, citológicos y bioquímicos para la completa identificación de los mismos.

La caracterización bioquímica de los hongos formadores de artrosporas proporciona un método de identifica-

ción más simple y abre una nueva discusión taxonómica (42) al igual como se utiliza para la identificación de levaduras (31, 65).

Son muchos los criterios bioquímicos utilizados para diferenciar algunas especies, tales como la capacidad de producir uno a varios enzimas (3, 43, 105), los requerimientos nutritivos (95, 96), las relaciones con la temperatura y con la tensión de agua (97), y así mismo se han realizado diversos intentos para elaborar una taxonomía numérica (27, 28, 32, 62, 110).

Siguiendo los criterios mencionados por los autores anteriormente citados y dado que la clasificación hasta nivel de especie de los grupos del género Aspergillus según las pautas recomendadas por Raper y Fennell (102) resulta poco definitiva especialmente en el caso del grupo Aspergillus niger, en la presente memoria hemos iniciado el estudio de la caracterización bioquímica de las cepas aisladas.

El uso de un medio de cultivo sólido para observar la producción de enzimas proporciona rapidez a la hora de detectar su ausencia o presencia.

El término producción de enzimas en medio sólido incluye la síntesis del enzima y la actividad del mismo sobre el sustrato después de su producción.

Dado que la síntesis y la actividad enzimática son pH dependientes, el pH de los medios sólidos utilizados varía de 4 a 7, y en algunos casos alcanza 7,5. Aunque el crecimiento es idóneo, en muchos casos se ha observado que a pH 4-5, la producción de enzimas se veía limitada o completamente inhibida (45). El pH 6 por el contrario, permite un buen crecimiento y una buena producción de enzimas.

Siguiendo las técnicas descritas en el apartado 4.2.2.1 y 4.2.2.2 y a la vista de los resultados obtenidos, observamos que las cepas ensayadas pertenecientes al grupo Aspergillus niger han presentado en un 100 % la capacidad amilolítica. La producción de estos enzimas por algunas cepas del grupo Aspergillus niger está en continuo estudio, y han sido ya usados para la obtención de glucosa cristalina a partir de almidón (101, 102, 109).

El 100 % de las cepas ensayadas presentan capacidad lipolítica, que ha sido también puesta de manifiesto en otras investigaciones (55, 102, 109).

Todas las cepas estudiadas tienen actividad pectolítica y elaboran catalasa, corroborando así otras investigaciones sobre el uso de algunos miembros del grupo A. niger como fuente de estos enzimas (102, 109). Del mismo modo se han obtenido resultados completamente positivos en la producción de ureasa y fosfatasa.

Algunos autores (102, 107) hacen constar la producción de enzimas proteolíticas por determinadas cepas del grupo Aspergillus niger, aunque su aplicación es limitada debido a que se requiere un pH ácido óptimo (2,7 a 3). En nuestro ensayo, siguiendo la técnica descrita por Hankin y Anagnostakis (45) el pH final del medio de cultivo es 6, por lo que el resultado de esta prueba ha sido negativo.

También han resultado negativas en un 100 % , la producción de DNAsa, la producción de gas y SH_2 en TSI, la reducción de Nitratos, la producción de amoníaco a partir de peptona , y la prueba del Voges-Proskauer.

Un 58 % de las cepas ensayadas han sido capaces de utilizar el citrato como única fuente de Carbono.

La acción de las cepas estudiadas sobre los azúcares , varía notablemente con el medio de cultivo empleado. Así, en la prueba del rojo de metilo, sólo el 68 % han producido ácido a partir de la glucosa, y un 100 % lo han hecho en el medio líquido descrito para fermentaciones (65) y en el medio TSI. En el medio de cultivo de Hugh y Lefson , el 100 % de las cepas estudiadas han presentado metabolismo fermentativo con respecto a la glucosa. La producción de ácido a partir de lactosa o sacarosa en medio TSI ha sido positiva en un 100 % , mientras que en el medio líquido para fermentaciones ha sido positiva en un 100 % para la sacarosa y sólo en un 36 % para la lactosa. En este último medio de cultivo, el 100 % de las cepas ensayadas han producido ácido a partir de la galactosa y maltosa.

La variabilidad observada en la actuación frente a los azúcares ensayados, permite deducir la necesidad de citar en cada caso el medio de cultivo sobre el que se ha realizado la prueba.

Además de los enzimas citados anteriormente, se ha utilizado una técnica semicuantitativa para la determinación de enzimas, descrita principalmente para bacterias, (3, 51, 56, 63, 77, 94, 117), pero cuya eficacia en hongos ha sido plenamente demostrada (1, 12, 13, 42).

En relación con la especie Aspergillus tubingensis (Schöber) Mösseray y tal como se indica en la tabla N^o 3, en el 100 % de las cepas estudiadas se detectó la presencia de los enzimas Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa. En orden de incidencia decreciente, de los 15 enzimas restantes, se observó que el 60,5 % de las cepas poseía Estearasa lipasa, el 36,3 % fosfamidasa, el 33,3 % α -fucosidasa, y el 21,2 % β -galactosidasa, no presentando ninguno de los enzimas restantes.

Las cepas pertenecientes a la especie Aspergillus heteromorphus Batista y Maia investigadas, presentan en su totalidad los enzimas Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa y N-acetil β -glucosaminidasa. Así mismo en un 46,6 % se detectó la estearasa lipasa, en un 46,6 % la fosfamidasa, en un 26,6 % la β -galactosidasa, y en un 6,6 % la α -galactosidasa, no evidenciándose la presencia de los 11 restantes enzimas investigados por el método semicuantitativo.

Finalmente y dentro del grupo Aspergillus niger, las dos cepas de Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom, presentaron una gran variabilidad en los enzimas detectados por este método, dado que mientras los enzimas Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa fueron hallados en ambas cepas, la cepa N^o 50 presentó además la α y β -galactosidasa.

De los datos aportados podemos deducir que atendiendo a los enzimas ensayados y al número de cepas investigadas, las especies del grupo Aspergillus niger coinciden en presentar los enzimas Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa.

En relación con la actividad inhibidora del desarrollo de microorganismos mostrado por las cepas ensayadas del grupo Aspergillus niger, siguiendo la técnica descrita en el apartado 4.2.3 y a la vista de los resultados obtenidos podemos deducir que el 80 % de las estirpes es activa frente a Escherichia coli, el 82 % inhibe el desarrollo de Serratia marcescens. La máxima actividad se manifiesta frente a Staphylococcus aureus, dado que se alcanzan porcentajes del 96 %, mientras que frente a Candida albicans sólo el 18 % de las cepas ensayadas han mostrado capacidad inhibidora.

31 de las cepas ensayadas fueron activas frente a tres de los microorganismos, 8 frente a dos, 6 frente a los cuatro microorganismos, y tan solo 5 frente a un único microorganismo.

En la bibliografía han sido descritos un número limitado de antibióticos, todos ellos de escasa aplicación, elaborados por algunas cepas del grupo Aspergillus niger, entre los que destaca una sustancia denominada aspergilina, descrita por Krasilnikov y Korenyako en 1945 y citada por Raper y Fennell (102), que mostró ser activa frente a bacterias Gram + y Gram -.

El 100 % de las cepas ensayadas del grupo Aspergillus fumigatus siguiendo las técnicas descritas en los apartados correspondientes, producen ureasa, como ya había sido observado por Franke y Krieg en 1952, citado por Raper y Fennell (102), y Hankin y Anagnostakis (45).

El 100 % de las cepas tienen actividad pectolítica, fosfatásica y amilolítica, y ninguna presenta enzimas proteolíticas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Hankin y Anagnostakis (45).

En ningún caso las cepas ensayadas han presentado enzimas lipolíticas, en contraste con Hankin y Anagnostakis (45), Ramakrishnen y Benerjee (1951, 1952) y Vishwanathan, Vasavada y cols (1957), autores mencionados por Raper y Fennell (102).

El 100 % de las cepas producen el enzima DNasa; lo que difiere de los resultados obtenidos por otros autores (45).

Todas las cepas han sido capaces de producir catalasa y utilizar el citrato como única fuente de Carbono.

Han resultado negativas en un 100 % las pruebas del Indol, Voges-Proskauer, producción de amoníaco a partir de peptona y la producción de gas y SH₂ en TSI.

El 62 % de las cepas aisladas, han reducido los nitratos a nitritos.

La acción sobre los azúcares podemos decir que es muy baja, ya que ninguna de las cepas ha producido ácido a partir de la glucosa en la prueba del Rojo de metilo, ni a partir de la glucosa, sacarosa y lactosa en el medio TSI. En el medio de cultivo de Hugh y Leifson, en ningún caso se ha observado acción sobre la glucosa. En el medio líquido para fermentaciones, los resultados han sido positivos en un 30 % para la glucosa, un 6 % para la galactosa, un 12 % para la maltosa, un 26 % para la sacarosa y totalmente negativo para la lactosa.

Al igual que para las cepas pertenecientes al grupo Aspergillus niger, se ha observado la elaboración de enzimas por el método semicuantitativo, descrito en el apartado 4.2.2.1

El 100 % de las cepas presentaron la producción de Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa, N-acetil β -glucosaminidasa y la fosfamidasa.

En orden creciente de los restantes enzimas, el 4 % de las cepas estudiadas produjeron α -glucosidasa, el 6 % cistina arilamidasa, el 80 % Estoarasa, y el 94 % estearasa Lipasa. En ninguna de las cepas ensayadas se detectó la presencia de los 10 enzimas restantes.

La producción de antibióticos por el grupo Aspergillus fumigatus fue ya evidenciada en 1938 por Anslow y Raistrick quienes, como señala Raper y Fennell (102), aislaron la fumigatina y espinulosina como metabolitos secundarios activos . La fumigatina fue posteriormente ensayada por Oxford y Raistrick en 1942, quienes demostraron su actividad frente a gran número de bacterias Gram + y Gram - en ensayos realizados "in vitro". En el mismo año Waksman, Horning y Spencer aislaron un tercer antibiótico denominado fumigacina que presentaba actividad frente a cocos gram + y bacilos.(102).

Las 50 cepas pertenecientes al grupo Aspergillus fumigatus investigadas en el presente trabajo, presentaron su máxima actividad frente a Staphylococcus aureus (82 %) . El 22 % de las cepas inhibieron el crecimiento de Escherichia coli, el 6 % fueron activas frente a Candida albicans, y sólo el 2 % de las cepas ensayadas impidieron el adecuado desarrollo de Serratia marcescens.

Ninguna de las cepas estudiadas pertenecientes al grupo Aspergillus fumigatus presentó actividad simultánea frente a los cuatro microorganismos investigados, 1 fue activa frente a 3 microorganismos, 9 frente a dos, y 36 frente a 1, existiendo 4 cepas que no presentaron acción inhibitoria alguna.

Al intentar establecer una comparación a nivel de los dos grupos del género Aspergillus objeto de la presente memoria, podemos señalar que la acción sobre los azúcares ensayados es notablemente superior en el caso de las cepas pertenecientes al grupo Aspergillus niger.

Con respecto a la utilización del citrato como única fuente de carbono, se establece también una diferencia, dado que el 100 % de las cepas de Aspergillus fumigatus pudieron desarrollarse en este medio, mientras que del grupo Aspergillus niger sólo lo hicieron el 59 %.

También en lo que a la reducción de nitratos se refiere, observamos que en el caso de las cepas del grupo Aspergillus niger ninguna fue capaz de actuar sobre los nitratos, diferenciándose de las del grupo Aspergillus fumigatus, ya que de ellas el 62 % consiguieron reducir los nitratos a nitritos.

En el caso de los enzimas detectados por métodos cualitativos, considerando las cepas estudiadas, estos dos grupos del género Aspergillus pueden distinguirse en base a que el grupo Aspergillus niger posee en un 100 % actividad lipolítica, no existiendo en ninguna de las cepas del grupo Aspergillus fumigatus. Por el contrario, un 100 % de éstas últimos presentaron actividad DNAsica, mientras que en ninguna de las cepas del grupo Aspergillus niger se pudo evidenciar la presencia de este enzima.

En relación con los 19 enzimas detectados por el método semicuantitativo, se observa claramente que las 100 cepas estudiadas poseen 4 enzimas comunes : Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa y N-acetil- β -glucosaminidasa.

Sin embargo en el caso de las fosfatasas ácida y alcalina, las cepas del grupo Aspergillus fumigatus poseen mayor actividad dado que su concentración oscila entre 5 y 10 nm, mientras que en las cepas del grupo Aspergillus niger se detectaron niveles de 5 nm.

Los dos enzimas restantes presentaron concentraciones análogas en ambos grupos.

Además de los cuatro enzimas mencionados, todas las cepas del grupo Aspergillus fumigatus ensayadas , poseen el enzima fosfamidasa.

Al estudiar los resultados obtenidos en la detección de sustancias inhibidoras, podemos observar que las cepas estudiadas del grupo Aspergillus niger poseen en general mayor acción inhibidora frente a los microorganismos ensayados que las cepas del grupo Aspergillus fumigatus .

Teniendo en cuenta los estudios realizados en la presente memoria, podemos deducir que no existe una plena correlación entre las actividades metabólicas observadas y los criterios morfológicos que permiten la clasificación hasta nivel de especie citados en la bibliografía, hecho que corrobora las aportaciones de algunos autores (83, 102).

7. CONCLUSIONES

Como resumen de los datos expuestos y a modo de conclusiones podemos señalar que :

- 1.- De las 50 cepas del grupo Aspergillus niger, 33 se han identificado como Aspergillus tubingensis (Schöber) Mosseray, 15 como Aspergillus heteromorphus Batista y Maia y las dos restantes como Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom
- 2.- Las 50 cepas del grupo Aspergillus fumigatus se han identificado como Aspergillus fumigatus Fresenius.
- 3.- Las 50 cepas del grupo Aspergillus niger poseen los enzimas Fosfatasa ácida y alcalina, β -glucosidasa , N-acetil- β -glucosaminidasa, ureasa y catalasa, así como las actividades amilolítica, lipolítica y pectolítica.
- 4.- Las cepas del grupo Aspergillus fumigatus poseen los enzimas Fosfatasa ácida y alcalina, fosfamidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, ureasa, DNasa y catalasa, así como las actividades amilolítica y pectolítica.
- 5.- Las 50 cepas del grupo Aspergillus niger son capaces de producir ácido a partir de glucosa, galactosa, maltosa y sacarosa, mientras que sólo el 36 % pueden hacerlo a partir de lactosa.

- 6.- El 30 % de las cepas pertenecientes al grupo Aspergillus fumigatus han producido ácido a partir de glucosa , el 26 % lo han hecho a partir de sacarosa y el 12 % a partir de maltosa. Ninguna de las cepas ha sido capaz de producirlo a partir de la lactosa.
- 7.- Las 50 cepas del grupo Aspergillus fumigatus pudieron desarrollarse en presencia de citrato como única fuente de carbono, mientras que las del grupo Aspergillus niger sólo lo hicieron en un 53 %.
- 8.- El 62 % de las cepas del grupo Aspergillus fumigatus ensayadas fueron capaces de reducir los nitratos, mientras que ninguna de las cepas del grupo Aspergillus niger lo hicieron.
- 9.- El 82 % de las cepas del grupo Aspergillus fumigatus fueron activas frente a Staphylococcus aureus , el 22 % frente a Escherichia coli , el 6 % frente a Candida albicans y el 2 % frente a Serratia marcescens .
- 10.- El 96 % de las cepas del grupo Aspergillus niger inhibieron el desarrollo de Staphylococcus aureus , el 32 % el de Serratia marcescens , el 80 % el de Escherichia coli y sólo el 18 % el de Candida albicans.
- 11.- De las 50 cepas ensayadas del grupo Aspergillus niger , 31 fueron activas frente a 3 de los microorganismos estudiados, 8 frente a 2, 5 frente a los 4 microorganismos, y tan solo 5 frente a un único microorganismo.

12.- Ninguna de las cepas del grupo Aspergillus fumigatus presentó actividad simultánea frente a los 4 microorganismos investigados, 1 fue activa frente a 3, 9 frente a 2 microorganismos y 36 frente a 1, existiendo 4 cepas que no presentaron acción inhibidora alguna.

13.- No existe plena correlación entre las actividades metabólicas observadas y los criterios morfológicos que permiten la clasificación hasta nivel de especie del género Aspergillus.

B . B I B L I O G R A F I A

- 1 . ABARCA SALAT L. 1979.- "Estudio de las micosis superficiales en conejos". I Premio ASESCU. Barcelona. 31 pp.
- 2 . ADAMS P.R. y J.J.DEPLOEY. 1978.- "Enzymes produced by thermophylic fungi" Mycologia 70 (4): 906-910.
- 3 . AMADOR YSCLA A. y GARCIA SABATER J.F. 1976.- "Identificación de micobacterias de crecimiento rápido utilizando el sistema API ZYM " Laboratorio 31: 223-239.
- 4 . AMMAR, M.S. ; N.N. GERBER y L.E.McDANIEL . 1979.- "New antibiotic pigments related to fusarubin from Fusarium solani I,II." J. Antibiot. 32(7): 679-684.
- 5 . API NEWS . API ZYM . 1979. La Balme-les-Grottes. 55pp.
- 6 . AUTSWICK P.K.C. 1963 .- "Ecology of Aspergillus fumigatus and the pathogenyc Phycomycetes" Recent Progress in Microbiology 8 : 644.
- 7 . BARBER, M. y S.W.A. KUPER . 1960. "Identification of Staphylococcus pyogenes by the phosphatase reaction" J.Pathol.Bacterol. 63 : 65-68.
- 8 . BECKER ,S. 1978.- " Value and tecnique of the urease test for differentiation of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton rubrum " Dermatol. Monatsschr. 164 (5): 372-374.

- 9 . BERGHEM ,E.L.L. ; L.G.PETTERSSON Y V.AXIO-FREDUKSSON .
1975.- "The mechanism of enzymatic cellulose degradation
Characterization and enzymatic properties of -1,4-glu-
can cellobiohydrolase from Trichoderma viride " Eur.J.
Biochem. 53 :55-62.
- 10 . BOECK L.D.;M.M.HOEHN ;J.E. WESTHEAD ; R.K. WOLTER Y D.
N.THOMAS .1975.- "New azasteroidal antifungal antibio-
tics from Geotricum flavo-brunneum ". The Journal of
Antibiotics. 28 (2) : 95-101.
- 11 . CAMPBELL,C.K. 1971 .- "Fine structure and physiology
of conidial germination in Aspergillus fumigatus "
Trans.Brit.myc.Soc. 57 :393-402.
- 12 . CALVO M.A.;L.ABARCA ; J= TRAPE. 1980,- "Estudio compa-
rativo de Trichophyton mentagrophytes y Trichophyton
verrucoosum ". Sabouraudia (En prensa).
13. . CALVO M.A. ; J. GUARRO ; A. SANCHEZ ; B.SOLEY ; J.TRA-
PE Y M:A.VIA. 1979.- "Contribución al estudio del Géne-
ro Arthrinium ". Libro de resúmenes del VII Congreso
Nacional de Microbiología Cadiz. pg:367.
- 14 . CALVO M.A. ; J. GUARRO ; Y G. SUAREZ . 1976 .-" Los
hongos como agentes etiológicos de alergias y enferme-
dades pulmonares : Su incidencia en Barcelona" Anales
de Medicina y Cirugía 61 (246) :329-340.

- 15 . CALVO TORRAS M.A. ; J. GUARRO ARTIGAS Y G.SUAREZ FERNANDEZ. 1979.- Los hongos como contaminantes en la industria farmacéutica II. Frecuencia del Gro. Aspergillus ". Circular farmacéutica 262 : 5-8.
- 16 . CALVO TORRAS M.A. ; J.GUARRO ARTIGAS ; G. SUAREZ FERNANDEZ Y C.RAMIREZ .1980 .- "Air-borne fungi in Barcelona city (Spain) I. A TWO-YEAR STUDY (1976-1978) ". Mycopathologia (En prensa).
- 17 . CALVO M.A ; J.GUARRO ; G. SUAREZ Y C. RAMIREZ .1980 .- "Air-borne fungi in the air of Barcelona (Spain) III. The genus Aspergillus Link" Mycopathologia (En prensa).
- 18 . CALVO TORRAS M.A. ; J. GUARRO ARTIGAS ; E.VICENTE PEDROG= 1978.- Presencia de Aspergillus fumigatus en atmósfera humana " Anales de Medicina y Cirugía 68 (251) : 69-73.
- 19 . CALVO TORRAS M.A. ; J. GUARRO ARTIGAS ; E. VICENTE Y G. SUAREZ FERNANDEZ 1978.- "Estudio comparativo de la micoflora atmosférica de dos ciudades del área mediterráneo" Revista Clínica Española 151 (3) : 203-206.
- 20 . CITRON K.M. 1975.- "Respiratory fungus allergy and infection" Proc. roy. Soc. Med. 68 : 587-592.
- 21 . COLOTELO, N. 1973 .- Physiological and biochemical properties of exudate associated with developing sclerotia of Sclerotinia sclerotiorum " (Lib).Debary.Can.J.Microbiol. 19 : 73-79

- 22 . COLOTELO, N. 1978.- "Fungal exudates". Canadian J.of Microbiol. 24 (10) : 1173-1181.
- 23 . COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE .1966.- "Descriptions of pathogenic fungi and bacteria " N°92,94. Kew, England.
- 24 . COTTER, D.A. Y A.J.MARTEL . 1978 .- "Acid phosphatase activity and polyol levels during the cycle of Geotricum sp." Microbiol. letters GBR 8 (30) : 85-93.
- 25 . COWAN AND STEEL'S . 1977.- "Identification of Medical bacteria " Cambridge University Press. Cambridge. 238 pp.
- 26 . CHAPMAN, E.S. ; E.EVANS ; M.C.JACOBELLI Y A.A. LOGAN 1975. "The cellulolytic and amylolytic activity of Papulaspora thermophila ". Mycologia 67 : 608-615.
- 27 . DABINETT, P.E. 1976 .- "Numerical taxonomy of the genus Graphium Corda and other associated genera of fungi. " Ph. D. Thesis, University of Western Ontario; London.Ontario.
- 28 . DABINETT P.E. Y A.M. WELLMAN . 1978.- "Numerical taxonomy of certain genera of Fungi Imperfecti and Ascomycotino" Canadian Joournal of Botany 56 (17) : 2031-2049.
- 29 . DAS S.K. Y A.B. BANERJEE . 1977.- "Lipolytic enzymes of Trichophyton rubrum" Sabouraudia 15 (3) :313-323.

- 30 . DE BERTOLDI M. 1976.-"New species of Humicola ; an approach to genetic and biochemical classification" .
Can. J.Bot. 54 : 2755-2768.
- 31 . DE HOOG , G.S. (ED). 1979.- "The black yeast,II: Monilia and Allied genera." Studies in Mycology N° 19, 90 pp.
Baarn.
- 32 . DE HOOG , G.S. y E.J. HERMANIDES-NIJHOF . 1977.- "The black yeasts and allied Hyphomycetes " Studies in Mycology N° 15, 222 pp.
- 33 . DE LA FUENTE PERUCHO ,A. ; J.A. DE DIEGO; M.SANCHEZ ; J.FARIÑAS , M.GARRIDO y A. DE LA FUENTE CHAOS. 1977.- "Aspergilosis pulmonar complicado". Rev.quirúrgica esp. 4 (6) : 385-389.
- 34 . DIFCO . 1973.- "Manual de bacteriología " Madrid 357 pp.
- 35 . ELLIS ,M.B. 1971.- "Dematiaceous Hyphomycetes " C.M.I. Kew, 608 pp.
- 36 . EMI, S. ; D.V.MYERS Y G.A. IACOBUCCI . 1976.- "Purification and properties of the thermostable Acid Protease of Penicillium duponti " Biochemistry 15 (4) : 842-848.
- 37 . FENIZIA ,D ; P. DE ANSERIS Y G. CICALA . 1976.- "Mastibovina subclinica attribuibile ad Aspergillus fumigatus " Atti della Società Italiana delle scienze Veterinarie .
29 : 664-668.

- 38 . FUJI K. ; E. FUJITA ; Y.TAKAISHI ; I.ARITA ; M.KOMATSU ;
Y N. HIRATSUKA . 1978 .- "New antibiotics trichopolynes
A and B : Isolation and biological activity " *Experientia*
34 : 237-238.
- 39 . GAMS, W ; H.A.van der AA ; A.J.PLAATS - NITERINK ; R.A.
SAMSON Y J.A.STALPERS . 1975 .- "Course of Mycology "
C.B.S. Baarn 105 pp.
- 40 . GARGANI G. 1976 .-"Il possibile ruolo eziopatogénico dei
miceti isolati dall'apparato respiratorio". *Annali Sclavo-*
vo. 18(2) : 281 -285
- 41 . GIP; L. ; G. PALSSON . 1970 .- "Production of antibiotics
by Geophilic dermatophytes. I. Screening test of antebac-
terial activity". *Mycosen* 13 : 397-400.
- 42 . GUEHO E . Y J. BUISSIERE . 1975.- "Méthode d'identifica-
tion biochimique de champignons filamenteux arthrosporés
appartenent au genre Geotrichum Link Ex Pers". *Ann . Mi-*
crobiol. (Inst. Pasterur) 126 A : 483-500
- 43 . GUNASEKARAN,M. Y L=KELLOGG . 1979 .- "Further studies
on the chemotaxonomy of Phmatotrichum" *Mycologia* 71 (1):
199-201.
- 44 . GURUSIDDAIAH ,S. ; L.D.WINWARD ; D. BURGER Y S.O.GRAHAM.
1979.- "Pantomycin : A new antimicrobial antibiotic" .
Mycologia 71 (1) : 103-118 .

- 45 . HANKIN, L. Y S.L. ANAGNOSTAKIS 1975 .- "The use of solid media for detection of enzyme production by fungi".
Mycologia 67 (3) : 597-607.
- 46 . HANKIN, L. ; M. ZUCKER Y D.C. SANDS 1971.- "Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria". Appl. Microbiol. 22 : 205-209.
- 47 . HARRIGAN , W.F. Y M.E. Mc CANCE 1979.- Métodos de laboratorio en Microbiología de alimentos y productos lácteos". Ed. Academia (León). 240 pp.
- 48 . HARVEY, R. Y MULLINS . 1975.- "The incidence of aero-allergens in south Wales ". Nova Hedwigia 24 : 445-460.
- 49 . HERR, D. ; G. LUCK Y H. DELLWEG .1978.- "Formation of cellulases in degradation of cellulose by several fungi" J. Ferment. Technol. J.P.N. 56 (4) : 396-402.
- 50 . HERVEY, A Y M.S.R. NAIR 1979.- "Antibiotic metabolite of a fungus cultivated by gardening ants." Mycologia 71 (5) : 1064-1066.
- 51 . HUMBLE , M.W. ; A. KING Y I. PHILIPS. 1977.- "Api Zym: A simple rapid system for detection of bacterial enzymes" J. Clin. Pathol. 30 : 275-277
- 52 . HYDE, M.A. 1972.- "Atmospheric pollen and spores in relation to allergy. I ". Clinical Allergy II: 153-179

- 53 . INTERN. UNION OF BIOCHEMISTRY . 1973.- "Recomendations of the Intl. Union of Biochem.(1972) on the nomenclature and classification of enzymes" Elsevier. Publ. Co., New York. N.Y. 443 pp.
- 54 . ISHIYAMA, T. ; T. FURUTA ; M. TAKAI Y Y. OKIMOTO . 1975. "L-Threo - β - Hydroxyaspartic acid as an antibiotic aminoacid" The Journal of antibiotics. 28 (10) : 821-823
- 55 . IWAI, M.; S. OKUMURA Y Y. TSUKISAKA .1975.- "The comparison of the properties of Two lipases from Penicillium cyclopium Westring" Agr. Biol. Chem. 39 (5) : 1063-1070.
- 56 . JACQUET, J. ; T.SENG FLUOR ; H. AINAS .- 1975 .- "Méthodes de recherches simples de quelques enzymes" Appl. Bull. Acad. Vet. 48 : 467-472
- 57 . JENSEN , R.G. 1974.- "Microbial lipolytic enzymes-characteristics of the lipase from the mold Geotrichum candidum : A review." Lipids 9 : 149-157.
- 58 . KARAS, A. ; J.R. HANKINS ; S. ATTAR; S.E. MILLER Y J.S. Mc LAUGHLIN . 1976 .- "Pulmonary aspergillosis and analysis of 41 patients". Ann Thorac. Surg. 22 (1): 1-7.
- 59 . KENDRICK , B. (ED). 1971.- "Taxonomic of fungi Imperfecti" Canadá 309 pp.
- 60 . KHAN , M.R. ; J.A. BLAIN Y J.D.E. PATTERSON . 1979.- "Extra-cellular proteases of Mucor pusillus ". Appl. Microbiol. 37 (4) : 719-724.

- 61 . KHARE , K.B. Y G. BOMPEIX 1976.- "Activités protéolytiques des Sclerotinia sclerotium et S. minor : Role : possible lors de la pathogenese ". Revue de Mycologie 40 (1) : 65-84.
- 62 . KIEFER ,J. 1979.- "Comments on taxonomy, independence and mathematical models (with reference to a methodology of machol and singer) ". Mycologia 71 (2): 343-378.
- 63 . KILIAN , M. 1978 .- "Rapid identification of Actinomycetaceae and related bacteria". J. Clin. Microbiol. 8 (2) : 127-153.
- 64 . KUBICEK,C.P. ; M.ROHR. 1977.- "Influence of manganese on enzyme synthesis and citric accumulation in Aspergillus niger " Eur. J. Appl. Microbiol. 4 (3): 167-175.
- 65 . LODDER ,J. (ED). 1974.- "The yeast Ataxonomic study". Netherlands, 3^e Ed. 1385 pp.
- 66 . LYNCH F.J. Y M.J. GEOSHEGAN . 1978.- Antibiotic activity of a fungal Perylene-quinone and some of its derivatives". Trans. Br. mycol. Soc. 72 (1) : 31-37.
- 67 . MABROUCK ,S.S. ; A.F. ABDEL-FATTAI Y A. ISMAIL . 1979.- "Preparation and properties of pectic enzymes produced by Trichoderma lignorum " Zentralbl. Bakteriolog. parasitendkd, Infektionskr . Hyg. 134 (3) : 282-286.

- 68 . MALO, J.L. ; R.HAWKINS Y J. PEPYS . 1977.- "Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis.1. Clinical and physiological findings " Thorax 32 (3):254-261.
- 69 . MANRESA, F. ; J.A. LOPEZ ; R. ANGLES Y G. MANRESA FORMOSA . 1976 .- "Aspergilosis broncopulmonar alérgica . A propósito de 4 casos.". Rev. Clin. Española. 140 (2): 149-154.
- 70 . MANRESA, F. ; J.A. LOPEZ ; R. ANGLES Y G. MANRESA FORMOSA. 1977.- "Aspergilosis broncopulmonar alérgica: estudio de 2 casos ". Med. Clin. (Barcelona) 69 : 322-325.
- 71 . MAXWELL, D.P. Y R.D. LUMSDEN 1970.- "Oxalic acid production by Sclerotinia sclerotiorum in infected bean and in culture ". Phytopathology 60 : 1395-1398.
- 72 . MARTINEZ, A.T. Y C. RAMIREZ. 1979.- "Ecological importance of antibiotics by species of Penicillium in an Andosol in the province of Navarra, Spain ". Anales de Edafología y Agrobiología. 38 (12) : 159-166.
- 73 . Mc PHEE, W.J. 1978.- "Biochemical and physiological properties of exudate from Fusarium culmorum and its relation to pathogenesis". Ph.D. Thesis. Univ. of Alberta, Edmonton, Alberta, Canadá.
- 74 . MEEVOOTISON, V. Y D.J. NIEDERPRUEM. 1979.- "Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially Trichophyton rubrum ". Sabouraudia 17 (2) : 91-106.

- 75 . MERCK .- "Manual de Microbiología" . 458 pp.
- 76 . MEREDITH, H.C. ; B.M. COGAN Y B. McLAULIN . 1978.-
"Pleural aspergilosis". Am.J. Roentgenol. 130 :164-166
- 77 . MONGET , D. 1978.- "Misse au point d'une microméthode de detection et de mesure d'activités enzymatiques (Api Zym). Resultats obtenus dans differents domaines d'application". These de docteur ingénieur. Lyon.
- 78 . MULLER, E. 1974.- "Taxonomy and Phylogeny of fungi". Progress in Botany. 36 : 247-262.
- 79 . MULLINS, J. Y R. HARVEY . 1977.- "Sporulation and spore liberation in Aspergillus fumigatus ". Mycopathologia 60 (3) : 175-177.
- 80 . MULLINS, J. ; R. HARVEY Y A. SEATON . 1976.- "Sources and incidence of airborne Aspergillus fumigatus (Fres.)" Clinical Allergy 6 : 209-218.
- 81 . NAKADAI T. Y S. NASUNO . 1977.- "The action of Acid proteínasa from Aspergillus oryzae on Soybean Proteins." Report of the Noda Institute for Scientific Research . 21 : 17-18
- 82 . NAKAXAMA, Y.M.D. ; K=SHIMANUKI ; S.UEHARA Y A.HIRAKATA . 1971.- "Analysis of 80 cases of childhood asthma provoked by mold allergens". Acta pediátrica Japónica 13 (2): 36-43.

- 83 . NICOT, J. 1977.- "La systématique des champignons imparfaits: Problemes et perspectives." Revue de Mycologie 41 (3): 381-395.
- 84 . NILSSON, T. Y J. GINNS . 1979.- "Cellulolytic activity and the taxonomic position of selected brown-rot fungi" Mycologia 71 (1): 199-201.
- 85 . ODURO, K.A. ; D.E. MUNNECKE ; J.J. SIMS Y N.T. KEEN 1976 .- "Isolation of antibiotics produced in culture by Armillaria mellea " Trans. Br. mycol. Soc. 66 (2): 195-199.
- 86 . OKADA, G. 1975 .- "Enzymatic Studies on a Cellulase System of Trichoderma viride " J. Biochem. 77 (1):33-42.
- 87 . OKADA, G. Y K. NISIZAWA 1975 .- "Enzymatic studies on a Cellulase of Trichoderma viride" J. Biochem. 78 (2):297-306.
- 88 . OKADA, G. 1976.- "Enzymatic studies on a Cellulase system of Trichoderma viride " J. Biochem. 80 (5): 913-922.
- 89 . OLUTIOLA, P.O. Y O.A. AKINTUDE . 1979.- "PectinLyase and Pectin methylesterase production by Penicillium citrinum" Trans. Br. mycol. Soc. 72 (1) : 49-55.
- 90 . OSO, B.A. 1978.- "The lipase activity of Talaromyces emerssonii". Canad. J. Bot. 56 (16) : 1840-1843.

- 91 . OSO, B.A. 1979.- "Mycelial growth and amylase production by Talaromyces emersonii". Mycologia 71 (3):520-529.
- 92 . OXOID . 1973.- "Manual" London 264 pp.
- 93 . PARAG, Y y G.PARAG 1974.- "Plaque formation in Bacillus subtilis, and growth inhibition of Bacillus subtilis and Sarcina sp. induced by Schizophyllum commune". Canadian Journal of Microbiology 20 (12): 1754-1757.
- 94 . PENNY, J. ; J. BUISSIERE 1970 .- "Microméthode d'identification du genre Staphylococcus". Ann. Inst. Pasteur 118 : 10-18.
- 95 . PHILPOT ,C.M. 1977.- "The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes". Sabouraudia 15 : 141-150.
- 96 . PIRES DE CAMARGO ,Z. Y D. FISCHMAN 1979.- "Use of morpho-physiological characteristics for differentiation of the species of Prototheca" Sabouraudia 17 (3): 275-278.
- 97 . PITT ,J.I. 1973 .- "An appraisal of identification methods for Penicillium species : novel taxonomic criteria based on temperature and water relations." Mycologia 65 : 1135-1157.
- 98 . PYC, R. ; A. FIECHTER Y E. GALAS 1977.- "Production of cellulolytic enzymes by fungal cultures" Eur. J.Appl. microbiol. 4(3) : 151-158.

- 99 . QUACK ,W. ; T. ANKE ; F.OBERWINKLER ; B.M. GIANNETTI ;
Y W.STELICH 1978.- "Antibiotics from basidiomycetes"
J. Antibiot. 31 (8) : 737-741.
- 100 . QURESHI ,I.M. ; T.BEGUM Y R. NOORANI 1976,- "Isola-
tion and identification of the metabolic products of
Aspergillus pulvinus Known and Fennell comparative
studies of production of terrein and ergosterol in
different media " Pakistan J.Sci. Ind. Res. 19(3-4):
120-122.
- 101 . RAMACHANDRAN,N ; K.R.SREEKANTIAH Y V.S. MURTHY . 1978
"Studies on the termophilic amylolytic enzymes of a strain
of A. niger." Starch 30 (8) : 272-275.
- 102 . RAPER,K.B. Y D.I. FENNELL . 1965.- "The genus Aspergi-
llus " Williams and Wilkins Co.Baltimore 668pp.
- 103 . RAPER, K.B. y C. THOM 1968.- "A manual of the Penicili-
lia". Williams and Wilkins Co. Baltimore 875 pp.
- 104 . SCHALLIBAUM ,M. ; J. NICOLET Y H. KONIG . 1980.- "Asper-
gillus nidulans and Aspergillus fumigatus as causal a-
gents of bovine mastitis ". Sabouraudia 18 (1): 33-38
- 105 . SEN,K. ; K. KOMAGATA . 1979.- "Distribution of urease
and extracellular DNase in yeast species " J.gen. appl.
Microbiol. JPN. 25 (2) : 127-135.

- 106 . SHINKE ,R. 1979.- "Studies on β -amylase production by microorganisms . A monograph." Hakkokagako kaishi 57 (2) : 102-113.
- 107 . SIERRA, G. 1957.- "A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates " Antonie van Leeuwenhoek Ned. Tijdschr. Hyg. 23 : 15-22.
- 108 . SINHA, R.J. Y C.L. KRAMER . 1971 "Identifying hyphal fragments in the atmosphere". Trans. Kansas. Acad . Science 74 (1) : 48-51.
- 109 . SMITH ,J.E. Y J.A. PATEMAN (ED) 1977.- Genetics and Physiology of Aspergillus " British Micological Society Symposium series N^o 1 : 391-404.
- 110 . SNEATH ,P.H.A. Y R.R. SOKAL. 1973.- "Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification" Freeman, San Francisco.
- 111 . SOLOMON , W.R. ; H.P. BORGE Y J.R. ROISE 1978.- "Airborne Aspergillus fumigatus levels outside and within a large clinical center". The Journal of allergy and clinical immunology. 62 (1) : 55-60.
- 112 . STADLER, R.M. ; P.J. SALZBRUNN ; W. O.J. KUDICEK. 1979. "An improved method for characterization of citrate production by conidia of Aspergillus niger" Biotechnol. lett. 1 (7) : 281-286

- 113 . STANIER, R.Y. ; M. DOUDROFF Y E.A. ADELBERG 1970 .-
 "Microbiología" Ed. Aguilar. Madrid. 932pp.
- 114 . STERNBERG ,D. 1976.- "Production of Cellulase By Trichoderma". Biotechnol. and bioeng. Symp. 6 : 35-53.
- 115 . STERNBERG ,D. 1976.- "β-Glucosidase of Trichoderma :
 Its biosynthesis and role in Saccharification of Cellulosa." American Society for Microbiology 31 (5):
 648-654.
- 116 . SUAREZ,G. ; J. GUARRO Y M.A.CALVO 1977.- "Fungi as a
 contaminants in the pharmaceutical industry. Possible
 toxicogenic power". Pharmaceutica Acta Helvetiae .
52 : 267-270.
- 117 . THARAGONNET,D. ; P.R. SISSON ; C.M. ROXBY ; H.R. INGHAM;
 Y J.B. SELKON 1977.- "The Api Zym System in the identification of Gram negative anaerobes. " J. Clin. Path.
30 : 505-509.
- 118 . TRABER , R. ; C. KELLER-JUSLEN ; H.R: LOOSLI; M.KUHN
 Y A. von WARIBURG , 1979.- " Cyclopeptid-Antibiotika
 aus Aspergillus -Arten struktur der echinocandine
 C und D." Helv. Chim. Acta 62 (4) : 1252-1267.
- 119 . TRIGIANO, R.N. YC.L. FERGUS 1979.- "Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture"
 Mycologia 71 (5) : 908-917 .

- 120 . TSUSITA , Y. Y A. ENDO 1978.- "Presence and partial characterization of internal acid protease of Aspergillus oryzae " Appl. environment. Microbiol. 2: 237-242.
- 121 . URBANEK; H. ; J.ZALEWSKA-SUBCZAK Y A. BORDOWINSKA ; 1978.- " Isolation and properties of extracellular cellulase-hemicellulase complex of Phoma hibernica." Archives of Microbiology 118 : 265-269.
- 122 . WILLIAMS , W.T. ; G.N. LANCE ; M.B. DALE Y M.T. CLIFFORD. 1971 .- "Controversy concerning the criteria for taxonomic strategies ". Comput. J. 14 : 162-165.
- 123 . YUSSEF, N. ; C.WYBORN ; G.HOLT; W.C.NOBLE Y Y.M. CLAYTON . 1978.- "Antibiotic production by dermatophyte fungi". J.Gen. Microbiol. 105 : 105-111.
- 124 . ZAWADA ,J.W. ; J.F. SUTCLIFFE 1974.- "Urease Activity in Aspergillus tamaris" Annals of Botany 38 (158) : 1093-1102.