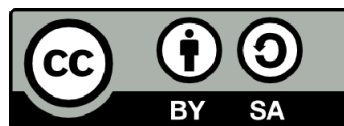




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Contribución al estudio de la micoflora presente en el hábitat de animales aparentemente sanos

M<sup>a</sup> Lourdes Abarca Salat



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0. Spain License.**

F. 740. 378

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE FARMACIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE  
EN EL HABITAT DE ANIMALES APARENTEMENTE SANOS

MEMORIA PRESENTADA PARA  
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR



Ma LOURDES ABARCA SALAT

A l'Albert

Quiero expresar mi más profunda gratitud a la Dra. Dña. Ma de los Angeles Calvo Torras, Catedrática de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona, directora de esta Tesis, por su estímulo constante, dedicación y ejemplo, y muy especialmente por su amistad y por todo lo que de ella he aprendido.

Al Profesor Dr. D. Jesús Guinea Sánchez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Farmacia de Barcelona, por haberme permitido presentar esta Tesis.

Al Dr. D. Juan del Castillo Franquet, Profesor Titular de Bioestadística de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona por su ayuda y orientación en el tratamiento estadístico de los resultados.

A los Dres. R.A. Samsom de la C.B.S. (Holanda), D.W. Minter de la C.M.I. ( Inglaterra ) y al Dr. C. Ramírez del C.S.I.C. por la confirmación taxonómica de algunas cepas aisladas en la presente Tesis.

A la Direcció General d'Ensenyament Universitari de la Generalitat de Catalunya, por la concesión de un "Ajut per a l'acabament de tesis doctorals".

A mis compañeros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona,



Dr. D. Francisco Javier Cabañes Saenz y Dña. M<sup>a</sup> Rosa Bragulat Arará por su comprensión, ayuda y en especial por su amistad.

A los alumnos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona por haberme facilitado la obtención de las muestras estudiadas y en especial a los alumnos internos del Departamento y a Dña. Gregoria Saez por la ayuda prestada en todo momento.

A mis padres y hermanos por su estímulo y comprensión.

I N D I C E

1. I N T R O D U C C I O N .....	1
2. O B J E T O E I N T E R E S .....	25
3. P L A N D E T R A B A J O .....	28
4. M A T E R I A L Y M E T O D O S .....	31
4.1. MUESTRAS ESTUDIADAS .....	32
4.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS .....	37
4.2.1. ESTUDIO DE LA MICOFLORA ATMOSFERICA .....	37
4.2.2. ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE PELOS Y PLUMAS .....	39
4.2.3. ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE PIENSO, FORRAJE Y ENSILADO .....	39
4.2.4. ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE SUELOS .....	40
4.2.4.1. MICOFLORA TOTAL .....	41
4.2.4.2. HONGOS QUERATINOFILICOS .....	42
4.3. ESTUDIO TAXONOMICO .....	44
4.3.1. CLASIFICACION HASTA NIVEL DE GENERO DE LOS HONGOS MICELIARES .....	44
4.3.2. CLASIFICACION HASTA NIVEL DE ESPECIE DE LOS HON- GOS MICELIARES .....	45
4.3.3. METODO EMPLEADO PARA LA CLASIFICACION DE LAS LE- VADURAS .....	49

4.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE CEPAS DEL GRUPO <u>ASPERGILLUS FLAVUS</u> .....	52
4.4.1. PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL MEDIO YES .....	53
4.4.2. PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL MEDIO APA Y EN EL MEDIO CAM .....	59
4.4.3. METODO PARA DETECTAR LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS SEGUN LA TECNICA DE FILTENBORG .....	62
4.4.4. METODOS BIOLOGICOS PARA DETECTAR LA CAPACIDAD TO- XIGENICA .....	62
4.4.4.1. ENSAYO TOXIGENICO FRENTE A LARVAS DE <u>ARTEMIA</u> <u>SALINA L.</u> .....	63
4.4.4.2. ENSAYOS TOXIGENICOS FRENTE A MICROORGANISMOS ..	66
4.5. PREPARACION Y VALORACION DE LOS PATRONES DE AFLATO- XINAS .....	70
4.6. CALCULO DEL LIMITE DE DETECCION DE LOS PATRONES DE AFLATOXINAS .....	72
4.7. MEDIOS DE CULTIVO, COLORANTES Y REACTIVOS .....	73
4.7.1. MEDIOS DE CULTIVO .....	73
4.7.2. COLORANTES Y REACTIVOS .....	80
5. R E S U L T A D O S .....	82
5.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICO- FLORA ATMOSFERICA .....	83
5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICO- FLORA PRESENTE EN EL PELO O PLUMAS DE LOS ANIMALES	99
5.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICO- FLORA PRESENTE EN PIENSOS, FORRAJES y ENSILADOS ..	110

5.3.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MICOFLORA PRESENTE EN PIENSOS .....	110
5.3.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MICOFLORA PRESENTE EN FORRAJES .....	126
5.3.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MICOFLORA PRESENTE EN ENSILADOS .....	132
5.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MICOFLORA PRE- SENTE EN LAS MUESTRAS DE SUELOS .....	135
5.4.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL .....	135
5.4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LOS HONGOS QUERATINOFILICOS .....	150
5.5. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MI- COFLORA TOTAL PRESENTE EN EL HABITAT DE LOS ANI- MALES SANOS .....	159
5.5.1. EXPLOTACIONES VACUNAS .....	163
5.5.2. EXPLOTACIONES PORCINAS .....	163
5.5.3. EXPLOTACIONES CUNICOLAS .....	163
5.5.4. EXPLOTACIONES AVIARES .....	164
5.5.5. EXPLOTACIONES DE OVEJAS .....	164
5.5.6. EXPLOTACIONES DE CABRAS .....	165
5.5.7. EXPLOTACION DE CABALLOS .....	165
5.5.8. EXPLOTACION DE PALOMAS .....	165
5.6. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA CA- PACIDAD TOXIGENICA DE CEPAS DEL GRUPO <u>ASPERGILLUS</u> <u>FLAVUS</u> .....	227
5.6.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO	

YES .....	227
5.6.1.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO CLOROFORMICO .....	227
5.6.1.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO CRUDO Y EL MICELIO ...	231
5.6.1.2.1. MEDICION DEL pH Y DEL PESO SECO DEL MICELIO	231
5.6.1.2.2. AFLATOXINAS DETECTADAS EN EL EXTRACTO CRUDO	
5.6.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO APA .....	238
5.6.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO CAM .....	242
5.6.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN LOS MEDIOS YES, APA Y CAM .....	248
5.6.5. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCION DE AFLATOXINAS POR LA TECNICA DE FILTENBORG .....	254
5.6.6. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS METODOS BIOLOGICOS PARA DETECTAR LA CAPACIDAD TOXIGENICA .	259
5.6.6.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FRENTE A LARVAS DE <u>ARTEMIA SALINA</u> L...	259
5.6.6.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A MICROORGANISMOS .	265
5.6.6.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE WICKERHAM .....	265
5.6.6.2.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE CAMPBELL .....	267
5.6.6.2.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE	

LOS DISCOS .....	284
5.7. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION DE LOS PATRONES DE AFLATOXINAS .....	301
6. D I S C U S I O N .....	302
6.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA ATMOSFERICA .....	303
6.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN EL PELO O PLUMAS DE LOS ANIMALES .....	309
6.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN PIENSOS, FORRAJES Y ENSILADOS .....	313
6.3.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN LOS PIENSOS .....	313
6.3.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN LOS FORRAJES .....	318
6.3.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN ENSI- LADOS .....	320
6.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN MUESTRAS DE SUELOS .....	322
6.4.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES	

AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL .....	322
6.4.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LOS HONGOS QUERATINOFILICOS .....	324
6.5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ES- TUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL PRESENTE EN EL HA- BITAT DE LOS ANIMALES INVESTIGADOS .....	331
6.5.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES VACUNAS .....	335
6.5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES DE CERDOS .....	336
6.5.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES DE CONEJOS .....	337
6.5.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES DE GALLINAS .....	338
6.5.5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES DE OVEJAS .....	339
6.5.6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES DE CABRAS .....	339
6.5.7. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLO- TACIONES DE CABALLO Y PALOMA .....	340



6.6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE LAS CEPAS DEL GRUPO <u>ASPERGILLUS FLAVUS</u> .....	341
6.6.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO YES .....	341
6.6.1.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRAC- TO CLOROFORMICO .....	344
6.6.1.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRAC- TO CRUDO Y EL MICELIO .....	346
6.6.1.2.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MEDICION DEL pH Y DEL PE- SO SECO DEL MICELIO .....	346
6.6.1.2.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LAS AFLATOXINAS DETECTADAS EN EL EXTRACTO CRUDO .....	347
6.6.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO REALIZADO CON LOS MEDIOS DE CULTIVO APA Y CAM .....	349
6.6.2.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO APA .....	351
6.6.2.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO CAM .....	355
6.6.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCION DE AFLATOXINAS POR LA TECNICA DE FILTENBORG .....	358



6.6.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS METODOS BIOLÓGICOS PARA DETECTAR CEPAS CON CAPACIDAD TOXIGENICA .....	361
6.6.4.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FRENTE A LARVAS DE <u>ARTEMIA SALINA</u> L. ....	362
6.6.4.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A MICROORGANISMOS .....	365
6.6.4.2.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE WICKERHAM .....	365
6.6.4.2.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE CAMPBELL .....	366
6.6.4.2.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE LOS DISCOS .....	370
7. C O N C L U S I O N E S .....	375
8. B I B L I O G R A F I A .....	379

## 1. INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

Las características nutricionales de los hongos determinan que puedan ser aislados de los más diversos sustratos.

Uno de los conceptos básicos en la ecología de los hongos es el de nicho ecológico. Este viene determinado por la capacidad de los hongos de utilizar compuestos de carbono, generalmente en forma de carbohidratos que son esenciales para el desarrollo de estos microorganismos. Los hongos sólo pueden existir en íntima asociación con estos sustratos y por ello se observa una alta demanda de los mismos durante el crecimiento vegetativo. El desarrollo fúngico viene establecido por dos características de estos sustratos: la facilidad de asimilación y su distribución espacial y temporal.

Algunos sustratos son solubles y fácilmente asimilables, otros no y en base a esta característica y a su presencia en los hábitats de forma continua o discontinua, puede establecerse una clasificación que se resume en la TABLA nº 1. Atendiendo a la composición y distribución de estos sustratos, será posible el crecimiento de unos u otros grupos de hongos.

Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es la relación existente entre las diversas especies fúngicas, estableciéndose un grado de competencia que impide en ocasiones el crecimiento

Naturaleza del sustrato	Fácilmente asimilable	Refractario
Continuo	Exudados de plantas, secreciones animales y microbianas Digeridos animales	Partes muertas de animales vi- vos (piel, pe- lo)
Discontinuo	Lecho de hojas, microorganismos, plantas y anima- les muertos, he- ces	Productos de descomposición final de plan- tas y animales (lignina, qui- tina y quera- tina)

TABLA nº 1.- Clasificación de los sustratos utilizables por los hongos.

de unas en beneficio de otras.

En condiciones adversas (temperaturas extremas, actividad de agua poco favorable, presencia de sustratos poco asimilables), se aíslan de forma selectiva determinados grupos de hongos, tal como se indica en la TABLA nº 2.

Algunos hongos saprófitos son ecológicamente dependientes de forma obligada a la simbiosis con animales o vegetales ( TABLA nº 3), adaptándose a las situaciones de "stress" que el desarrollo en estas condiciones pueda determinar. Sin embargo estos microorganismos considerados como saprófitos, pueden en ocasiones comportarse como parásitos, desencadenando procesos patológicos en la célula sobre la que se desarrollan.

Sustratos poco asimilables	Temperaturas adversas	Baja actividad de agua
Lignícolas	Termofílicos	Xerotolerantes
Queratinofílicos	Psicrófilos	(xerofílicos,
Quitinotróficos		halofílicos y osmofílicos)

TABLA nº 2.- Grupos de hongos según su capacidad de desarrollo en condiciones adversas.

	Alta concentración de nutrientes	Baja concentración de nutrientes
Asociaciones con animales	Levaduras de las mucosas de los vertebrados.  Hongos del rumen y ciego de los herbívoros.  Hongos del intestino de los invertebrados.  "Mycetangial fungi".  Hongos de hormigas.	Hongos de los exoesque- letos de los invertebra- dos.  Hongos de la piel y ane- jos.
Asociaciones con vegetales	Levaduras de exudados ricos en azúcares.	Hongos de la superficie de las hojas.

---

TABLA nº 3.- Hongos saprófitos ecológicamente dependientes de asocia-  
ciones con animales y vegetales.

Los animales constituyen un hábitat potencial para los hongos saprófitos, aunque en general existen factores desfavorables que dificultan el crecimiento de la mayoría de estos microorganismos. La micoflora presente en la superficie de los animales está constituida por todos aquellos hongos que se encuentran en la piel y otras superficies queratinizadas.

La queratina es una escleroproteína fibrosa, insoluble, con un contenido en azufre proporcionalmente superior al que se encuentra en otras proteínas ( 110, 377 ). A pesar de ser un sustrato poco idóneo para el desarrollo fúngico, puede soportar el crecimiento de un reducido, pero importante, grupo de hongos denominados queratinofílicos, algunos de los cuales se desarrollan en los tejidos queratinizados de los animales vivos por acción de procesos enzimáticos entre los que la sulfitolisis parece ser la más común ( 212, 324 ). Esta característica adquiere tal importancia que en base a ella se distingue un grupo de hongos patógenos: los dermatofitos.

Tras la exposición de un animal a un dermatofito, no siempre se establece un proceso de infección, y como consecuencia de ello, algunos animales pueden ser considerados como portadores ( 274 ).

Algunos animales poseen una resistencia natural a la infección y factores como la edad, madurez sexual, estado nutricional y hormonal y la presencia o ausencia de enfermedades concurren-

tes, puede influir en la resistencia natural a las infecciones micóticas ( 274 ). Existen también factores de tipo local que impiden la invasión micótica entre los que citaremos: la barrera mecánica de la piel, las membranas mucosas intactas y la actividad fungistática de los ácidos grasos ( 5, 170 ), aunque este último factor se encuentra actualmente en discusión ( 325 ).

Entre las especies de dermatofitos aislados de los animales aparentemente sanos, se citan en la bibliografía, entre otros los siguientes: Trichophyton mentagrophytes ( 111, 138, 142, 147, 174, 183, 192, 213, 231, 241, 242, 249, 250, 286, 288 ) Microsporum canis ( 26, 111, 231, 288 ), Trichophyton rubrum ( 109, 154 ). Asimismo se cita el aislamiento de M. gypseum ( 111, 138, 243, 249, 250, 288 ).

No todos los queratinofílicos se consideran patógenos y la mayoría de ellos pueden ser aislados de suelos, por lo que se les atribuye la característica de ser geofílicos. En general no se limitan a un solo hábitat, sino que suelen presentarse intercambios entre los sustratos geofílico, zoofílico y antropofílico ( 9, 231, 285, 312 ).

Simultáneamente a este grupo de hongos, que como ya hemos indicado están adaptados al desarrollo sobre queratina y pueden permanecer en este sustrato durante un período de tiempo prolongado, se han aislado también otros géneros de hongos miconiales y levaduras de la superficie de los animales. Su presen-



cia puede ser considerada en ocasiones como temporal y en la mayoría de los casos no llegan a desarrollarse, permaneciendo en este sustrato en forma de propágulos fúngicos viables. Este grupo de hongos debe considerarse como saprófito y constituyente de la micoflora habitual de la superficie corporal de los animales. Se aislan frecuentemente en los medios de cultivo de laboratorio e incluso de forma concomitante con especies de dermatofitos ( 4,111, 161, 370 ) dificultando en ocasiones un correcto diagnóstico ( 3 ).

El estudio de la micoflora presente en animales sanos, no se ha llevado a cabo de forma exhaustiva y por ello son escasos los trabajos citados en la bibliografía que hacen referencia a este tema. Entre ellos podemos mencionar los de Philpot y Berry ( 302 ), Kushida y cols. (216) y van Cutsem y cols. (111) en perros; Hubalek y cols. (190,191) en animales salvajes y Hubalek (189 ) en plumas de pájaros; González Cabo (156) en conejos; Caretta y cols. (81) en vacas, Marsella y cols. (243) y Caretta y del Frate (80) en pelos y pulmas de animales salvajes. Los géneros aislados mayoritariamente son: Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Aureobasidium, Mucor y Rhizopus.

De la mayoría de los hongos saprófitos no se conoce su capacidad para desencadenar infecciones en animales sanos ( 4 ). Sin embargo algunos de ellos pueden alcanzar un carácter invasivo en condiciones de inmunodeficiencia del hospedador, trans-

formándose en agentes etiológicos de procesos patógenos, comportándose en este caso como patógenos oportunistas.

Entre los autores que describen la epidemiología de las infecciones causadas por hongos oportunistas destacaremos a Rippon ( 320 ).

En la TABLA nº 4 se resumen las lesiones superficiales producidas en animales por hongos oportunistas ( 4 ).

EXAMEN HISTOPATOLOGICO POSITIVO

AGENTE ETIOLOGICO	LESION CLINICA	HOSPEDADOR
<u>Alternaria alternata</u>	Alopecia, descamación	Ciervo
<u>Alternaria alternata</u>	Agrietamientos en la piel	Ciervo
<u>Alternaria tenuis</u>	Nódulos en la piel	Caballo
<u>Aspergillus sp.</u>	Nódulos en la piel	Conejo
<u>Aureobasidium pullulans</u>	Infección cutánea	Erizo
<u>Candida albicans</u>	Dermatitis inflamatoria	Pollo
<u>Drechslera spicifera</u>	Placas superficiales	Caballo
<u>Drechslera spicifera</u>	Faeohifomicosis	Gato
<u>Drechslera rostrata</u>	Micetoma	Vaca
<u>Geotrichum sp.</u>	Lesiones necróticas	Flamenco
<u>Geotrichum candidum</u>	Dermatitis diseminada	Tortuga gigante
<u>Helminthosporium spiciferum</u>	Nódulos granulomatosos	Vaca
<u>Hyphomyces destruens (Pythium sp.)</u>	Lesión fibrosa	Caballo

TABLA nº 4.- Lesiones producidas en la piel de los animales por hongos miceliarios y levaduras oportunistas.

AGENTE ETIOLOGICO	LESION CLINICA	HOSPEDADOR
<u>Hyphomyces destruens</u> ( <u>Pythium</u> sp.)	Ulceración superficial	Caballo
<u>Malassezia</u> ( <u>Pityrospo.</u> ) <u>pachydermatitis</u>	Alopecia	Oso negro
<u>Paecilomyces</u> sp.	Granuloma	Mono
<u>Pyronellaea glomerata</u>	Hiperqueratosis	Cabra
<u>Phialophora</u> -like	Ulceración	Rana
<u>Phoma cava</u>	Dermatitis	Ciervo
<u>Pseudomicrodochium suttonii</u>	Lesiones subcutáneas	Perro
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	Descamación	Buey
<u>Rhodotorula mucilaginosa</u>	Dermatitis	Pollo
?	Ficomicosis	Ardilla
?	Granuloma faeomicótico	Gato
SIN CONFIRMACION HISTOLOGICA		
<u>Acremonium</u> ( <u>Cephalosporium</u> ) sp.	Lesiones en la piel	Gato
<u>Alternaria alternata</u>	Lesiones en la piel	Caballo, Perro
<u>Alternaria</u> sp.	Lesiones en la piel	Perro, Gato, Caballo
		Vaca

TABLA nº 4 .- ( continuación )

AGENTE ETIOLOGICO	LESION CLINICA	HOSPEDADOR
<u>Anixiopsis stercoraria</u>	Pérdida de pelo, costras	Jabalí salvaje
<u>Chryso sporium evolceanui</u>	Dermatitis exudativa	Perro
<u>Epicoccum sp.</u>	Lesiones en la piel	Perro, cobayo
<u>Rhodotorula glutinis</u>	Dermatitis	Pollos
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	Pityriasis rosa	Cerdo

TABLA nº 4.- ( continuación )

El suelo debe considerarse como el principal reservorio de los microorganismos, y por ello, la mayoría de los hongos pueden ser aislados a partir de este sustrato.

Los propágulos fúngicos se depositan en el suelo, procedentes de los más diversos hábitats: atmósfera, restos vegetales, animales, etc., existiendo una posible asociación entre varias especies fúngicas.

Los hongos realizan en el suelo, diversas funciones útiles, destacando fundamentalmente la mineralización de la materia orgánica (110).

La investigación de la micoflora geofílica ha sido realizada por numerosos autores, pudiendo destacar como estudios de recopilación más significativos los de Domsch y Gams (124) Gilman (149) y Barron (23), entre otros. Sin embargo, son relativamente pocas las referencias bibliográficas que mencionan estudios específicos realizados en suelos de granjas y explotaciones animales, destacando los de Caretta y cols. (81), Ajello (7), Jain (198, 199), centrados exclusivamente en el aislamiento de queratinofílicos.

Entre los grupos de hongos que han sido aislados de suelos destacan los queratinofílicos. El hallazgo de dermatofitos en este hábitat por Vanbreuseghem (372), por Ajello (6) y Gordon (157) inició una serie de estudios sobre estos

microorganismos, utilizando fundamentalmente la técnica de Vanbreuseghem ( 371 ). La importancia de los hongos queratinofílicos ha sido anteriormente mencionada y su posible presencia tanto en la superficie de los animales como en el suelo puede estar justificada por la fácil dispersión de sus conidios que facilita el paso de uno a otro sustrato ( 121,240,300).

La detección y estudio taxonómico de los queratinofílicos aislados de muestras de suelos ha sido realizado por diversos autores ( 7, 8, 11, 24, 68, 73, 80, 81, 82, 83, 97, 132, 139, 139, 140, 160, 164, 198, 199, 200, 248, 253, 254, 272, 304, 307, 308, 377 ).

Estos estudios destacan tanto la presencia de géneros que crecen utilizando la queratina como sustrato habitual (Microsporium, Trichophyton, Chrysosporium y sus teleomorfos) como aquellos que pueden desarrollarse sobre ella de forma ocasional (Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Mucor, Chaetomium, Gliomastix, Epicoccum, Acremonium, Alternaria, Cylindrocarpon, Geotrichum, Cladosporium, Paecilomyces, Scopulariopsis).

La micoflora atmosférica constituye uno de los grandes capítulos que forman el amplio concepto de la denominada Aerobiología o biología del aire. Su estudio permite señalar la intensidad y frecuencia de los hongos en la atmósfera.

En la bibliografía se han descrito diversos métodos para llevar a cabo la toma de muestras, que pueden resumirse en cuatro ( 159 ):

- 1.- Métodos gravimétricos, basados en la sedimentación de las partículas presentes en la atmósfera.
- 2.- Métodos de inercia, en los que las partículas se pueden retener sobre filtros o bien sobre medios de cultivo.
- 3.- Métodos por precipitación térmica, basados en hacer incidir unas muestras de aire a través de una zona regulada a 100°C.
- 4.- Métodos por precipitación electrostática, eficaces para recoger partículas en suspensión.

Uno de los más utilizados, por su sencillez es el método gravimétrico, que permite por simple exposición de placas de Petri, recoger los propágulos fúngicos que se depositan por acción de la gravedad sobre la superficie de un medio de cultivo.

Esta metodología ha sido empleada por numerosos autores que han llevado a cabo el estudio exhaustivo de la micoflora de diversas zonas geográficas ( 13, 61, 62, 63, 79, 92, 93, 137, 235, 236 ).

Entre las investigaciones realizadas para establecer la micoflora atmosférica destacan aquellas encaminadas a deter-



minar la posible relación entre el contenido fúngico del aire y la presencia de los mismos microorganismos en otros hábitats (suelos, nidos, camas de animales, etc.), pudiendo desencadenar procesos patológicos en los animales expuestos y la contaminación y deterioro de los sustratos destinados a la alimentación ( 99,127,156,220,221,262,303,329).

La composición y origen de los productos destinados a la alimentación animal determina que éstos sean un sustrato idóneo para el desarrollo de los hongos y la producción y acumulación de micotoxinas.

La capacidad que poseen las cepas fúngicas de desarrollarse sobre vegetales determina su presencia en granos, semillas piensos, forrajes, ensilados, etc. Algunos géneros fúngicos llegan a los granos y semillas incluso antes de su recolección y procesado por lo que se denominan "hongos de campo" o como consecuencia de las condiciones de almacenaje a que generalmente son sometidos, calificándolos de "hongos de almacenamiento" ( 98 ).

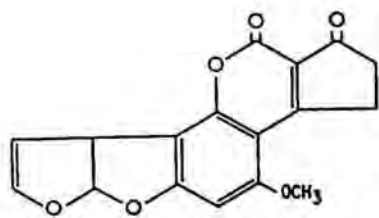
Se han realizado numerosos estudios con el fin de conocer cualitativa y cuantitativamente la presencia de hongos miceliares y levaduras en los alimentos destinados al consumo animal, destacando entre otros los que se han realizado a partir de muestras de granos, cereales y leguminosas ( 1,2, 33,76,77,91,101,155,178,179,180,182,214,218,252,255,257,263, 269,270,276,330,367,368,378,379,381,394).

forrajes y ensilados ( 55,81,88,104,106,219,222,258,298,299 )  
piensos ( 55,223,233,262,266,281 ).

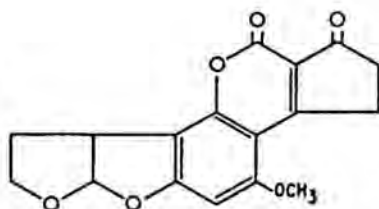
Existe una gran variedad de hongos miceliares que en condiciones adecuadas ( 58 ) pueden elaborar y acumular metabolitos tóxicos para el hombre y los animales, denominados micotoxinas (10, 78, 94, 100, 108, 145, 153, 171, 177, 201, 209, 219, 224, 259, 260, 261, 264, 279, 293, 321, 342, 352, 339, 392 ).

El número de hongos toxigénicos es muy elevado, estimándose que entre el 30 y el 40% de los géneros aceptados (260) tienen la capacidad de elaborar algunos metabolitos tóxicos. Además debe tenerse en cuenta que una misma micotoxina puede ser elaborada por géneros distintos y que una determinada especie puede producir diferentes tipos de micotoxinas. Aunque la lista de metabolitos secundarios tóxicos está en continua progresión, los que clásicamente han sido considerados como los de mayor importancia son los elaborados por los géneros Aspergillus, Penicillium y Fusarium.

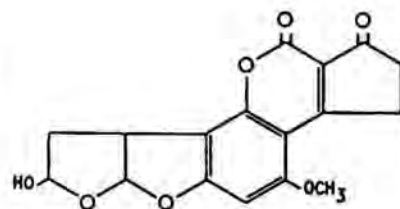
El grupo Aspergillus flavus es el máximo productor del tipo de micotoxinas denominadas aflatoxinas cuyo estudio se inició en la década de los sesenta ( 260 ). Son las únicas micotoxinas para las que existe una reglamentación específica en gran número de países que regula las cantidades máximas permitidas en alimentos y piensos ( 35,136,338 ).



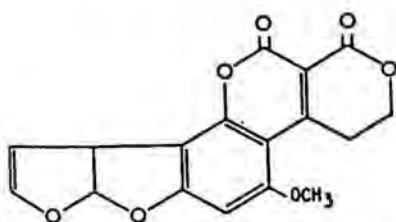
Aflatoxina B<sub>1</sub>



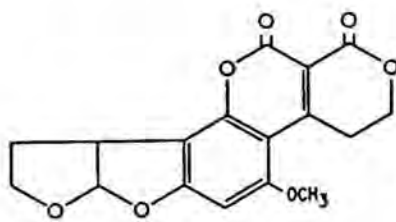
Aflatoxina B<sub>2</sub>



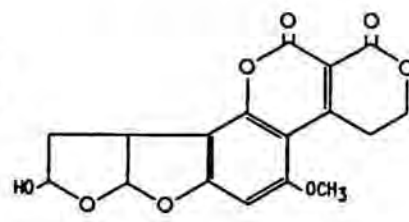
Aflatoxina B<sub>2a</sub>



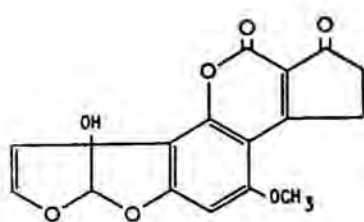
Aflatoxina G<sub>1</sub>



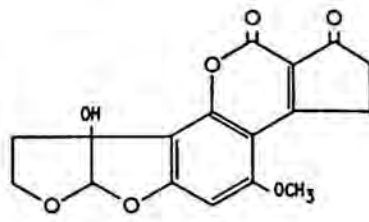
Aflatoxina G<sub>2</sub>



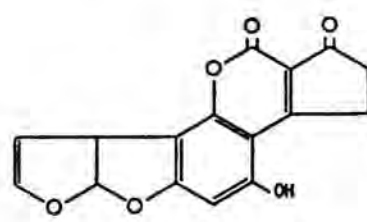
Aflatoxina G<sub>2a</sub>



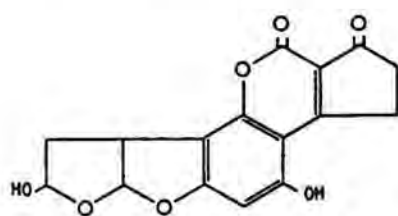
Aflatoxina M<sub>1</sub>



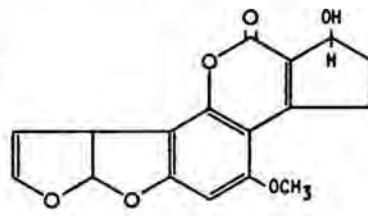
Aflatoxina M<sub>2</sub>



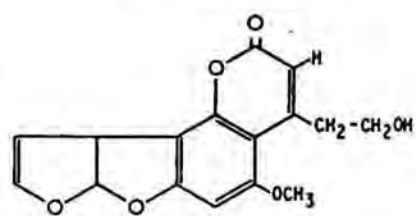
Aflatoxina P<sub>1</sub>



Aflatoxina Q<sub>1</sub>



Aflatoxicol



Parasiticol

CUADRO n° 1 .- Estructura química de las principales aflatoxinas y sus derivados.

Químicamente presentan una estructura difumarocumarínica (CUADRO nº 1 ) (392) y observadas a la luz ultravioleta presentan fluorescencia azul (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> ) o verde (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>). Posteriormente se identificaron las aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub> que son los derivados hidroxilados de la B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> respectivamente. Otros derivados detectados son las aflatoxinas B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub> (2-hidroxiderivados de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> ), las aflatoxinas P<sub>1</sub> y Q<sub>1</sub>, aflatoxicol y parasiticol.

Las aflatoxinas son elaboradas básicamente por cepas de Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus, aunque en la bibliografía se cita también su producción por parte de cepas de Penicillium puberulum (185), Aspergillus ostianus (340), A. niger, A. ruber, A. wentii, P. citrinum, P. frequentans, P. variabile y Rhizopus sp. (245, 260) aunque no ha podido ser nuevamente demostrada la capacidad productora de estas cepas en otros ensayos (256, 387).

Uno de los aspectos de mayor interés en el estudio de las micotoxinas es establecer las condiciones óptimas que favorecen la elaboración y acumulación de las mismas por parte de las cepas productoras. Entre ellas podemos citar:

#### Condiciones mediales

- Temperatura ( 32, 41, 58, 59, 116, 165, 186, 201, 244, 267, 290, 333, 335, 336, 349, 358, 364, 383 ).
- pH ( 59, 115, 128, 186, 201, 244 ).

- Tiempo de incubación ( 29, 195, 201, 345, 349 ).
  
- Tipo de sustrato:
  - a) naturales ( 12, 14, 29, 41, 104, 176, 186, 205, 227, 228, 238, 239, 247, 265, 277, 280, 301, 317, 318, 344, 347, 351, 357, 386, 399, 400 ).
  
  - b) semisintéticos ( 25, 56, 57, 59, 115, 167, 195, 226, 273, 290, 331, 332, 349, 353, 366, 380 ).
  
  - c) definidos ( 104, 106, 107, 116, 117, 167, 168, 197, 297, 313, 345, 346, 348, 349, 350 ).
  
- Influencia de determinadas sustancias sobre la producción de aflatoxinas ( 21, 25, 28, 30, 53, 54, 96, 104, 105, 107, 117, 133, 134, 135, 148, 168, 169, 184, 206, 227, 230, 237, 238, 246, 247, 280, 291, 297, 311, 314, 395, 396, 397, 398 ).
  
- Importancia del tamaño del inóculo ( 107, 345, 346 ).
  
- Importancia del método de cultivo ( 115, 133, 167, 175, 247, 297, 313, 350 ).
  
- Influencia de la luz ( 30, 31 ).

Asimismo y dada la importancia sanitaria y económica de las aflatoxinas se han desarrollado numerosos métodos

para detectar y cuantificar su presencia, tanto en los sustratos naturales como en los medios de cultivo. Todos se basan en la realización de una extracción primaria, una purificación y separación de las mismas, seguida de una confirmación y cuantificación (15,21,36,71,89,90,112,129,135,150,151,152,158,181,193,251,341,343,353,357,360,361,365,388,392).

Aunque las metodologías citadas permiten una exacta detección y cuantificación de las aflatoxinas producidas, requieren en la mayoría de los casos la puesta a punto de diversas técnicas de las que no siempre se dispone en el laboratorio de Microbiología. Por ello, varios investigadores han propuesto el empleo de diversos medios de cultivo que facilitan la realización de un ensayo inicial para detectar de forma rápida y sin necesidad de realizar la extracción, cepas productoras de aflatoxinas (172,229,313,363,375).

Con el fin de conocer la presencia de cepas del grupo Aspergillus flavus (Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus), potencialmente toxigénicas, Bothast y Fennell en 1974 (40) describieron un medio de cultivo específico, modificado por Pitt en 1983 (306) que permite detectarlas de forma selectiva en cualquier tipo de muestras al cabo de cuarenta y dos horas y cuya eficacia ha sido demostrada por otros autores (34).

Dado el carácter tóxico de este grupo de metabolitos secundarios, se citan en la bibliografía numerosas publicaciones referidas a ensayos biológicos que facilitan la detección de cepas toxigénicas. Entre las técnicas empleadas podemos citar:

- Bioensayos en patitos de un día ( 194, 260, 317, 339 ).
- Bioensayos en embrión de pollo ( 56, 74, 122, 234, 260, 271, 373, 374 ).
- Bioensayos en ratas y ratones ( 74, 196, 215, 260, 278 ).
- Bioensayos en pollitos ( 122, 162, 208, 260, 382 ).
- Bioensayos en cultivos celulares ( 260, 268, 295, 322 ).
- Bioensayos sobre células vegetales ( 260, 295 ).
- Bioensayos sobre insectos ( 95, 166, 260 ).
- Bioensayos sobre cultivos de microorganismos:
  - a) Bacterias gram positivas ( 19, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 56, 60, 66, 75, 102, 163, 217, 271, 282, 295, 296, 315, 323, 330, 356, 359, 362, 392 ).
  - b) Bacterias gram negativas ( 66, 75, 194, 217, 260, 282 ).
  - c) Levaduras y hongos filamentosos ( 66, 75, 260, 296, 354, 393 ).



- Bioensayos sobre larvas de Artemia salina ( 52, 66, 118, 122, 173, 260, 275, 295, 331, 359 ).
  
- Bioensayos sobre peces zebra (Brachydario rerio)(120,295).

La capacidad de los hongos de desarrollarse en los más diversos sustratos, unido a la fácil dispersión de los propágulos fúngicos, determina que éstos puedan fácilmente colonizar al hombre e incidir sobre su salud directamente o a través de la cadena de contaminación citada a lo largo de este capítulo.

En el hombre se describen procesos de intoxicación o de infección a través del consumo de alimentos de origen vegetal o animal o el contacto directo con animales contaminados. Las interrelaciones ecológicas entre los diversos factores considerados se establece en la FIGURA nº 1.



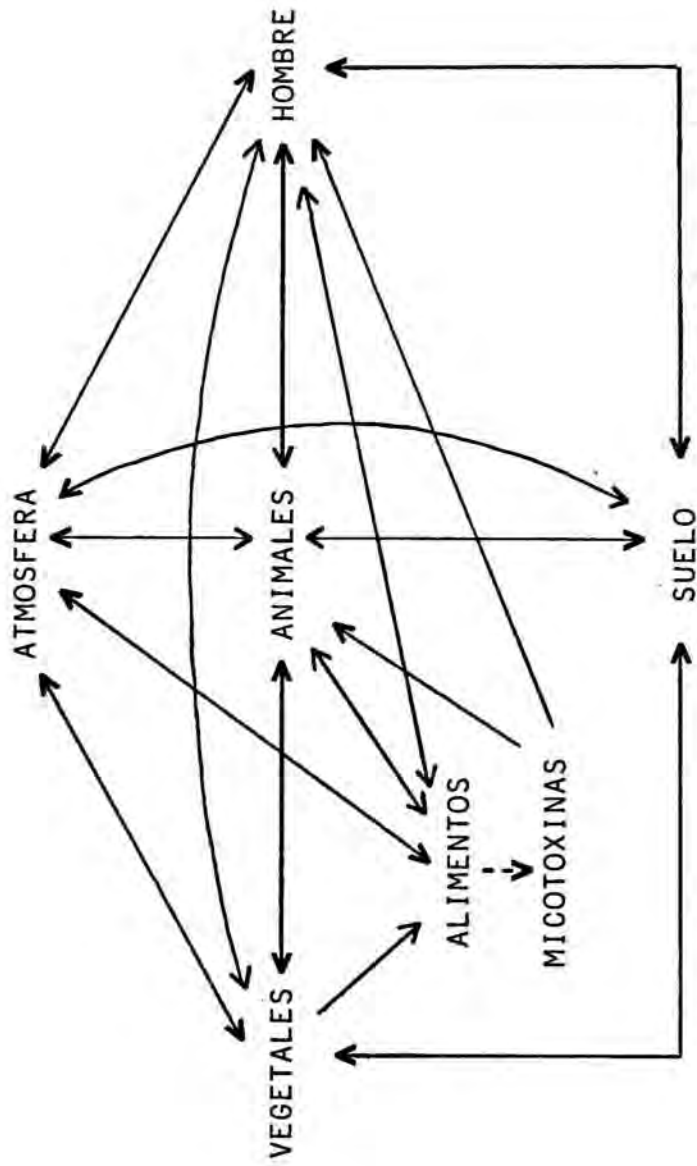


FIGURA nº 1.- Interrelaciones ecológicas que facilitan la contaminación fúngica

## 2. OBJETO E INTERES

## 2. OBJETO E INTERES

La célula animal puede ser parasitada por un amplio grupo de hongos miceliares y levaduras que desencadenan procesos clínicos característicos: dermatofitosis, micosis profundas, etc. Estos microorganismos han sido objeto de estudio por parte de numerosos investigadores, pero son escasos los trabajos que hacen referencia a la micoflora presente en animales sin afección fúngica alguna.

La presencia de todo tipo de hongos en la piel y plumas de los animales está directamente relacionada con el contenido en propágulos fúngicos viables del hábitat propio de cada animal: atmósfera, suelos, nidos, camas, etc.

Otro aspecto de gran interés es el de las micotoxicosis, originadas tras el consumo de alimentos contaminados por cepas fúngicas toxigénicas, capaces de elaborar y acumular micotoxinas sobre este sustrato o directamente por las micotoxinas, metabolitos secundarios de marcada resistencia a los factores ambientales y que una vez vertidos al medio por parte de las cepas productoras, pueden persistir activos durante un largo período de tiempo.

Por todo lo expuesto, hemos considerado de interés llevar a cabo una investigación que permita establecer la distribución de hongos en animales procedentes de granjas y explotaciones

ubicadas en su totalidad en Cataluña y que no presentaban procesos micóticos aparentes, así como estudiar la capacidad de elaborar y acumular aflatoxinas por parte de las cepas pertenecientes al grupo Aspergillus flavus aisladas de muestras de alimentos destinados al consumo animal, estudiando de forma exhaustiva su capacidad tóxica y determinando los niveles de las mismas que las cepas mencionadas pueden producir en diversas condiciones de cultivo.

El estudio detallado de los resultados obtenidos tiene por objeto indicar las relaciones ecológicas entre los hongos aislados de los diversos sustratos estudiados y la posible incidencia de animales portadores de hongos patógenos que pueden ser el elemento transmisor de procesos de infección a otros animales e incluso al hombre, así como detectar la presencia de cepas con capacidad de elaborar aflatoxinas, metabolitos que pueden ser acumulados en el animal y tras el consumo del mismo o de sus derivados, originar un proceso de micotoxicosis en el hombre.

### 3. PLAN DE TRABAJO

### 3. PLAN DE TRABAJO

El Plan de trabajo seguido en la presente Memoria ha sido el siguiente:

- 1.- Elección de las granjas y explotaciones
- 2.- Preparación y siembra de las muestras
- 3.- Determinación de la micoflora atmosférica
- 4.- Determinación de la micoflora presente en el pelo y plumas de los animales estudiados
- 5.- Determinación de la micoflora presente en el suelo
  - Micoflora total
  - Hongos queratinofílicos
- 6.- Determinación cualitativa y cuantitativa de la micoflora presente en piensos compuestos, forrajes y ensilados
- 7.- Estudio de la capacidad toxigénica de las cepas del grupo Aspergillus flavus aisladas de muestras de alimentos
  - a.- Ensayos de actividad frente a larvas de Artemia salina L.

b.- Ensayos de actividad frente a microorganismos

- Método de Wickerham

- Método de Campbell

- Método de los discos

8.- Detección y cuantificación de las aflatoxinas elaboradas por las cepas en estudio

- Cultivos en medio YES

- Cultivos en medio APA

- Cultivos en medio CAM

9.- Lectura y tratamiento de los resultados

#### 4. MATERIAL Y METODOS



#### 4.1. MUESTRAS ESTUDIADAS

Con el fin de estudiar la micoflora presente en el hábitat de animales aparentemente sanos se han elegido setenta y siete granjas o explotaciones ubicadas en Cataluña, cuya distribución geográfica por comarcas se detalla en la FIGURA nº 2.

Las granjas o explotaciones investigadas estaban destinadas a la producción de diversas especies animales, tal como se indica en la TABLA siguiente:

ESPECIE ANIMAL	Nº DE MUESTRAS ESTUDIADAS
Vaca	20
Cerdo	20
Gallina	15
Conejo	15
Oveja	3
Cabra	2
Caballo	1
Paloma	1
TOTAL	77

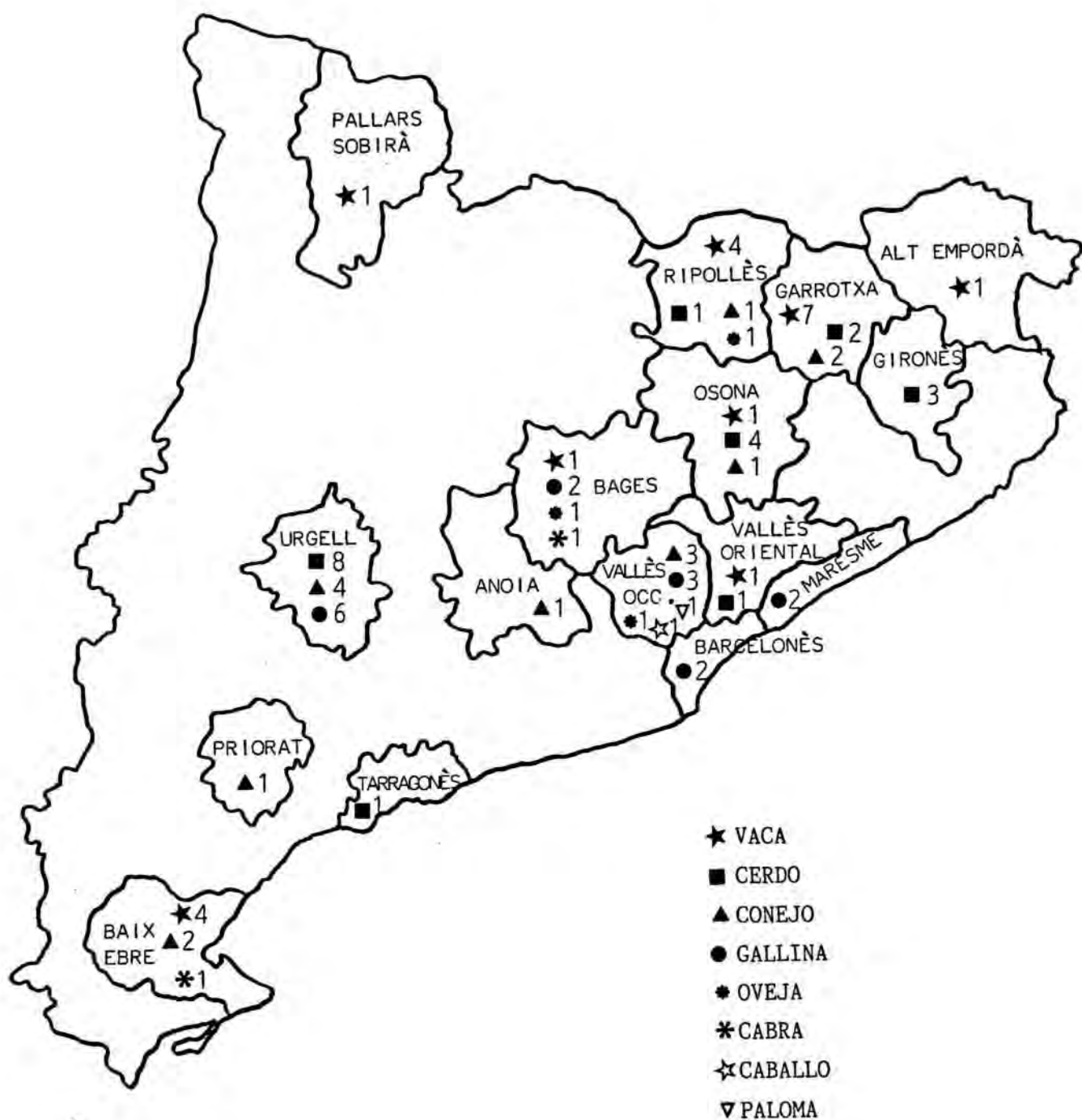


FIGURA nº 2 .- Distribución geográfica de las 77 explotaciones.

En la TABLA nº 5 se resume la distribución por comarcas de las setenta y siete explotaciones estudiadas, indicando el número atribuido a cada una de ellas.

De cada granja seleccionada se realizó el estudio de la micoflora presente en la atmósfera, en el pelo o plumaje de los animales, en los alimentos suministrados (pienso compuesto, forraje o ensilado) y en el suelo, siempre que el tipo de explotación fuera adecuado para ello. En las muestras de tierra se determinó asimismo la presencia de hongos queratinofílicos.

En la TABLA nº 6 se detalla el número total de muestras estudiadas.

	VACA	CERDO	CONEJO	GALLINA	OVEJA	CABRA	CABALLO	PALOMA
ANOIA	-	-	16	-	-	-	-	-
ALT EMPORDA	15	-	-	-	-	-	-	-
BAGES	67	-	-	25,66	58	26	-	-
BAIX EBRE	38,62,79,82	-	63,68	-	-	47	-	-
BARCELONES	-	-	-	7,78	-	-	-	-
GARROTXA	1,24,41,42, 56,80,81	52,53	69,70	-	-	-	-	-
GIRONES	-	18,21,23	-	-	-	-	-	-
MARESME	-	-	-	6,8	-	-	-	-
OSONA	73	48,49,50,51	71	-	-	-	-	-
PALLARS SOBIRA	11	-	-	-	-	-	-	-
PRIORAT	-	-	20	-	-	-	-	-
RIPOLLES	29,31,76,77	33	75	-	32	-	-	-
TARRAGONES	-	2	-	-	-	-	-	-
URGELL	-	19,22,34,36, 37,54,55,59	39,44,45,74	4,35,40, 46,57,61	-	-	-	-
VALLES OCCIDENTAL	-	-	28,43,72	30,64,65	60	-	17	27
VALLES ORIENTAL	14	10	-	-	-	-	-	-

TABLE n° 5.- Distribución por comarcas de las setenta y siete explotaciones estudiadas, indicando el número atribuido a cada una de ellas.

	AIRE	PELO PLUMAS	PIENSO	FORRAJE	ENSILADO	SUELO	TOTAL
VACA	20	20	19	4	3	11	77
CERDO	20	20	20	-	-	3	63
CONEJO	15	15	15	-	-	6	51
GALLINA	15	15	15	-	-	15	60
OVEJA	3	3	3	-	-	2	11
CABRA	2	2	1	1	-	2	8
CABALLO	1	1	1	1	-	1	5
PALOMA	1	1	1	-	-	1	4
TOTAL	77	77	75	6	3	41	279

Tabla nº 6 .- Distribución y número total de muestras estudiadas.

## 4.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

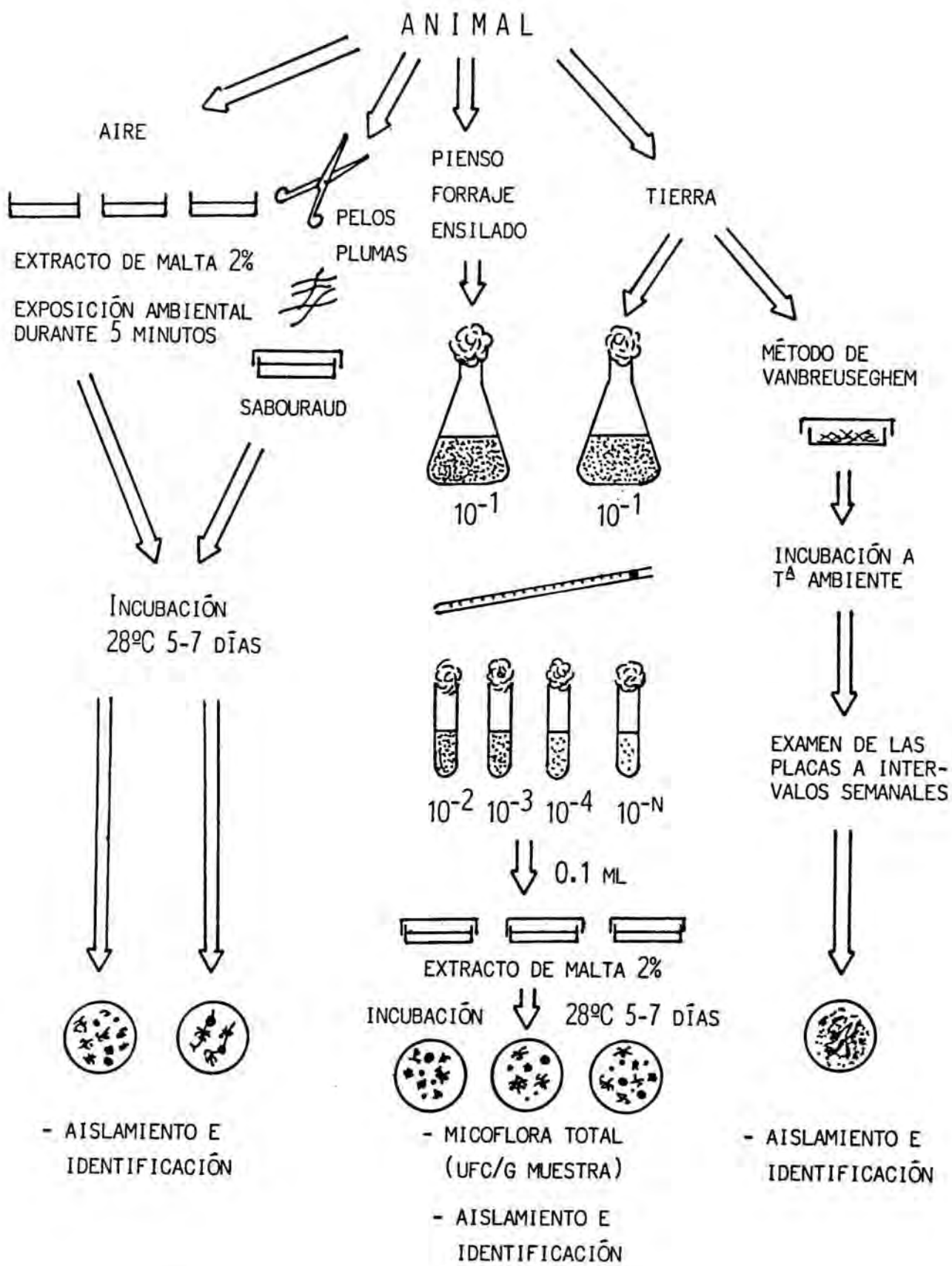
La metodología empleada para el estudio de la micoflora presente en el hábitat de los animales investigados se resume en el ESQUEMA nº 1 .

### 4.2.1. ESTUDIO DE LA MICOFLORA ATMOSFÉRICA

El estudio de la micoflora atmosférica se realizó siguiendo técnicas gravimétricas ( 127, 159, 262,329). Tres placas de Petri, conteniendo agar extracto de malta al 2% adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina, convenientemente distribuidas por la nave en la que se alojaban los animales, se expusieron durante cinco minutos, con el fin de que los propágulos fúngicos presentes en la atmósfera se depositaran libremente por acción de la gravedad.

Las placas se transportaron lo más rápidamente posible al laboratorio, realizándose la incubación a 28°C durante 5-7 días.

Tras el desarrollo de las colonias se procedió al aislamiento e identificación de aquellas que a simple vista o por observación al microscopio estereoscópico fueron consideradas diferentes. El aislamiento se realizó en tubos de agar extracto de malta al 2% y la identificación se llevó a cabo siguiendo las técnicas descritas en el apartado 4.3.



ESQUEMA nº 1 .- Metodología de trabajo seguida.

#### 4.2.2. ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE PELOS Y PLUMAS

De cada explotación estudiada se escogió un animal representativo, del cual se tomaron con pinzas o tijeras, previamente esterilizadas, las muestras de pelo o plumas. Transportadas éstas al laboratorio en placas de Petri estériles, se procedió a la siembra de las mismas en Agar glucosado de Sabouraud (AGS), adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina con el fin de inhibir el desarrollo bacteriano.

La siembra se realizó depositando fragmentos de pelo o plumas en la superficie del medio de cultivo. Las placas se incubaron a 28°C durante 5-7 días.

Tras el desarrollo de las colonias se procedió al aislamiento e identificación de las cepas, siguiendo la técnica descrita en el apartado 4.2.1.

#### 4.2.3. ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE PIENSO, FORRAJE Y ENSILADO

Las muestras de pienso, forraje y ensilado se tomaron de los comederos de las granjas o explotaciones y se transportaron al laboratorio en frascos estériles.

A partir de cada muestra se preparó una dilución inicial ( $10^{-1}$ )



en suero fisiológico estéril, realizándose un banco de diluciones decimales de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-5}$ .

La siembra se llevó a cabo por agotamiento en superficie (328), depositando 0.1 ml de cada dilución en tres placas de Petri, conteniendo agar extracto de malta al 2% adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina.

La incubación se realizó a 28°C, procediéndose a la lectura transcurridos 5-7 días.

Tras el desarrollo de las colonias se realizó el análisis cuantitativo de las muestras, escogiendo aquella dilución en la que se hubieran desarrollado entre 10 y 100 Unidades Formadoras de Colonias (U.F.C.) (328) y obteniendo la media aritmética del número de colonias desarrolladas en las tres placas correspondientes a la dilución elegida. Multiplicando el nº de UFC por el factor de dilución y teniendo en cuenta el volumen de muestra depositado en la placa se determinó el nº total de UFC/g de muestra.

Realizado el contaje se procedió al aislamiento e identificación de las cepas, siguiendo la técnica descrita en el apartado 4.2.1.

#### 4.2.4. ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE SUELOS

#### 4.2.4.1. MICOFLORA TOTAL

Siempre que el tipo de explotación lo permitía, se tomaron muestras de la tierra en contacto con los animales, transportándose al laboratorio en frascos estériles.

A partir de cada muestra se prepararon diluciones iniciales ( $10^{-1}$ ) en suero fisiológico estéril y se realizó un banco de diluciones decimales desde  $10^{-3}$  hasta  $10^{-7}$ .

La siembra se llevó a cabo por agotamiento en superficie (328), depositando 0.1 ml de cada dilución en tres placas de Petri, que contenían agar extracto de malta al 2% adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina.

La incubación se realizó a 28°C, por espacio de 5-7 días.

Tras el desarrollo de las colonias se realizó el análisis cuantitativo de las muestras, escogiendo aquella dilución en la que se hubieran desarrollado entre 10 y 100 UFC/placa (328) y obteniendo el número total de UFC/g tal como se describe en el apartado 4.2.3.

Posteriormente se procedió al aislamiento e identificación de las cepas siguiendo la técnica descrita en el apartado 4.2.1.

#### 4.2.4.2. HONGOS QUERATINOFÍLICOS

La determinación de los hongos queratinofílicos presentes en las muestras de suelo estudiadas se llevó a cabo siguiendo la técnica "Tokava Hair Baiting Method" de Vanbreuseghem ( 371 ) basada en depositar en placas de Petri estériles la cantidad suficiente de tierra para formar una capa uniforme de una altura aproximada de medio centímetro. Para conseguir el grado de humedad adecuado, se añadió a cada placa agua o suero fisiológico estéril. No se consideró necesaria la adición de antibiótico para inhibir la flora bacteriana, siguiendo las recomendaciones propuestas por otros autores ( 73 ).

Como fuente de queratina se utilizó crin de caballo estéril cortado en fragmentos de aproximadamente 3-4 cm, que se colocaron con pinzas previamente esterilizadas sobre la superficie de la capa de suelo.

Las placas así preparadas se incubaron a temperatura ambiente, observándose a intervalos semanales durante seis meses, hasta la detección mediante el microscopio estereoscópico de crecimiento fúngico sobre la queratina. Para evitar la desecación se añadía agua o suero fisiológico estéril de forma periódica.

Al observar formación de micelio sobre un fragmento de crin, se seleccionaba con pinzas esterilizadas y se depositaba sobre una placa de Petri, conteniendo Mycosel<sup>R</sup>, con la finalidad de

obtener el crecimiento de los hongos queratinofílicos en cultivo puro. Estas placas se incubaron a 28°C, durante 5-7 días.

Desarrolladas las colonias se procedió al aislamiento en tubos de agar extracto de malta al 2% o en agar glucosado de Sabouraud según el género al que pertenecían al colonias. La identificación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.3.

### 4.3. ESTUDIO TAXONOMICO

#### 4.3.1. CLASIFICACION HASTA NIVEL DE GENERO DE LOS HONGOS MICELIARES

Desarrolladas las colonias y con el fin de proceder a su identificación hasta nivel de género, se llevó a cabo la observación de su hábitat de crecimiento. Si este método no es suficiente se realiza una preparación microscópica a partir de la colonia.

La metodología seguida consiste en separar un fragmento del cultivo con la ayuda de dos agujas enmangadas, se fracciona sobre un portaobjetos y los fragmentos se transfieren a un tubo de ensayo que contiene agua y Tween 80 al 0.01%. La suspensión se somete a agitación mecánica con el fin de dispersar los conidios y poder observar con claridad el conidióforo y la célula conidiógena de la cepa en estudio. A continuación se realiza la preparación entre portaobjetos y cubreobjetos pudiendo añadirse unas gotas de lactofenol antes de proceder a la observación microscópica.

Tras el estudio de las características macroscópicas y microscópicas de la cepa, se consigue la clasificación hasta nivel de género.

En ocasiones, la dificultad de identificación de las cepas determina que se lleve a cabo la técnica del microcultivo,

que consiste en colocar en una placa de Petri estéril un tubo de vidrio doblado, sobre el que se deposita un portaobjetos estéril. Se vierte, sobre éste, una fina capa de medio de cultivo y una vez solidificado se lleva a cabo la siembra a partir de un cultivo puro, realizando para ello, una fina estría.

Para mantener las condiciones de humedad adecuada se adicionan una gotas de glicerol al 30% estéril.

La incubación se realiza a 28°C durante 2-3 días. Transcurrido este período de tiempo se observa al microscopio.

La inclusión de las cepas en un determinado género se realizó siguiendo los Tratados de von Arx ( 17 ), Barnett y Hunter ( 22 ) y Carmichael y cols. ( 86 ).

#### 4.3.2. CLASIFICACION HASTA NIVEL DE ESPECIE DE LOS HONGOS MICELIARES

Identificado el género al que pertenecen las cepas aisladas y conservadas en cultivos axénicos, se procede a su clasificación hasta nivel de especie.

A partir de los cultivos se preparó una suspensión de un pequeño fragmento de la colonia en Tween 80 al 0.01%, sometiéndose a agitación mecánica con el fin de dispersar los conidios.

Con la ayuda de un asa de siembra doblada, se procedió a depositar una gota de la suspensión en el centro de la placa de Petri, excepto en el caso de los género Penicillium y Aspergillus en los que se depositan tres asas, correspondiendo a los vértices de un triángulo equilátero.

El medio de cultivo utilizado varía según el género en estudio. A continuación se indican los medios de cultivo empleados para la identificación hasta nivel de especie de los distintos géneros aislados a lo largo de la presente Tesis.

#### AGAR EXTRACTO DE MALTA AL 2%

Absidia (401), Acremonium (146 ), Ampulliferina (130), Aphanocladium (146), Arthrinium (130), Aspergillus (310, 327), Aureobasidium (130), Botrytis (130), Chaetomium ( 18 ), Circinella (401), Cylindrocarpon ( 17 ), Doratomyces (130 ), Drechslera (130), Emericellopsis (146 ), Epicoccum (130 ), Gilmaniella (130), Gliocladium (309), Humicola (130), Mucor (401), Myceliophthora(283,284)Mycogone (188), Paecilomyces (326), Penicillium (211,305, 309), Periconia (130), Pleospora ( 17 ), Rhizopus (401), Sepedonium (114, 188), Scopulariopsis (124, 328), Scytalidium (130 ), Staphylotrichum (130), Trichoderma (319), Tritirachium (187), Ulocladium ( 130,131 ).

#### AGAR EXTRACTO DE MALTA AL 5%

Alternaria ( 130,131,204 ).

AGAR CZAPEK

Aspergillus (310,327), Penicillium (211,309), Chaetomium ( 87 )  
y Gliocladium ( 309 ).

AGAR GLUCOSADO DE SABOURAUD

Acremonium ( 146 ), Arthroderma ( 312 ), Chrysosporium  
(85,284), Geotrichum ( 84 ), Microsporum ( 312 ), Trichophyton  
( 312 ).

OAT-MEAL AGAR

Phoma ( 37 ).

AGAR PATATA GLUCOSADA

Fusarium (38,39,203), Microascus ( 369 ).

AGAR GLUCOSA

Cladosporium (130,131,376 ).

La incubación se realizó a 28°C durante 10-14 días, excepto en las cepas del género Cladosporium que se incubaron a temperatura ambiente, durante siete días.

Para la identificación hasta nivel de especie deben considerarse de forma exhaustiva las características macroscópicas y microscópicas que se citan a continuación.

Las características macroscópicas principales son:



Velocidad de crecimiento

Color del anverso y del reverso

Presencia de pigmento difusible en el medio de cultivo

Presencia de gotas de exudado. En caso afirmativo, color de las mismas

Textura o aspecto de la colonia. Presencia de esclerocios

Formación de surcos radiales y/o concéntricos

Presencia y abundancia de hifas estériles

Las principales características microscópicas son:

Características de las hifas

Características del conidióforo

Características de la célula conidiógena

Características de los conidios

Características de los cuerpos fructíferos

Características de las esporas

Presencia o ausencia de clamidosporas

Presencia de estructuras características de determinados géneros: hifas en raqueta, células de Hülle, etc.

Aquellas cepas que transcurridos treinta días no mostraron estructuras reproductivas fueron consideradas como Micelio estéril hialino o dematiáceo, según presentaran sus hifas transparentes o coloreadas.

### 4.3.3. METODO EMPLEADO PARA LA CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS

Las levaduras aisladas se han identificado mediante el sistema API 20C Aux<sup>R</sup> (207). Con este micrométodo se consigue la clasificación, estudiando la capacidad de crecimiento en presencia de diecinueve carbohidratos como única fuente de carbono.

El método consiste en preparar una suspensión de la levadura en estudio, hasta alcanzar una turbidez igual al tubo nº 2 de la escala de McFarland (225). 100 µl de esta suspensión se transfirieron al API 20C Medium, cuya composición se especifica en el apartado 4.7.

Posteriormente se llena la galería y se realiza la incubación a 28°C, durante 48-72 horas.

Los carbohidratos estudiados son los siguientes: glucosa (2.4 mg), glicerol (2.4 mg), 2-ceto-D-gluconato (2.4 mg), L-arabinosa (2.4 mg), xilosa (2.4 mg), adonitol (2.4 mg), xilitol (2.4 mg), galactosa (2.4 mg), inositol (4.7 mg), sorbitol (2.4 mg), metil-D-glucósido (2.4 mg), N-acetil-glucosamina (2.4 mg), celobiosa (2.4 mg), lactosa (2.4 mg), maltosa (2.4 mg), sacarosa (2.4 mg), trehalosa (2.4 mg), melezitosa (2.4 mg) y rafinosa (3.8 mg).

Paralelamente se realizaron microcultivos con el fin de conocer

si la levadura en estudio poseía capacidad de formar micelio o pseudomicelio ( 210 ).

La metodología empleada es la indicada en el apartado 4.3.1. teniendo en cuenta que el medio de cultivo es el Corn Meal agar y que es conveniente inocular la levadura, siguiendo dos líneas paralelas. Se coloca un cubreobjetos esterilizado antes de proceder a la incubación.

Asimismo se realizaron otras pruebas complementarias: capacidad de crecimiento a 37°C, reducción de nitratos y producción de sustancias amiloides extracelulares.

#### Capacidad de crecimiento a 37°C

Las cepas en estudio se sembraron en agar extracto de malta al 2% y se incubaron a 37°C durante 2-4 días. En caso de observarse un crecimiento débil se realizó una resiembra que se incubó durante 2-4 días a la misma temperatura, siendo estos últimos resultados considerados como definitivos ( 210 ).

#### Reducción de nitratos

Las cepas en estudio se siembran en cuatro tubos de ensayo con agua de peptona y nitrato (210) y se incuban a 28°C, realizándose las lecturas al cabo de 3,5,10 y 15 días, mediante la adición del reactivo de Griess - Illosway. La presencia de nitritos se manifiesta por la aparición de color rojo. Si se produce un resultado negativo, debe confirmarse añadiendo al

tubo polvo de zinc que reducirá a nitrito cualquier residuo de nitrato y dará color rojo.

#### Producción de sustancias amiloides extracelulares

Las cepas se sembraron en el medio descrito en el apartado 4.7. y se incubaron a 28°C durante 1-2 semanas. La lectura se realizó tras adición de unas gotas de lugol. Si las cepas elaboraron polisacáridos extracelulares, se observará coloración azul característica ( 210 ).

#### 4.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE CEPAS DEL GRUPO ASPERGILLUS FLAVUS

Se ha investigado la capacidad de producción de aflatoxinas de las cepas del grupo Aspergillus flavus aisladas de las muestras destinadas a la alimentación de los animales, junto con cepas utilizadas como control positivo ( Aspergillus flavus NRRL 6540, A. flavus NRRL 3251, A. flavus NRRL 6412, A. parasiticus NRRL 2999 y A. parasiticus NRRL 3145) y negativo ( A. flavus NRRL 6538) de producción de aflatoxinas.

Los medios de cultivo empleados para poner de manifiesto la capacidad de producción de aflatoxinas han sido: "Yeast extract sucrose" (YES), "Aflatoxin producing ability" (APA) y "Coconut agar medium" (CAM).

La detección de aflatoxinas se ha realizado mediante cromatografía en capa fina a partir de depositar alícuotas del extracto clorofórmico obtenido tras el desarrollo de las cepas en estudio en los medios YES, APA y CAM y del extracto crudo procedente de los cultivos en el medio YES. Asimismo se han realizado cromatografías de los cultivos obtenidos en los medios APA y CAM, siguiendo la metodología de Filtenborg (141).

#### 4.4.1. PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL MEDIO YES

##### Preparación del inóculo

Tras el desarrollo de las cepas en estudio en agar patata glucosa (PDA) durante 7-10 días a 28°C, se prepararon suspensiones de las mismas en Tween 80 al 0.01%. Las suspensiones se filtraron a través de gasa estéril para eliminar los restos de micelio, determinándose el número de conidios por ml mediante cámara de contaje. La concentración final se ajustó a  $10^6$  conidios/0.1 ml (59).

Posteriormente se inocularon 0.1 ml de cada suspensión en erlenmeyers de 250 ml que contenían 50 ml del medio YES ( 25, 56, 57, 59, 115,167, 195, 226, 273, 290, 331, 332, 349, 353, 366, 380 ) ajustado a pH 5.5 (366 ).

La incubación se realizó a 28°C durante 14 días en ausencia de luz y en cultivo estático ( 115, 133, 167, 247, 297, 313, 350 ).

##### Obtención del extracto crudo

Antes de realizar el proceso de extracción se tomaron, mediante pipeta estéril alícuotas del cultivo que fueron sometidas a filtración esterilizante. El filtrado obtenido se consideró el extracto crudo.

##### Ensayos realizados con el extracto crudo

A partir del extracto crudo se realizaron las siguientes deter-

minaciones:

- Determinación del pH (pHmetro Crison Digit 501)
- Cromatografía en capa fina
- Determinación de la actividad toxigénica frente a larvas de Artemia salina
- Estudio de la capacidad inhibidora del desarrollo de microorganismos

#### Extracción y concentración

A cada erlenmeyer se añadieron 50 ml de cloroformo, disgregando el micelio con ayuda de un agitador magnético. El micelio se recogió mediante filtración sobre papel de filtro previamente pesado (Whatman nº 3, Wathman Ltd.) y se sometió a temperatura de 80°C durante 14-20 horas, hasta peso constante.

El filtrado se pasó a un embudo de decantación recogiendo la capa clorofórmica a través de sulfato sódico anhidro.

La extracción se repitió con dos volúmenes de 50 ml de cloroformo, reuniendo los extractos clorofórmicos que se evaporaron a sequedad en rotavapor (Büchi) con ayuda de vacío y a la temperatura de 55°C.

El residuo obtenido se redisolvió en 5 ml de cloroformo (extracto solución A) y 1 ml de este extracto volvió a evaporarse, redisolviéndolo en 1 ml de acetona-agua (80:20 v/v) para el

ensayo frente a larvas de Artemia salina ( Apartado 4.4.4.1 ).

Todos los extractos se guardaron en viales de color ámbar con tapón de rosca y cierre de teflón.

La metodología empleada es la recomendada por diversos autores ( 56, 332, 391 ).

#### Separación cromatográfica

La separación de las aflatoxinas presentes en el extracto clorofórmico y en el extracto crudo se realizó mediante cromatografía en capa fina (15, 150, 151, 152, 158, 341, 343, 392 ).

Como soporte se utilizaron cromatoplasmas de silicagel 60, sin indicador de fluorescencia de 20x20 y espesor de capa de 0.25 mm (Merck<sup>R</sup> 5553), divididas en 20 franjas de 1 cm de anchura y activadas por calentamiento a 110°C durante 30 minutos. Una vez activadas, las cromatoplasmas se guardan en un desecador, pudiendo ser utilizadas cuando alcanzan la temperatura ambiente.

En una línea imaginaria situada a 4 cm de la base de las cromatoplasmas se depositaron dos volúmenes de 6 µl, cada uno en un punto central de una de las franjas citadas) de la solución problema ( extracto clorofórmico o extracto crudo). En uno de los depósitos se superpusieron además 5 µl de la solución patrón de aflatoxinas (patrón interno). En otro punto de la línea imaginaria se depositaron 5 µl de la solución patrón de aflato-



xinas (patrón externo) ( 151 ).

Los depósitos de los volúmenes indicados se realizan con una microjeringa (Hamilton).

Preparadas las cromatoplasmas se trazó con un lápiz de grafito una recta a 11 cm de la línea en la que se habían colocado los depósitos para indicar la altura hasta la que debía llegar el frente de solvente.

La cámara de desarrollo se preparó con 200 ml del solvente adecuado. En este caso se ha utilizado cloroformo-acetona (180:20 v/v), recomendado para la separación de aflatoxinas ( 15, 150, 158, 392 ).

Transcurridos 5 o 10 minutos después de preparadas las cromatoplasmas se introdujeron en la cubeta, en correcta posición vertical y con la superficie del silicagel distante 3-5 cm de la pared frontal de la cámara de desarrollo. Se tapó la cubeta y se dejaron desarrollar las cromatoplasmas en cámara insaturada hasta que el frente del solvente alcanzó la altura indicada (11 cm). Finalizado el proceso las cromatoplasmas se secaron al aire, en ausencia de luz.

#### Detección con luz ultravioleta

Una vez secas se observaron las cromatoplasmas con lámpara de luz ultravioleta a 360 nm (UV Atom-70), sobre fondo negro

y a la distancia de unos 10 cm de las misma, detectándose la fluorescencia típica de las micotoxinas estudiadas ( 15, 150, 158, 392 ).

- Aflatoxina  $B_1$  y  $B_2$  : color azul intenso

- Aflatoxina  $G_1$  y  $G_2$  : fluorescencia azul verdosa

Con el solvente utilizado el orden de aparición de las mismas, de mayor a menor Rf es el siguiente: aflatoxina  $B_1$ , aflatoxina  $B_2$ , aflatoxina  $G_1$  y aflatoxina  $G_2$ .

Considerando el color de la fluorescencia emitido y el orden de aparición en las cromatoplasmas, se puede detectar la presencia de aflatoxinas en la muestra, comparando con las fluorescencias y el Rf de los patrones.

#### Confirmación

Para confirmar la presencia de aflatoxinas  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$  y  $G_2$  se procedió a pulverizar la zona de la cromatoplasma en la que se observaban con una solución de ácido sulfúrico-agua destilada (1/3), con lo cual las cuatro aflatoxinas mostraron fluorescencia de color amarillo intenso a 360 nm ( 15, 392 ).

#### Cuantificación

Para el análisis cuantitativo de las manchas consideradas positivas, después de su confirmación se ha utilizado el método

del límite de detección descrito por Gimeno (150,151,152 ).

Este método se basa en la comparación entre el límite inferior de aparición de la micotoxina en la mancha problema y el límite de detección de la micotoxina patrón en las mismas condiciones, conociendo el factor de dilución de la muestra.

Para ello se cromatografiaron cantidades decrecientes del extracto solución A (6,5,4,3,2 y 1  $\mu$ l), determinándose el mínimo volumen en el que podía aún detectarse la micotoxina tras el desarrollo de la cromatoplaca.

La concentración de la micotoxina problema en la muestra se determinó por la fórmula:

$$\mu\text{g de aflatoxina/l de medio de cultivo} = \frac{L \times v \times 10^6}{a \times V}$$

siendo:

L= Límite de detección de las micotoxinas expresado en  $\mu$ g

v= volumen del extracto solución A expresado en ml

a= volumen correspondiente a la última mancha visible de la micotoxina problema (extracto solución A) expresado en  $\mu$ l

V= volumen de medio de cultivo extraído expresado en ml

Si la aflatoxina era visible en todos los volúmenes cromatogra-

fiados, se procedía a la dilución del extracto solución A, según la siguiente pauta: 50  $\mu$ l del mismo se pasaban a un mini-vial que contenía 250  $\mu$ l de cloroformo. De este modo se obtenía una dilución 1/6 (extracto solución B).

Posteriormente se procedía a cromatografiar una serie de volúmenes decrecientes del extracto solución B que se desarrollaron tal como se ha descrito anteriormente. Se observó cual era el volumen correspondiente a la última mancha visible de la micotoxina, aplicándose la fórmula citada y multiplicando el resultado por seis, se calculaba la concentración de aflatoxinas presente en la muestra.

Si la micotoxina seguía siendo visible en todas las manchas se realizaba una nueva dilución y un nuevo desarrollo y así sucesivamente, hasta conseguir determinar el volumen correspondiente a la última mancha en la que se observaba la micotoxina en estudio.

#### 4.4.2. PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN EL MEDIO APA Y EN EL MEDIO CAM

La metodología seguida para detectar la producción de aflatoxinas en los medios APA (172 ) y CAM (229 ) es la siguiente:

A partir de cultivos de siete días de cepas del grupo Asper-

gillus flavus en estudio en agar extracto de malta al 2%, se realizó la siembra por inoculación central en placas de APA y CAM.

Transcurrido un período de incubación de 10 días a 28°C en el caso del medio APA y de 7 días en el medio CAM, se anotaron las características macroscópicas de las colonias desarrolladas: diámetro (en mm), color del anverso y del reverso, presencia de surcos radiales y/o concéntricos, abundancia de esporulación y presencia de esclerocios.

A continuación se observaron con la lámpara de luz ultravioleta a 360 nm sobre fondo negro, en la oscuridad y a unos 10 cm de distancia de la fuente de luz. Con este tipo de iluminación las cepas productoras de aflatoxinas mostraron un halo de fluorescencia azul que difundía por la placa, llegando a ocuparla por completo ( 172, 229 ).

Las cepas no productoras de aflatoxinas no mostraron fluorescencia específica alguna, cuando se observaron en las condiciones de ensayo indicadas.

#### Extracción de aflatoxinas de los cultivos obtenidos en APA y CAM

Las cepas que denotaron la aparición de fluorescencia en los medios de cultivo APA y CAM y todas aquellas cepas que mostraron capacidad para formar aflatoxinas en el medio YES,

aunque no mostraran fluorescencia, fueron sometidas a un proceso de extracción de las micotoxinas elaboradas y acumuladas, siguiendo la técnica descrita por Hara y cols. ( 172 ).

El contenido íntegro de cada placa de Petri (sustrato y micelio) se pesó y fraccionó en un vaso de precipitados con 75 ml de agua destilada, procediéndose a su homogenización durante 5 minutos. Se añadieron 25 ml de cloroformo, agitando durante 15 minutos. A continuación se filtró con ayuda del vacío y el filtrado se pasó a un embudo de decantación. La capa clorofórmica se filtró a través de sulfato sódico anhidro y se recogió en un matraz. La extracción se repitió dos veces más con 25 ml de cloroformo. Los extractos clorofórmicos reunidos se evaporaron a sequedad en rotavapor y se redisolviéron en 1 ml de cloroformo para proceder a la separación por cromatografía en capa fina.

#### Separación y cuantificación de las aflatoxinas producidas en los cultivos en APA y CAM

La separación de las aflatoxinas presentes en el extracto clorofórmico se realizó por cromatografía en capa fina, siguiendo la técnica descrita en el apartado 4.4.1.

La cuantificación se realizó por el método del límite de detección, según la pauta descrita en el apartado 4.4.1. El cálculo de los  $\mu\text{g}$  de aflatoxina/Kg de medio de cultivo, se realizó mediante la fórmula citada anteriormente, en la que se sustituyó

el factor V, por el peso inicial en gramos del medio de cultivo extraído.

#### 4.4.3. METODO PARA DETECTAR LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS SEGUN LA TECNICA DE FILTENBORG

El método descrito por Filtenborg ( 141 ) sirve para poner de manifiesto la producción de micotoxinas sin necesidad de realizar ningún proceso de extracción, ya que la mayoría de las micotoxinas son extracelulares y difunden en el medio de cultivo.

Desarrolladas las cepas en un medio de cultivo sólido (APA y CAM) y con la ayuda de un sacabocados se separó un pequeño disco de cultivo de 5 cm de diámetro, que se depositó sobre una placa de cromatografía en capa fina, previamente activada durante 20 minutos a 100°C.

Los discos de cultivo se levantaron con cuidado de la placa al cabo de unos 10 segundos (143 ) y se procedió al desarrollo de las cromatoplasmas, siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.4.1.

#### 4.4.4. METODOS BIOLOGICOS PARA DETECTAR LA CAPACIDAD TOXIGENICA .

En el presente estudio se ha investigado la toxicidad de cepas



del grupo Aspergillus flavus frente a larvas de Artemia salina L. ( 52, 66, 122, 173, 295, 331, 359 ) y la capacidad de producir sustancias inhibitoras del crecimiento de una gran diversidad de microorganismos.

Los ensayos microbiológicos se han llevado a cabo siguiendo diversas metodologías:

- Método de Wickerham ( 309 )
- Método de Campbell ( 72, 113 )
- Método de los discos ( 102 )

#### 4.4.4.1. ENSAYO TOXIGENICO FRENTE A LARVAS DE ARTEMIA SALINA L.

El método utilizado es una modificación del descrito por Payen y cols. ( 295 ) utilizando tres diluciones para cada cepa fúngica. Mediante esta técnica se ha investigado el poder patógeno de las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, tras su desarrollo en los medios de YES, CAM y APA. En el caso del medio YES se ha ensayado la toxicidad de los metabolitos secundarios liberados directamente al medio de cultivo (extracto crudo, apartado 4.4.1.) y tras extracción con cloroformo y posterior redisolución en acetona-agua (80:20) (apartado 4.4.1.).

Antes de iniciar el experimento se pesaron de 100 a 200 mg de huevos de Artemia salina L. y se colocaron en un erlenmeyer que contenía 100 ml de agua salada (solución estéril de NaCl



15g/l) y se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Con ayuda de una pipeta Pasteur se separaron las larvas de las cáscaras de los huevos y del resto de los huevos que no habían eclosionado y se colocaron en un tubo de hemólisis a una concentración aproximada de 600-1000 larvas / ml.

En el caso de las cepas desarrolladas en los medios APA y CAM, se cortó un disco del centro de la colonia con la ayuda de un tubo de hemólisis que se colocó en el fondo del tubo, añadiendo 1 ml de acetona-agua (80:20 v/v) y procediéndose a la agitación de los tubos. Los tubos así preparados se mantuvieron a 4°C durante una noche y antes del inicio del ensayo se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

El ensayo se realizó en una placa de Terasaki (295), colocando una gota de agua destilada estéril en las cuatro esquinas de la placa (50 µl) y utilizando tres cúpulas para cada extracto acetónico. En cada una de ellas se depositaron 10 µl del diluyente (agua salada) y 10 µl del extracto acetónico a ensayar en la primera cúpula. Después de homogenizar bien con la ayuda de la micropipeta se tomaron 10 µl de esta primera cúpula y se añadieron a la segunda, después de homogenizar se transfirieron 10 µl de la segunda cúpula a la tercera. De este modo se estableció una gama de diluciones (razón 0.5) para cada extracto acetónico.

En el caso del estudio de la toxicidad de los metabolitos elaborados en el medio YES con o sin extracción, se colocan en la primera cúpula 10  $\mu$ l del medio YES o del extracto clorofórmico evaporado y redisuelto en acetona-agua (80:20 v/v), siguiendo el mismo proceso de diluciones ya descrito.

Se añaden 10  $\mu$ l de la suspensión de larvas, de manera que en cada cúpula se depositan de 6 a 10 larvas.

El control se realizó con un disco del medio APA o CAM sin inocular en acetona-agua (80:20 v/v), medio YES estéril, o acetona-agua (80:20 v/v) según sea la solución problema a ensayar.

La lectura se realizó al cabo de 3,6 y 24 horas, observando la presencia o ausencia de larvas muertas en cada cúpula, utilizando el siguiente baremo:

- 0 = Todas las larvas vivas
- 1 = Una parte de las larvas muertas
- 2 = Todas las larvas muertas

De este modo el valor máximo que puede obtener un extracto fúngico es de 18.

#### 4.4.4.2. ENSAYOS TOXIGENICOS FRENTE A MICROORGANISMOS

##### Método de Wickerham

Este método ha sido descrito por Raper y Thom (309) para poner de manifiesto la capacidad de cepas del género Penicillium y otros saprófitos de elaborar antibióticos.

Se basa en sembrar, siguiendo una línea vertical a modo de secante, la cepa del grupo Aspergillus flavus en estudio en una placa de Petri que contiene 20 ml del medio de Wickerham (309) cuya composición se detalla en el apartado 4.7. Las placas sembradas se incuban a 28°C durante 48 horas y transcurrido este período de tiempo se siembran perpendicularmente a la cepa fúngica desarrollada los microorganismos a ensayar, marcando el punto de iniciación del inóculo. Seguidamente las placas se incuban a 37°C, realizándose la lectura al cabo de 24 h.

Los microorganismos frente a los que se ha ensayado la actividad toxigénica han sido : Escherichia coli ATCC 9637, Staphylococcus aureus ATCC 9144, Bacillus subtilis ATCC 11774, Bacillus megaterium ATCC 25848 y Candida albicans ATCC 10231

Si la cepa del grupo Aspergillus flavus ensayada es capaz de elaborar sustancias inhibitoras del crecimiento de estas bacterias y levadura, se observa que el crecimiento empieza más allá de la zona de inicio de la siembra. Si no se detecta creci-

miento, la inhibición es total. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

#### Método de Campbell

Con el fin de detectar la producción de metabolitos secundarios activos frente a diversos microorganismos, se ha seguido el método descrito por Campbell ( 72 ) y modificado por Dabinett y cols. ( 113 ).

Esta técnica consiste en colocar discos de cultivo de las cepas del grupo Aspergillus flavus en estudio, desarrolladas en los medios APA y CAM sobre placas de Petri que contenían medio de Tripticasa soja agar (TSA) en el que se había incluido el microorganismos a ensayar.

Previamente se prepararon suspensiones al 0.5 de la escala de Mc Farland (225) de los microorganismos en estudio: Escherichia coli ATCC 9637, Staphylococcus aureus ATCC 9144, Bacillus subtilis ATCC 11774, Bacillus megaterium ATCC 25848 y Candida albicans ATCC 10231, en solución salina estéril. Se inocula 1 ml de la suspensión en tubos que contienen 24 ml de TSA a 44°C-45°C, procediéndose a la homogenización y vertido a las placas.

Con la ayuda de un sacabocados se obtuvieron discos de 5 cm de diámetro de las colonias de Aspergillus flavus desarrolladas en los medios de APA y CAM durante siete días y se colocan

en posición invertida sobre las placa de TSA.

La incubación se realizó a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este período de tiempo, si las cepas del grupo A. flavus, estudiadas han elaborado sustancias activas, capaces de inhibir el crecimiento de los microorganismos estudiados, aparecerán halos de inhibición alrededor de los discos depositados.

Paralelamente se depositan discos procedentes de los medios de cultivo sin inocular que se consideran como ensayos control. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

#### Método de los discos

El método utilizado es el descrito por Clements (102) basado en la inhibición del crecimiento de Bacillus megaterium producida por la aflatoxina B<sub>1</sub>.

Esta técnica consiste en colocar discos de papel de filtro impregnados con la solución problema, sobre placas de Petri que contienen TSA en el que se han incluido los microorganismos en ensayo.

La preparación de los inóculos sigue la metodología descrita en el método de Campbell.

Se impregnan discos de papel de filtro Whatman nº 3 ( Whatman Ltd.) estériles de 5 mm de diámetro con 10 µl del extracto

clorofórmico obtenido a partir del crecimiento de las cepas en estudio en el medio YES (apartado 4.3.1.) y del extracto crudo obtenido del medio YES (apartado 4.3.1.). Como ensayo control se impregnan discos de papel de filtro con medio YES estéril y con cloroformo.

Los discos se colocan sobre las placas de TSA y se realiza la incubación a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este período de tiempo si la solución problema contiene sustancias activas capaces de inhibir el desarrollo de los microorganismos ensayados, aparecerán halos de inhibición alrededor de los discos.

Todos los estudios se realizaron por duplicado.

#### 4.5. PREPARACION Y VALORACION DE LOS PATRONES DE AFLATOXINAS

Para valorar los patrones de aflatoxinas, siguiendo la metodología descrita por diversos autores (15,36,392) debe prepararse una solución en cloroformo que contenga aproximadamente 10 µg de aflatoxina/ml y posteriormente determinar el espectro de absorción al ultravioleta entre 330 y 370 nm utilizando como blanco cloroformo en el caso de aflatoxina B<sub>1</sub> y benceno-acetonitrilo (9:1) en el caso de las aflatoxinas B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>. En este último caso, se debe evaporar 1 ml de la solución preparada en cloroformo y redissolverla en 1 ml de benceno-acetonitrilo (9:1).

La concentración de aflatoxina se determina midiendo la absorbancia (A), a la longitud de onda de máxima absorción, más próxima a 350 nm, utilizando la fórmula siguiente:

$$\mu\text{g de aflatoxina/ml} = \frac{A \times P_m \times 1000}{E}$$

siendo:

A = Absorbancia

P<sub>m</sub> = Peso molecular de la aflatoxina

E = Coeficiente de extinción molar

A continuación se indican los valores de P<sub>m</sub> y E, utilizados para

el cálculo de la concentración de aflatoxinas en la solución patrón (15, 36 ).

AFLATOXINA	Pm	Disolvente	E
B <sub>1</sub>	312	Benceno-acetonitrilo	19800
B <sub>1</sub>	312	Cloroformo	20600
B <sub>2</sub>	314	Benceno-acetonitrilo	20900
G <sub>1</sub>	328	Benceno-acetonitrilo	17100
G <sub>2</sub>	330	Benceno-acetonitrilo	18200

Una vez valoradas las soluciones se prepara una solución de trabajo que contenga 3 µg de aflatoxina B<sub>1</sub>/ml, 0.8 µg de aflatoxina B<sub>2</sub>/ml; 3 µg de aflatoxina G<sub>1</sub>/ml y 0.8 µg de aflatoxina G<sub>2</sub>/ml.

Todas las soluciones se conservan en viales de color ámbar bien cerrados y en nevera a 4°C.



#### 4.6. CALCULO DEL LIMITE DE DETECCION DE LOS PATRONES DE AFLATOXINAS

Para realizar el cálculo del límite de detección de los patrones de aflatoxinas se debe preparar una solución con cada una de las cuatro aflatoxinas a una concentración de  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Se depositan sobre una cromatoplaca varios volúmenes ( $0.5$  a  $10 \mu\text{l}$ ) de cada solución y se procede al desarrollo de las mismas.

Realizado el proceso se debe observar cual es el mínimo volumen de aflatoxina que puede detectarse ( 150, 151, 152 ).

## 4.7. MEDIOS DE CULTIVO, COLORANTES Y REACTIVOS

### 4.7.1. MEDIOS DE CULTIVO

#### AGAR EXTRACTO DE MALTA AL 2% (172 )

Extracto de malta .....	20 g
Peptona .....	1 g
Glucosa .....	20 g
Agar .....	25 g
Agua destilada .....	1000 ml

Se ajusta el pH a 4.5-5 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

#### AGAR GLUCOSADO DE SABOURAUD (DIFCO) (123 )

Neopeptona .....	10 g
Glucosa .....	40 g
Agar .....	15 g
Agua destilada .....	1000 ml

El pH del medio de cultivo es de  $5.6 \pm 0.2$ . Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

#### AGAR MYCOSEL (BBL)( 27 )

"Papainic digest of Soybean meal" .....	10.00 g
Glucosa .....	10.00 g

Agar .....	15.00	g
Cicloheximida .....	0.40	g
Cloramfenicol .....	0.05	g
Agua destilada .....	1000.00	ml

El pH del medio de cultivo es de  $6.9 \pm 0.2$ . Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

AGAR CZAPEK-DOX (OXOID) ( 287 )

Nitrato sódico .....	2.00	g
Cloruro potásico .....	0.50	g
Glicerofosfato magnésico .....	0.01	g
Sulfato de hierro .....	0.35	g
Sacarosa .....	30.00	g
Agar .....	15.00	g
Agua destilada .....	1000.00	ml

El pH del medio de cultivo es de 6.8. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

AGAR PATATA GLUCOSADA (DIFCO) ( 123 )

Infusión de patatas .....	200.0	g
Bacto-glucosa .....	20.0	g
Agar .....	15.0	g
Agua destilada .....	1000.0	ml

El pH del medio es de 4.5-5. Se esteriliza en autoclave a

120°C durante 20 minutos.

OAT-MEAL AGAR (DIFCO) (123)

"Oat-meal" .....	60.0	g
Agar .....	12.5	g
Agua destilada .....	1000.0	ml

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

AGAR EXTRACTO DE MALTA AL 5 % (204)

Extracto de malta .....	50	g
Peptona .....	1	g
Glucosa .....	20	g
Agar .....	25	g
Agua destilada .....	1000	ml

El pH del medio de cultivo es de 4.5-5. Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 120°C.

AGAR GLUCOSA (376)

Nitrato potásico .....	2.0	g
Sulfato magnésico .....	0.5	g
Fosfato monopotásico .....	1.0	g
Glucosa .....	50.0	g
Agar .....	20.0	g
Agua destilada .....	1000.0	ml

Se ajusta el pH a 5.4, se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

"API 20C MEDIUM"

Sulfato amónico .....	5.000	g
Fosfato monopotásico .....	0.310	g
Fosfato dipotásico .....	0.450	g
Fosfato disódico .....	0.920	g
Cloruro sódico .....	0.100	g
Cloruro cálcico .....	0.050	g
Sulfato magnésico .....	0.200	g
Histidina .....	0.005	g
Triptófano .....	0.020	g
Metionina .....	0.020	g
Agar .....	1.000	g
Solución de vitaminas .....	1.000	ml
Solución de oligoelementos .....	10.000	ml
Agua destilada c.s.p. ....	1000.00	ml

El pH final del medio de cultivo es de 6.5-6.7

CORN MEAL AGAR (OXOID) ( 287 )

Extracto de "corn meal" .....	2.0	g
Agar .....	15.0	g
Agua destilada .....	1000.0	ml

El pH del medio de cultivo es de 6.0. Se esteriliza en auto-

clave a 120°C durante 20 minutos.

AGUA DE PEPTONA CON NITRATOS (210)

Nitrato potásico .....	0.2	g
Peptona .....	10.0	g
Cloruro sódico .....	5.0	g
Agua destilada .....	1000.0	ml

Se ajusta el pH a 7.2 y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

MEDIO DE CULTIVO PARA ESTUDIO DE COMPUESTOS AMILOIDES EXTRACELULARES (210)

Fosfato monopotásico .....	0.2	g
Sulfato magnésico .....	0.1	g
Agua destilada .....	100.0	ml

Se ajusta el pH a 4.5 y se añade glucosa al 2%. A continuación se adiciona un volumen igual de agua con agar al 4%, se reparte en tubos y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

MEDIO YES (115)

Sacarosa .....	20	g
Extracto de levadura .....	2	g
Agua destilada .....	100	ml

Se ajusta el pH a 5.5 y se esteriliza en autoclave a 120°C du-

rante 20 minutos.

MEDIO APA (172 )

Fosfato monoamónico .....	10,000	g
Fosfato dipotásico .....	1,000	g
Sulfato magnésico .....	0,500	g
Cloruro potásico .....	0,500	g
Sulfato de hierro .....	0,010	g
Sacarosa .....	30,000	g
Cloruro de mercurio .....	0,136	g
"Corn steep liquor" .....	0,500	g
Agar .....	20,000	g
Agua destilada .....	1000,000	ml

Se disuelven por una parte las sales de mercurio, hierro y magnesio y por otra los demás componentes salvo el agar. Así se evita la aparición de precipitados de difícil solubilización que se forman al disolver conjuntamente todos los ingredientes ( 265 ).

Una vez disueltos se mezclan ambas fracciones y se ajusta el pH a 5.5. con NaOH 0.1N. Se añade el agar, se calienta hasta ebullición para su completa disolución y se distribuye en tubos (25ml/ tubo). Los tubos se esterilizan a 120°C durante 20 minutos.

Una vez esterilizados se vierte el contenido de cada tubo en

placas de Petri de vidrio estériles y se deja solidificar, de esta forma todas las placas contienen la misma cantidad de medio de cultivo.

MEDIO CAM (229)

Este medio tiene la misma composición que el medio APA, pero el "corn steep liquor" se sustituye por 100 ml de leche de coco preparada del siguiente modo: se homogeniza en una batidora una parte de pulpa de coco troceada con dos partes de agua destilada caliente (p/v) y se filtra a través de dos capas de gasa.

Una vez añadidos y disueltos los demás componentes excepto el agar se ajusta el pH a 6.9 con NaOH 1N. Se añade el agar, se calienta hasta ebullición para su completa disolución y se distribuye en tubos (25ml/tubo). Los tubos se esterilizan en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

Una vez esterilizados, se vierte el contenido de cada tubo a una placa de Petri de vidrio estéril y se deja solidificar.

MEDIO DE WICKERHAM (309)

Extracto de levadura .....	2.00	g
Peptona .....	3.00	g
Glucosa .....	2.00	g
Sacarosa .....	30.00	g
"Corn steep liquor" .....	5.00	g



Nitrato sódico .....	2.00	g
Fosfato dipotásico .....	1.00	g
Sulfato magnésico .....	0.50	g
Cloruro potásico .....	0.20	g
Sulfato de hierro .....	0.01	g
Agar .....	20.00	g
Agua destilada .....	1000.00	ml

El pH del medio es de 7. Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

#### TRIPTICASA SOJA AGAR (DIFCO) ( 123 )

Bacto-triptona .....	15.00	g
Bacto-soytona .....	5.00	g
Cloruro sódico .....	5.00	g
Bacto- agar .....	15.00	g

El pH del medio es de  $7.3 \pm 0.2$ . Se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

### 4.7.2. COLORANTES Y REACTIVOS

#### LACTOFENOL DE AMMAN (225)

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

REACTIVOS DE GRIESS-ILLOSWAY ( 210 )

GRIESS I

Acido sulfanílico .....	8 g
Acido acético 5N .....	1000 ml

GRIESS II

$\alpha$ -naftilamina .....	5 g
Acido acético 5N .....	1000 ml

SOLUCION DE YODO (LUGOL) (225)

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

## 5. RESULTADOS

## 5.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA ATMOSFERICA

En la TABLA nº 7 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la micoflora atmosférica, así como el número de muestras de cada tipo de explotación de las que fueron aislados.

Los microorganismos están ordenados en el TABLA, atendiendo a la frecuencia total de aislamiento en las explotaciones estudiadas.

Para una mejor interpretación de las TABLAS correspondientes a este apartado, debe considerarse lo siguiente:

1 = VACA	2 = CERDO	3 = CONEJO	4 = GALLINA
5 = OVEJA	6 = CABRA	7 = CABALLO	8 = PALOMA

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  ( 365 ) para comparar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros aislados en las explotaciones vacunas, porcinas, cunícolas y de gallinas.

En la TABLA nº 8 se indican los géneros que presentan diferencias significativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium</u>	16	15	14	11	2	2	1	1	62	80.52
<u>Aspergillus</u>	13	15	11	9	2	2	1	1	54	70.13
<u>Cladosporium</u>	17	8	10	9	3	2	-	1	50	64.93
<u>Alternaria</u>	17	11	6	9	3	2	-	1	49	63.64
<u>Candida</u>	11	13	3	11	3	1	-	1	43	55.84
<u>Mic. est. dematiáceo</u>	13	9	8	5	3	1	-	1	40	51.95
<u>Mucor</u>	12	14	4	3	-	-	-	-	33	42.86
<u>Fusarium</u>	8	10	4	3	-	-	1	-	26	33.77
<u>Scopulariopsis</u>	3	1	10	7	2	-	-	-	23	29.87
<u>Aphanocladium</u>	3	10	1	6	-	1	-	-	21	27.27
<u>Absidia</u>	8	5	1	4	1	-	1	-	20	25.97
<u>Epicoccum</u>	4	3	5	4	-	1	-	-	17	22.08
<u>Acremonium</u>	4	-	2	3	1	-	-	-	10	12.99
<u>Ulocladium</u>	6	3	-	1	-	-	-	-	10	12.99
<u>Geotrichum</u>	2	5	1	1	-	-	-	-	9	11.69
<u>Phoma</u>	3	2	2	1	-	-	-	-	8	10.39

TABLA nº 7 .- Frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la microfiora atmosférica. Distribución de los mismos según el tipo de explotación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Chrysosporium</u>	2	1	1	1	-	1	-	1	7	9.09
<u>Trichoderma</u>	4	-	1	2	-	-	-	-	7	9.09
<u>Trichothecium</u>	1	-	4	2	-	-	-	-	7	9.09
<u>Mic.est.hialino</u>	3	1	2	1	-	-	-	-	7	9.09
<u>Sepedonium</u>	-	2	2	2	-	-	-	-	6	7.79
<u>Paecilomyces</u>	1	-	-	3	-	-	-	1	5	6.49
<u>Rhodotorula</u>	1	1	2	-	1	-	-	-	5	6.49
<u>Scytalidium</u>	-	1	2	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Arthrinium</u>	-	1	1	1	-	-	-	-	3*	3.90
<u>Arthroderma</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aureobasidium</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Botrytis</u>	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2.60
<u>Drechslera</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Gilmaniella</u>	1	-	-	-	1	-	-	-	2	2.60
<u>Gliocladium</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Humicola</u>	-	1	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Rhizopus</u>	-	1	-	-	-	-	1	-	2	2.60
<u>Staphylotrichum</u>	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Chaetomium</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30

TABLA nº 7 .- Micoflora atmosférica (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Circinella</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Doratomyces</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Myceliophthora</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1.30
<u>Periconia</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Pleospora</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1.30
Nº TOTAL DE MUESTRAS	20	20	15	15	3	2	1	1		

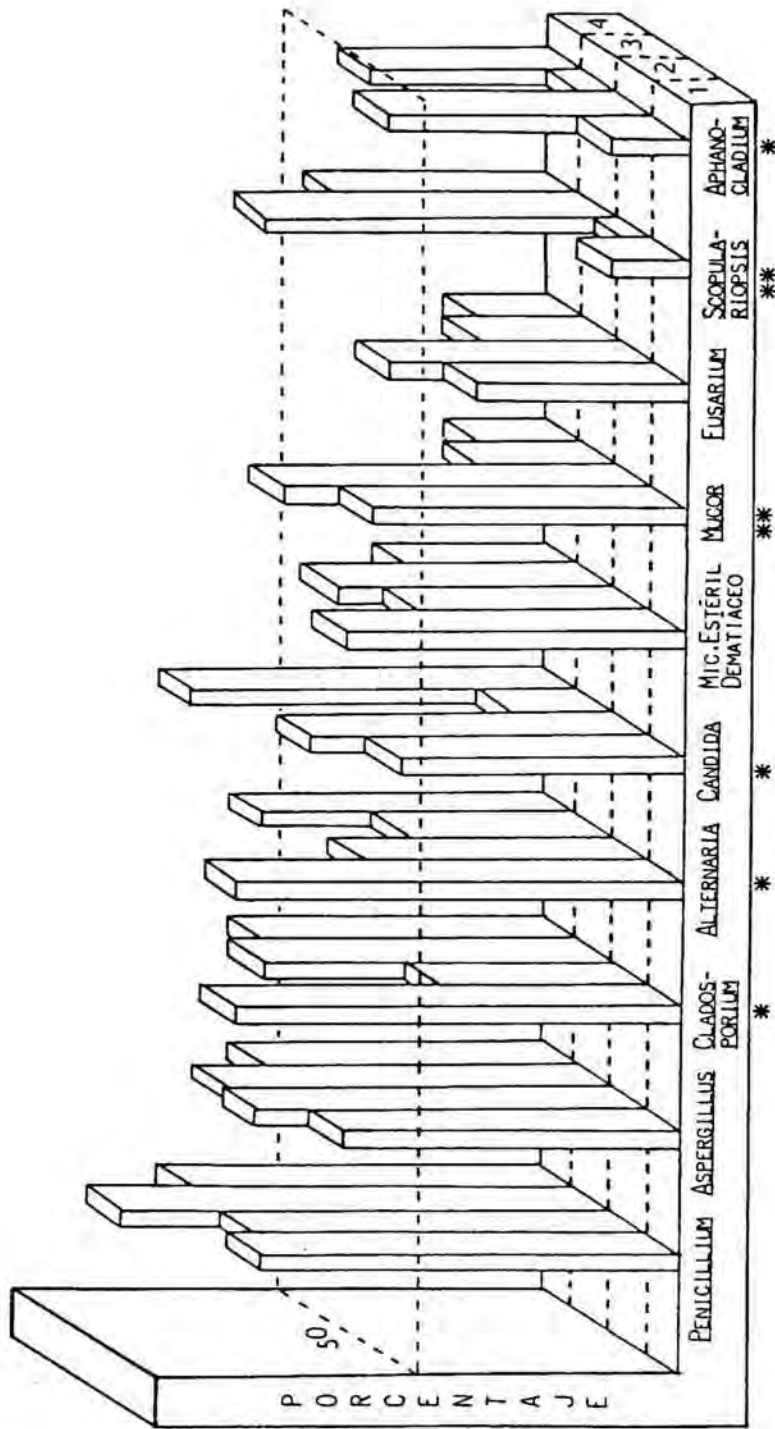
TABLA nº 7 .- Micoflora atmosférica (continuación)

<u>GENERO</u>	<u>CALCULADO</u>	<u>NIVEL DE CONFIANZA</u>
<u>Cladosporium</u>	8.821386	95%
<u>Alternaria</u>	7.958656	95%
<u>Candida</u>	10.227520	95%
<u>Mucor</u>	12.478840	99%
<u>Scopulariopsis</u>	19.682540	99%
<u>Aphanocladium</u>	10.791670	95%

TABLA nº 8 .- Relación de géneros que presentan diferencias significativas.

En la GRAFICA nº 1 se representa la comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente en la atmósfera de las granjas de vacas, cerdos, conejos y gallinas.





GRAFICA nº 1 .- Comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente en la atmósfera de las granjas de vacas (1), cerdos (2), conejos (3) y de gallinas (4). \* = Nivel de confianza del 95%. \*\* = Nivel de confianza del 99%.

En la TABLA nº 9 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de las especies aisladas en el estudio de la micoflora atmosférica, indicando asimismo el número de granjas de cada especie animal en que fueron aisladas.

El orden seguido en la TABLA viene dado por la frecuencia de aparición de los géneros aislados. Las especies se indican por orden alfabético.

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aparición de cada una de las especies aisladas en las explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas.

En la TABLA nº 10 se indican las especies que presentan diferencias significativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium brasilianum</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium canescens</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium carneo-lutescens</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2.60
<u>Penicillium chrysogenum</u>	3	3	2	7	1	-	1	1	18	23.38
<u>Penicillium corylophilum</u>	1	1	1	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium cyclopium</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Penicillium frequentans</u>	1	-	3	2	-	-	-	-	6	7.79
<u>Penicillium fellutanum</u>	-	-	1	2	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium implicatum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium jenseni</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Penicillium janthinellum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium martensii</u>	4	2	2	-	1	-	-	-	9	11.69
<u>Penicillium meleagrinum</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Penicillium melinii</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	-	-	2	1	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium olivino-viride</u>	1	1	1	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Penicillium palitans</u>	1	-	1	1	-	-	-	-	3	3.90

TABLA nº 9 .- Frecuencia y porcentaje total de aislamiento de las especies aisladas en el estudio de la microflora atmosférica. Distribución de las mismas según el tipo de explotación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium paxilli</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium puberulum</u>	2	5	1	-	1	1	-	-	10	12.99
<u>Penicillium restrictum</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium roqueforti</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium rubrum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium simplicissimum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium variabile</u>	1	1	1	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium velutinum</u>	-	2	-	1	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium viridicatum</u>	3	4	4	4	1	2	-	1	19	24.67
<u>Aspergillus amstelodami</u>	2	3	2	-	-	-	-	-	7	9.09
<u>Aspergillus awamori</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Aspergillus candidus</u>	4	1	3	5	-	-	-	1	14	18.18
<u>Aspergillus chevalieri</u>	2	1	2	4	-	-	-	-	9	11.69
<u>Aspergillus flavus</u>	2	8	1	1	-	-	1	-	13	16.88
<u>Aspergillus fumigatus</u>	8	6	2	3	1	1	-	-	21	27.27
<u>Aspergillus heteromorphus</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1.30
<u>Aspergillus nidulans</u>	1	2	-	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Aspergillus ochraceus</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30

TABLA nº 9 .- Micoflora atmosférica (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aspergillus parasiticus</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aspergillus repens</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aspergillus speluneus</u>	3	-	1	-	1	-	-	-	5	6.49
<u>Aspergillus sydowi</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Aspergillus terreus</u>	5	2	2	1	-	-	-	-	10	12.99
<u>Aspergillus terricola</u>	5	1	2	-	-	-	-	-	8	10.39
<u>Aspergillus tubingensis</u>	8	1	-	-	-	-	1	-	10	12.99
<u>Aspergillus versicolor</u>	1	-	2	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Aspergillus sp.</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	8	-	6	3	-	-	-	-	17	22.08
<u>Cladosporium herbarum</u>	7	4	4	6	2	1	-	1	25	32.47
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	3	2	1	-	-	-	-	-	6	7.79
<u>Cladosporium sphaerospermum</u>	-	2	-	-	1	1	-	-	4	5.19
<u>Cladosporium tenuissimum</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Alternaria alternata</u>	15	11	6	8	2	2	-	1	45	58.44
<u>Alternaria chlamydospora</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Alternaria longipes</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1.30
<u>Alternaria phragmospora</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30

TABLA n° 9 .- Micoflora atmosférica (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Alternaria raphani</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Alternaria tenuissima</u>	-	-	-	1	1	-	-	-	2	2.60
<u>Candida famata</u>	11	12	3	10	3	1	-	1	41	53.25
<u>Candida lusitanae</u>	1	2	-	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Mucor circinelloides</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Mucor hiemalis</u>	2	1	-	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Mucor plumbeus</u>	5	3	4	-	-	-	-	-	12	15.58
<u>Mucor racemosus</u>	6	12	2	2	-	-	-	-	22	28.57
<u>Fusarium lateritium</u>	2	1	-	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Fusarium oxysporum</u>	5	9	3	2	-	-	1	-	20	25.97
<u>Fusarium semitectum</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Fusarium solani</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Fusarium dimerum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	3	-	7	6	1	-	-	-	17	22.07
<u>Scopulariopsis candida</u>	2	1	7	2	1	-	-	-	13	16.88
<u>Scopulariopsis fusca</u>	-	-	2	1	1	-	-	-	4	5.19

TABLA nº 9 .- Microflora atmosférica (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aphanocladium album</u>	3	10	1	6	-	1	-	-	21	27.27
<u>Absidia corymbifera</u>	8	5	1	4	1	-	1	-	20	25.97
<u>Epicoccum purpurascens</u>	4	3	5	4	-	1	-	-	17	22.08
<u>Acremonium bactrocephalum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Acremonium curvulum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Acremonium pinkertoniae</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Acremonium roseum</u>	1	-	-	2	1	-	-	-	4	5.19
<u>Acremonium strictum</u>	2	-	-	1	-	-	-	-	3	3.90
<u>Acremonium tubakii</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Acremonium terricola</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Acremonium vitellinum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Ulocladium chlamydosporum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Ulocladium chartarum</u>	2	1	-	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Ulocladium consortiale</u>	3	2	-	-	-	-	-	-	5	6.49
<u>Geotrichum candidum</u>	2	5	1	1	-	-	-	-	9	11.69

TABLA nº 9 .- Micoflora atmosférica (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Phoma betae</u>	2	-	-	1	-	-	-	-	3	3.90
<u>Phoma destructiva</u>	-	1	2	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Phoma glomerata</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Phoma lycopersici</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Chrysosporium georgii</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Chrysosporium indicum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Chrysosporium keratinophilum</u>	-	-	-	-	-	1	-	1	2	2.60
<u>Chrysosporium merdarium</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Chrysosporium tropicum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Chrysosporium sp.</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Trichoderma viride</u>	4	-	1	2	-	-	-	-	7	9.09
<u>Trichothecium roseum</u>	1	-	4	2	-	-	-	-	7	9.09
<u>Sepedonium chrysospermum</u>	-	2	2	2	-	-	-	-	6	7.79
<u>Paecilomyces variotii</u>	1	-	-	3	-	-	-	1	5	6.49

TABLA nº 9 .- Micoflora atmosférica (continuación)



	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Rhodotorula glutinis</u>	1	1	2	-	1	-	-	-	5	6.49
<u>Scytalidium lignicola</u>	-	1	2	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Arthrinium phaeospermum</u>	-	1	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Arthrinium sphaerospermum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Arthroderma benhamiae</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aureobasidium pullulans</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Botrytis cinerea</u>	-	-	-	-	1	1	-	-	2	2.60
<u>Drechslera dematioidea</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Gilamiella sp.</u>	1	-	-	-	1	-	-	-	2	2.60
<u>Gliocladium catenulatum</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Humicola grisea</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Humicola fuscoatra</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Rhizopus oryzae</u>	-	1	-	-	-	-	1	-	2	2.60

TABLA nº 9 .- Micoflora atmosférica (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Staphylotrichum coccosporum</u>	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2,60
<u>Chaetomium globosum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Circinella umbellata</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Doratomyces stemonitis</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Myceliophthora sp.</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1,30
<u>Periconia byssoides</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Pleospora herbarum</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1,30
Nº TOTAL DE MUESTRAS	20	20	15	15	3	2	1	1		

TABLA nº 9 .- Micoflora atmosférica (continuación)

ESPECIE	$\chi^2$ CALCULADO	NIVEL DE CONFIANZA
<u>Aspergillus flavus</u>	10.39272	95%
<u>Aspergillus tubingensis</u>	18.67942	99%
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	11.26526	95%
<u>Candida famata</u>	8.01607	95%
<u>Mucor racemosus</u>	12.15278	99%
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	13.94869	99%
<u>Scopulariopsis candida</u>	12.15278	99%

TABLA n° 10 .- Relación de especies que presentan diferencias significativas.

## 5.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICROFLORA PRESENTE EN EL PELO O PLUMAS DE LOS ANIMALES

En la TABLA nº 11 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la microflora presente en el pelo o plumas, así como el número de muestras de cada especie animal de las que fueron aislados.

Los microorganismos están ordenados en la TABLA, atendiendo a la frecuencia total de aislamiento en las explotaciones estudiadas.

Para una mejor interpretación de las TABLAS correspondientes a este apartado, debe considerarse lo siguiente:

1 = VACA	2 = CERDO	3 = CONEJO	4 = GALLINA
5 = OVEJA	6 = CABRA	7 = CABALLO	8 = PALOMA

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros aislados en las muestras de vaca, cerdo y conejo y en las plumas de gallina, estudiadas.

En la TABLA nº 12 se indica el único género que presentó diferencias significativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aspergillus</u>	12	12	7	7	2	1	1	-	42	54.54
<u>Penicillium</u>	3	9	7	11	-	2	-	1	33	42.86
<u>Mucor</u>	8	6	4	9	1	-	-	-	28	36.36
<u>Absidia</u>	10	4	2	6	1	-	-	-	23	29.87
<u>Alternaria</u>	5	2	7	2	1	2	-	1	20	25.97
<u>Mic.est.dematiaáceo</u>	1	1	5	3	-	1	-	-	11	14.28
<u>Candida</u>	1	5	-	4	-	-	-	-	10	12.99
<u>Fusarium</u>	1	3	2	2	-	-	-	-	8	10.39
<u>Scopulariopsis</u>	2	3	2	1	-	-	-	-	8	10.39
<u>Aphanocladium</u>	-	2	-	4	-	-	-	-	6	7.79
<u>Cladosporium</u>	2	-	2	1	-	1	-	-	6	7.79
<u>Acremonium</u>	2	-	2	-	-	-	-	-	4	5.19
<u>Geotrichum</u>	2	-	1	1	-	-	-	-	4	5.19
<u>Rhizopus</u>	1	1	-	1	-	-	1	-	4	5.19
<u>Arthrinium</u>	-	2	-	-	-	-	-	1	3	3.90
<u>Arthroderma</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60

TABLA nº 11 .- Frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la microfiora presente en pelo o plumas . Distribución de los mismos según la especie animal.

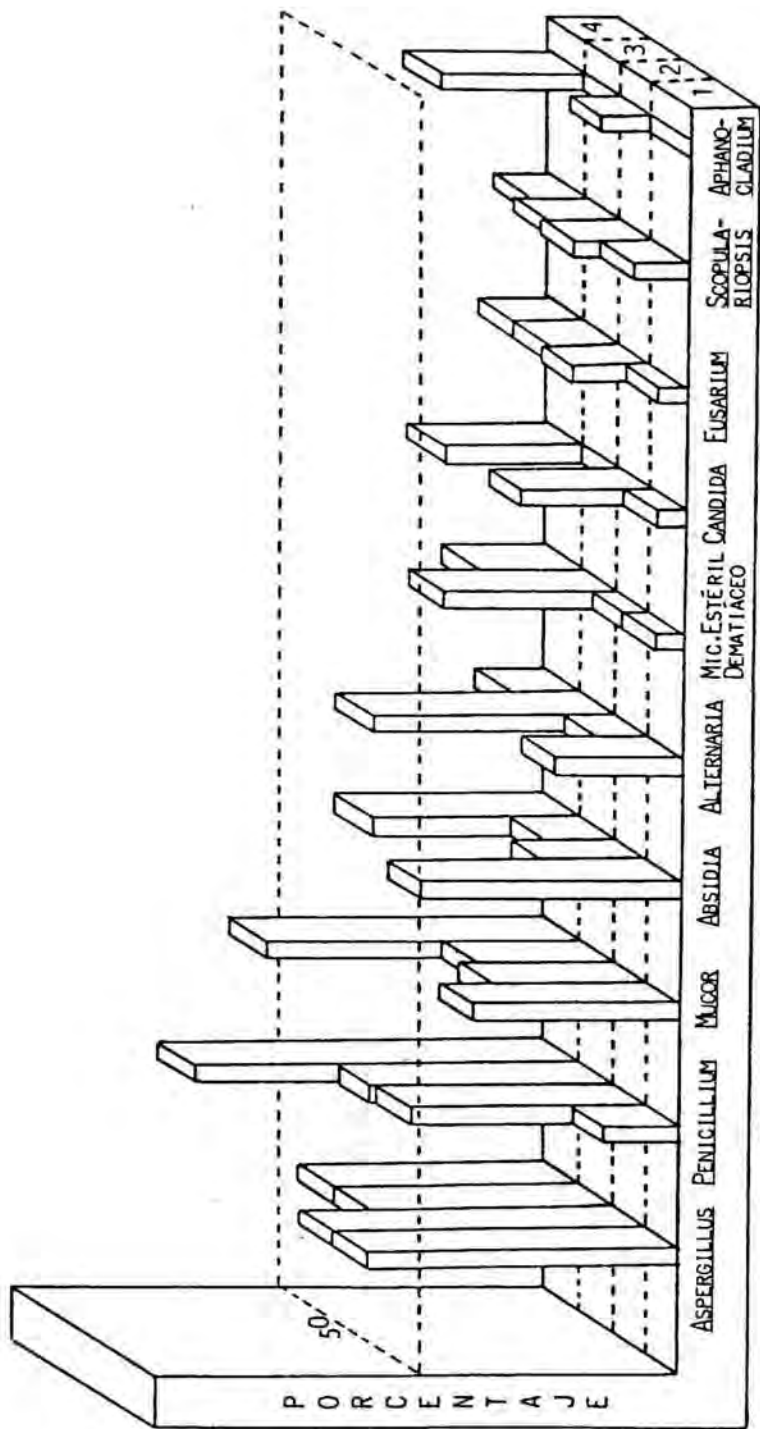
	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Epicoccum</u>	-	-	1	-	-	1	-	-	2	2.60
<u>Gliocladium</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Paecilomyces</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2.60
<u>Trichoderma</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Trichothecium</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Ulocladium</u>	1	1	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Mic.est.hialino</u>	1	1	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Circinella</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Phoma</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Scytalidium</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
Nº TOTAL DE MUESTRAS	20	20	15	15	3	2	1	1		

TABLA nº 11 .- Pelos y Plumas (continuación)

GENERO	$\chi^2$ CALCULADO	NIVEL DE CONFIANZA
<u>Penicillium</u>	12.15278	99%

TABLA n<sup>o</sup> 12 .- Relación de géneros que presentan diferencias significativas.

En la GRAFICA n<sup>o</sup> 2 se representa la comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente en el pelo de vaca, cerdo y conejo y plumas de gallina.



\*\*

GRAFICA nº 2 .- Comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente de pelos de vacas (1), cerdos (2), conejos (3) y plumas de gallinas (4).  
 \*\* = Nivel de confianza del 99%.



En la TABLA nº 13 se detalla la frecuencia total de aparición de las especies aisladas en el estudio de la micoflora presente en el pelo o plumas, indicando asimismo el número de muestras de cada especie animal de las que fueron aisladas.

El orden seguido en la TABLA viene dado por la frecuencia de aparición de los géneros aislados. Las especies se indican por orden alfabético.

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aparición de cada una de las especies aisladas en el pelo de vaca, cerdo y conejo y plumas de gallina.

En la TABLA nº 14 se indican las especies que presentan diferencias significativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aspergillus amstelodami</u>	2	2	2	-	-	-	-	-	6	7.79
<u>Aspergillus awamori</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aspergillus candidus</u>	-	6	2	3	-	-	-	-	11	14.28
<u>Aspergillus chevalieri</u>	1	1	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aspergillus flavus</u>	3	1	1	1	1	-	-	-	7	9.09
<u>Aspergillus fumigatus</u>	3	3	2	3	-	1	-	-	12	15.58
<u>Aspergillus nidulans</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Aspergillus terreus</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Aspergillus terricola</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Aspergillus tubingensis</u>	6	2	-	-	1	-	1	-	10	12.99
<u>Aspergillus versicolor</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Penicillium carneo-lutescens</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium chrysogenum</u>	1	2	3	4	-	-	-	1	11	14.28
<u>Penicillium frequentans</u>	-	2	1	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium fellutanum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium jenseni</u>	-	-	-	1	-	1	-	-	2	2.60

TABLA nº 13.- Frecuencia y porcentaje total de aparición de las especies aisladas en el estudio de la *mi-coflora* presente en pelo y plumas. Distribución de los mismos según la especie animal.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium martensii</u>	-	-	1	3	-	1	-	-	5	6.49
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1.30
<u>Penicillium olivino-viride</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Penicillium palitans</u>	-	1	-	2	-	-	-	-	3	3.90
<u>Penicillium variabile</u>	2	2	-	1	-	-	-	-	5	6.49
<u>Penicillium viridicatum</u>	1	2	2	3	-	-	-	1	9	11.69
<u>Mucor circinelloides</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Mucor hiemalis</u>	1	-	1	-	1	-	-	-	3	3.90
<u>Mucor plumbeus</u>	2	1	2	2	-	-	-	-	7	9.09
<u>Mucor racemosus</u>	4	5	1	7	-	-	-	-	17	22.08
<u>Absidia corymbifera</u>	10	4	2	6	1	-	-	-	23	29.87
<u>Alternaria alternata</u>	5	1	7	1	-	2	-	1	17	22.08
<u>Alternaria longipes</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Alternaria tenuissima</u>	-	1	-	-	1	-	-	-	2	2.60

TABLA nº 13 .- Pelos y Plumas (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Candida famata</u>	1	4	-	3	-	-	-	-	8	10.39
<u>Candida lusitanae</u>	-	1	-	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Fusarium oxysporum</u>	1	3	1	2	-	-	-	-	7	9.09
<u>Fusarium equiseti</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	-	-	1	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Scopulariopsis candida</u>	2	3	2	-	-	-	-	-	7	9.09
<u>Aphanocladium album</u>	-	2	-	4	-	-	-	-	6	7.79
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Cladosporium herbarum</u>	1	-	1	1	-	1	-	-	4	5.19
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Acremonium strictum</u>	2	-	1	-	-	-	-	-	3	3.90
<u>Acremonium terricola</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.30

TABLA nº 13 .- Pelos y Plumas (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Geotrichum candidum</u>	2	-	1	1	-	-	-	-	4	5,19
<u>Rhizopus oryzae</u>	-	-	-	1	-	-	1	-	2	2,60
<u>Rhizopus oligosporus</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Arthrinium phaeospermum</u>	-	2	-	-	-	-	-	-	2	2,60
<u>Arthrinium sphaerospermum</u>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1,30
<u>Arthroderma benhamiae</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2,60
<u>Epicoccum purpurascens</u>	-	-	1	-	-	1	-	-	2	2,60
<u>Gliocladium catenulatum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Gliocladium virens</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1,30
<u>Paecilomyces variotii</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2,60

TABLA nº 13 .- Pelos y Plumas (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Trichoderma viride</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.60
<u>Trichothecium roseum</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Ulocladium consortiale</u>	1	1	-	-	-	-	-	-	2	2.60
<u>Circinella umbellata</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.30
<u>Phoma glomerata</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
<u>Scytalidium lignicola</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.30
Nº TOTAL DE MUESTRAS	20	20	15	15	3	2	1	1		

TABLA nº13.- Pelos y Plumas (continuación)

ESPECIE	X <sup>2</sup> CALCULADO	NIVEL DE CONFIANZA
<u>Aspergillus tubingensis</u>	10.72581	95%
<u>Alternaria alternata</u>	11.45833	99%

TABLA nº 14 .- Relación de especies que presentan diferencias significativas

### 5.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN PIENSOS, FORRAJES Y ENSILADOS

#### 5.3.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN PIENSOS

En la TABLA nº 15 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la micoflora de piensos compuestos, así como el número de muestras de cada tipo de explotación de las que fueron aislados.

Los microorganismos están ordenados en la TABLA, atendiendo a la frecuencia total de aislamiento en las explotaciones estudiadas.

Para una mejor interpretación de las TABLAS correspondientes a este apartado, debe considerarse lo siguiente:

1 = VACA	2 = CERDO	3 = CONEJO	4 = GALLINA
5 = OVEJA	6 = CABRA	7 = CABALLO	8 = PALOMA

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros aislados en las muestras de pienso compuesto de vacas, cerdos, conejos y gallinas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium</u>	18	16	14	14	3	1	1	1	68	90,67
<u>Aspergillus</u>	18	14	13	11	1	-	1	-	58	77,33
<u>Fusarium</u>	13	11	-	9	-	-	-	-	33	44,00
<u>Candida</u>	5	7	4	13	2	-	-	-	31	41,33
<u>Aphanocladium</u>	4	8	-	8	1	-	-	-	21	28,00
<u>Acremonium</u>	6	3	1	4	-	-	-	1	15	20,00
<u>Mucor</u>	4	1	3	5	-	-	-	-	13	17,33
<u>Rhizopus</u>	3	6	1	1	-	-	-	-	11	14,67
<u>Absidia</u>	3	4	-	3	-	-	-	-	10	13,33
<u>Alternaria</u>	1	2	1	1	-	1	1	1	8	10,67
<u>Cladosporium</u>	1	2	1	1	-	1	-	1	7	9,33
<u>Mic.est.dematíáceo</u>	1	1	2	2	-	1	-	-	7	9,33
<u>Geotrichum</u>	-	2	1	3	-	-	-	-	6	8,00
<u>Rhodotorula</u>	-	1	2	2	-	-	1	-	6	8,00
<u>Aureobasidium</u>	-	-	1	1	-	-	-	1	3	4,00
<u>Paecilomyces</u>	1	-	-	2	-	-	-	-	3	4,00

TABLA nº 15 .-- Frecuencia y porcentaje total de aparición de hongos filamentosos y levaduras aislados de la microfiora de piensos compuestos. Distribución de los mismos según cada tipo de explotación.



	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Scopulariopsis</u>	-	-	2	1	-	-	-	-	3	4.00
<u>Gliocladium</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.67
<u>Trichoderma</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2.67
<u>Ampulliferina</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Arthrinium</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Circinella</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Emericellopsis</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Gilmaniella</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Trichothecium</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Tritirachium</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Ulocladium</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
Nº TOTAL DE MUESTRAS	19	20	15	15	3	1	1	1		

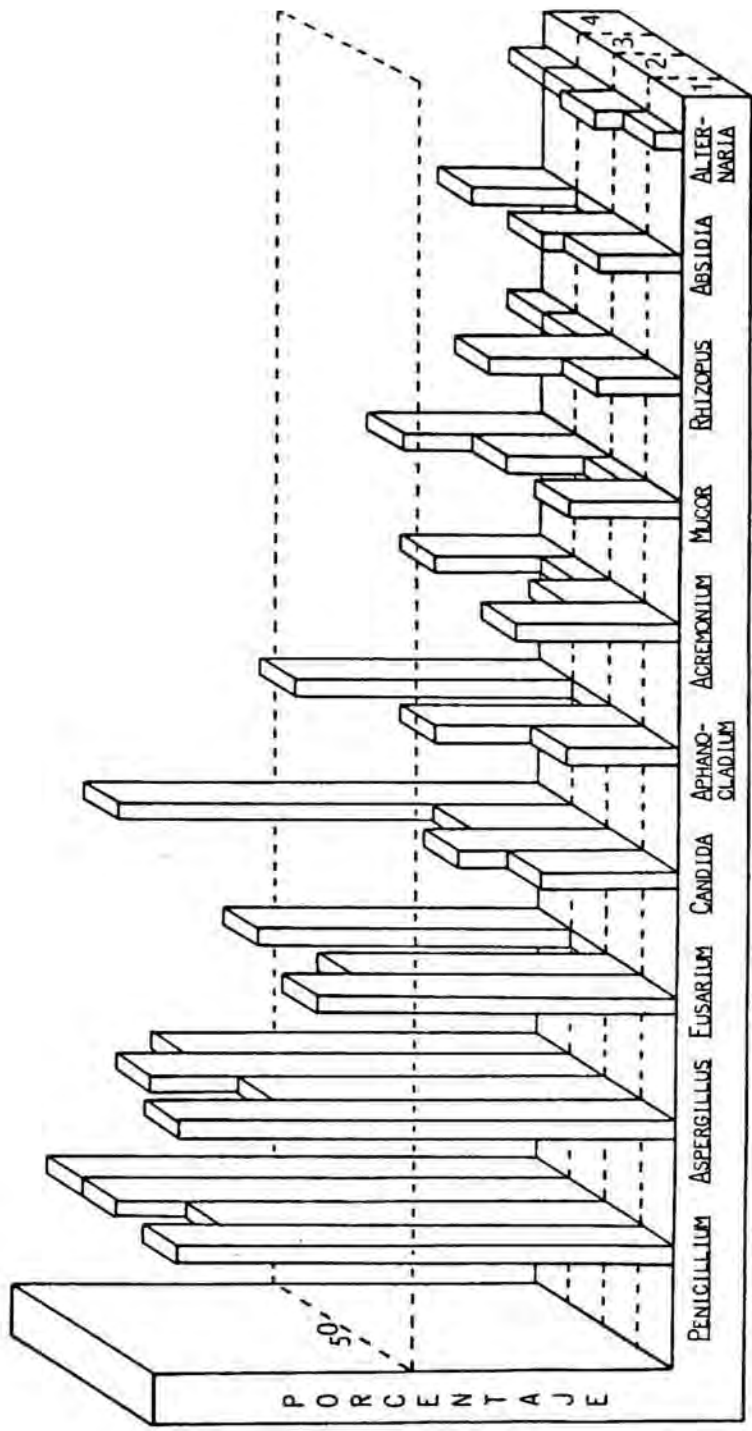
TABLA nº 15 .- Piensos compuestos (continuación)

En la TABLA n° 16 se indican los géneros que presentan diferencias significativas.

GENERO	$\chi^2$ CALCULADO	NIVEL DE CONFIANZA
<u>Fusarium</u>	18.28307	99%
<u>Candida</u>	16.05080	99%
<u>Aphanocladium</u>	12.20211	99%

TABLA n° 16 .- Relación de géneros que presentan diferencias significativas.

En la GRAFICA n° 3 se representa la comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente en los piensos compuestos destinados a la alimentación de vacas, cerdos, conejos y gallinas, estudiados.



GRAFICA nº 3 .- Comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente de piensos compuestos destinados a la alimentación de vacas (1), cerdos (2), conejos (3) y gallinas (4). \*\* = Nivel de confianza del 99%.

En la TABLA nº 17 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de las especies aisladas en el estudio de la micoflora de los piensos compuestos destinados a los animales en estudio, así como el número de muestras destinadas a cada especie animal del que fueron aisladas.

El orden seguido en la TABLA viene dado por la frecuencia de aparición de los géneros aislados. Las especies se indican por orden alfabético.

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aparición de cada una de las especies aisladas en las explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas.

En la TABLA nº 18 se indican las especies que presentan diferencias significativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium canescens</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium casei</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium chrysogenum</u>	6	4	10	6	1	1	1	-	29	38.67
<u>Penicillium citrinum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium corylophilum</u>	6	1	-	-	1	-	-	-	8	10.67
<u>Penicillium decumbens</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium frequentans</u>	4	-	2	1	-	-	-	-	7	9.33
<u>Penicillium fellutanum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium implicatum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium italicum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium janthinellum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium martensii</u>	4	1	2	2	-	-	-	-	9	12.00
<u>Penicillium meleagrinum</u>	2	2	1	-	-	-	-	-	5	6.67
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium nigricans</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium olivino-viride</u>	1	2	-	1	-	-	-	-	4	5.33
<u>Penicillium palitans</u>	1	-	1	1	1	-	-	-	4	5.33
<u>Penicillium paxilli</u>	2	1	2	-	-	-	-	-	5	6.67

TABLA nº 17 .- Frecuencia y porcentaje de aparición de las especies aisladas en el estudio de la micoflora del pienso compuesto. Distribución de las mismas según cada tipo de explotación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium puberulum</u>	-	3	-	-	-	-	-	-	3	4.00
<u>Penicillium purpurogenum</u>	1	-	-	2	-	-	-	-	3	4.00
<u>Penicillium simplicissimum</u>	2	2	-	-	-	-	-	1	5	6.67
<u>Penicillium steckii</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium stiptatum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium variabile</u>	3	4	-	1	-	-	1	-	9	12.00
<u>Penicillium verruculosum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Penicillium viridicatum</u>	10	3	2	2	-	-	1	-	18	24.00
<u>Aspergillus amstelodami</u>	-	-	3	-	-	-	-	-	3	4.00
<u>Aspergillus awamori</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Aspergillus candidus</u>	4	6	2	4	-	-	-	-	16	21.33
<u>Aspergillus chevalieri</u>	5	4	3	4	-	-	-	-	16	21.33
<u>Aspergillus flavipes</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.67
<u>Aspergillus flavus</u>	9	11	3	8	1	-	1	-	33	44.00
<u>Aspergillus flavus var. columnaris</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Aspergillus fumigatus</u>	7	9	4	8	-	-	1	-	29	38.67
<u>Aspergillus nidulans</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Aspergillus parasiticus</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Aspergillus repens</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33

TABLA n° 17.- Piensos compuestos (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aspergillus terreus</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2.67
<u>Aspergillus terricola</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.67
<u>Aspergillus tubingensis</u>	2	3	1	-	-	-	-	-	6	8.00
<u>Aspergillus versicolor</u>	2	-	2	-	-	-	-	-	4	5.33
<u>Fusarium moniliforme</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	2.67
<u>Fusarium oxysporum</u>	13	11	-	9	-	-	-	-	33	44.00
<u>Fusarium solani</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Candida famata</u>	4	6	4	12	2	-	-	-	28	37.33
<u>Candida lusitanae</u>	1	1	-	1	1	-	-	-	4	5.33
<u>Aphanocladium album</u>	4	8	-	8	1	-	-	-	21	28.00
<u>Acremonium biseptum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Acremonium roseum</u>	1	3	-	4	-	-	-	-	8	10.67
<u>Acremonium strictum</u>	4	-	-	-	-	-	-	1	5	6.67
<u>Acremonium humicola</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Mucor circinelloides</u>	1	-	1	1	-	-	-	-	3	4.00

TABLA nº 17 .- Piensos compuestos (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Mucor plumbeus</u>	2	-	2	2	-	-	-	-	6	8.00
<u>Mucor racemosus</u>	2	1	1	2	-	-	-	-	6	8.00
<u>Rhizopus oryzae</u>	2	2	-	-	-	-	-	-	4	5.33
<u>Rhizopus oligosporus</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Rhizopus stolonifer</u>	1	3	1	1	-	-	-	-	6	8.00
<u>Absidia corymbifera</u>	3	4	-	3	-	-	-	-	10	13.33
<u>Alternaria alternata</u>	1	2	1	1	-	1	1	1	8	10.67
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Cladosporium herbarum</u>	1	2	-	1	-	1	-	1	6	8.00
<u>Geotrichum candidum</u>	-	2	1	3	-	-	-	-	6	8.00
<u>Rhodotorula glutinis</u>	-	1	2	2	-	-	1	-	6	8.00
<u>Aureobasidium pullulans</u>	-	-	1	1	-	-	-	1	3	4.00
<u>Paecilomyces variotii</u>	1	-	-	2	-	-	-	-	3	4.00

TABLA nº 17.- Piensos compuestos (continuación)



	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Scopulariopsis candida</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	2.67
<u>Gliocladium catenulatum</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	2.67
<u>Trichoderma viride</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	2.67
<u>Ampulliferina persimplex</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Arthrinium sphaerospermum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Circinella umbellata</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Emericellopsis terricola</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Gilmaniella sp.</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Trichothecium roseum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1.33
<u>Tritirachium oryzae</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1.33
<u>Ulocladium consortiale</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1.33
<b>Nº TOTAL DE MUESTRAS</b>	19	20	15	15	3	1	1	1		

TABLA nº 17 .- Piensos compuestos (continuación)

ESPECIE	$\chi^2$ CALCULADO	NIVEL DE CONFIANZA
<u>Penicillium chrysogenum</u>	8.36497	95%
<u>Penicillium corylophilum</u>	13.54353	99%
<u>Penicillium viridicatum</u>	11.08433	95%
<u>Fusarium oxysporum</u>	18.28307	99%
<u>Candida famata</u>	14.95444	99%
<u>Aphanocladium album</u>	12.20211	99%

TABLA n<sup>o</sup> 18 .- Relación de especies que presentan diferencias significativas.

En las TABLAS núms. 19 a 22 se recogen los resultados correspondientes al número de UFC/g de las setenta y cinco muestras de pienso compuesto estudiadas, distribuidas en función de la especie animal a la que iban destinados, así como su transformación en logaritmo decimal para proceder a su análisis.

En la GRAFICA n<sup>o</sup> 4 se representa la media de los logaritmos del número de UFC/g de pienso compuesto, de las muestras destinadas a vacas, cerdos, conejos y gallinas estudiados. En este caso, se ha realizado el análisis de la varianza para comparar si existían diferencias significativas en el contenido fúngico de los piensos destinados a las cuatro especies animales consideradas (355).

En la TABLA n<sup>o</sup> 23 se observa la distribución de los recuentos efectuados (log UFC/g) en los piensos compuestos estudiados.

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g	Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
11	$23 \times 10^4$	5.362	2	$27 \times 10^4$	5.431
14	$70 \times 10^4$	5.845	10	$2 \times 10^4$	4.301
15	$82 \times 10^4$	5.914	18	$147 \times 10^6$	8.167
24	$72 \times 10^4$	5.857	19	$121 \times 10^6$	8.083
29	$34 \times 10^4$	5.531	21	$62 \times 10^6$	7.792
31	$41 \times 10^6$	7.613	22	$76 \times 10^6$	7.881
38	$13 \times 10^4$	5.114	23	$25 \times 10^6$	7.398
41	$17 \times 10^4$	5.230	33	$37 \times 10^4$	5.568
42	$14 \times 10^4$	5.146	34	$15 \times 10^4$	5.176
56	$157 \times 10^3$	5.196	36	$51 \times 10^4$	5.707
62	$168 \times 10^4$	6.225	37	$9 \times 10^4$	4.954
67	$38 \times 10^3$	4.580	48	$56 \times 10^3$	4.748
73	$29 \times 10^4$	5.462	49	$29 \times 10^4$	5.462
76	$35 \times 10^3$	4.544	50	$32 \times 10^3$	4.505
77	$25 \times 10^3$	4.398	51	$48 \times 10^3$	4.681
79	$24 \times 10^3$	4.380	52	$275 \times 10^4$	6.439
80	$73 \times 10^3$	4.863	53	$300 \times 10^4$	6.477
81	$29 \times 10^3$	4.462	54	$33 \times 10^2$	3.518
82	$3 \times 10^3$	3.477	55	$26 \times 10^3$	4.415
			59	$175 \times 10^4$	6.243
VACA		$n = 19$ $\bar{X} = 5.221$ $\sigma_{n-1} = 0.888$	CERDO		$n = 20$ $\bar{X} = 5.847$ $\sigma_{n-1} = 1.405$

TABLA nº 19 .- Resultados correspondientes al número de UFC/g de pienso compuesto destinado a la alimentación de vacas y cerdos.

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g	Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
16	$68 \times 10^4$	5.832	4	$50 \times 10^4$	5.699
20	$97 \times 10^3$	4.987	6	$5 \times 10^4$	4.699
28	$32 \times 10^4$	5.505	7	$15 \times 10^4$	5.176
39	$47 \times 10^3$	4.672	8	$22 \times 10^4$	5.342
43	$13 \times 10^2$	3.114	25	$7 \times 10^6$	6.845
44	$78 \times 10^3$	4.892	30	$54 \times 10^6$	7.732
45	$7 \times 10^3$	3.845	35	$46 \times 10^4$	5.663
63	$58 \times 10^3$	4.763	40	$5 \times 10^4$	4.699
68	$15 \times 10^3$	4.176	46	$11 \times 10^4$	5.041
69	$23 \times 10^3$	4.362	57	$195 \times 10^6$	8.290
70	$10 \times 10^2$	3.000	61	$42 \times 10^4$	5.623
71	$20 \times 10^2$	3.301	64	$42 \times 10^3$	4.623
72	$10 \times 10^3$	4.000	65	$41 \times 10^4$	5.613
74	$3 \times 10^2$	2.477	66	$32 \times 10^4$	5.505
75	$7 \times 10^3$	3.845	78	$182 \times 10^4$	6.260
CONEJO		n = 15 $\bar{X} = 4.185$ $\sigma_{n-1} = 0.953$	GALLINA		n = 15 $\bar{X} = 5.787$ $\sigma_{n-1} = 1.082$

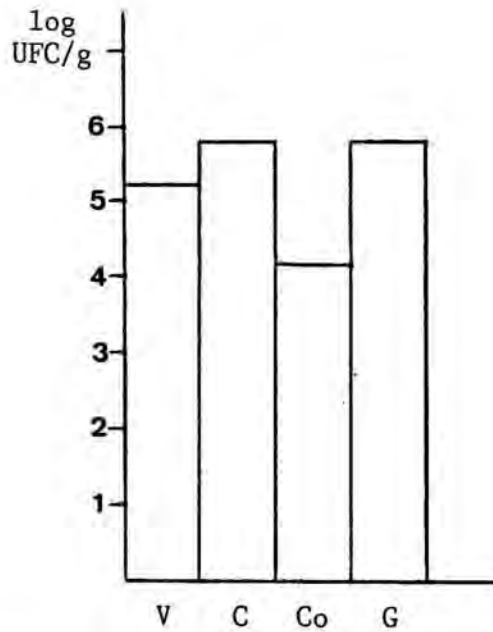
TABLA nº 20 .- Resultados correspondientes al número de UFC/g de pienso compuesto, destinado a la alimentación de conejos y de gallinas.

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
32	$10 \times 10^4$	5.000
58	$247 \times 10^4$	6.393
60	$29 \times 10^3$	4.462
OVEJA		$n = 3$ $\bar{X} = 5.285$ $\sigma_{n-1} = 0.996$

TABLA nº 21.- Resultados correspondientes al nº de UFC/g de pienso compuesto destinado a la alimentación de ovejas.

ESPECIE ANIMAL	Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
CABRA	26	$21 \times 10^4$	5.322
CABALLO	17	$80 \times 10^4$	5.903
PALOMA	27	$16 \times 10^4$	5.204

TABLA nº 22 .- Resultados correspondientes al nº de UFC/g de pienso destinado a la alimentación de cabras, caballos y palomas.



GRAFICA nº 4 .- Comparación entre el valor medio del log UFC/g de pienso destinado a vacas (V), cerdos (C), conejos (Co) y gallinas (G). Análisis de la varianza  $p=0.0002$ . Diferencias significativas, nivel de confianza 99%.

log UFC/g	VACA	CERDO	CONEJO	GALLINA	TOTAL
< 2.501	-	-	1	-	1
2.501 - 3.500	1	-	3	-	4
3.501 - 4.500	3	3	5	-	11
4.501 - 5.500	9	7	4	6	26
5.501 - 6.500	5	5	2	6	18
6.501 - 7.500	-	1	-	1	2
> 7.500	1	4	-	2	7
TOTAL	19	20	15	15	69

TABLA nº 23 .- Distribución de los recuentos efectuados (log UFC/g) en los piensos compuestos estudiados.

### 5.3.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN FORRAJES

En la TABLA nº 24 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la micoflora de los forrajes investigados, así como el número de muestras de cada tipo de explotación de las que fueron aislados.

Los microorganismos están ordenados en la TABLA, atendiendo a la frecuencia total de aislamiento en las explotaciones estudiadas.

Dado el bajo número de muestras de forraje estudiadas no se ha realizado tratamiento estadístico de los resultados.

	VACA	CABRA	CABALLO	TOTAL	%
<u>Alternaria</u>	3	1	1	5	83.33
<u>Aspergillus</u>	3	-	1	4	66.67
<u>Penicillium</u>	3	-	1	4	66.67
<u>Cladosporium</u>	1	1	1	3	50.00
<u>Scytalidium</u>	2	-	1	3	50.00
<u>Absidia</u>	1	-	1	2	33.33
<u>Mucor</u>	1	-	1	2	33.33
<u>Rhizopus</u>	1	-	1	2	33.33
Mic.est.dematíáceo	1	-	1	2	33.33
<u>Aureobasidium</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Candida</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Drechslera</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Epicoccum</u>	-	1	-	1	16.67
<u>Phoma</u>	-	1	-	1	16.67
Mic.est.hialino	1	-	-	1	16.67
Nº TOTAL DE MUESTRAS	4	1	1		

TABLA nº 24 .- Frecuencia y porcentaje de aparición de hongos filamentosos y levaduras aislados de muestras de forrajes. Distribución de los mismos según cada tipo de explotación.



En la TABLA nº 25 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de las especies aisladas en el estudio de la micoflora de los forrajes, así como el número de muestras destinadas a cada especie animal del que fueron aisladas.

El orden seguido en la TABLA viene dado por la frecuencia de aparición de los géneros aislados. Las especies se indican por orden alfabético.

Dado el bajo número de muestras de forraje estudiadas, no se ha realizado tratamiento estadístico de los resultados.

En la TABLA nº 26 se recogen los resultados correspondientes al número de UFC/g de las seis muestras de forraje estudiadas, según la especie animal a la que iban destinadas, así como su transformación en logaritmo decimal.

	VACA	CABRA	CABALLO	TOTAL	%
<u>Alternaria alternata</u>	2	1	1	4	66.67
<u>Alternaria longipes</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Aspergillus awamori</u>	2	-	-	2	33.33
<u>Aspergillus ficuum</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Aspergillus flavus</u>	-	-	1	1	16.67
<u>Aspergillus fumigatus</u>	3	-	1	4	66.67
<u>Penicillium albocinerascens</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Penicillium brasilianum</u>	-	-	1	1	16.67
<u>Penicillium chrysogenum</u>	2	-	-	2	33.33
<u>Penicillium frequentans</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Penicillium viridicatum</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Cladosporium herbarum</u>	1	1	1	3	50.00
<u>Scytalidium lignicola</u>	2	-	1	3	50.00
<u>Absidia corymbifera</u>	1	-	1	2	33.33

TABLA nº 25 .- Frecuencia y porcentaje de aparición de las especies aisladas en el estudio de la micoflora presente en los forrajes estudiados. Distribución según cada tipo de explotación.

	VACA	CABRA	CABALLO	TOTAL	%
<u>Mucor racemosus</u>	1	-	1	1	16.67
<u>Mucor plumbeus</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Rhizopus oryzae</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	-	1	1	16.67
<u>Aureobasidium pullulans</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Candida famata</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Drechslera dematioidea</u>	1	-	-	1	16.67
<u>Epicoccum purpurascens</u>	-	1	-	1	16.67
<u>Phoma macrostoma</u>	-	1	-	1	16.67
Nº TOTAL DE MUESTRAS	4	1	1		

TABLA nº 25 .- Forrajes (continuación)

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
1	$39 \times 10^4$	5.591
11	$65 \times 10^3$	4.813
24	$14 \times 10^4$	5.146
29	$175 \times 10^6$	8.243
VACA		$n = 4$ $\bar{X} = 5.948$ $\sigma_{n-1} = 1.563$

ESPECIE ANIMAL	Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
CABRA	47	$257 \times 10^4$	6.410
CABALLO	17	$20 \times 10^4$	5.301

TABLA nº 26 .- Resultados correspondientes al número de UFC/g de forraje destinado a la alimentación de vacas, cabras y caballos.

### 5.3.3 RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN ENSILADOS

En las TABLAS núms. 27 y 28 se detalla la frecuencia y el porcentaje total de aparición de los géneros y especies aislados de las tres muestras de ensilado destinadas al consumo del ganado vacuno estudiadas.

El orden seguido en la TABLA viene dado por la frecuencia de aislamiento.

Dado que todas las muestras estudiadas pertenecen a una única especie animal no se ha podido establecer ninguna comparación de resultados.

En la TABLA nº 29 se recogen los resultados correspondientes al número de UFC/g de muestra de ensilado estudiado y su transformación logarítmica.

	VACA	%
<u>Geotrichum</u>	3	100.00
<u>Candida</u>	2	66.67
<u>Absidia</u>	1	33.33
<u>Aspergillus</u>	1	33.33
Nº TOTAL DE MUESTRAS	3	

TABLA nº 27.- Frecuencia y porcentaje de aparición de géneros aislados de muestras de ensilados.

	VACA	%
<u>Geotrichum candidum</u>	3	100.00
<u>Candida lusitaniae</u>	2	66.67
<u>Absidia corymbifera</u>	1	33.33
<u>Aspergillus fumigatus</u>	1	33.33
Nº TOTAL DE MUESTRAS	3	

TABLA nº 28 .- Frecuencia y porcentaje de aparición de especies aisladas de muestras de ensilados.

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
24	$53 \times 10^6$	7.724
41	$300 \times 10^6$	8.477
42	$32 \times 10^6$	7.505
VACA		$n = 3$ $\bar{X} = 7.902$ $\sigma_{n-1} = 0.510$

TABLA nº 29 .- Resultados correspondientes al nº de UFC/g de ensilado destinado a la alimentación de vacas.

## 5.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MICOFLORA PRESENTE EN LAS MUESTRAS DE SUELOS

### 5.4.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL

En la TABLA n°30 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de los hongos filamentosos y levaduras aislados en el estudio de la micoflora presente en las muestras de suelos, así como el número de muestras de cada tipo de explotación de las que fueron aisladas.

Los microorganismos están ordenados en la TABLA, atendiendo a la frecuencia total de aislamiento en las explotaciones estudiadas.

Para una mejor interpretación de las TABLAS correspondientes a este apartado, debe considerarse lo siguiente:

1 = VACA	2 = CERDO	3 = CONEJO	4 = GALLINA
5 = OVEJA	6 = CABRA	7 = CABALLO	8 = PALOMA

Se ha realizado el "test"  $\chi^2(355)$  para comparar la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros aislados en las muestras de tierra de explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas, observándose que no existen diferencias significativas.



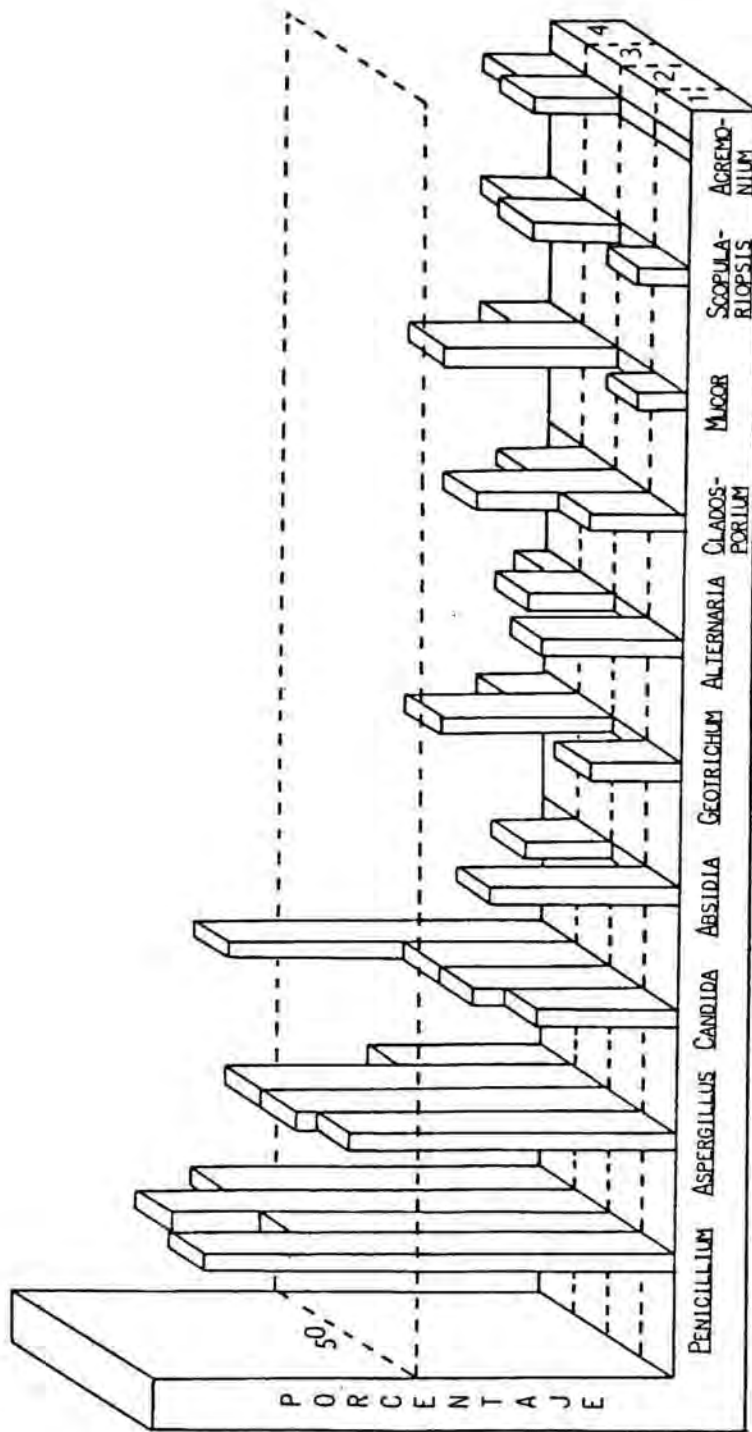
	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium</u>	10	2	5	10	2	1	1	1	32	78.05
<u>Aspergillus</u>	7	2	4	5	1	-	1	1	21	51.22
<u>Candida</u>	3	1	2	10	2	2	-	1	21	51.22
<u>Absidia</u>	4	-	1	-	2	-	-	-	7	17.07
<u>Geotrichum</u>	2	-	2	2	-	-	-	1	7	17.07
<u>Alternaria</u>	3	-	1	1	-	-	-	1	6	14.63
<u>Cladosporium</u>	2	1	1	-	1	-	-	-	5	12.19
<u>Mucor</u>	1	-	2	2	-	-	-	-	5	12.19
<u>Scopulariopsis</u>	1	-	1	2	1	-	-	-	5	12.19
<u>Acremonium</u>	-	-	1	2	-	-	1	-	4	9.76
<u>Aphanocladium</u>	-	1	-	3	-	-	-	-	4	9.76
<u>Mic.est.dematiaáceo</u>	-	1	1	1	-	-	-	1	4	9.76
<u>Fusarium</u>	1	-	1	-	-	-	1	-	3	7.32
<u>Rhizopus</u>	1	-	1	-	-	-	1	-	3	7.32
<u>Aureobasidium</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	4.88
<u>Chryso sporium</u>	-	-	-	1	-	-	-	1	2	4.88

TABLA n° 30 .- Frecuencia y porcentaje total de aparición de hongos filamentosos y levaduras aislados de muestras de suelos. Distribución de los mismos según cada tipo de explotación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Mycelophthora</u>	-	-	-	1	1	-	-	-	2	4,88
<u>Rhodotorula</u>	-	-	1	-	-	-	-	1	2	4,88
<u>Trichoderma</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	4,88
<u>Mic.est.hialino</u>	-	1	-	-	-	-	-	1	2	4,88
<u>Chaetomium</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2,44
<u>Circinella</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2,44
<u>Cylindrocarpon</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2,44
<u>Epicoccum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2,44
<u>Gilmaniella</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2,44
<u>Gliocladium</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2,44
<u>Pecilomyces</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2,44
<u>Staphylotrichum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2,44
<u>Trichothecium</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2,44
Nº TOTAL DE MUESTRAS	11	3	6	15	2	2	1	1		

TABLA nº 30.- Suelos (continuación)

En la GRAFICA nº 5 se representa la comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente en las muestras de suelos analizados.



GRAFICA nº 5 .- Comparación entre el porcentaje de aparición de los diez géneros aislados mayoritariamente de suelos procedentes de explotaciones de vacas (1), cerdos (2), conejos (3) y gallinas (4).

En la TABLA nº 31 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de las especies aisladas en el estudio de las muestras de suelos estudiadas, así como el número de muestras de cada explotación de las que fueron aisladas.

El orden seguido en la TABLA viene dado por la frecuencia de aparición de los géneros aislados. Las especies se indican por orden alfabético.

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar la frecuencia de aparición de cada una de las especies aisladas en las muestras de suelos de explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas, observándose que no existen diferencias significativas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Penicillium chrysogenum</u>	4	1	1	6	2	1	1	1	17	41.46
<u>Penicillium corylophilum</u>	1	1	-	1	1	-	-	-	4	9.76
<u>Penicillium frequentans</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	4.88
<u>Penicillium fellutanum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2.44
<u>Penicillium implicatum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Penicillium martensii</u>	-	-	2	1	-	-	-	-	3	7.32
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Penicillium nigricans</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2.44
<u>Penicillium olivino-viride</u>	1	-	1	2	-	-	-	-	4	9.76
<u>Penicillium palitans</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Penicillium paxilli</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	4.88
<u>Penicillium puberulum</u>	1	1	-	-	-	-	-	-	2	4.88
<u>Penicillium simplicissimum</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2.44
<u>Penicillium steckii</u>	-	1	1	1	-	-	-	-	3	7.32
<u>Penicillium variabile</u>	-	-	-	1	-	-	1	-	2	4.88
<u>Penicillium viridicatum</u>	3	-	2	2	1	-	-	1	9	21.95

TABLA n° 31 .- Frecuencia y porcentaje de aparición de las especies aisladas en el estudio de la microflore de suelos. Distribución según cada tipo de explotación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aspergillus amstelodami</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Aspergillus awamori</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Aspergillus candidus</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Aspergillus chevalieri</u>	-	-	1	-	-	-	-	1	2	4.88
<u>Aspergillus flavus</u>	-	-	1	3	-	-	1	-	5	12.19
<u>Aspergillus fumigatus</u>	7	1	1	3	-	-	1	-	13	31.70
<u>Aspergillus nidulans</u>	-	1	-	1	-	-	-	-	2	4.88
<u>Aspergillus speluneus</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Aspergillus terreus</u>	1	-	1	1	-	-	-	-	3	7.32
<u>Aspergillus terreus var. aureus</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	2.44
<u>Aspergillus tubingensis</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Aspergillus versicolor</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Candida famata</u>	2	1	1	9	2	1	-	1	17	41.46
<u>Candida lusitanae</u>	1	-	1	1	-	1	-	-	4	9.76
<u>Absidia corymbifera</u>	4	-	1	-	2	-	-	-	7	17.07
<u>Geotrichum candidum</u>	2	-	2	2	-	-	-	1	7	17.07

TABLA nº 31 .- Suelos (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Alternaria alternata</u>	3	-	1	-	-	-	-	1	5	12.19
<u>Alternaria longipes</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2.44
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Cladosporium herbarum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Cladosporium sphaerospermum</u>	-	1	-	-	1	-	-	-	2	4.88
<u>Mucor mucedo</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Mucor plumbeus</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	4.88
<u>Mucor racemosus</u>	1	-	1	2	-	-	-	-	4	9.76
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	-	-	1	2	1	-	-	-	4	9.76
<u>Scopulariopsis candida</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	4.88
<u>Acremonium persicinum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2.44
<u>Acremonium roseum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Acremonium strictum</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2.44
<u>Acremonium tubakii</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2.44

TABLA nº 31.- Suelos (continuación)



	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Aphanocladium album</u>	-	1	-	3	-	-	-	-	4	9.76
<u>Fusarium oxysporum</u>	1	-	1	-	-	-	1	-	3	7.32
<u>Fusarium poae</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Fusarium trincinctum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Fusarium equiseti</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Rhizopus oryzae</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	2.44
<u>Rhizopus stolonifer</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	4.88
<u>Aureobasidium pullulans</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	4.88
<u>Chrysosporium merdarium</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2.44
<u>Chrysosporium queenslandicum</u>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2.44
<u>Myceliophthora sp.</u>	-	-	-	1	1	-	-	-	2	4.88
<u>Rhodotorula glutinis</u>	-	-	1	-	-	-	-	1	2	4.88
<u>Trichoderma viride</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	4.88

TABLA nº 31 .- Suelos (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Chaetomium varioستيolatum</u>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2.44
<u>Circinella umbellata</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Cylindrocarpon sp.</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Epicoccum purpurascens</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Gilmaniella sp.</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Gliocladium catenulatum</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	2.44
<u>Paecilomyces variotii</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Staphylotrichum coccosporum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	2.44
<u>Trichothecium roseum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	2.44
Nº TOTAL DE MUESTRAS	11	3	6	15	2	2	1	1		

TABLA nº 31 .- Suelos (continuación)

En las TABLAS números 32 y 33 se recogen los resultados correspondientes al número de UFC/g de las cuarenta y una muestras de tierra estudiadas, distribuidas en función del tipo de explotación del que procedían, así como su transformación en logaritmo decimal para proceder a su análisis.

En la GRAFICA nº 6 se representa la media de los logarismos del número de UFC/g de las muestras procedentes de las explotaciones de vaca, cerdo, conejo y gallina estudiadas. En este caso, se ha realizado el análisis de la varianza para comparar los valores de micoflora total presentes en las muestras procedentes de las cuatro explotaciones, observándose que no existían diferencias significativas.

En la TABLA nº 34 se observa la distribución de los recuentos efectuados (log UFC/g) en las muestras de suelos de explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas, estudiadas.

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g	Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
1	$277 \times 10^7$	9.442	4	$5 \times 10^6$	6.699
11	$3 \times 10^6$	6.477	6	$300 \times 10^7$	9.477
14	$110 \times 10^6$	8.041	7	$7 \times 10^6$	6.845
15	$107 \times 10^6$	8.029	8	$6 \times 10^6$	6.778
24	$3 \times 10^6$	6.477	25	$2 \times 10^6$	6.301
29	$13 \times 10^5$	6.114	30	$413 \times 10^7$	9.616
38	$3 \times 10^6$	6.477	35	$23 \times 10^6$	7.362
41	$4 \times 10^6$	6.602	40	$125 \times 10^7$	9.097
42	$12 \times 10^6$	7.079	46	$5 \times 10^6$	6.699
56	$60 \times 10^6$	7.778	57	$30 \times 10^9$	10.477
67	$21 \times 10^6$	7.322	61	$300 \times 10^6$	8.477
			64	$256 \times 10^7$	9.408
			65	$220 \times 10^6$	8.342
			66	$5 \times 10^6$	6.699
			78	$48 \times 10^6$	7.681
VACA		$n = 11$ $\bar{X} = 7.258$ $\sigma_{n-1} = 0.993$	GALLINA		$n = 15$ $\bar{X} = 7.997$ $\sigma_{n-1} = 1.356$

TABLA nº 32.- Resultados correspondientes al número de UFC/g de suelo procedente de explotaciones de vacas y gallinas.

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
2	$24 \times 10^6$	7.380
34	$25 \times 10^6$	7.398
55	$49 \times 10^6$	7.690
CERDO		$n = 3$ $\bar{X} = 7.489$ $\sigma_{n-1} = 0.174$

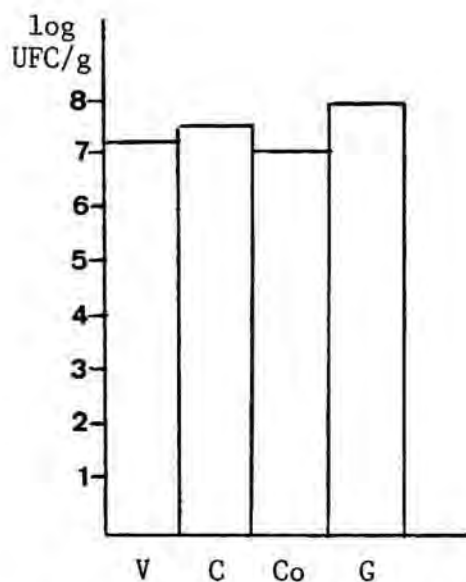
Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
16	$69 \times 10^6$	7.839
28	$40 \times 10^7$	8.602
44	$31 \times 10^4$	5.491
63	$198 \times 10^6$	8.297
68	$11 \times 10^6$	7.041
69	$15 \times 10^4$	5.176
CONEJO		$n = 6$ $\bar{X} = 7.074$ $\sigma_{n-1} = 1.451$

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
58	$58 \times 10^4$	5.763
60	$11 \times 10^4$	5.041
OVEJA		$n = 2$ $\bar{X} = 5.402$ $\sigma_{n-1} = 0.510$

Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
26	$7 \times 10^6$	6.845
47	$25 \times 10^4$	5.398
CABRA		$n = 2$ $\bar{X} = 6.121$ $\sigma_{n-1} = 1.023$

ESPECIE ANIMAL	Nº GRANJA	UFC/g	log UFC/g
CABALLO	17	$60 \times 10^6$	7.778
PALOMA	27	$35 \times 10^7$	8.544

TABLA nº 33 .- Resultados correspondientes al número de UFC/g de suelo procedente de explotaciones de cerdos, conejos, ovejas, cabras caballo y palomas.



GRAFICA nº 6 .- Comparación entre el valor medio del log UFC/g de suelos procedentes de explotaciones de vacas (V), cerdos (C), conejos (Co) y gallinas (G).

log UFC/g	VACA	CERDO	CONEJO	GALLINA	TOTAL
< 5.501	-	-	2	-	2
5.501 - 6.500	4	-	-	1	5
6.501 - 7.500	3	2	1	6	12
7.501 - 8.500	3	1	2	3	9
8.501 - 9.500	1	-	1	3	5
> 9.500	-	-	-	2	2
TOTAL	11	3	6	15	35

TABLA nº 34 .- Distribución de los recuentos efectuados (log UFC/g) en las muestras de suelos estudiados.

#### 5.4.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE HONGOS QUERATINOFILICOS

En la TABLA nº se exponen el número y porcentaje de muestras de suelos procedentes de cada explotación animal estudiada, en las que se aislaron hongos queratinofílicos siguiendo la técnica de Vanbreuseghem ( 371 ).

En la TABLA nº36 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de hongos miceliares y levaduras aislados en el estudio de los hongos queratinofílicos del suelo, así como el número de muestras de cada tipo de explotación de que fueron aislados.

Los microorganismos están ordenados en la TABLA, atendiendo a la frecuencia de aislamiento en las muestras estudiadas.

Para una mejor interpretación de las TABLAS correspondientes a este apartado, debe considerarse lo siguiente:

1 = VACA	2 = CERDO	3 = CONEJO	4 = GALLINA
5 = OVEJA	6 = CABRA	7 = CABALLO	8 = PALOMA

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros aislados en las muestras de tierra de explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas, observándose que no existen diferencias significativas.

ESPECIE ANIMAL	Nº MUESTRAS POSITIVAS	% MUESTRAS POSITIVAS
VACA	5	45.4
CERDO	2	66.7
CONEJO	4	66.7
GALLINA	9	60.0
OVEJA	1	50.0
CABRA	-	-
CABALLO	1	100.0
PALOMA	1	100.0
Nº TOTAL DE MUESTRAS DE SUELO ESTUDIADAS: 41	23	56.1

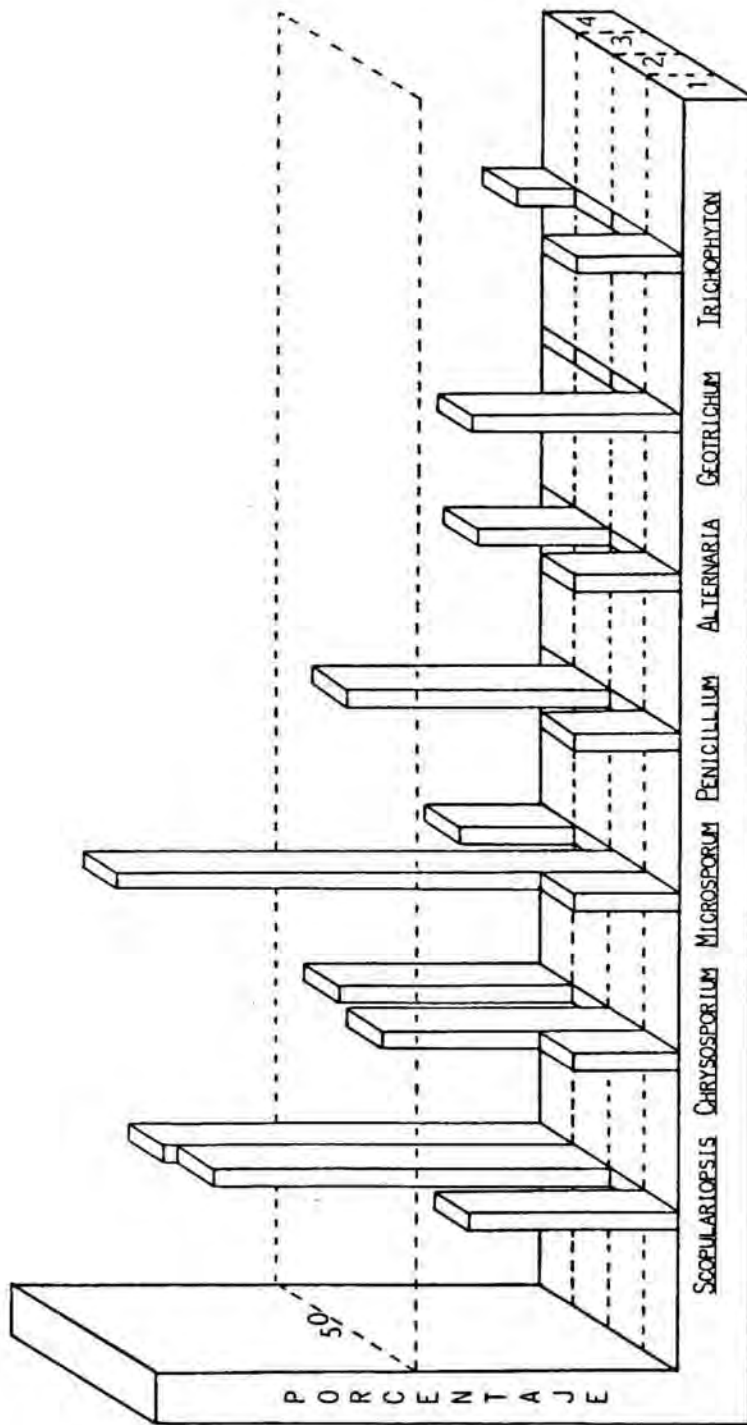
TABLA nº 35 .- Número y porcentaje de muestras de suelo procedentes de cada tipo de explotación en las que se aislaron hongos queratinofílicos.



	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Scopulariopsis</u>	2	-	3	7	1	-	1	1	15	65.22
<u>Chrysosporium</u>	1	1	-	4	-	-	-	1	7	30.43
<u>Microsporium</u>	1	2	-	2	-	-	-	-	5	21.74
<u>Penicillium</u>	1	-	2	-	-	-	-	1	4	17.39
<u>Alternaria</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	8.69
<u>Geotrichum</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	8.69
<u>Trichophyton</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	8.69
<u>Acremonium</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Cylindrocarpon</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Fusarium</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Gilmaniella</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Microascus</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	4.35
<u>Mycogone</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Trichothecium</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Mic.est.dematíáceo</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
Nº TOTAL DE MUESTRAS	5	2	4	9	1	-	1	1		

TABLA nº 36 .- Frecuencia y porcentaje total de aparición de hongos queratinofílicos aislados de muestras de suelos. Distribución de los mismos según cada tipo de explotación.

En la GRAFICA nº 7 se representa la comparación entre el porcentaje de aparición de los siete géneros aislados mayoritariamente en las muestras de suelos analizadas.



GRAFICA nº 7 .- Comparación entre el porcentaje de aparición de los siete géneros aislados mayoritariamente mediante la técnica de Vanbreuseghem de muestras de suelos procedentes de explotaciones de vacas (1), cerdos (2), conejos (3) y gallinas (4).

En la TABLA nº 37 se detalla la frecuencia y porcentaje total de aparición de las especies de hongos queratinofílicos aisladas en las muestras de suelo estudiadas, así como el número de muestras de cada explotación de las que fueron aisladas.

El orden seguido en la TABLA, viene dado por la frecuencia de aparición de los géneros aislados. Las especies se indican por orden alfabético.

Se ha realizado el "test"  $\chi^2$  (355) para comparar la frecuencia de aparición de cada una de las especies de hongos queratinofílicos aisladas de las muestras de suelos de explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas, observándose que no existen diferencias significativas.

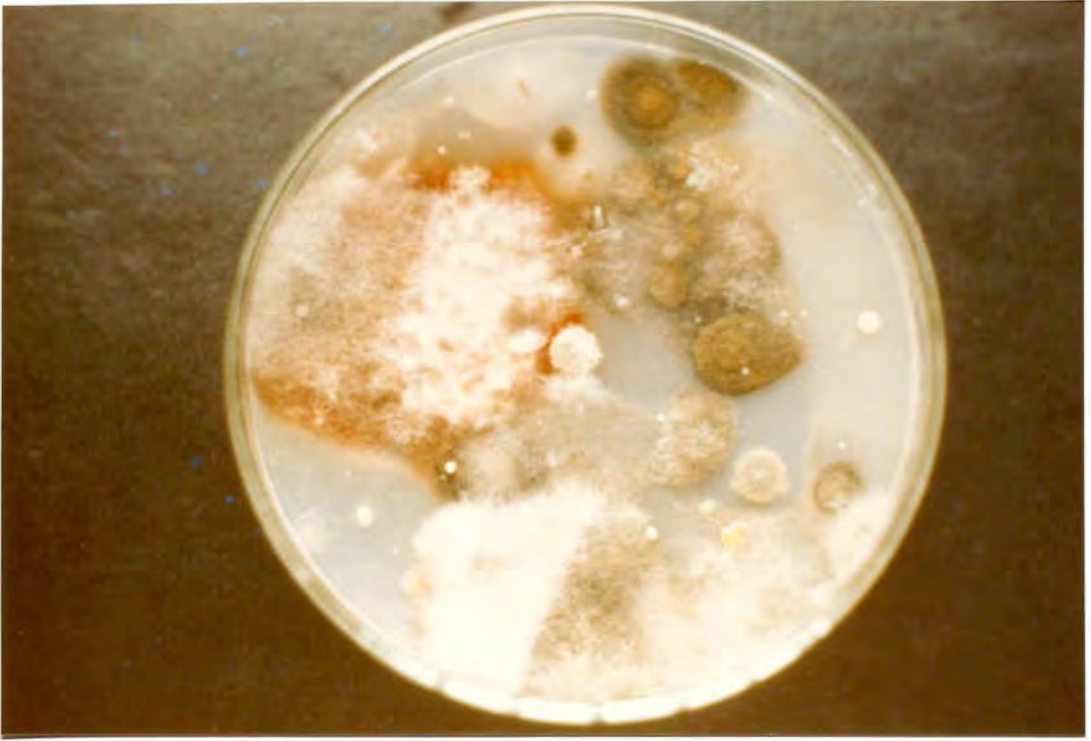
	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	1	-	3	5	1	-	1	1	12	52.17
<u>Scopulariopsis candida</u>	-	-	3	5	1	-	-	-	9	39.13
<u>Scopulariopsis fusca</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Chrysosporium georgii</u>	-	-	-	1	-	-	-	-	1	4.35
<u>Chrysosporium indicum</u>	-	-	-	2	-	-	-	-	2	8.69
<u>Chrysosporium keratinophilum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Chrysosporium merdarium</u>	-	1	-	1	-	-	-	-	2	8.69
<u>Chrysosporium queenslandicum</u>	1	-	-	1	-	-	-	1	3	13.04
<u>Chrysosporium tropicum</u>	-	1	-	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Microsporium gypseum</u>	1	2	-	2	-	-	-	-	5	21.74
<u>Penicillium chrysogenum</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Penicillium martensii</u>	-	-	2	-	-	-	-	-	2	8.69
<u>Penicillium velutinum</u>	-	-	-	-	-	-	-	1	1	4.35
<u>Alternaria alternata</u>	1	-	1	-	-	-	-	-	2	8.69

TABLA nº 37 .- Frecuencia y porcentaje total de aparición de especies de hongos queratinofílicos aislados de muestras de suelos. Distribución de las mismas según cada tipo de explotación.

	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL	%
<u>Geotrichum candidum</u>	2	-	-	-	-	-	-	-	2	8.69
<u>Trichophyton ajelloi</u>	1	-	-	1	-	-	-	-	2	8.69
<u>Acremonium fusidioides</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Cylindrocarpon sp.</u>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	4.35
<u>Fusarium oxysporum</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Gilmaniella sp.</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Microascus manginii</u>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	4.35
<u>Mycogone perniciosa</u>	-	-	-	-	-	-	1	-	1	4.35
<u>Trichothecium roseum</u>	-	-	1	-	-	-	-	-	1	4.35
Nº TOTAL DE MUESTRAS	5	2	4	9	1	-	1	1		

TABLA nº 37 .- Hongos queratinofílicos (continuación)





Microflora atmosférica. Crecimiento observado en una placa de Petri (agar extracto de malta al 2%) tras un periodo de incubación de 7 días a 28°C



Desarrollo de hongos queratinofílicos sobre crin de caballo (Técnica de Vanbreuseghem)

## 5.5. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL PRESENTE EN EL HABITAT DE LOS ANIMALES SANOS

En la TABLA nº 38 se resumen los géneros aislados en las setenta y siete explotaciones estudiadas distribuidas en cuatro hábitats: aire, animal, alimento y suelo.

Dado el bajo número de muestras de forraje y ensilado investigadas se ha considerado oportuno agruparlas bajo la denominación de "alimento" junto con los piensos.

En la columna relativa a "animal" se incluyen los resultados obtenidos conjuntamente en el estudio de la micoflora presente en el pelo y plumas de todos los animales estudiados.

Con el fin de observar si existen diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros según los hábitats, se ha realizado el "test" de  $\chi^2$  (355).



	AIRE	ANIMAL	ALIMENTO	SUELO
<u>Absidia</u>	26.0	29.9	15.5	17.1
<u>Acremonium</u>	13.0	5.2	17.8	9.7
** <u>Alternaria</u>	63.6	26.0	15.5	14.6
<u>Ampulliferina</u>	-	-	1.2	-
** <u>Aphanocladium</u>	27.3	7.8	25.0	9.7
<u>Arthrinium</u>	3.9	3.9	1.2	-
<u>Arthroderma</u>	2.6	2.6	-	-
** <u>Aspergillus</u>	70.1	54.5	75.0	51.2
<u>Aureobasidium</u>	2.6	-	4.8	4.9
<u>Botrytis</u>	2.6	-	-	-
** <u>Candida</u>	55.8	13.0	40.5	51.2
<u>Chaetomium</u>	1.3	-	-	2.4
** <u>Chrysosporium</u>	9.1	-	-	21.9
<u>Circinella</u>	1.3	1.3	1.2	2.4
** <u>Cladosporium</u>	64.9	7.8	11.9	12.2
<u>Cylindrocarpon</u>	-	-	-	4.9
<u>Doratomyces</u>	1.3	-	-	-
<u>Drechslera</u>	2.6	-	1.2	-
<u>Emericellopsis</u>	-	-	1.2	-
** <u>Epicoccum</u>	22.1	2.6	1.2	2.4

TABLA n<sup>o</sup> 38.- Distribución de los géneros aislados en las 77 explotaciones estudiadas. Diferencias significativas: \* Nivel de confianza 95%, \*\* Nivel de confianza 99%

	AIRE	ANIMAL	ALIMENTO	SUELO
** <u>Fusarium</u>	33.8	10.4	39.3	9.7
<u>Geotrichum</u>	11.7	5.2	10.7	21.9
<u>Gilmaniella</u>	2.6	-	1.2	4.9
<u>Gliocladium</u>	2.6	2.6	2.4	2.4
<u>Humicola</u>	2.6	-	-	-
<u>Microascus</u>	-	-	-	2.4
<u>Microsporium</u>	-	-	-	12.2
** <u>Mucor</u>	42.8	36.4	17.8	12.2
<u>Myceliophthora</u>	1.3	-	-	4.9
<u>Mycogone</u>	-	-	-	2.4
<u>Paecilomyces</u>	6.5	2.6	3.6	2.4
** <u>Penicillium</u>	80.5	42.8	85.7	87.8
<u>Periconia</u>	1.3	-	-	-
<u>Phoma</u>	10.4	1.3	1.2	-
<u>Pleospora</u>	1.3	-	-	-
* <u>Rhizopus</u>	2.6	5.2	15.5	7.3
<u>Rhodotorula</u>	6.5	-	7.1	4.9
<u>Sepedonium</u>	7.8	-	-	-
** <u>Scopulariopsis</u>	29.9	10.4	3.6	48.8
<u>Scytalidium</u>	5.2	1.3	3.6	-
<u>Staphylotrichum</u>	2.6	-	-	2.4
<u>Trichoderma</u>	9.1	2.6	2.4	4.9
<u>Trichophyton</u>	-	-	-	4.9
<u>Trichothecium</u>	9.1	2.6	1.2	4.9

TABLA nº 38.- (continuación)

	AIRE	ANIMAL	ALIMENTO	SUELO
<u>Tritirachium</u>	-	-	1.2	-
** <u>Ulocladium</u>	13.0	2.6	1.2	-
** Mic. est. dematiáceo	51.9	14.3	10.7	12.2
Mic. est. hialino	9.1	2.6	1.2	4.9
Nº TOTAL DE MUESTRAS	77	77	84	41

TABLA nº 38.- (continuación)

Para cada grupo de explotaciones estudiadas, se consideró de interés destacar aquellas especies aisladas de los diversos hábitats, indicando asimismo para cada explotación las que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats estudiados.

#### 5.5.1. EXPLOTACIONES VACUNAS

En la TABLA nº 39 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación en que se detectaron.

En las TABLAS núms. 40 a 58 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados de cada explotación.

#### 5.5.2. EXPLOTACIONES PORCINAS

En la TABLA nº 59 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación en que se detectaron.

En las TABLAS núms. 60 a 79 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados de cada explotación.

#### 5.5.3. EXPLOTACIONES CUNICOLAS

En la TABLA nº 80 se resume la distribución de cada una de las

especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación en que se detectaron.

En las TABLAS núms. 81 a 94 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados de cada explotación.

#### 5.5.4. EXPLOTACIONES AVIARES

En la TABLA nº 95 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación en que se detectaron.

En las TABLAS núms. 96 a 110 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados de cada explotación.

#### 5.5.5. EXPLOTACIONES DE OVEJAS

En la TABLA nº 111 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación en que se detectaron.

En las TABLAS núms. 112 a 114 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados de cada explotación.

### 5.5.6. EXPLOTACIONES DE CABRAS

En la TABLA nº 115 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación en que se detectaron.

En las TABLAS núms. 116 y 117 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados de cada explotación.

### 5.5.7. EXPLOTACION DE CABALLOS

En la TABLA nº 118 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats estudiados.

En la TABLA nº 119 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados.

### 5.5.8. EXPLOTACION DE PALOMAS

En la TABLA nº 120 se resume la distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats estudiados.

En la TABLA nº 121 se indican aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats muestreados.

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS.	MIC.	TOTAL	TIERRA
							QUERAT.	
<u>Absidia corymbifera</u>	14, 24, 42, 56, 73, 80, 81, 82	1, 11, 29, 31, 42, 56, 67, 73, 76, 81	11, 73, 81,	11	24	14, 41, 42, 67	-	-
<u>Acremonium biseptum</u>	-	-	79	-	-	-	-	-
<u>Acremonium curvulum</u>	73	-	-	-	-	-	-	-
<u>Acremonium roseum</u>	79	-	62	-	-	-	-	-
<u>Acremonium strictum</u>	14, 15	38, 67	42, 67, 77, 81	-	-	-	-	-
<u>Acremonium tubakii</u>	79	-	-	-	-	-	-	-
<u>Alternaria alternata</u>	1, 11, 14, 15, 24, 29, 42, 56, 62, 67, 77, 79, 80, 81, 82	29, 62, 67, 79, 82	67	1, 11	-	1, 29, 56	29	-
<u>Alternaria chlamydospora</u>	38	-	-	-	-	-	-	-
<u>Alternaria longipes</u>	-	-	-	24	-	-	-	-
<u>Alternaria raphani</u>	31	-	-	-	-	-	-	-
<u>Aphanocladium album</u>	38, 62, 81	-	29, 38, 42, 62	-	-	-	-	-

TABLEA n° 39 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación vacuna en que se detectaron.

## TIERRA

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS.	MIC.	TOTAL	QUERAT.
<u>Aspergillus amstelodami</u>	73,80	62,73	-	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus awamori</u>	-	76	76	1,11	-	-	11	-
<u>Aspergillus candidus</u>	14,62,80,82	-	11,24,38,56	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus chevalieri</u>	1,29	80	24,29,38,42,77	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus ficuum</u>	-	-	-	24	-	-	-	-
<u>Aspergillus flavipes</u>	-	-	15	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus flavus</u>	14,29	14,15,56	11,14,29,31,38, 62,73,76,82	-	-	-	-	-
<u>A.flavus var.columnaris</u>	-	-	77	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	1,14,15,38, 41,42,81,82	14,15,81	11,14,15,24, 56,77,80	1,11,24	24	-	1,11,14, 15,24,41, 42	-
<u>Aspergillus nidulans</u>	42	-	67	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus ochraceus</u>	62	-	-	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus parasiticus</u>	15,81	-	81	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus speluneus</u>	38,41,42	-	-	-	-	-	42	-

TABLA nº 39 .- Explotaciones vacunas (continuación)



	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS.	MIC.	TOTAL	TIERRA	QUERAT.
<u>Aspergillus sydowi</u>	62	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus terreus</u>	14,15,42,81, 82	81	-	-	-	42	-	-	-
<u>Aspergillus terricola</u>	14,38,42,62, 80	76	62	-	-	-	-	-	-
<u>Aspergillus tubingensis</u>	1,14,15,29, 41,42,56,73	1,15,29,31, 56,62	56,67	-	-	42	-	-	-
<u>Aspergillus versicolor</u>	62	38,62	24,79	-	-	-	-	-	-
<u>Aureobasidium pullulans</u>	11,79	-	-	24	-	-	-	-	-
<u>Candida famata</u>	11,14,31,41, 67,73,76,77, 79,80,82	79	42,56,62,73	29	-	14,56	-	-	-
<u>Candida lusitanae</u>	41	-	29	-	41,42	41	-	-	-
<u>Chaetomium globosum</u>	24	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Chrysosporium georgii</u>	38	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>Chrysosporium indicum</u>	24	-	-	-	-	-	-	-	-
<u>C. keratinophilum</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	29

TABLA n° 39 .- Explotaciones vacunas ( continuación )

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS. MIC.	TIERRA
					TOT. QUERAT.	
<u>Chrysosporium queenslandicum</u>	-	-	-	-	-	29
<u>Circinella unbellata</u>	80	-	-	-	-	-
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	56,62,67,73, 76,77,80,81	62	-	-	-	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	1,11,14,15, 24,38,79	79	42	11	-	56
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	31,62,73	-	-	-	-	67
<u>Cladosporium tenuissimum</u>	29	-	-	-	-	-
<u>Cylindrocarpon sp.</u>	-	-	-	-	-	38
<u>Dreschlera dematioidea</u>	80,81	-	-	1	-	-
<u>Epicoccum purpurascens</u>	56,77,80,81	-	-	-	-	-
<u>Fusarium lateritium</u>	14,80	-	-	-	-	-
<u>Fusarium moniliforme</u>	-	-	77,79	-	-	-
<u>Fusarium oxysporum</u>	24,56,62,79, 81	38	11,15,29,31, 38,41,62,67, 73,76,77,79, 81	-	-	56
<u>Fusarium poae</u>	-	-	-	-	-	56

TABLA n° 39 .- Explotaciones vacunas (continuación)

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS. MIC.	TOTAL	TIERRA
						QUERAT.	
<u>Fusarium semitectum</u>	79	-	-	-	-	-	-
<u>Fusarium solani</u>	1,80	-	-	-	-	-	-
<u>Fusarium tricinctum</u>	-	-	-	-	-	56	-
<u>Fusarium equiseti</u>	-	-	-	-	-	56	-
<u>Fusarium dimerum</u>	80	-	-	-	-	-	-
<u>Geotrichum candidum</u>	41,81	42,79	-	-	24,41,42	41,56	29,41
<u>Gilmaniella sp.</u>	15	-	-	-	-	-	-
<u>Gliocladium catenulatum</u>	82	-	82	-	-	-	-
<u>Microsporium gypseum</u>	-	-	-	-	-	-	24
<u>Mucor circinelloides</u>	41	41	-	-	-	-	-
<u>Mucor hiemalis</u>	67,79	67	81	-	-	-	-
<u>Mucor plumbeus</u>	1,76,77,79, 81	77,80	80,81	1	-	-	-
<u>Mucor racemosus</u>	24,29,38,42, 67,82	15,24,29,38	15,41	-	-	15	-
<u>Paecilomyces variotii</u>	15	-	77	-	-	-	-

TABLA n° 39 .- Explotaciones vacunas (continuación)

	AIRE.	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS. MIC.	TOTAL	TIERRA	QUERAT.
<u>Penicillium albocinerascens</u>	-	-	-	1	-	-	-	-
<u>Penicillium canescens</u>	76	-	-	-	-	-	-	-
<u>Penicillium chrysogenum</u>	1,38,41	11	11,24,31,38, 42,67	1,11	-	1,11,29, 38	24	24
<u>Penicillium corylophilum</u>	24	-	14,31,67,73, 81,82	-	-	29	-	-
<u>Penicillium frequentans</u>	11	-	11,38,73,80	24	-	24	-	-
<u>Penicillium implicatum</u>	42	-	-	-	-	42	-	-
<u>Penicillium italicum</u>	-	-	67	-	-	-	-	-
<u>Penicillium jensenii</u>	73	-	-	-	-	-	-	-
<u>Penicillium janthinellum</u>	-	-	62	-	-	-	-	-
<u>Penicillium martensii</u>	42,76,77,79	-	42,76,79,80	-	-	-	-	-
<u>Penicillium meleagrinum</u>	81	-	73,76	-	-	-	-	-
<u>Penicillium olivino-viride</u>	24	-	82	-	-	67	-	-
<u>Penicillium palitans</u>	73	-	73	-	-	-	-	-
<u>Penicillium paxilli</u>	14	-	24,67	-	-	11	-	-

TABLA n° 39 .- Explotaciones vacunas (continuación)

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS. MIC.	TOTAL QUERAT.	TIERRA
<u>Penicillium puberulum</u>	31,62	-	-	-	-	38	-
<u>Penicillium purpurogenum</u>	-	-	29	-	-	-	-
<u>Penicillium simplicissimum</u>	73	-	79,80	-	-	-	-
<u>Penicillium stipitatum</u>	-	-	42	-	-	-	-
<u>Penicillium variabile</u>	24	15,62	29,77,82	-	-	-	-
<u>Penicillium viridicatum</u>	38,56,67	62	11,14,15,56,62, 67,77,80,81,82	11	-	14,15,56	-
<u>Penicillium melinii</u>	73	-	-	-	-	-	-
<u>Phoma betae</u>	62,79	-	-	-	-	-	-
<u>Phoma glomerata</u>	14	79	-	-	-	-	-
<u>Rhizopus oryzae</u>	-	-	76,81	24	-	-	-
<u>Rhizopus oligosporus</u>	-	41	-	-	-	-	-
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	-	14	-	-	14	-
<u>Rhodotorula glutinis</u>	31	-	-	-	-	-	-

TABLA nº 39 .- Explotaciones vacunas (continuación)

TIERRA

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	ENS.	MIC.	TOTAL	QUERAT.
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	62,73,80	-	-	-	-	-	-	38
<u>Scopulariopsis candida</u>	62,73	73,77	-	-	-	67	-	-
<u>Scopulariopsis fusca</u>	-	-	-	-	-	-	-	11
<u>Scytalidium lignicola</u>	-	80	-	11,24	-	-	-	-
<u>Staphylotrichum coccosporum</u>	-	-	-	-	-	67	-	-
<u>Trichoderma viride</u>	41,76,79, 80	41	-	-	-	41	-	-
<u>Trichophyton ajelloi</u>	-	-	-	-	-	-	-	24
<u>Trichothecium roseum</u>	62	-	-	-	-	-	-	-
<u>Ulocladium chlamydosporum</u>	67	-	-	-	-	-	-	-
<u>Ulocladium chartarum</u>	62,73	-	-	-	-	-	-	-
<u>Ulocladium consortiale</u>	38,76,82	82	-	-	-	-	-	-
Micelio estéril dematiáceo	1,11,14,15, 24,38,42,73, 76,77,79,80, 82	82	67	1	-	-	-	-
Micelio estéril hialino	24,29,73	15	-	1	-	-	-	-

TABLA nº 39 .- Explotaciones vacunas (continuación)

ESPECIES	AIRE	PELO	FORRAJE	TIERRA
<u>Alternaria alternata</u>	x		x	x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x	x
<u>Aspergillus tubingensis</u>	x	x		
<u>Mucor plumbeus</u>	x		x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x	x

Tabla nº 40 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 1.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	TIERRA	
					Mic.T.	Quer.
<u>Absidia corymbifera</u>		x	x	x		
<u>Alternaria alternata</u>	x			x		
<u>Aspergillus awamori</u>				x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>			x	x	x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>		x	x	x	x	
<u>Penicillium frequentans</u>	x		x			
<u>Penicillium viridicatum</u>			x	x		

Tabla nº 41 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº11.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>	x			x
<u>Aspergillus flavus</u>	x	x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	x	x
<u>Candida famata</u>	x			x
<u>Penicillium viridicatum</u>			x	x
<u>Rhizopus stolonifer</u>			x	x

Tabla nº 42 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº14.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	x	x
<u>Aspergillus tubingensis</u>	x	x		
<u>Mucor racemosus</u>		x	x	x
<u>Penicillium viridicatum</u>			x	x

Tabla nº 43 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 15.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	FORR.	TIERRA	
					ENS.	Mic.T. Querat.
<u>Absidia corymbifera</u>	x				x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>			x	x	x	x
<u>Mucor racemosus</u>	x	x				
<u>Penicillium chrysogenum</u>			x			x
<u>Penicillium frequentans</u>				x		x

Tabla nº 44 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 24.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	TIERRA	
					Mic.T.	Quer.
<u>Alternaria alternata</u>	x	x			x	x
<u>Aspergillus chevalieri</u>	x		x			
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x			
<u>Aspergillus tubingensis</u>	x	x				
<u>Mucor racemosus</u>	x	x				

Tabla nº 45 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 29.



ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Aphanocladium album</u>	x		x		
<u>Fusarium oxysporum</u>		x	x		
<u>Mucor racemosus</u>	x	x			
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x	x	

Tabla nº 46 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 38.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	ENS.	TIERRA	
					Mic.T.	Querat.
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x				x	
<u>Candida lusitanae</u>	x			x	x	
<u>Geotrichum candidum</u>	x			x	x	x
<u>Mucor circinelloides</u>	x	x				
<u>Trichoderma viride</u>	x	x			x	

Tabla nº 47 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 41.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	ENS.	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>		x			x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x				x
<u>Aspergillus speluneus</u>	x				x
<u>Aspergillus terreus</u>	x				x
<u>Aspergillus tubingensis</u>	x				x
<u>Geotrichum candidum</u>			x	x	
<u>Penicillium implicatum</u>	x				x
<u>Penicillium martensii</u>	x			x	

Tabla nº 48 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 42.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x		
<u>Alternaria alternata</u>	x			x
<u>Aspergillus tubingensis</u>	x	x	x	
<u>Candida famata</u>			x	x
<u>Fusarium oxysporum</u>	x			x
<u>Penicillium viridicatum</u>	x		x	x

Tabla nº 49 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 56.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	
<u>Aphanocladium album</u>	x		x
<u>Aspergillus terricola</u>	x		x
<u>Aspergillus versicolor</u>	x	x	
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x
<u>Penicillium viridicatum</u>		x	x

Tabla nº 50 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 62.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>		x		x
<u>Acremonium strictum</u>		x	x	
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	x	
<u>Mucor hiemalis</u>	x	x		
<u>Penicillium viridicatum</u>	x		x	

Tabla nº 51 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 67.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x	x
<u>Aspergillus amstelodami</u>	x	x	
<u>Candida famata</u>	x		x
<u>Penicillium palitans</u>	x		x
<u>Scopulariopsis candida</u>	x	x	

Tabla nº 52 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 73.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus awamori</u>		x	x
<u>Penicillium martensii</u>	x		x

Tabla nº 53 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 76.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Mucor plumbeus</u>	x	x	

Tabla nº 54 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 77.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	
<u>Candida famata</u>	x	x	
<u>Cladosporium herbarum</u>	x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x
<u>Penicillium martensii</u>	x		x

Tabla nº 55 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 79.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Mucor plumbeus</u>		x	x

Tabla nº 56 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 80.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x	x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	
<u>Aspergillus parasiticus</u>	x		x
<u>Aspergillus terreus</u>	x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x
<u>Mucor plumbeus</u>	x		x

Tabla nº 57 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 81.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	
<u>Gliocladium catenulatum</u>	x		x
<u>Ulocladium consortiale</u>	x	x	

Tabla nº 58 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación vacuna nº 82.

	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Absidia corymbifera</u>	18, 23, 52, 53, 54	10, 18, 21, 52	36, 52, 53, 55	-	-
<u>Acremonium roseum</u>	-	-	36, 37, 55	-	-
<u>Alternaria alternata</u>	10, 19, 22, 23, 33, 37, 48, 50, 51, 54, 55	36	33, 55	-	-
<u>Alternaria tenuissima</u>	-	34	-	-	-
<u>Ampulliferina persimplex</u>	-	-	51	-	-
<u>Aphanocladium album</u>	10, 19, 21, 22, 34, 36, 48, 50, 51, 52	34, 51	2, 3, 22, 48, 49, 50, 51, 59	2	-
<u>Arthriniium phaeospermum</u>	48	23, 48	-	-	-
<u>Aspergillus amstelodami</u>	37, 54, 55	54, 55	-	-	-
<u>Aspergillus candidus</u>	22	2, 23, 33, 48, 50, 53	2, 10, 22, 33, 51, 54	-	-
<u>Aspergillus chevalieri</u>	10	48	10, 49, 50, 51	-	-
<u>Aspergillus flavus</u>	2, 18, 19, 21, 22, 49, 50, 52	21	2, 18, 19, 21, 22, 23, 36, 48, 49, 50, 51	-	-

TABLA nº 59 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación porcina en que se detectaron.

	TIERRA				
	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Aspergillus fumigatus</u>	2, 18, 19, 21, 22, 51	19, 22, 49	2, 10, 18, 19, 21, 22, 23, 49, 50	2	-
<u>Aspergillus nidulans</u>	36, 50	-	-	55	-
<u>Aspergillus terreus</u>	22, 36	-	-	-	-
<u>Aspergillus terricola</u>	2	-	-	-	-
<u>Aspergillus tubingensis</u>	23	21, 55	18, 19, 21	-	-
<u>Candida famata</u>	2, 18, 33, 34, 37, 48, 50, 51, 52, 53, 55, 59	49, 52, 55, 59	33, 36, 37, 52, 53, 59	34	-
<u>Candida lusitanae</u>	33, 54	54	54	-	-
<u>Chryso sporium merdarium</u>	-	-	-	-	2
<u>Chryso sporium tropicum</u>	-	-	-	-	2
<u>Chryso sporium sp.</u>	2	-	-	-	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	10, 18, 50, 54	-	54, 55	-	-
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	33, 52	-	-	-	-
<u>Cladosporium sphaerospermum</u>	53, 59	-	-	55	-

TABLA n° 59 .- Explotaciones porcinas (continuación)

	TIERRA				
	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Emericellopsis terricola</u>	-	-	54	-	-
<u>Epicoccum purpurascens</u>	50, 53, 59	-	-	-	-
<u>Fusarium lateritium</u>	49	-	-	-	-
<u>Fusarium oxysporum</u>	2, 18, 21, 22, 23, 36, 48, 50, 52	36, 37, 51	2, 10, 23, 33, 36, 48, 49, 50, 51, 55, 59	-	-
<u>Geotrichum candidum</u>	23, 36, 37, 48, 51	-	52, 53	-	-
<u>Humicola grisea</u>	19	-	-	-	-
<u>Microsporium gypseum</u>	-	-	-	-	2, 55
<u>Mucor hiemalis</u>	49	-	-	-	-
<u>Mucor plumbeus</u>	18, 22, 49	37	-	-	-
<u>Mucor racemosus</u>	2, 19, 21, 23, 33, 36, 48, 49, 50, 51, 53, 54	2, 10, 21, 50, 55	50	-	-
<u>Penicillium brasilianum</u>	52	-	-	-	-
<u>Penicillium chrysogenum</u>	2, 34, 59	2, 19	2, 23, 34, 36	2	-
<u>Penicillium corylophilum</u>	33	-	34	34	-

TABLA n° 59 .- Explotaciones porcinas (continuación)

	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Penicillium decumbens</u>	-	-	22	-	-
<u>Penicillium frequentans</u>	-	23,59	-	-	-
<u>Penicillium martensii</u>	19,33	-	55	-	-
<u>Penicillium meleagrinum</u>	-	-	48,51	-	-
<u>Penicillium olivino-viride</u>	59	51	33,37	-	-
<u>Penicillium palitans</u>	-	50	-	-	-
<u>Penicillium paxilli</u>	-	-	23	-	-
<u>Penicillium puberulum</u>	22,48,49,50,51	-	48,49,50	2	-
<u>Penicillium restrictum</u>	54	-	-	-	-
<u>Penicillium simplicissimum</u>	-	-	21,55	-	-
<u>Penicillium steckii</u>	-	-	34	34	-
<u>Penicillium variabile</u>	21	19,22	2,18,19,22	-	-
<u>Penicillium velutinum</u>	21,53	-	-	-	-
<u>Penicillium viridicatum</u>	10,19,49,53	48,52	22,49,59	-	-
<u>Phoma destructiva</u>	10	-	-	-	-

TABLA nº 59 .- Explotaciones porcinas (continuación)



	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Phoma lycopersici</u>	23	-	-	-	-
<u>Rhizopus oryzae</u>	51	-	22,51	-	-
<u>Rhizopus oligosporus</u>	-	-	21	-	-
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	18	18,49,50	-	-
<u>Rhodotorula glutinis</u>	22	-	55	-	-
<u>Sepedonium chrysospermum</u>	49,52	-	-	-	-
<u>Scopulariopsis candida</u>	53	52,53,59	-	-	-
<u>Scytalidium lignicola</u>	10	-	-	-	-
<u>Ulocladium chartarum</u>	50	-	-	-	-
<u>Ulocladium consortiale</u>	37,55	53	23	-	-
Micelio estéril dematiáceo	10,18,19,23,33, 37,49,54,55	33	33	55	-
Micelio estéril hialino	22	2	-	2	-

TABLA nº 59 .- Explotaciones porcinas (continuación)

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Aphanocladium album</u>			x	x	
<u>Aspergillus candidus</u>		x	x		
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x		
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x		
<u>Mucor racemosus</u>	x	x			
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x	x	x	x	

Tabla nº 60 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 2.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aphanocladium album</u>	x		x
<u>Aspergillus chevalieri</u>	x		x

Tabla nº 61 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 10.

ESPECIE	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x	
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x
<u>Rhizopus stolonifer</u>		x	x

Tabla nº 62 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 18.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	x
<u>Penicillium variable</u>		x	x

Tabla nº 63 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 19.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus flavus</u>	x	x	x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x
<u>Aspergillus tubingensis</u>		x	x
<u>Mucor racemosus</u>	x	x	

Tabla nº 64 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 21.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aphanocladium album</u>	x		x
<u>Aspergillus candidus</u>	x		x
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	x
<u>Penicillium variable</u>		x	x

Tabla nº 65 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 22.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x

Tabla nº 66 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 23.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria alternata</u>	x		x
<u>Aspergillus candidus</u>		x	x
<u>Candida famata</u>	x		x

Tabla nº 67 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 33.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Aphanocladium album</u>	x	x		
<u>Candida famata</u>	x			x
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x	
<u>Penicillium corylophilum</u>			x	x
<u>Penicillium steckii</u>			x	x

Tabla nº 68 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 34.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Fusarium oxysporum</u>	x	x	x

Tabla nº 69 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 36.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Candida famata</u>	x		x

Tabla nº 70 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 37.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aphanocladium album</u>	x		x
<u>Arthrimum phaeospermum</u>	x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x
<u>Penicillium puberulum</u>	x		x

Tabla nº 71 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 48.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x
<u>Penicillium puberulum</u>	x		x
<u>Penicillium viridicatum</u>	x		x

Tabla nº 72 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 49.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aphanocladium album</u>	x		x
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x
<u>Mucor racemosus</u>	x	x	x
<u>Penicillium puberulum</u>	x		x

Tabla nº 73 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 50.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aphanocladium album</u>	x	x	x
<u>Fusarium oxysporum</u>		x	x
<u>Rhizopus oryzae</u>	x		x

Tabla nº 74 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 51.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x	x
<u>Candida famata</u>	x	x	x

Tabla nº 75 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 52.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Absidia corymbifera</u>	x		x
<u>Candida famata</u>	x		x
<u>Scopulariopsis candida</u>	x	x	

Tabla nº 76 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 53.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus amstelodami</u>	x	x	
<u>Candida lusitaniae</u>	x	x	x
<u>Cladosporium herbarum</u>	x		x

Tabla nº 77 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 54.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Alternaria alternata</u>	x		x		
<u>Aspergillus amstelodami</u>	x	x			
<u>Candida famata</u>	x	x			

Tabla nº 78 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 55.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Candida famata</u>	x	x	x

Tabla nº 79 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación porcina nº 59.

	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Absidia corymbifera</u>	28	28,75	-	69	-
<u>Acremonium bactrocephalum</u>	75	-	-	-	-
<u>Acremonium pinkertoniae</u>	75	-	-	-	-
<u>Acremonium roseum</u>	-	-	-	44	-
<u>Acremonium strictum</u>	-	43	-	-	-
<u>Acremonium terricola</u>	68	63	-	-	-
<u>Acremonium humicola</u>	-	-	63	-	-
<u>Alternaria alternata</u>	16,43,44,63,68 74	43,44,63,68, 70,72,74	44	63	63
<u>Aphanocladium album</u>	72	-	-	-	-
<u>Arthrinium phaeospermum</u>	16	-	-	-	-
<u>Arthroderma benhamiae</u>	39,45	39,45	-	-	-
<u>Aspergillus amstelodami</u>	71,75	63,71	43,68,69	68	-
<u>Aspergillus awamori</u>	68	68	-	-	-

TABLA nº 80 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación cunícola en que se detectaron.



	TIERRA				
	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Aspergillus candidus</u>	68,70,74	70,74	63,71	69	-
<u>Aspergillus chevalieri</u>	39,74	-	39,45,74	69	-
<u>Aspergillus flavus</u>	20	16	16,20,75	16	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	16,20	16,20	16,20,28,43	16	-
<u>Aspergillus nidulans</u>	-	63	-	-	-
<u>Aspergillus repens</u>	63,75	-	71	-	-
<u>Aspergillus speluneus</u>	68	-	-	-	-
<u>Aspergillus terreus</u>	28,68	-	-	28	-
<u>Aspergillus terricola</u>	68,69	-	-	-	-
<u>Aspergillus tubingensis</u>	-	-	20	-	-
<u>Aspergillus versicolor</u>	16,74	-	68,72	68	-
<u>Aureobasidium pullulans</u>	-	-	68	-	-
<u>Candida famata</u>	28,68,75	-	28,43,63,72	44	-
<u>Candida lusitanae</u>	-	-	-	69	-
<u>Chrysosporium tropicum</u>	16	-	-	-	-
<u>Circinella umbellata</u>	-	-	63	63	-

TABLA nº 80 .- Explotaciones cunícolas (continuación)

TIERRA

	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	63,68,70,71, 74,75	-	72	68	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	16,39,43,63	72	-	-	-
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	71	71	-	-	-
<u>Cladosporium tenuissimum</u>	69	-	-	-	-
<u>Doratomyces stemonitis</u>	74	-	-	-	-
<u>Epicoccum purpurascens</u>	39,70,71,74, 75	70	-	69	-
<u>Fusarium oxysporum</u>	43,68,71	68	-	28	-
<u>Fusarium semitectum</u>	72	-	-	-	-
<u>Fusarium equiseti</u>	-	63	-	-	-
<u>Geotrichum candidum</u>	28	28	28	28,63	-
<u>Gilmaniella sp.</u>	-	-	69	69	-
<u>Gliocladium catenulatum</u>	72	70	-	-	-
<u>Gliocladium virens</u>	-	74	-	-	-
<u>Humicola fuscoatra</u>	69	-	-	-	-

TABLA nº 80 .- Explotaciones cunícolas (continuación)

	TIERRA				
	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Mucor hiemalis</u>	-	70	69	-	-
<u>Mucor mucedo</u>	-	-	-	63	-
<u>Mucor plumbeus</u>	28,63,68,70	28,63	63,68	28,63	-
<u>Mucor racemosus</u>	63,68	68	63	63	-
<u>Paecilomyces variotii</u>	-	-	-	28	-
<u>Penicillium casei</u>	-	-	39	-	-
<u>Penicillium chrysogenum</u>	16,28	20,44,69	16,20,28,44, 45,68,69,70, 72,74	16	-
<u>Penicillium corylophilum</u>	70	-	-	-	-
<u>Penicillium cyclopium</u>	43,70	-	-	-	-
<u>Penicillium frequentans</u>	44,45,70	70	20,69	-	-
<u>Penicillium fellutanum</u>	72	-	-	-	-
<u>Penicillium martensii</u>	69,74	63	63,69	63,69	63,69
<u>Penicillium meleagrinum</u>	74	-	75	-	-
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	39,63	-	63	63	-
<u>Penicillium olivino-viride</u>	63	-	-	68	-

TABLA n° 80.- Explotaciones cunícolas (continuación)

	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Penicillium palitans</u>	75	-	44	68	-
<u>Penicillium paxilli</u>	-	-	70,71	-	-
<u>Penicillium puberulum</u>	39	-	-	-	-
<u>Penicillium steckii</u>	-	-	-	69	-
<u>Penicillium variabile</u>	20	-	-	-	-
<u>Penicillium viridicatum</u>	28,39,68,70	68,72	16,28	16,28	-
<u>Periconia byssoides</u>	70	-	-	-	-
<u>Phoma destructiva</u>	16,75	-	-	-	-
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	-	63	63	-
<u>Rhodotorula glutinis</u>	63,71	-	44,69	63	-
<u>Sepedonium chrysospermum</u>	68,69	-	-	-	-
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	43,45,63,68, 69,71,75	69	-	69	44,68,69
<u>Scopulariopsis candida</u>	39,45,69,70, 71,74,75	69,75	39,63	69	44,68,69
<u>Scopulariopsis fusca</u>	71,75	-	-	-	-

TABLA n° 80 .- Explotaciones cunicolas (continuación)

	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Scytalidium lignicola</u>	16,70	-	-	-	-
<u>Staphylotrichum coccosporum</u>	45	-	-	-	-
<u>Trichoderma viride</u>	70	-	-	-	-
<u>Trichothecium roseum</u>	39,63,68,74	45,63	63	63	63
Micelio estéril dematiáceo	39,43,44,68, 69,70,72,75	44,45,63, 71,74	44,72	68	-
Micelio estéril hialino	68,70	-	-	-	-

TABLA nº 80 .- Explotaciones cunícolas (continuación)

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Aspergillus flavus</u>		x	x	x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	x	x
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x	x
<u>Penicillium viridicatum</u>			x	x

Tabla nº 81 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 16.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x	x	x
<u>Penicillium chrysogenum</u>		x	x

Tabla nº 82 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 20.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x		
<u>Aspergillus terreus</u>	x			x
<u>Candida famata</u>	x		x	
<u>Geotrichum candidum</u>	x	x	x	x
<u>Mucor plumbeus</u>	x	x		x
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x	
<u>Penicillium viridicatum</u>	x		x	x

Tabla nº 83 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 28.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Arthroderma benhamiae</u>	x	x	
<u>Aspergillus chevalieri</u>	x		x
<u>Scopulariopsis candida</u>	x		x

Tabla nº 84 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 39.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	

Tabla nº 85 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 43.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Quer.
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	x		
<u>Penicillium chrysogenum</u>		x	x		

Tabla nº 86 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 44.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Arthroderma benhamiae</u>	x	x	

Tabla nº 87 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 45.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Alternaria alternata</u>	x	x		x	x
<u>Circinella umbellata</u>			x	x	
<u>Mucor plumbeus</u>	x	x	x	x	
<u>Mucor racemosus</u>	x		x	x	
<u>Penicillium martensii</u>		x	x	x	x
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	x		x	x	
<u>Rhizopus stolonifer</u>			x	x	
<u>Rhodotorula glutinis</u>	x			x	
<u>Trichothecium roseum</u>	x	x	x	x	x

Tabla nº 88 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 63.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Alternaria alternata</u>	x	x			
<u>Aspergillus amstelodami</u>			x	x	
<u>Aspergillus awamori</u>	x	x			
<u>Aspergillus versicolor</u>			x	x	
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	x			x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x	x			
<u>Mucor plumbeus</u>	x		x		
<u>Mucor racemosus</u>	x	x			
<u>Penicillium viridicatum</u>	x	x			
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x				x

Tabla nº 89 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 68.



ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Gilmaniella</u> sp.			x	x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>		x	x		
<u>Penicillium martensii</u>	x		x	x	x
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x	x		x	x
<u>Scopulariopsis candida</u>	x	x		x	x

Tabla nº 90 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 69.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus candidus</u>	x	x	
<u>Epicoccum purpurascens</u>	x	x	
<u>Penicillium frequentans</u>	x	x	

Tabla nº 91 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 70.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Aspergillus amstelodami</u>	x	x	
<u>Cladosporium macrocarpum</u>	x	x	

Tabla nº 92 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 71.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	
<u>Aspergillus candidus</u>	x	x	
<u>Aspergillus chevalieri</u>	x		x

Tabla nº 93 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº74.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Scopulariopsis candida</u>	x	x	

Tabla nº 94 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación cunícola nº 75.

	TIERRA				
	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Absidia corymbifera</u>	30,57,61,64	25,40,57,61, 66,78	4,7,64	-	-
<u>Acremonium persicinum</u>	-	-	-	65	-
<u>Acremonium roseum</u>	6,66	-	6,64,65,66	-	-
<u>Acremonium strictum</u>	66	-	-	-	-
<u>Acremonium tubakii</u>	-	-	-	8	-
<u>Acremonium vitellinum</u>	65	-	-	-	-
<u>Alternaria alternata</u>	4,6,25,40,57, 64,66,78	61	65	-	-
<u>Alternaria longipes</u>	-	8	-	8	-
<u>Alternaria phragmospora</u>	25	-	-	-	-
<u>Alternaria tenuissima</u>	30	-	-	-	-
<u>Aphanocladium album</u>	4,7,40,57,61, 78	7,35,57,61	4,7,8,25,35 40,61,78	35,61,78	-
<u>Arthrinium sphaerospermum</u>	65	-	65	-	-

TABLA n° 95 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación avícola en que se detectaron.

	TIERRA				
	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Aspergillus candidus</u>	7, 25, 35, 57, 78	4, 8, 78	4, 6, 25, 46	-	-
<u>Aspergillus chevalieri</u>	25, 57, 66, 78	-	4, 7, 25, 65	-	-
<u>Aspergillus flavipes</u>	-	-	6	-	-
<u>Aspergillus flavus</u>	30	30	4, 6, 7, 8, 30, 64, 65, 78	4, 65, 78	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	4, 8, 57	61, 64, 65	4, 6, 7, 8, 30, 40, 64, 65	4, 7, 8	-
<u>Aspergillus nidulans</u>	-	-	-	4	-
<u>Aspergillus terreus</u>	4	-	8, 65	8	-
<u>Aspergillus terricola</u>	-	78	4	-	-
<u>Aspergillus versicolor</u>	30	-	-	-	-
<u>Aspergillus sp.</u>	78	-	-	-	-
<u>Aureobasidium pullulans</u>	-	-	8	4, 7	-
<u>Candida famata</u>	6, 30, 35, 40, 46, 57, 61, 64, 66, 78	40, 61, 78	4, 6, 7, 8, 30 35, 40, 61, 64, 65, 66, 78	6, 30, 35, 40, 46, 61, 64, 66, 78	-

TABLA n° 95 .- Explotaciones avícolas (continuación)

	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA	QUERAT.
<u>Candida lusitanae</u>	7	57	57	57	-	-
<u>Chrysosporium georgii</u>	-	-	-	-	8	8
<u>Chrysosporium indicum</u>	-	-	-	-	65,78	65,78
<u>Chrysosporium merdarium</u>	25	-	-	25	25	25
<u>Chrysosporium queenslandicum</u>	-	-	-	-	8	8
<u>Circinella umbellata</u>	-	35	-	-	-	-
<u>Cladosporium cladosporioides</u>	64,66,78	-	-	-	-	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	6,7,8,30, 35,57	65	6	-	-	-
<u>Epicoccum purpurascens</u>	25,35,40,66	-	-	-	-	-
<u>Fusarium lateritium</u>	64	-	-	-	-	-
<u>Fusarium oxysporum</u>	8,25	64,65	4,6,7,8,25, 64,65,66,78	-	-	-
<u>Fusarium sdolani</u>	-	-	25	-	-	-
<u>Geotrichum candidum</u>	30	64	30,65,78	30,64	-	-

TABLA nº 95 .- Explotaciones avícolas (continuación)

TIERRA

	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERAT.
<u>Gliocladium catenulatum</u>	-	-	66	78	-
<u>Microsporium gypseum</u>	-	-	-	-	8,25
<u>Mucor circinelloides</u>	66	-	-	-	-
<u>Mucor hiemalis</u>	-	-	8	-	-
<u>Mucor plumbeus</u>	-	7,57	40,64	-	-
<u>Mucor racemosus</u>	6,40	6,8,30,46, 61,65,66	46,57	8,30	-
<u>Myceliophthora sp.</u>	-	-	-	4	-
<u>Paecilomyces variotii</u>	4,6,7	7,64	4,7	-	-
<u>Penicillium canescens</u>	-	-	6	-	-
<u>Penicillium carneo-lutescens</u>	4,25	4	-	-	-
<u>Penicillium chrysogenum</u>	6,25,30,57, 61,64,78	6,7,25,30	7,8,25,30, 46,57	4,6,8,25, 30,78	-
<u>Penicillium citrinum</u>	-	-	66	-	-
<u>Penicillium corylophilum</u>	-	-	-	35	-

TABLA n° 95 .- Explotaciones avícolas (continuación)

	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Penicillium frequentans</u>	57,66	-	6	7	-
<u>Penicillium fellutanum</u>	64,65	65	65	65	-
<u>Penicillium implicatum</u>	-	-	8	-	-
<u>Penicillium jenseni</u>	78	78	-	-	-
<u>Penicillium janthinellum</u>	65	-	-	-	-
<u>Penicillium martensii</u>	-	8,66,78	64,65	25	-
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	64	-	-	-	-
<u>Penicillium olivino-viride</u>	57	-	61	66,78	-
<u>Penicillium palitans</u>	66	66,78	78	-	-
<u>Penicillium paxilli</u>	-	-	-	25	-
<u>Penicillium purpurogenum</u>	-	-	4,78	-	-
<u>Penicillium roqueforti</u>	7	-	-	-	-
<u>Penicillium rubrum</u>	57	-	-	-	-
<u>Penicillium steckii</u>	-	-	-	35	-

TABLA nº 95 .- Explotaciones avícolas (continuación)

	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Penicillium variabile</u>	-	57	65	4	-
<u>Penicillium velutinum</u>	30	-	-	-	-
<u>Penicillium verruculosum</u>	-	-	25	-	-
<u>Penicillium viridicatum</u>	25,57,64,66	7,8,64	8,40	25,66	-
<u>Phoma betae</u>	66	-	-	-	-
<u>Rhizopus oryzae</u>	-	4	-	-	-
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	-	78	-	-
<u>Rhodotorula glutinis</u>	-	-	40,78	-	-
<u>Sepedonium chrysospermum</u>	4,66	-	-	-	-
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	30,40,46,65, 66,78	40	35	46,65	30,40,57, 64,65
<u>Scopulariopsis candida</u>	64,66	-	-	-	30,57,64, 66,78
<u>Scopulariopsis fusca</u>	66	-	-	-	-
<u>Scytalidium lignicola</u>	8	-	-	-	-

TABLA n.º 95 .- Explotaciones avícolas (continuación)



	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC. TOTAL	TIERRA QUERAT.
<u>Staphylotrichum coccosporum</u>	78	-	-	-	-
<u>Trichoderma viride</u>	4,64	64	4,65	8	-
<u>Trichophyton ajelloi</u>	-	-	-	-	8
<u>Trichothecium roseum</u>	4,66	-	-	-	-
<u>Tritirachium oryzae</u>	-	-	7	-	-
<u>Ulocladium chartarum</u>	66	-	-	-	-
Micelio estéril dematiáceo	6,8,25,64, 66	8,35,40	25,30	25	-
Micelio estéril hialino	30	-	-	-	-

TABLA nº 95 .- Explotaciones avícolas (continuación)

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA
<u>Aspergillus candidus</u>		x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x	x
<u>Aphanocladium album</u>	x		x	
<u>Paecilomyces variotii</u>	x		x	
<u>Penicillium carneo-lutescens</u>	x	x		
<u>Trichoderma viride</u>	x		x	

Tabla nº 96 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 4.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA
<u>Acremonium roseum</u>	x		x	
<u>Candida famata</u>	x		x	x
<u>Cladosporium herbarum</u>	x		x	
<u>Mucor racemosus</u>	x	x		
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x	x		x

Tabla nº 97 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 6.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA
<u>Aphanocladium album</u>	x	x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>			x	x
<u>Paecilomyces variotii</u>	x	x	x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>		x	x	

Tabla nº 98 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 7.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Alternaria longipes</u>		x		x	
<u>Aspergillus flavus</u>			x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>	x		x	x	
<u>Aspergillus terreus</u>			x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x		
<u>Mucor racemosus</u>		x		x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>			x	x	
<u>Penicillium viridicatum</u>		x	x		

Tabla nº 99 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 8.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Aspergillus candidus</u>	x		x		
<u>Aspergillus chevalieri</u>	x		x		
<u>Chrysosporium merdarium</u>	x			x	x
<u>Fusarium oxysporum</u>	x		x		
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x	x	x	x	
<u>Penicillium viridicatum</u>	x			x	

Tabla nº 100 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 25.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Aspergillus flavus</u>	x	x	x		
<u>Candida famata</u>	x		x	x	
<u>Geotrichum candidum</u>	x		x	x	
<u>Mucor racemosus</u>		x		x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x	x	x	x	
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x				x

Tabla nº 101 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 30.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA
<u>Aphanocladium album</u>		x	x	x
<u>Candida famata</u>	x		x	x

Tabla nº 102 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 35.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	Mic.T.	Querat.
<u>Aphanocladium album</u>	x		x		
<u>Candida famata</u>	x	x	x	x	
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x	x			x

Tabla nº 103 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 40.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA
<u>Candida famata</u>	x			x
<u>Mucor racemosus</u>		x	x	
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x			x

Tabla nº 104 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 46.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x			
<u>Aphanocladium album</u>	x	x			
<u>Candida lusitaniae</u>		x	x	x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x		

Tabla nº 105 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 57.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>	x	x		
<u>Aphanocladium album</u>	x	x	x	x
<u>Candida famata</u>	x	x	x	x

Tabla nº 106 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 61.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Absidia corymbifera</u>	x		x		
<u>Aspergillus fumigatus</u>		x	x		
<u>Candida famata</u>	x		x	x	
<u>Fusarium oxysporum</u>		x	x		
<u>Geotrichum candidum</u>		x		x	
<u>Penicillium viridicatum</u>	x	x			
<u>Scopulariopsis candida</u>	x				x
<u>Trichoderma viride</u>	x	x			

Tabla nº 107 .- Relación de especies aislados como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 64.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Arthriniun sphaerospermum</u>	x		x		
<u>Aspergillus flavus</u>			x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>		x	x		
<u>Fusarium oxysporum</u>		x	x		
<u>Penicillium fellutanum</u>	x	x	x	x	
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x			x	x

Tabla nº 108.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 65.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Acremonium roseum</u>	x		x		
<u>Candida famata</u>	x		x	x	
<u>Penicillium palitans</u>	x	x			
<u>Penicillium viridicatum</u>	x			x	
<u>Scopulariopsis candida</u>	x				x

Tabla nº 109.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 66.

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TOTAL	
				Mic.T.	Querat.
<u>Aphanocladium album</u>	x		x	x	
<u>Aspergillus candidus</u>	x	x			
<u>Aspergillus flavus</u>			x	x	
<u>Candida famata</u>	x	x	x	x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x			x	
<u>Penicillium jenseni</u>	x	x			
<u>Penicillium palitans</u>		x	x		

Tabla nº 110.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación aviar nº 78.

	TIERRA			
	AIRE	PELO	PIENSO MIC.	TOT. QUERATINOFILICOS
<u>Absidia corymbifera</u>	60	58	-	58,60
<u>Acremonium roseum</u>	60	-	-	-
<u>Alternaria alternata</u>	58,60	-	-	-
<u>Alternaria tenuissima</u>	32	32	-	-
<u>Aphanocladium album</u>	-	-	58	-
<u>Aspergillus flavus</u>	-	58	32	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	58	-	-	-
<u>Aspergillus speluneus</u>	60	-	-	-
<u>Aspergillus terreus var. aureus</u>	-	-	-	58
<u>Aspergillus tubingensis</u>	-	60	-	-
<u>Botrytis cinerea</u>	32	-	-	-
<u>Candida famata</u>	32,58,60	-	58,60	58,60
<u>Candida lusitanae</u>	-	-	58	-

TABLA nº 111 .- Distribución de cada una de las especies en los diversos hábitats, indicando el número de la explotación de ovejas en que se detectaron.

	TIERRA				
	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERATINOFILICOS
<u>Chrysosporium keratinophilum</u>	26	-	-	-	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	32,58	-	-	-	-
<u>Cladosporium sphaeospermum</u>	60	-	-	60	-
<u>Gilmaniella sp.</u>	60	-	-	-	-
<u>Microascus manginii</u>	-	-	-	-	58
<u>Mucor hiemalis</u>	-	60	-	-	-
<u>Myceliophthora sp.</u>	58	-	-	58	-
<u>Penicillium crysogenum</u>	58	-	58	58,60	-
<u>Penicillium corylophilum</u>	-	-	32	60	-
<u>Penicillium martensii</u>	32	-	-	-	-
<u>Penicillium nigricans</u>	-	-	60	60	-
<u>Penicillium palitans</u>	-	-	60	-	-
<u>Penicillium puberulum</u>	32	-	-	-	-
<u>Penicillium viridicatum</u>	58	-	-	60	-

TABLA nº 111 .- Explotaciones de ovejas (continuación)



TIERRA

	AIRE	PELO	PIENSO	MIC. TOTAL	QUERATINOFILICOS
<u>Rhodotorula glutinis</u>	32	-	-	-	-
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	58	-	-	58	58
<u>Scopulariopsis candida</u>	60	-	-	-	60
<u>Scopulariopsis fusca</u>	60	-	-	-	-
Micelio estéril dematiáceo	32,58,60	-	-	-	-

TABLA nº 111 .- Explotaciones de ovejas (continuación)

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO
<u>Alternaria tenuissima</u>	x	x	

Tabla nº 112.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación de ovejas nº 32.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Absidia corymbifera</u>		x		x	
<u>Candida famata</u>	x		x	x	
<u>Myceliophthora sp.</u>	x			x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x	x	
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	x			x	x

Tabla nº 113 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación de ovejas nº 58.

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Absidia corymbifera</u>	x			x
<u>Candida famata</u>	x		x	x
<u>Cladosporium sphaerospermum</u>	x			x
<u>Penicillium nigricans</u>			x	x

Tabla nº 114.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los sustratos estudiados en la explotación de ovejas nº 60.

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	TIERRA
<u>Alternaria alternata</u>	26,47	26,47	26	47	-
<u>Alternaria longipes</u>	26	-	-	-	-
<u>Aphanocladium album</u>	47	-	-	-	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	26	47	-	-	-
<u>Aspergillus heteromorphus</u>	47	-	-	-	-
<u>Botrytis cinerea</u>	47	-	-	-	-
<u>Candida famata</u>	26	-	-	-	47
<u>Candida lusitanae</u>	-	-	-	-	26
<u>Chaetomium variotiolatum</u>	-	-	-	-	47
<u>Chryso sporium keratinophilum</u>	26	-	-	-	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	26	47	26	47	-
<u>Cladosporium sphaerospermum</u>	47	-	-	-	-
<u>Epicoccum purpurascens</u>	26	47	-	47	-

TABLA nº 115 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats, indicando el número de explotaciones de cabras en que se detectaron.

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	TIERRA
<u>Penicillium chrysogenum</u>	-	-	26	-	26
<u>Penicillium jensenii</u>	-	47	-	-	-
<u>Penicillium martensii</u>	-	26	-	-	-
<u>Penicillium nalgiovensis</u>	-	26	-	-	-
<u>Penicillium puberulum</u>	47	-	-	-	-
<u>Penicillium simplicissimum</u>	-	-	-	-	26
<u>Penicillium viridicatum</u>	26,47	-	-	-	-
<u>Phoma macrostoma</u>	-	-	-	47	-
<u>Pleospora herbarum</u>	47	-	-	-	-
Micelio estéril dematiáceo	26	26	26	-	-

TABLA nº 115 .- Explotaciones de cabras (continuación)

ESPECIE	AIRE	PELO	PIENSO	TIERRA
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	x	
<u>Cladosporium herbarum</u>	x		x	
<u>Penicillium chrysogenum</u>			x	x

Tabla nº 116.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación de cabras nº 26.

ESPECIE	AIRE	PELO	FORRAJE	TIERRA
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	x	
<u>Cladosporium herbarum</u>		x	x	
<u>Epicoccum purpurascens</u>		x	x	

Tabla nº 117 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación de cabras , nº 47.

	TIERRA					
	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE MIC.	TOT. QUERATINOFILICOS	
<u>Absidia corymbifera</u>	17	-	-	17	-	-
<u>Acremonium fusidioides</u>	-	-	-	-	-	17
<u>Acremonium strictum</u>	-	-	-	-	17	-
<u>Alternaria alternata</u>	-	-	17	17	-	-
<u>Aspergillus flavus</u>	17	-	17	17	17	-
<u>Aspergillus fumigatus</u>	-	-	17	17	17	-
<u>Aspergillus tubingensis</u>	17	17	-	-	-	-
<u>Cladosporium herbarum</u>	-	-	-	17	-	-
<u>Fusarium oxysporum</u>	17	-	-	-	17	17
<u>Gilmaniella sp.</u>	-	-	-	-	-	17
<u>Mucor racemosus</u>	-	-	-	17	-	-
<u>Mycogone pernicioso</u>	-	-	-	-	-	17
<u>Penicillium brasilianum</u>	-	-	-	17	-	-
<u>Penicillium chrysogenum</u>	17	-	17	-	17	-

TABLA nº 118 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats estudiados en la explotación de caballos.

TIERRA

	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	MIC. TOT.	QUERATINOFILICOS
<u>Penicillium variabile</u>	-	-	17	-	17	-
<u>Penicillium viridicatum</u>	-	-	17	-	-	-
<u>Rhizopus oryzae</u>	17	17	-	-	17	-
<u>Rhizopus stolonifer</u>	-	-	-	17	-	-
<u>Rhodotorula glutinis</u>	-	-	17	-	-	-
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	-	-	-	-	-	17
<u>Scytalidium lignicola</u>	-	-	-	17	-	-
Micelio estéril dematiáceo	-	-	-	17	-	17

TABLA nº 118 .- Explotación de caballos (continuación)

ESPECIES	AIRE	PELO	PIENSO	FORRAJE	TIERRA	
					Mic.T.	Quer.
<u>Absidia corymbifera</u>	x			x		
<u>Alternaria alternata</u>			x	x		
<u>Aspergillus flavus</u>	x		x	x	x	
<u>Aspergillus fumigatus</u>			x	x	x	
<u>Aspergillus tubingensis</u>	x	x				
<u>Fusarium oxysporum</u>	x				x	x
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x		x		x	
<u>Penicillium variable</u>			x		x	
<u>Rhizopus oryzae</u>	x	x			x	

Tabla nº 119.- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación de caballos nº 17.



	TIERRA				
	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC.	TOTAL QUERATINOFILICOS
<u>Acremonium strictum</u>	-	-	27	-	-
<u>Alternaria alternata</u>	27	27	27	27	-
<u>Arthrinium sphaerospermum</u>	-	27	-	-	-
<u>Aspergillus candidus</u>	27	-	-	-	-
<u>Aspergillus chevalieri</u>	-	-	-	27	-
<u>Aureobasidium pullulans</u>	-	-	27	-	-
<u>Candida famata</u>	27	-	-	27	-
<u>Chryso sporium keratinophilum</u>	27	-	-	-	-
<u>Chryso sporium queenslandicum</u>	-	-	-	27	27
<u>Cladosporium herbarum</u>	27	-	27	-	-
<u>Geotrichum candidum</u>	-	-	-	27	-
<u>Paecilomyces variotii</u>	27	-	-	-	-
<u>Penicillium chrysogenum</u>	27	27	-	27	-

TABLA n° 120 .- Distribución de cada una de las especies aisladas en los diversos hábitats estudiados en la explotación de palomas.

TIERRA

	AIRE	PLUMAS	PIENSO	MIC.	TOTAL	QUERATINOFILICOS
<u>Penicillium simplicissimum</u>	-	-	27	-	-	-
<u>Penicillium vellutinum</u>	-	-	-	-	-	27
<u>Penicillium viridicatum</u>	27	27	-	-	27	-
<u>Rhodotorula glutinis</u>	-	-	-	-	27	-
<u>Scopulariopsis brevicaulis</u>	-	-	-	-	-	27
Micelio estéril dematiáceo	27	-	-	-	27	-
Micelio estéril hialino	-	-	-	-	27	-

TABLA n.º 120 .- Explotación de palomas (continuación)

ESPECIES	AIRE	PLUMAS	PIENSO	TIERRA	
				Mic.T.	Querat.
<u>Alternaria alternata</u>	x	x	x	x	
<u>Candida famata</u>	x			x	
<u>Chrysosporium queenslandicum</u>				x	x
<u>Cladosporium herbarum</u>	x		x		
<u>Penicillium chrysogenum</u>	x	x		x	
<u>Penicillium viridicatum</u>	x	x		x	

Tabla nº 121 .- Relación de especies aisladas como mínimo en dos de los hábitats estudiados en la explotación de palomas nº 27.

5.6. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE LAS CEPAS DEL GRUPO ASPERGILLUS FLAVUS

5.6.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO YES

5.6.1.1. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO CLOROFÓRMICO

Realizada la extracción clorofórmica de los cultivos de las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, desarrolladas en el medio YES durante catorce días y posterior cromatografía de los extractos obtenidos, se observó que tan solo diez de las cuarenta y tres cepas estudiadas tenían la capacidad de producir aflatoxinas en el medio de cultivo YES.

De las treinta y siete cepas del grupo Aspergillus flavus aisladas de alimentos : piensos compuestos (36 cepas) y ensilado (1 cepa), tan solo cinco de ellas procedentes de piensos compuestos (4 cepas de Aspergillus flavus Link y una cepa de Aspergillus parasiticus Speare), fueron capaces de producir aflatoxinas.

En la TABLA nº 122 se detalla la concentración de aflatoxinas elaborada por las diez cepas productoras obtenida tras la cuantificación realizada por el método del límite de detección.

	Aflatoxinas producidas ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
<u>A. flavus</u> 2 i	200.0	-	133.3	-
<u>A. flavus</u> 4 x	600.0	-	800.0	-
<u>A. flavus</u> 17 l	200.0	-	-	-
<u>A. parasiticus</u> 81 t	10800.0	200.0	9600.0	800.0
<u>A. flavus</u> 82 n	200.0	-	66.7	-
<u>A. parasiticus</u> NRRL 2999	259200.0	7200.0	172800.0	2400.0
<u>A. parasiticus</u> NRRL 3145	43200.0	1200.0	172800.0	4800.0
<u>A. flavus</u> NRRL 6540	1200.0	-	-	-
<u>A. flavus</u> NRRL 3251	1440.0	1200.0	266.7	-
<u>A. flavus</u> NRRL 6412	200.0	5.5	-	-

TABLA n<sup>o</sup> 122 .- Concentración de aflatoxinas elaborada por las diez cepas productoras en el medio YES, expresada en  $\mu\text{g}/\text{l}$ .



Desarrollo de una cepa de Aspergillus flavus en agar Czapek a los catorce días de cultivo a 28°C





Desarrollo de una cepa de Aspergillus parasiticus en agar Czapek a los catorce días de cultivo a 28°C

## 5.6.1.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO CRUDO Y EL MICELIO

### 5.6.1.2.1. MEDICIÓN DEL pH Y DEL PESO SECO DEL MICELIO

En la TABLA nº 123 se detallan los resultados correspondientes al peso seco del micelio (mg) y el pH final del medio de cultivo, tras el desarrollo de las cepas en estudio en el medio YES durante catorce días.

Se ha realizado el análisis de la varianza ( 355 ) con el fin de comparar las medias obtenidas de pH final y peso seco del micelio (expresado en mg) entre las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, observándose que no existen diferencias significativas ( TABLA nº 124 ).

Con el fin de conocer la relación existente entre el peso seco del micelio y el pH se procedió al cálculo de la recta de regresión ( 355 ).

En las GRAFICAS núms. 8 y 9 se observan las rectas de regresión en el caso de las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas respectivamente.

En la GRAFICA nº 10 se representan los valores de pH, peso seco de micelio y concentración de aflatoxinas producidas



CEPA	pH final	Peso seco (mg)	Aflatoxinas
2 i	8.40	880	+
4 x	8.01	1020	+
17 l	5.17	1410	+
81 t	6.02	1300	+
82 n	7.66	1140	+
2999	5.59	1790	+
3145	5.78	1470	+
6540	5.14	1500	+
3251	4.40	2050	+
6412	5.58	1320	+
6538	4.04	1880	-
6 l	3.87	2150	-
7 k	7.64	990	-
8 i	5.45	1510	-
11 j	5.14	1840	-
14 v	5.62	1470	-
15 s	5.06	1580	-
16 l	4.66	2150	-
17 s	7.43	1300	-
18 r	5.28	2300	-
19 o	4.73	2200	-
20 b	4.49	2260	-

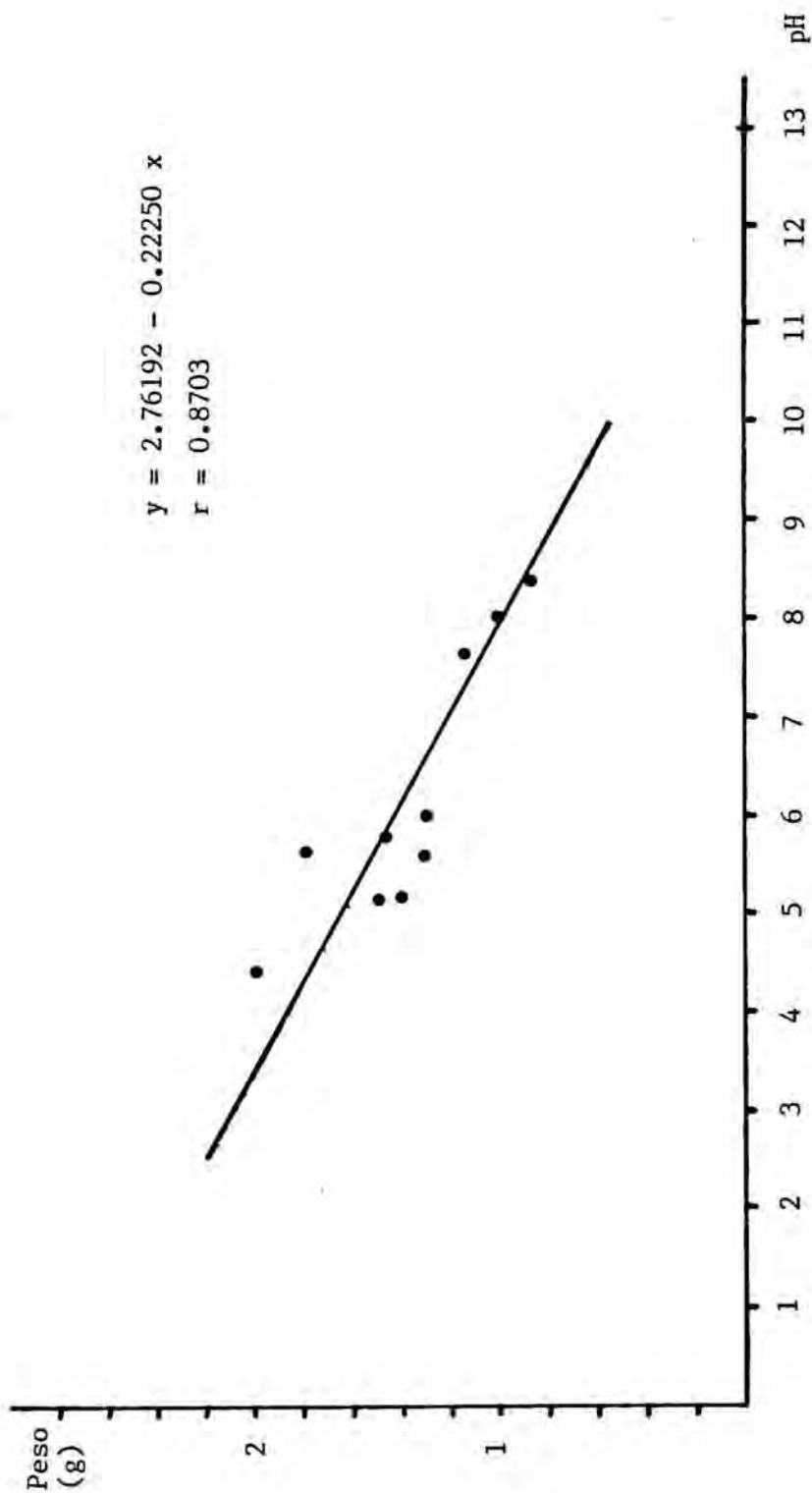
  

CEPA	pH final	Peso seco (mg)	Aflatoxinas
21 r	5.29	1260	-
22 v	5.48	1390	-
23 y	5.03	1010	-
29 z	7.80	1130	-
30 p	7.65	1180	-
31 p	8.01	1440	-
32 k	8.48	940	-
36 k	5.81	1440	-
38 a	5.87	1780	-
48 h	7.59	1250	-
49 k	6.46	1790	-
50 j	7.87	1020	-
51 f	5.21	1380	-
62 e	7.22	1110	-
64 y	3.80	1520	-
65 z	8.18	1060	-
73 r	7.47	1070	-
75 l	8.33	970	-
76 q	6.01	1050	-
77 l	6.88	1090	-
78 c	6.49	1280	-

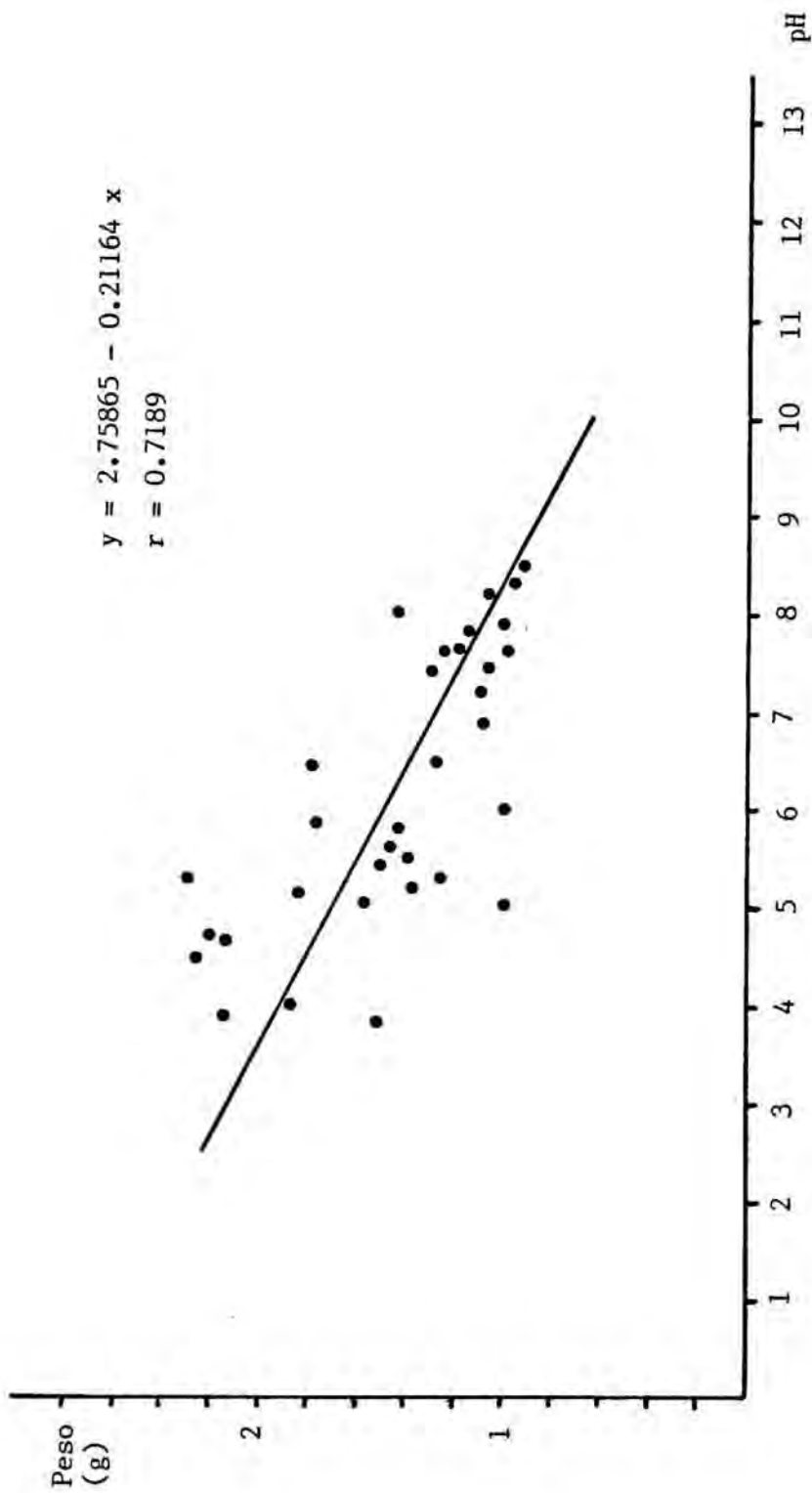
TABLA nº 123 .- Resultados correspondientes al pH final del medio de cultivo y el peso seco del micelio, tras el desarrollo de las cepas en el medio YES durante catorce días.

	pH final	Peso seco
TOTAL	n = 43 $\bar{X} = 6.188$ $\sigma_{n-1} = 1.391$	n = 43 $\bar{X} = 1434$ $\sigma_{n-1} = 0.400$
Cepas productoras de Aflatoxinas	n = 10 $\bar{X} = 6.175$ $\sigma_{n-1} = 1.359$	n = 10 $\bar{X} = 1388$ $\sigma_{n-1} = 0.347$
Cepas no productoras de Aflatoxinas	n = 33 $\bar{X} = 6.192$ $\sigma_{n-1} = 1.421$	n = 33 $\bar{X} = 1448$ $\sigma_{n-1} = 0.418$

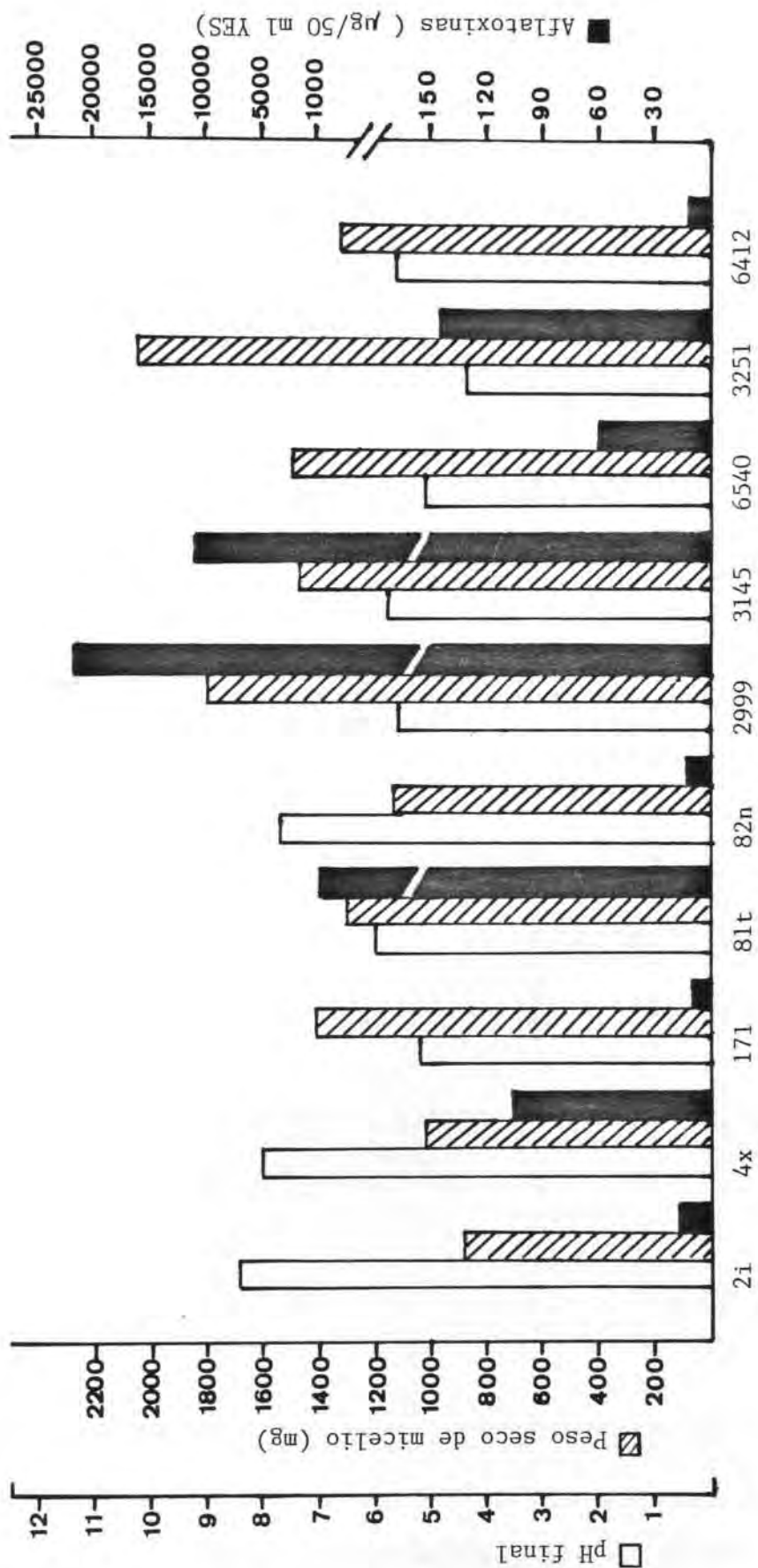
TABLA n° 124 .- Comparación entre los valores medios obtenidos de pH final y peso seco del micelio ( expresado en mg) entre las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas.



GRAFICA nº 8 .-. Correlación existente entre el peso seco del micelio y el pH del medio de cultivo, correspondiente a las cepas productoras de aflatoxinas.



GRAFICA nº 9 .- Correlación existente entre el peso seco del micelio y el pH del medio de cultivo, correspondiente a las cepas no productoras de aflatoxinas.



GRAFICA nº 10 .- Valores de pH, peso seco del micelio y concentración de aflatoxinas producidas por las cepas del grupo *Aspergillus flavus* en el medio YES.

por las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas.

#### 5.6.1.2.2. AFLATOXINAS DETECTADAS EN EL EXTRACTO CRUDO

En la TABLA nº 125 se exponen las aflatoxinas detectadas por cromatografía en capa fina, depositando directamente el extracto crudo procedente del cultivo en medio YES, indicando asimismo aquellas que fueron detectadas tras el proceso de extracción.

CEPA	Aflatoxinas detectadas en el extracto crudo	Aflatoxinas detectadas en el extracto clorofórmico
2 i	-	$B_1 + G_1$
4 x	-	$B_1 + G_1$
17 l	-	$B_1$
81 t	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$
82 n	-	$B_1 + G_1$
2999	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$
3145	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$
6540	$B_1$	$B_1$
3251	$B_1 + B_2$	$B_1 + B_2 + G_1$
6412	$B_1$	$B_1 + B_2$

TABLA nº 125 .- Relación de las aflatoxinas detectadas en el extracto crudo y clorofórmico, procedente de las cepas cultivadas en medio YES.

## 5.6.2. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO APA

En el medio APA las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas se caracterizaron por presentar, en general, poca esporulación y gran cantidad de surcos radiales. El anverso era decolor amarillento en el centro y blanco en los extremos de la colonia. El reverso presentaba color crema o ligeramente anaranjado. En ninguna cepa se observó la formación de esclerocios.

En la TABLA nº 126 se detalla el diámetro de las cuarenta y tres cepas estudiadas, la aparición de fluorescencia y las aflatoxinas detectadas tras el proceso de extracción.

En la TABLA nº 127 se indica el valor de la media y desviación estándar del diámetro de las colonias, así como el porcentaje de cepas que presentan cada uno de los aspectos considerados.

Se ha realizado el análisis de la varianza ( 355 ) con el fin de comparar si existían diferencias entre el diámetro de las colonias que presentaban fluorescencia y las que no la mostraron y se ha comparado asimismo el diámetro de las colonias productoras y no productoras de aflatoxinas en este medio de cultivo, observándose sólo diferencias significativas entre el diámetro de las cepas fluorescentes y no fluorescentes (nivel de confianza entre 90 y 95%).

CEPA	DIAMETRO (mm)	FLUORESCENCIA	AFLATOXINAS DETECTADAS
21 r	49	-	-
22 v	29	-	-
23 y	49	-	-
29 z	52	-	-
30 p	53	-	-
31 p	42	-	-
32 k	52	-	-
36 k	29	-	-
38 a	26	-	-
48 h	51.5	-	-
49 k	43	-	-
50 j	42	-	-
51 f	43	-	-
62 e	57	-	-
64 y	43	-	-
65 z	45	-	-
73 r	33	-	-
75 l	43	-	-
76 q	29	-	-
77 l	32	-	-
78 c	18	-	-

CEPA	DIAMETRO (mm)	FLUORESCENCIA	AFLATOXINAS DETECTADAS
2 i	55	-	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>
4 x	45	-	-
17 l	47	-	-
81 t	43	-	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>
82 n	31	-	-
2999	27	+	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
3145	26	+	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
6540	46	-	-
3251	42	+	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub>
6412	46	-	-
6538	49	-	-
6 l	21	-	-
7 k	61.5	-	-
8 f	49	-	-
11 j	41	-	-
14 v	33.5	-	-
15 s	32	-	-
16 l	54	-	-
17 s	48	-	-
18 r	33	-	-
19 o	47	-	-
20 b	47	-	-

TABLA nº 126 .- Diámetro de las colonias, aparición de fluorescencia y aflatoxinas detectadas tras el proceso de extracción de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio APA.



	Nº CEPAS	%	DIAMETRO	
			$\bar{X}$	$\sigma_{n-1}$
CEPAS FLUORESCENTES	3	6.98	31.67	8.96
CEPAS NO FLUORESCENTES	40	93.02	42.24	10.16
CEPAS PRODUCTORAS	5	11.63	38.60	12.18
CEPAS NO PRODUCTORAS	38	88.37	41.88	10.21
TOTAL	43	100.00	41.50	10.35

TABLA nº127.- Valor de la media y desviación estándar del diámetro de las colonias de las cepas estudiadas.

En la TABLA nº 128 se detalla la concentración de aflatoxinas elaborada por las cepas productoras en el medio APA, calculada siguiendo la técnica del límite de detección.

CEPA	CONCENTRACION DE AFLATOXINA ( $\mu\text{g/Kg}$ )			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
2i	16.06	-	10.71	-
81t	15.13	-	10.08	-
2999	10334.93	287.08	6889.95	191.39
3145	560.46	560.46	373.63	186.82
3251	3523.65	704.73	-	-

TABLA nº 128 .- Concentración de aflatoxinas elaborada por las cepas productoras en medio APA.

### 5.6.3. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO CAM

En el medio CAM, las cepas del grupo Aspergillus flavus, estudiadas se caracterizaron por presentar abundante esporulación. Las colonias eran de color verde-amarillento y extremos blancos. Presentaron abundante formación de surcos radiales.

Las cepas que mostraron fluorescencia presentaron una menor esporulación y los surcos aparecieron en número muy elevado adquiriendo un aspecto cerebriforme. Una de las cepas control Aspergillus flavus NRRL 3251 presentó formación de pequeños esclerocios de color marrón.

El reverso de las colonias era de color crema, a excepción de las cepas fluorescentes que tomaban tonalidades amarillentas.

En la TABLA nº 129 se detalla el diámetro de las cuarenta y tres cepas estudiadas, la aparición de fluorescencia y la producción de aflatoxinas detectadas tras el proceso de extracción.

En la TABLA nº 130 se indica el valor de la media y desviación estándar del diámetro de las colonias, así como el porcentaje de cepas que presentaron cada uno de los aspectos considerados.

CEPA	DIÁMETRO (mm)	FLUORESCENCIA	AFLATOXINAS DETECTADAS
2 i	73.5	-	-
4 x	80	-	-
17 l	72.5	-	B <sub>1</sub>
81 t	58	+	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
82 n	80	-	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>
2999	73	+	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
3145	69	+	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
6540	75	-	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub>
3251	80	+	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub>
6412	72	-	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>
6538	76	-	-
6 l	80	-	-
7 k	65	-	-
8 f	75	-	-
11 j	73	-	-
14 v	80	-	-
15 s	80	-	-
16 l	70	-	-
17 s	77	-	-
18 r	75	-	-
19 o	75	-	-
20 b	75	-	-

CEPA	DIÁMETRO (mm)	FLUORESCENCIA	AFLATOXINAS DETECTADAS
21 r	67	-	-
22 v	80	-	-
23 y	73	-	-
29 z	77	-	-
30 p	76	-	-
31 p	73	-	-
32 k	84	-	-
36 k	78	-	-
38 a	84	-	-
48 h	73	-	-
49 k	70	-	-
50 j	73	-	-
51 f	72	-	-
62 e	78	-	-
64 y	70	-	-
65 z	67	-	-
73 r	73	-	-
75 l	68	-	-
76 q	75	-	-
77 l	82	-	-
78 c	75	-	-

TABLA nº 129 .- Diámetro de las colonias, aparición de fluorescencia y aflatoxinas detectadas tras el proceso de extracción de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio CAM.

	Nº CEPAS %		DIAMETRO	
			$\bar{X}$	$\sigma_{n-1}$
CEPAS FLUORESCENTES	4	9.30	70.00	9.20
CEPAS NO FLUORESCENTES	39	90.70	74.92	4.56
CEPAS PRODUCTORAS	8	18.60	72.44	6.99
CEPAS NO PRODUCTORAS	35	81.40	74.93	4.70
TOTAL	43	100.00	74.46	5.19

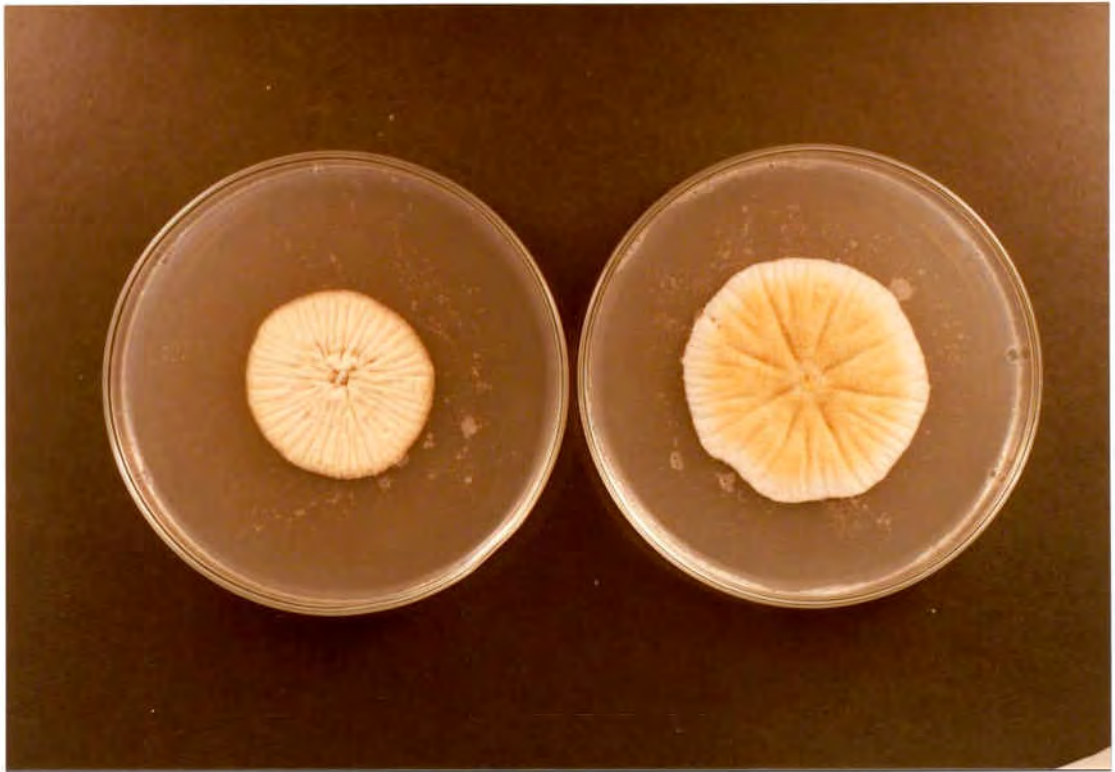
TABLA nº 130 .- Valor de la media y desviación estándar del diámetro de las colonias de las cepas estudiadas.

Se ha realizado el análisis de la varianza (355) con el fin de comparar si existían diferencias significativas entre el diámetro de las colonias que presentaban fluorescencia y el de las que no mostraron esta propiedad y se ha comparado, asimismo el diámetro de las colonias productoras y no productoras de aflatoxinas en este medio de cultivo, observándose sólo diferencias significativas entre el diámetro de las cepas fluorescentes y no fluorescentes (nivel de confianza entre 90 y 95%).

En la TABLA nº 131 se detalla la concentración de aflatoxinas elaborada por las cepas productoras en el medio CAM, calculada siguiendo la técnica del límite de detección.

CEPA	CONCENTRACION DE AFLATOXINA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
17 1	570.52	-	-	-
81t	106569.20	986.75	71046.14	986.75
82n	526.57	-	175.50	-
2999	115542.34	3058.05	73393.11	2038.70
3145	112369.94	9364.16	74913.20	12485.50
6540	3182.71	44.20	19.65	-
3251	57036.67	3168.70	29.34	-
6412	1582.80	14.65	175.87	4.88

TABLA nº 131 .- Concentración de aflatoxinas elaboradas por las cepas productoras en medio CAM.



Cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio APA



Cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio CAM





Detección de fluorescencia tras el desarrollo de cepas aflatoxi-  
génicas del grupo Aspergillus flavus en el medio APA

A= Cepa negativa

B= Cepa positiva



#### 5.6.4. RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRODUCCION DE AFLATOXINAS EN LOS MEDIOS YES, APA Y CAM

Con el fin de estudiar la eficacia de detección de aflatoxinas mediante la fluorescencia así como la capacidad de elaboración de las mismas en los medios APA y CAM, se han comparado los resultados obtenidos en estos dos medios con respecto a los hallados en el medio YES (TABLAS núms 132 y 133).

En la TABLA nº 134 se compara el tipo de aflatoxinas producido por las cepas en cada medio de cultivo.

Para poder evaluar qué medio de cultivo favorece una mayor producción de aflatoxinas, se han resumido en la TABLA nº 135 , los valores relativos a la concentración de aflatoxinas elaboradas por cada cepa en ppm ( $\mu\text{g/ml}$  en el caso del medio YES y  $\mu\text{g/g}$  en los medios APA y CAM) en los tres medios ensayados.

MEDIO APA	MEDIO YES		TOTAL
	Nº DE CEPAS PRODUCTORAS	Nº DE CEPAS NO PRODUCTORAS	
Nº DE CEPAS FLUORESCENTES	3	0	3
Nº DE CEPAS NO FLUORESCENTES	7	33	40
TOTAL	10	33	43
Nº DE CEPAS PRODUCTORAS	5	0	5
Nº DE CEPAS NO PRODUCTORAS	5	33	38
TOTAL	10	33	43

TABLA nº 132 .- Relación entre fluorescencia y producción de aflatoxinas en el medio YES y APA.

MEDIO CAM	MEDIO YES		TOTAL
	Nº DE CEPAS PRODUCTORAS	Nº DE CEPAS NO PRODUCTORAS	
Nº DE CEPAS FLUORESCENTES	4	0	4
Nº DE CEPAS NO FLUORESCENTES	6	33	39
TOTAL	10	33	43
Nº DE CEPAS PRODUCTORAS	8	0	8
Nº DE CEPAS NO PRODUCTORAS	2	33	35
TOTAL	10	33	43

TABLA nº 133.- Relación entre fluorescencia y producción de aflatoxinas en el medio YES y CAM.

	YES	APA	CAM
<u>A. flavus</u> 2 i	$B_1 + G_1$	$B_1 + G_1$	-
<u>A. flavus</u> 4 x	$B_1 + G_1$	-	-
<u>A. flavus</u> 17 l	$B_1$	-	$B_1$
<u>A. parasiticus</u> 81 t	$B_1+B_2+G_1+G_2$	$B_1 + G_1$	$B_1+B_2+G_1+G_2$
<u>A. flavus</u> 82 n	$B_1 + G_1$	-	$B_1 + G_1$
<u>A. parasiticus</u> NRRL 2999	$B_1+B_2+G_1+G_2$	$B_1+B_2+G_1+G_2$	$B_1+B_2+G_1+G_2$
<u>A. parasiticus</u> NRRL 3145	$B_1+B_2+G_1+G_2$	$B_1+B_2+G_1+G_2$	$B_1+B_2+G_1+G_2$
<u>A. flavus</u> NRRL 6540	$B_1$	-	$B_1+B_2+G_1$
<u>A. flavus</u> NRRL 3251	$B_1+B_2+G_1$	$B_1 + B_2$	$B_1+B_2+G_1$
<u>A. flavus</u> NRRL 6412	$B_1+B_2$	-	$B_1+B_2+G_1+G_2$

TABLA nº 134 .- Resumen de los distintos tipos de aflatoxinas elaboradas por las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas en los distintos medios de cultivo.

	YES	APA	CAM
2 i	$B_1 = 0.200$ $G_1 = 0.133$	$B_1 = 0.016$ $G_1 = 0.011$	- -
4 x	$B_1 = 0.600$ $G_1 = 0.800$	- -	- -
17 1	$B_1 = 0.200$	-	$B_1 = 0.570$
81 t	$B_1 = 10.800$ $B_2 = 0.200$ $G_1 = 9.600$ $G_2 = 0.800$	$B_1 = 0.015$ - $G_1 = 0.010$ -	$B_1 = 106.569$ $B_2 = 0.987$ $G_1 = 71.046$ $G_2 = 0.987$
82 n	$B_1 = 0.200$ $G_1 = 0.067$	- -	$B_1 = 0.526$ $G_1 = 0.175$
2999	$B_1 = 259.200$ $B_2 = 7.200$ $G_1 = 172.800$ $G_2 = 2.400$	$B_1 = 10.335$ $B_2 = 0.287$ $G_1 = 6.890$ $G_2 = 0.191$	$B_1 = 115.542$ $B_2 = 3.058$ $G_1 = 73.393$ $G_2 = 2.039$
3145	$B_1 = 43.200$ $B_2 = 1.200$ $G_1 = 172.800$ $G_2 = 4.800$	$B_1 = 0.560$ $B_2 = 0.560$ $G_1 = 0.374$ $G_2 = 0.187$	$B_1 = 112.370$ $B_2 = 9.364$ $G_1 = 74.913$ $G_2 = 12.485$
6540	$B_1 = 1.200$ - -	- - -	$B_1 = 3.183$ $B_2 = 0.044$ $G_1 = 0.020$

TABLA n° 135 .- Concentración de aflatoxinas ( ppm ) elaborada por las cepas del grupo Aspergillus flavus, en los tres medios de cultivo ensayados.

	YES	APA	CAM
3251	$B_1 = 1.440$	$B_1 = 3.524$	$B_1 = 57.037$
	$B_2 = 1.200$	$B_2 = 0.705$	$B_2 = 3.169$
	$G_1 = 0.267$	-	$G_1 = 0.029$
6412	$B_1 = 0.200$	-	$B_1 = 1.583$
	$B_2 = 0.005$	-	$B_2 = 0.015$
	-	-	$G_1 = 0.176$
	-	-	$G_2 = 0.005$

TABLA n° 135.- (continuación)

### 5.6.5. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCION DE AFLATOXINAS POR LA TECNICA DE FILTENBORG

En las TABLAS núms.136 y 137 se detallan las aflatoxinas detectadas en los cultivos realizados en los medios APA y CAM, respectivamente, siguiendo la técnica de Filtenborg. Se indican asimismo aquéllas recuperadas tras el proceso de extracción clorofórmica de los cultivos desarrollados en los medios citados.

En las TABLAS núms.138 y 139 se distribuyen las cepas productoras de aflatoxinas en los medios APA y CAM respectivamente, que fueron detectadas o no mediante la mencionada técnica, atendiendo al límite de detección establecido por Filtenborg (141). y que corresponde a 0,1 ppm.

Con el fin de conocer si los datos obtenidos permiten corroborar este límite de detección, se ha realizado el "test" exacto de Fisher ( 355 ) con los resultados obtenidos conjuntamente en los dos medios de cultivo (TABLA nº 140 ), observándose diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%, en el caso de las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>1</sub>. Dado el bajo número de cepas productoras de G<sub>2</sub> no pudo realizarse para esta aflatoxina el análisis estadístico.

CEPA	AFLATOXINAS DETECTADAS TECNICA FILTENBORG	AFLATOXINAS DETECTADAS PROCESO EXTRACCION
2 i	-	$B_1 + G_1$
81 t	-	$B_1 + G_1$
2999	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$
3145	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$	$B_1 + B_2 + G_1 + G_2$
3251	$B_1 + B_2$	$B_1 + B_2$

TABLA nº 136 .- Aflatoxinas detectadas en los cultivos realizados en el medio APA, siguiendo la técnica de Filtenborg y tras el proceso de extracción clorofórmica.



CEPA	AFLATOXINAS DETECTADAS TECNICA FILTENBORG	AFLATOXINAS DETECTADAS PROCESO EXTRACCION
17 l	-	B <sub>1</sub>
81 t	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>
82 n	-	B <sub>1</sub> + G <sub>1</sub>
2999	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>
3145	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>
6540	-	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub>
3251	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub>
6412	-	B <sub>1</sub> + B <sub>2</sub> + G <sub>1</sub> + G <sub>2</sub>

TABLA nº 137 .- Aflatoxinas detectadas en los cultivos realizados en el medio CAM, siguiendo la técnica descrita por Filtenborg y tras el proceso de extracción clorofórmica.

	< 100 ug/Kg				> 100 ug/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Cepas productoras detectadas	0	0	0	0	3	3	2	2
Cepas productoras no detectadas	2	0	2	0	0	0	0	0
TOTAL	2	0	2	0	3	3	2	2

TABLA nº 138.- Número de cepas productoras de aflatoxinas en el medio APA detectadas por la técnica de Filtenborg.

	<100 ug/Kg				> 100 ug/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Cepas productoras detectadas	0	0	0	0	4	4	3	3
Cepas productoras no detectadas	0	2	2	1	4	0	2	0
TOTAL	0	2	2	1	8	4	5	3

TABLA nº 139 .- Número de cepas productoras de aflatoxinas en el medio CAM detectadas por la técnica de Filtenborg.

	< 100 ug/Kg				> 100 ug/Kg			
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>
Cepas productoras detectadas	0	0	0	0	7	7	5	5
Cepas productoras no detectadas	2	2	4	1	4	0	2	0
TOTAL	2	2	4	1	11	7	7	5

TABLA n<sup>o</sup> 140.- Número de cepas productoras de aflatoxinas en los medios APA y CAM detectadas por la técnica de Filtenborg.

## 5.6.6. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS METODOS BIOLOGICOS PARA DETECTAR LA CAPACIDAD TOXIGENICA

### 5.6.6.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FRENTE A LARVAS DE ARTEMIA SALINA L.

La mortalidad de las larvas de Artemia salina L. observada cuando se pusieron en contacto con el extracto crudo y acetónico obtenido de cultivos en el medio YES y preparados según la técnica descrita en el apartado 4.4.1., se resume en la TABLA nº 141.

En la TABLA nº 142 se indica el grado de mortalidad ocasionado en las larvas al ensayar el extracto acetónico preparado a partir de cultivos en los medios APA y CAM.

El valor relativo a cada cepa fúngica se obtiene al sumar los resultados correspondientes a las lecturas realizadas al cabo de 3,6 y 24 horas, tal como se indica en el apartado 4.4.4.1.

En las TABLAS se indica asimismo si las cepas son o no productoras de aflatoxinas en los medios estudiados, con el fin de poder realizar para cada uno de ellos la comparación entre los resultados obtenidos por las cepas productoras y no pro-

ductoras de aflatoxinas (análisis se la varianza ( 355 )).

En la TABLA nº143 se observa el valor de la media y desviación estándar de la mortalidad obtenida.

En la GRAFICA nº 11 se destaca la comparación entre el valor medio de la mortalidad obtenida por todas las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas en los cuatro extractos ensayados, observándose una diferencia significativa con un nivel de confianza del 99%.

La comparación entre la mortalidad determinada por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en cada medio de cultivo se resume en la GRAFICA nº 12.

CEPA E. CRUDO E. ACETONICO AFLATOXINAS CEPA E. CRUDO E. ACETONICO AFLATOXINAS

2 i	4	18	+	21 r	5	7	-
4 x	6	16	+	22 v	4	9	-
17 l	7	6	+	23 y	7	6	-
81 t	3	4	+	29 z	3	15	-
82 n	3	4	+	30 p	5	18	-
2999	7	7	+	31 p	3	18	-
3145	8	9	+	32 k	3	18	-
6540	7	8	+	36 k	6	15	-
3251	3	10	+	38 a	10	16	-
6412	7	7	+	48 h	12	18	-
6538	6	4	-	49 k	8	14	-
6 l	18	18	-	50 j	3	15	-
7 k	5	12	-	51 f	10	14	-
8 f	6	14	-	62 e	4	17	-
11 j	8	-17	-	64 y	11	10	-
14 v	8	10	-	65 z	6	4	-
15 s	11	14	-	73 r	6	10	-
16 l	14	16	-	75 l	3	11	-
17 s	4	8	-	76 q	3	9	-
18 r	14	18	-	77 l	8	7	-
19 o	10	7	-	78 c	6	8	-
20 b	13	6	-				

TABLA nº 141 .- Valores de mortalidad de las larvas de Artemia salina L. producida por los extractos crudo y acetónico obtenidos a partir de cultivos en medio YES.

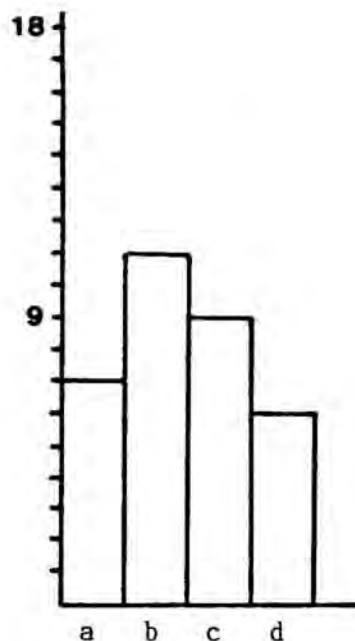
CEPA	APA	AFLA.	CAM	AFLA.	CEPA	APA	AFLA.	CAM	AFLA.
2 i	3	+	3	-	21 r	8	-	8	-
4 x	12	-	2	-	22 v	10	-	7	-
17 l	6	-	5	+	23 y	4	-	4	-
81 t	9	+	5	+	29 z	3	-	5	-
82 n	2	-	3	+	30 p	8	-	5	-
2999	13	+	5	+	31 p	9	-	3	-
3145	13	+	9	+	32 k	9	-	4	-
6540	10	-	9	+	36 k	6	-	3	-
3251	17	+	12	+	38 a	7	-	3	-
6412	14	-	9	+	48 h	11	-	3	-
6538	3	-	6	-	49 k	7	-	8	-
6 l	15	-	12	-	50 j	6	-	7	-
7 k	9	-	7	-	51 f	3	-	5	-
8 f	8	-	6	-	62 e	4	-	1	-
11 j	9	-	9	-	64 y	5	-	4	-
14 v	10	-	5	-	65 z	4	-	3	-
15 s	12	-	2	-	73 r	7	-	3	-
16 l	12	-	12	-	75 l	12	-	2	-
17 s	10	-	5	-	76 q	12	-	4	-
18 r	7	-	12	-	77 l	12	-	1	-
19 o	14	-	12	-	78 c	5	-	4	-
20 b	18	-	9	-					

TABLA nº 142 .- Valores de mortalidad de las larvas de Artemia salina L., producida por los extractos acetónicos obtenidos a partir de cultivos en APA y CAM.

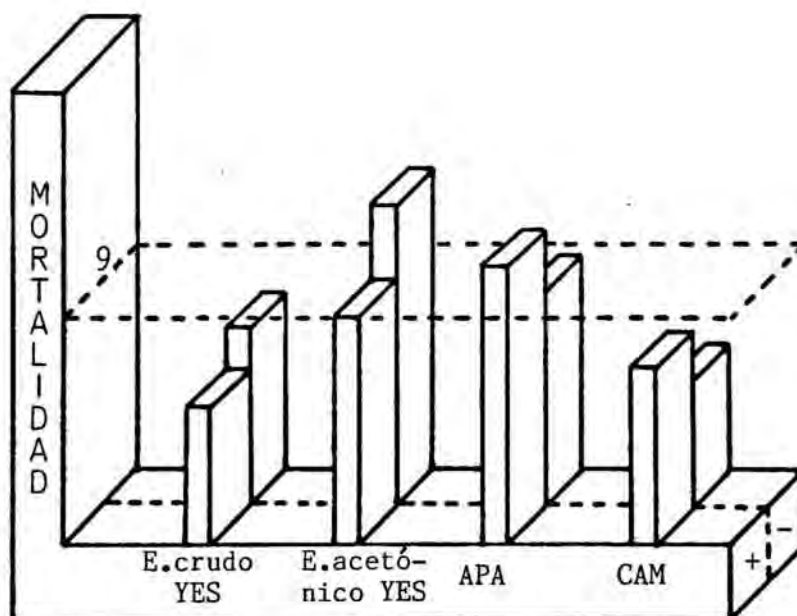
	YES E. CRUDO	YES E. ACETON.	APA E. ACETON.	CAM E. ACETON.
CEPAS PRODUCTORAS	n = 10 $\bar{X} = 5.50$ $\sigma_{n-1} = 2.01$	n = 10 $\bar{X} = 8.90$ $\sigma_{n-1} = 4.70$	n = 5 $\bar{X} = 11.00$ $\sigma_{n-1} = 5.29$	n = 8 $\bar{X} = 7.12$ $\sigma_{n-1} = 3.04$
CEPAS NO PRODUCTORAS	n = 33 $\bar{X} = 7.36$ $\sigma_{n-1} = 3.87$	n = 33 $\bar{X} = 12.21$ $\sigma_{n-1} = 4.60$	n = 38 $\bar{X} = 8.50$ $\sigma_{n-1} = 3.78$	n = 35 $\bar{X} = 5.40$ $\sigma_{n-1} = 3.19$
TOTAL	n = 43 $\bar{X} = 6.93$ $\sigma_{n-1} = 3.59$	n = 43 $\bar{X} = 11.44$ $\sigma_{n-1} = 4.78$	n = 43 $\bar{X} = 8.79$ $\sigma_{n-1} = 3.99$	n = 43 $\bar{X} = 5.72$ $\sigma_{n-1} = 3.20$

TABLA n° 143 .- Valor de la media y desviación estándar de la mortalidad observada en las larvas de Artemia salina L.





GRAFICA nº 11 .- Comparación del valor medio de la mortalidad obtenida por todas las cepas estudiadas. a= extracto crudo YES, b= ext. acetónico YES, c= ext. acetónico APA, d= ext. acetónico CAM.



GRAFICA nº 12 .- Comparación entre la mortalidad obtenida por las cepas productoras de aflatoxinas (+) y no productoras (-) en los cuatro extractos ensayados. ● Diferencias significativas, nivel de confianza entre 90 y 95%.

## 5.6.6.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A MICROORGANISMOS

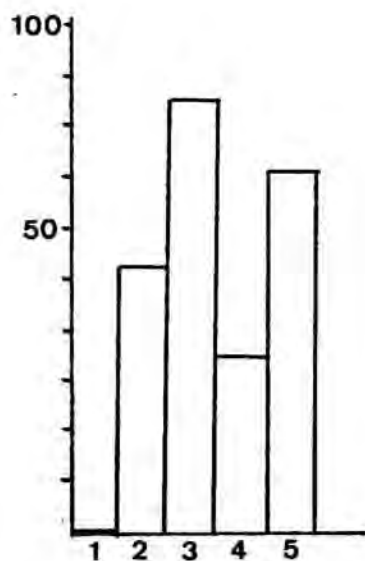
### 5.6.6.2.1. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE WICKERHAM

En la TABLA nº 144 se muestra el número y porcentaje de cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas activas sobre cada uno de los cinco microorganismos ensayados.

En la GRAFICA nº 13 se representa el porcentaje de cepas activas frente a cada uno de los microorganismos ensayados.

Microorganismo ensayado	Nº cepas activas	% cepas activas
<u>Escherichia coli</u>	-	-
<u>Staphylococcus aureus</u>	23	53.49
<u>Bacillus subtilis</u>	37	86.05
<u>Bacillus megaterium</u>	15	34.88
<u>Candida albicans</u>	31	72.09

TABLA nº 144 .- Número y porcentaje de cepas activas sobre los microorganismos ensayados.



GRAFICA nº 13 .- Porcentaje de cepas activas frente a los microorganismos estudiados (1 = E. coli, 2 = S. aureus, 3 = B. subtilis, 4 = B. megaterium, 5 = C. albicans).

## 5.6.6.2.2. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE CAMPBELL

### Resultados obtenidos a partir de cultivos en medio APA

En la TABLA nº 145 se detallan los resultados correspondientes a la inhibición de crecimiento de los microorganismos ensayados, producida por todas las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas y la comparación de los resultados obtenidos por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, tras su desarrollo en el medio APA.

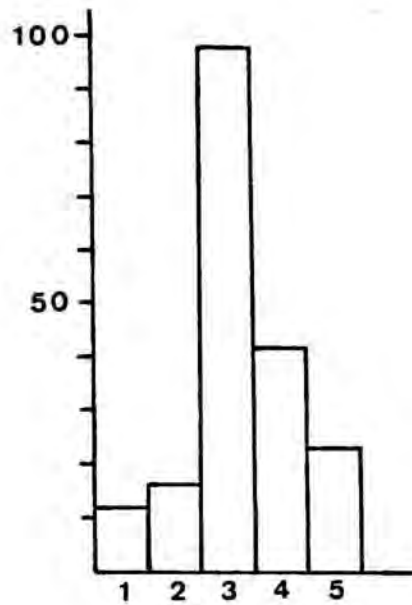
La comparación estadística se ha realizado mediante el "test" exacto de Fisher (355)=

En la GRAFICA nº 14 se observa el porcentaje de todas las cepas activas frente a cada uno de los microorganismos ensayados.

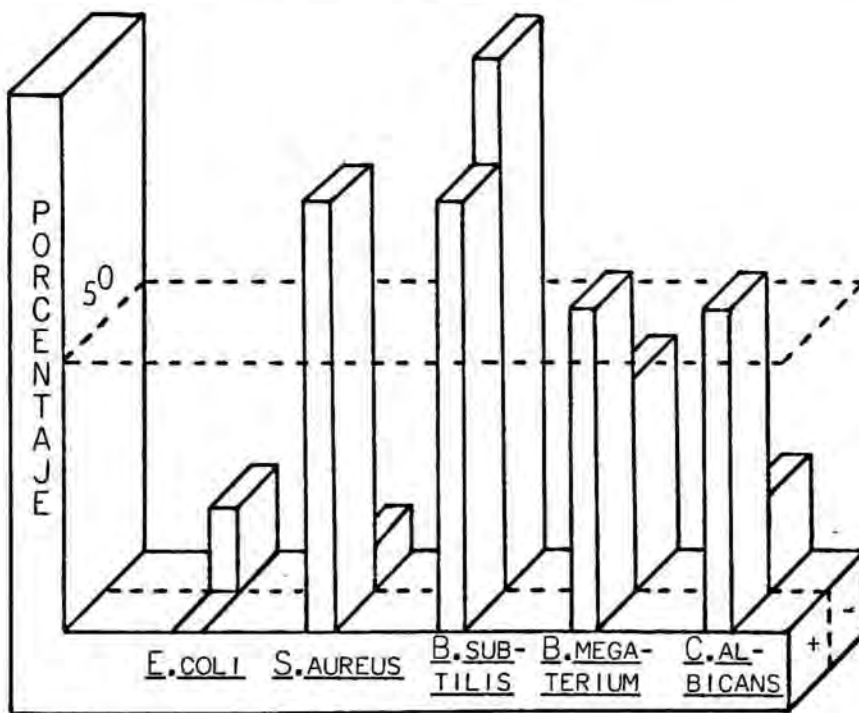
En la GRAFICA nº 15 se resume la comparación entre los porcentajes de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en el medio APA, activas sobre los microorganismos investigados.

MICROORGANISMO	Nº CEPAS ACTIVAS		% CEPAS ACTIVAS		Nº CEPAS ACTIVAS	TOTAL	
	AFLA +	AFLA -	AFLA +	AFLA -		% CEPAS ACTIVAS	% CEPAS ACTIVAS
<u>Escherichia coli</u>	-	6	-	15.79	5		11.63
<u>Staphylococcus aureus</u>	4	3	80	**	7		16.28
<u>Bacillus subtilis</u>	4	38	80	100.00	42		97.67
<u>Bacillus megaterium</u>	3	15	60	39.47	18		41.86
<u>Candida albicans</u>	3	7	60	●	10		23.25
Nº TOTAL CEPAS ENSAYADAS	5	38					

TABLA nº 145 .- Capacidad inhibidora de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio APA. \* \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 99 %. ● Diferencias significativas, nivel de confianza entre el 90 y el 95%.



GRAFICA n° 14 .- Porcentaje de cepas activas frente a los microorganismos estudiados (1 = E. coli, 2 = S. aureus, 3 = B. subtilis, 4 = B. megaterium, 5 = C. albicans).



GRAFICA n° 15 .- Comparación entre los porcentajes de cepas productoras (+) y no productoras (-) en el medio APA, activas sobre los microorganismos investigados.--Diferencias significativas, nivel de confianza: \*\* 99% y ● entre el 90 y el 95%.

En la TABLA N° 146 se observa el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos ensayados, producido por las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas y desarrolladas en el medio APA, siguiendo la técnica de Campbell.

Para una mejor interpretación de la TABLA debe tenerse en cuenta:

Grado de inhibición:

0 = 0 mm de halo de inhibición

1 = Disminución de crecimiento, pero no se observa halo definido

2 = Halo de inhibición de hasta 10 mm

3 = Halo de inhibición >10 a 15 mm

4 = Halo de inhibición >15 mm

Con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en el grado de inhibición producido por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas se ha realizado el "test" T (355).

MICROORGANISMO	AFLA +					AFLA -					
	GRADO DE INHIBICION					GRADO DE INHIBICION					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	
<u>Escherichia coli</u>	5	0	0	0	0	*	32	0	6	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	1	0	1	2	1	*	35	0	0	3	0
<u>Bacillus subtilis</u>	1	0	0	3	1		0	0	2	27	9
<u>Bacillus megaterium</u>	2	1	2	0	0		23	2	13	0	0
<u>Candida albicans</u>	2	3	0	0	0	*	31	7	0	0	0

TABLA nº 146 .-- Grado de inhibición de las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en el medio APA. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.



### Resultados obtenidos a partir de cultivos en medio CAM

En la TABLA nº 147 se detallan los resultados correspondientes a la inhibición de crecimiento de los microorganismos ensayados, producida por todas las cepas del grupo Aspergillus flavus, estudiadas y la comparación de los resultados obtenidos por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas tras su desarrollo en el medio CAM.

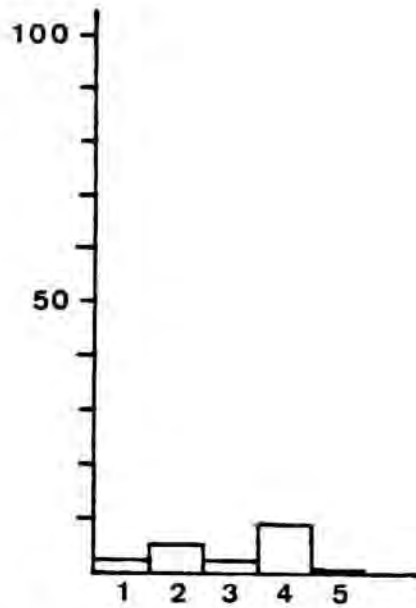
La comparación estadística se ha realizado mediante el "test" exacto de Fisher ( 355 ).

En la GRAFICA nº 16 se observa el porcentaje de todas las cepas activas frente a cada uno de los microorganismos ensayados.

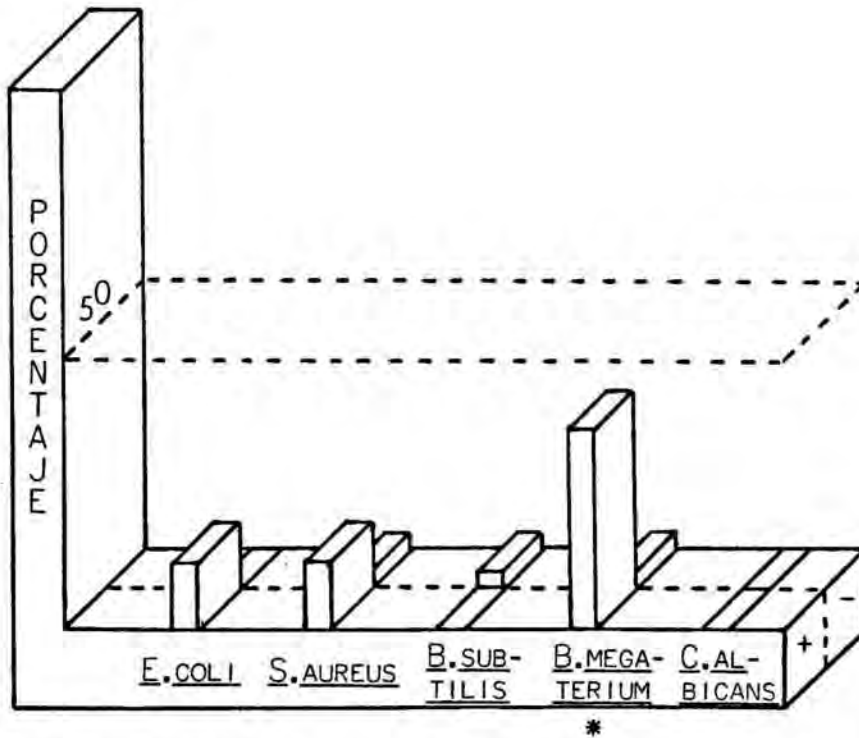
En la GRAFICA nº 17 se resume la comparación entre los porcentajes de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en el medio CAM, activas sobre los microorganismos investigados.

MICROORGANISMO	Nº CEPAS ACTIVAS		% CEPAS ACTIVAS		TOTAL	
	AFLA +	AFLA -	AFLA +	AFLA -	Nº CEPAS ACTIVAS	% CEPAS ACTIVAS
<u>Escherichia coli</u>	1	0	12.50	-	1	2.32
<u>Staphylococcus aureus</u>	1	1	12.50	2.86	2	4.65
<u>Bacillus subtilis</u>	-	1	-	2.86	1	2.32
<u>Bacillus megaterium</u>	3	1	37.50	* 2.86	4	9.30
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-	-	-
Nº TOTAL CEPAS ENSAYADAS	8	35				

TABLA nº 147.- Capacidad inhibidora de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio CAM. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.



GRAFICA n° 16 .- Porcentaje de cepas activas frente a los microorganismos estudiados (1 = E. coli, 2 = S. aureus, 3 = B. subtilis, 4 = B. megaterium, 5 = C. albicans).



GRAFICA n° 17 .- Comparación entre el porcentaje de cepas productoras (+) y no productoras (-) en el medio CAM, activas sobre los microorganismos investigados. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.

En la TABLA nº 148 se observa el grado de inhibición del crecimiento de los microorganismos ensayados, producido por las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, desarrolladas en el medio CAM y siguiendo la técnica de Campbell.

Para una mejor interpretación de la TABLA debe tenerse en cuenta:

Grado de inhibición:

0 = 0 mm de halo de inhibición

1 = Disminución de crecimiento, pero no se observa un halo definido

2 = Halo de inhibición de hasta 10 mm

3 = Halo de inhibición >10 a 15 mm

4 = Halo de inhibición >15 mm

Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en el grado de inhibición producido por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas se ha realizado el "test" T (355).

MICROORGANISMO	AFLA +					AFLA -				
	GRADO DE INHIBICION					GRADO DE INHIBICION				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	7	1	0	0	0	35	0	0	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	7	1	0	0	0	34	1	0	0	0
<u>Bacillus subtilis</u>	8	0	0	0	0	34	0	0	1	0
<u>Bacillus megaterium</u>	5	0	1	2	0	34	1	0	0	0
<u>Candida albicans</u>	8	0	0	0	0	35	0	0	0	0

TABLA n° 148 .- Grado de inhibición de las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en el medio CAM. ●Diferencias significativas, nivel de confianza entre 90 y 95%.

Comparación de los resultados obtenidos a partir de cultivos  
en los medios de APA y CAM

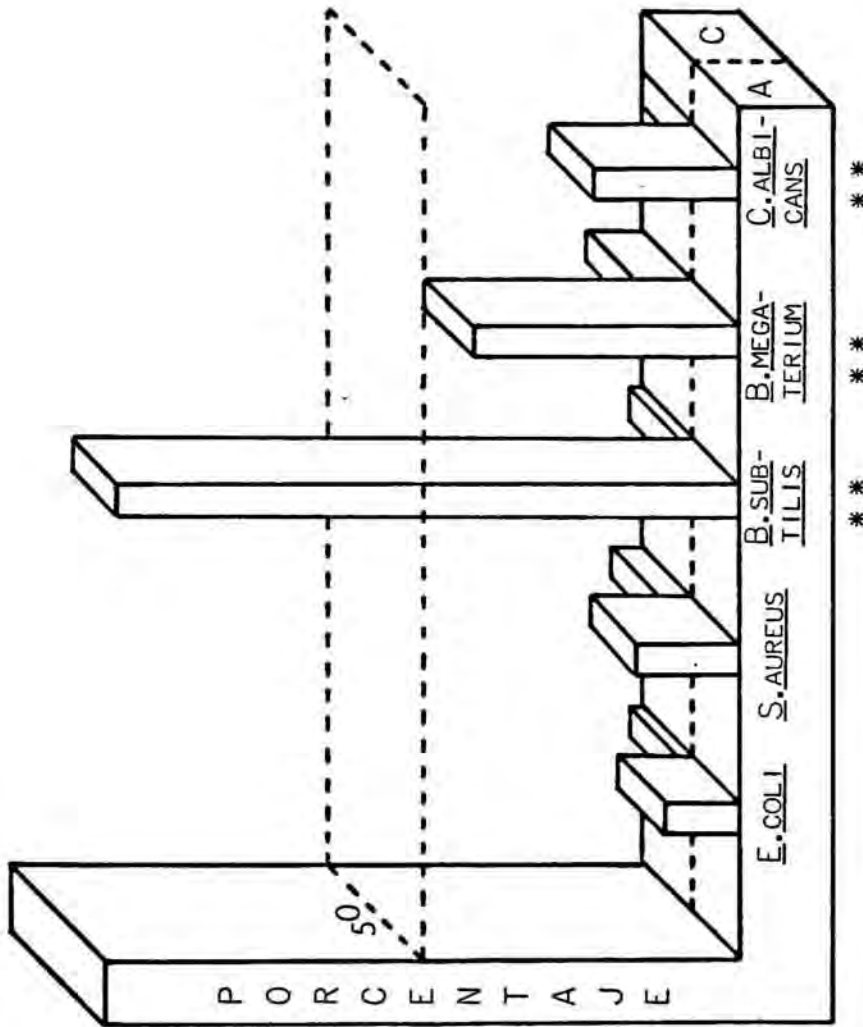
En la TABLA nº 149 se observa la comparación entre el porcentaje de cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio APA y en el medio CAM que inhiben el desarrollo de los microorganismos ensayados. Dicha comparación se ha realizado con todas las cepas estudiadas y con las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas en los dos medios de cultivo.

El estudio estadístico se ha llevado a cabo mediante el "test" del  $\chi^2$  y en los casos en que fue necesario mediante el "test" exacto de Fisher ( 355 ).

En las GRAFICAS núms. 18 y 19 se observa la comparación entre el porcentaje de cepas activas desarrolladas en el medio APA y CAM, considerando todas las cepas estudiadas (GRAFICA nº 18 ), las cepas productoras de aflatoxinas en cada uno de los medios (GRAFICA nº 19 a ) y las cepas no productoras de aflatoxinas (GRAFICA nº 19 b ).

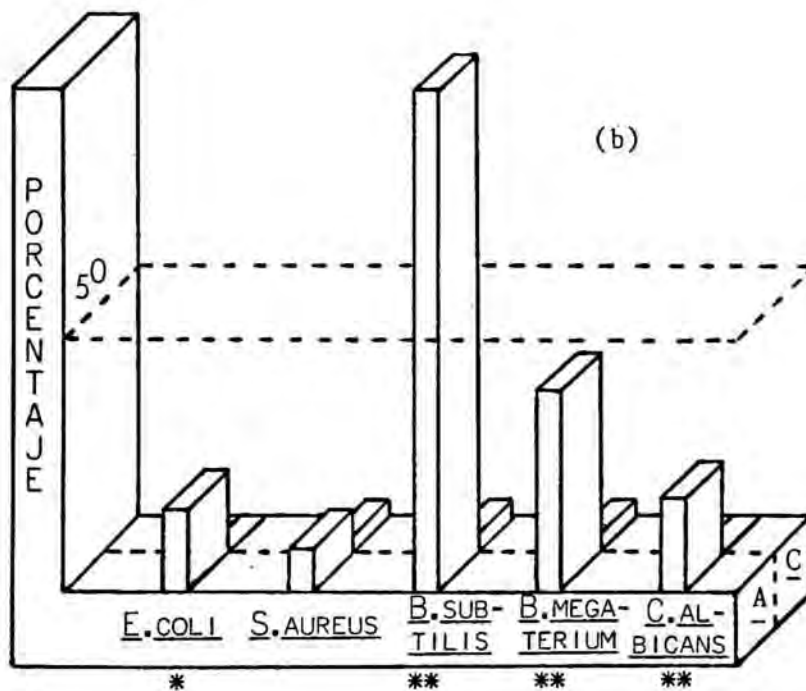
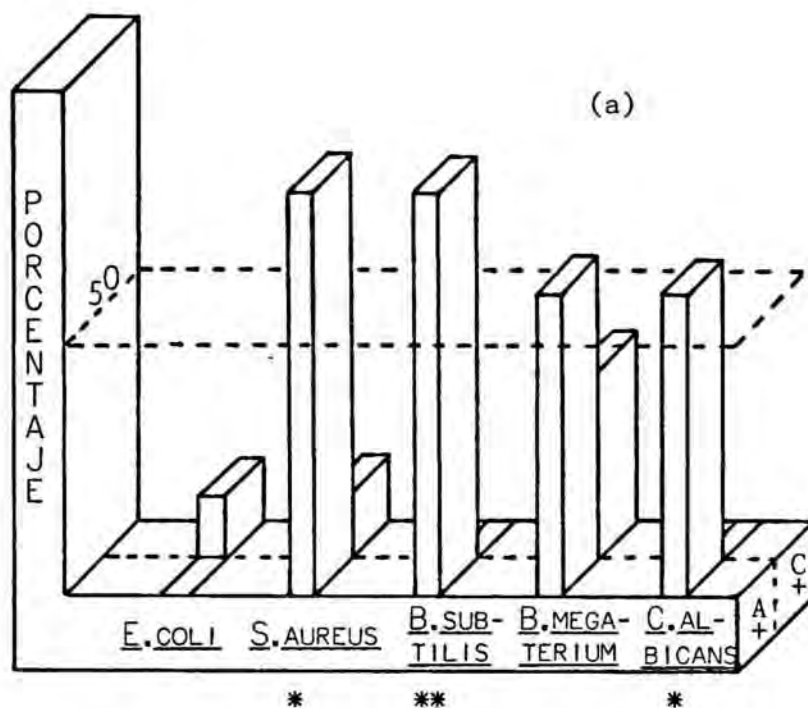
MICROORGANISMO	% CEPAS ACTIVAS AFLA +		% CEPAS ACTIVAS AFLA -		% TOTAL CEPAS ACTIVAS	
	APA	CAM	APA	CAM	APA	CAM
<u>Escherichia coli</u>	-	12.5	15.79 *	-	11.63	2.32
<u>Staphylococcus aureus</u>	80 *	12.5	7.89	2.86	16.28	4.65
<u>Bacillus subtilis</u>	80 **	-	100.00 **	2.86	97.67 **	2.32
<u>Bacillus megaterium</u>	60	37.5	39.47 **	2.86	41.86 **	9.30
<u>Candida albicans</u>	60 *	-	18.42 **	-	23.25 **	-

TABLA nº 149 .- Estudio comparativo de la capacidad inhibidora de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en los medios de APA y CAM. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%. \*\* Diferencias significativas, nivel de confianza del 99%.



GRAFICA nº 18 .- Comparación entre el porcentaje de cepas desarrolladas en los medios APA (A) y CAM (C), activas frente a los microorganismos ensayados.  
 \*\* Diferencias significativas, nivel de confianza del 99%.





GRAFICA nº 19 .- Comparación entre el porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas (a) y no productoras (b) en los medios APA (A) y CAM (C). Diferencias significativas, nivel de confianza: \* 95% \*\* 99%.

En las TABLAS núms. 150 y 151 se observa el grado de inhibición del desarrollo de los microorganismos ensayados, producido por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, respectivamente al desarrollarse en los medios APA y CAM, siguiendo la técnica de Campbell.

Para una mejor interpretación de las TABLAS, debe tenerse en cuenta:

Grado de inhibición:

0 = 0 mm de halo de inhibición

1 = Disminución del crecimiento, pero no se observa un halo definido

2 = Halo de inhibición de hasta 10 mm

3 = Halo de inhibición >10 a 15 mm

4 = Halo de inhibición >15 mm

Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en el grado de inhibición producido al desarrollarse las cepas en APA o en CAM se ha realizado el "test" T (355).

MICROORGANISMO	MEDIO APA				MEDIO CAM					
	GRADO DE INHIBICION				GRADO DE INHIBICION					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	5	0	0	0	0	7	1	0	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	1	0	1	2	1	*	7	1	0	0
<u>Bacillus subtilis</u>	1	0	0	3	1	*	8	0	0	0
<u>Bacillus megaterium</u>	2	1	2	0	0	5	0	1	2	0
<u>Candida albicans</u>	2	3	0	0	0	●	8	0	0	0

TABLA n° 150 .- Grado de inhibición de las cepas productoras de aflatoxinas en los medios APA y CAM. Diferencias significativas : \* nivel de confianza del 95% ; ● nivel de confianza entre 90 y 95%.

MICROORGANISMO	MEDIO APA					MEDIO CAM				
	GRADO DE INHIBICIÓN					GRADO DE INHIBICIÓN				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	32	0	6	0	0	**	35	0	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	35	0	0	3	0		34	1	0	0
<u>Bacillus subtilis</u>	0	0	2	27	9	**	34	0	0	1
<u>Bacillus megaterium</u>	23	2	13	0	0	**	34	1	0	0
<u>Candida albicans</u>	31	7	0	0	0	**	35	0	0	0

TABLA nº 151 .- Grado de inhibición de las cepas no productoras de aflatoxinas en los medios APA y CAM. \*\* Diferencias significativas, nivel de confianza del 99%.

### 5.6.6.2.3. RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE LOS DISCOS

#### Resultados obtenidos a partir de los extractos crudos procedentes de los cultivos en medio YES

En la TABLA nº 152 se detallan los resultados correspondientes a la inhibición del crecimiento de los microorganismos ensayados, producida por todas las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas y la comparación de los resultados obtenidos por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas cuando se impregnaron los discos con el extracto crudo procedente de los cultivos en medio YES.

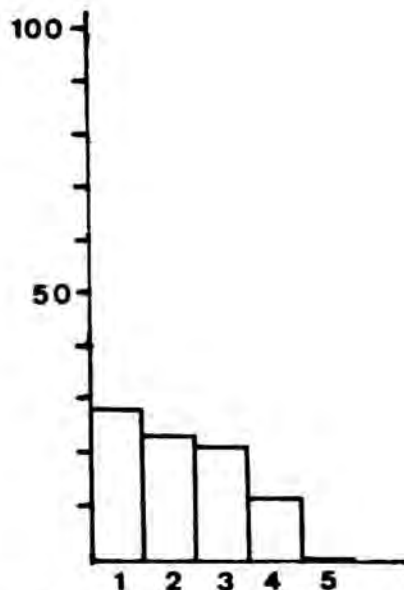
La comparación estadística se ha realizado mediante el "test" del  $\chi^2$  (355).

En la GRAFICA nº 20 se representa el porcentaje de todas las cepas activas frente a los cinco microorganismos ensayados.

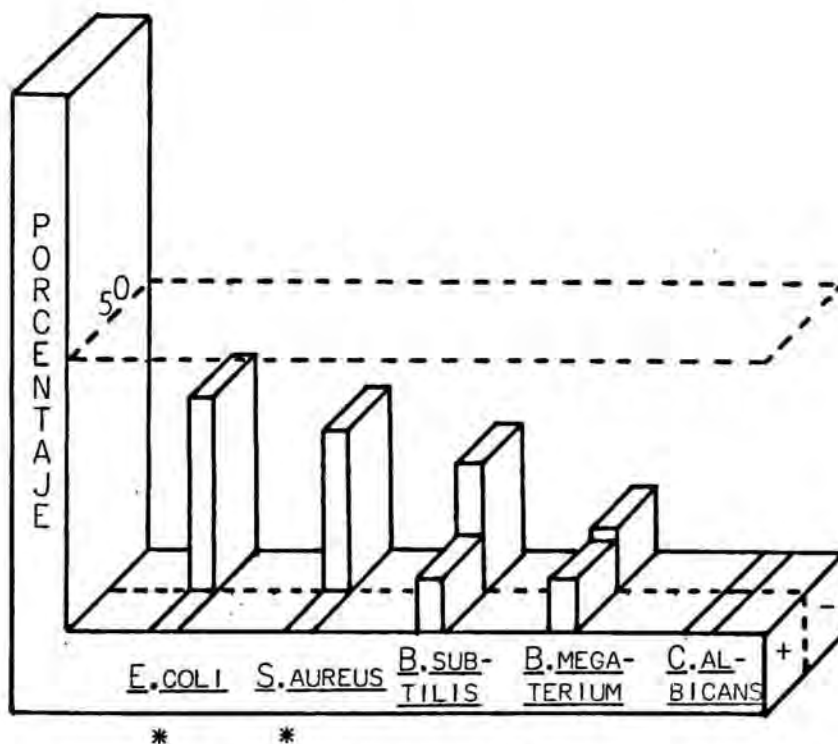
En la GRAFICA nº 21 se observa la comparación entre los porcentajes de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, activas frente a cada uno de los microorganismos ensayados.

MICROORGANISMO	Nº CEPAS ACTIVAS		% CEPAS ACTIVAS		TOTAL	
	AFLA +	AFLA -	AFLA +	AFLA -	Nº CEPAS ACTIVAS	% CEPAS ACTIVAS
<u>Escherichia coli</u>	-	12	-	36.36	12	27.91
<u>Staphylococcus aureus</u>	-	10	-	30.30	10	23.25
<u>Bacillus subtilis</u>	1	8	10	24.24	9	20.93
<u>Bacillus megaterium</u>	1	4	10	12.12	5	11.63
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-	-	-
Nº TOTAL CEPAS ENSAYADAS	10	33				

TABLA nº 152 .- Capacidad inhibidora del extracto crudo obtenido a partir de las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, al desarrollarse en el medio YES. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.



GRAFICA n° 20 .- Porcentaje de extractos crudos activos frente a los microorganismos ensayados (1= E. coli , 2= S. aureus, 3= B. subtilis, 4= B. megaterium, 5= C. albicans).



GRAFICA n° 21 .- Comparación entre el porcentaje de extractos crudos procedentes de cepas productoras (+) y no productoras (-) en el medio YES, activos sobre los microorganismos investigados. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.

En la TABLA nº 153 se observa el grado de inhibición del desarrollo de los microorganismos ensayados, producido por el extracto crudo de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio YES, siguiendo la técnica de los discos.

Para una mejor interpretación de la TABLA, debe tenerse en cuenta:

Grado de inhibición:

0 = 0 mm de halo de inhibición

1 = Disminución del crecimiento, pero no se observa un halo definido

2 = Halo de inhibición de hasta 10 mm

3 = Halo de inhibición de > 10 a 15 mm

4 = Halo de inhibición > 15 mm

Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en el grado de inhibición producido por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas se ha realizado el "test" T (355).



MICROORGANISMO	AFLA +					AFLA -				
	GRADO DE INHIBICION					GRADO DE INHIBICION				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	10	0	0	0	0	**	21	1	7	1
<u>Staphylococcus aureus</u>	10	0	0	0	0	**	23	2	6	0
<u>Bacillus subtilis</u>	9	0	1	0	0		25	3	3	1
<u>Bacillus megaterium</u>	9	0	1	0	0		29	3	0	1
<u>Candida albicans</u>	10	0	0	0	0		33	0	0	0

TABLA nº 153 .- Grado de inhibición de los extractos crudos obtenidos al cultivar las cepas del grupo Aspergillus flavus en el medio YES.

\*\* Diferencias significativas, nivel de confianza del 99%.

Resultados obtenidos a partir de los extractos clorofórmicos  
procedentes de los cultivos en el medio YES

En la TABLA nº 154 se detallan los resultados correspondientes a la inhibición de crecimiento de los microorganismos ensayados, producida por todas las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas y la comparación entre las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, cuando se impregnaron los discos de papel de filtro con el extracto clorofórmico obtenido a partir de los cultivos en el medio YES.

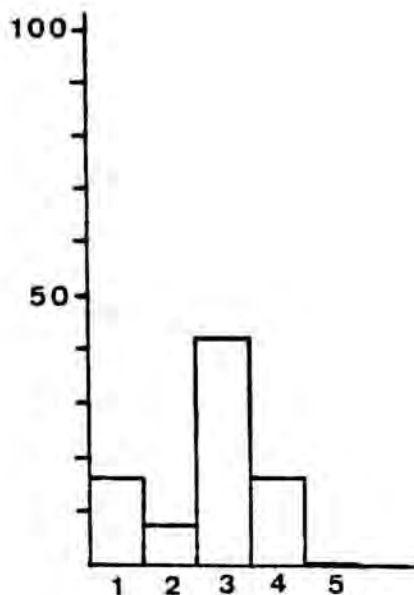
La comparación estadística se ha realizado mediante el "test" del  $\chi^2$  (355).

En la GRAFICA nº 22 se representa el porcentaje de todas las cepas activas frente a los cinco microorganismos ensayados.

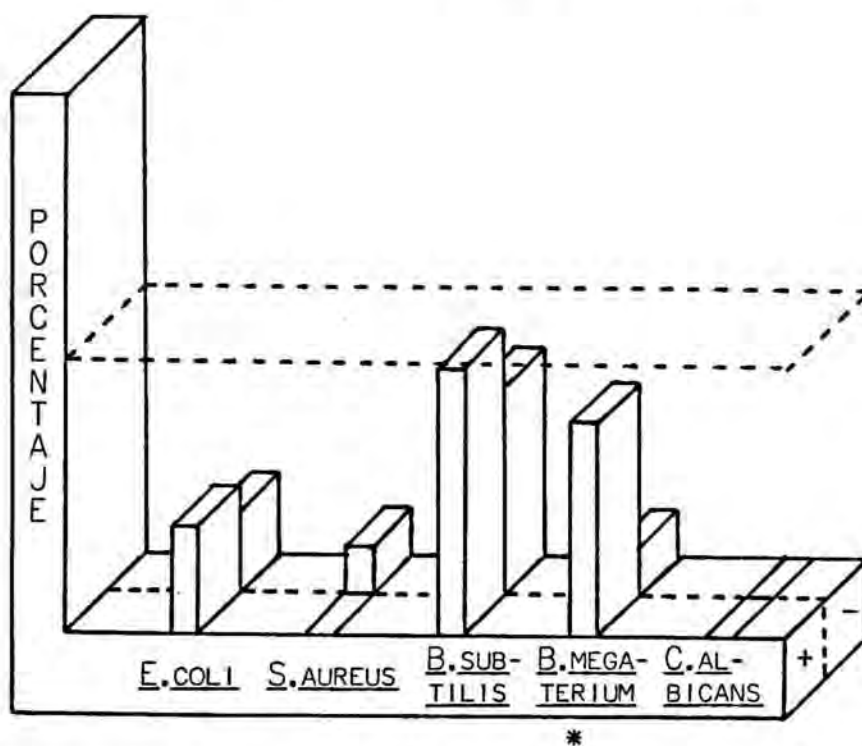
En la GRAFICA nº 23 se observa la comparación entre los porcentajes de cepas productoras y no productoras de aflatoxinas, activas frente a cada uno de los microorganismos ensayados.

MICROORGANISMO	Nº CEPAS ACTIVAS		% CEPAS ACTIVAS		TOTAL	
	AFLA +	AFLA -	AFLA +	AFLA -	Nº CEPAS ACTIVAS	% CEPAS ACTIVAS
<u>Escherichia coli</u>	2	5	20	15.15	7	16.28
<u>Staphylococcus aureus</u>	-	3	-	9.09	3	6.98
<u>Bacillus subtilis</u>	5	13	50	39.39	18	41.86
<u>Bacillus megaterium</u>	4	3	40	* 9.09	7	16.28
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-	-	-
Nº TOTAL CEPAS ENSAYADAS	10	33				

TABLA nº 154 .- Capacidad inhibidora del extracto clorofórmico obtenido a partir de las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, al desarrollarse en el medio YES. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.



GRAFICA n<sup>o</sup> 22 .- Porcentaje de extractos clorofórmicos activos frente a los microorganismos ensayados (1= E. coli , 2= S. aureus, 3= B. subtilis, 4= B. megaterium, 5= C. albicans).



GRAFICA n<sup>o</sup> 23 .- Comparación entre el porcentaje de extractos clorofórmicos procedente de cepas productoras (+) y no productoras (-) en el medio YES activas sobre los microorganismos ensayados.  
\* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.

En la TABLA nº 155 se observa el grado de inhibición del desarrollo de los microorganismos ensayados, producidos por el extracto clorofórmico de las cepas del grupo Aspergillus flavus desarrolladas en el medio YES, siguiendo la técnica de los discos.

Para una mejor interpretación de la TABLA, debe tenerse en cuenta:

Grado de inhibición:

0 = 0 mm de halo de inhibición

1 = Disminución del crecimiento, pero no se observa un halo definido

2 = Halo de inhibición de hasta 10 mm

3 = Halo de inhibición de >10 a 15 mm

4 = Halo de inhibición >15mm

Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en el grado de inhibición producido por las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas se ha realizado el "test" T.(355).

MICROORGANISMO	AFLA +				AFLA -					
	GRADO DE INHIBICION				GRADO DE INHIBICION					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	8	0	2	0	0	28	5	0	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	10	0	0	0	0	• 30	0	2	1	0
<u>Bacillus subtilis</u>	5	1	4	0	0	20	1	11	0	1
<u>Bacillus megaterium</u>	6	2	1	0	1	30	0	3	0	0
<u>Candida albicans</u>	10	0	0	0	0	33	0	0	0	0

TABLA nº 155 .- Grado de inhibición de los extractos clorofórmicos de las cepas del grupo Aspergillus flavus cultivadas en el medio YES.

• Diferencias significativas, nivel de confianza entre 90 y 95%.

Comparación de los resultados obtenidos con el extracto  
crudo y clorofórmico de los cultivos desarrollados en el  
medio YES

En la TABLA nº156 se observa la comparación entre el porcentaje de cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, activas frente al desarrollo de los microorganismos ensayados, utilizando discos impregnados con extracto crudo o con extracto clorofórmico procedente de cultivos en medio YES. Dicha comparación se ha realizado con todas las cepas estudiadas y con las cepas productoras y no productoras de aflatoxinas.

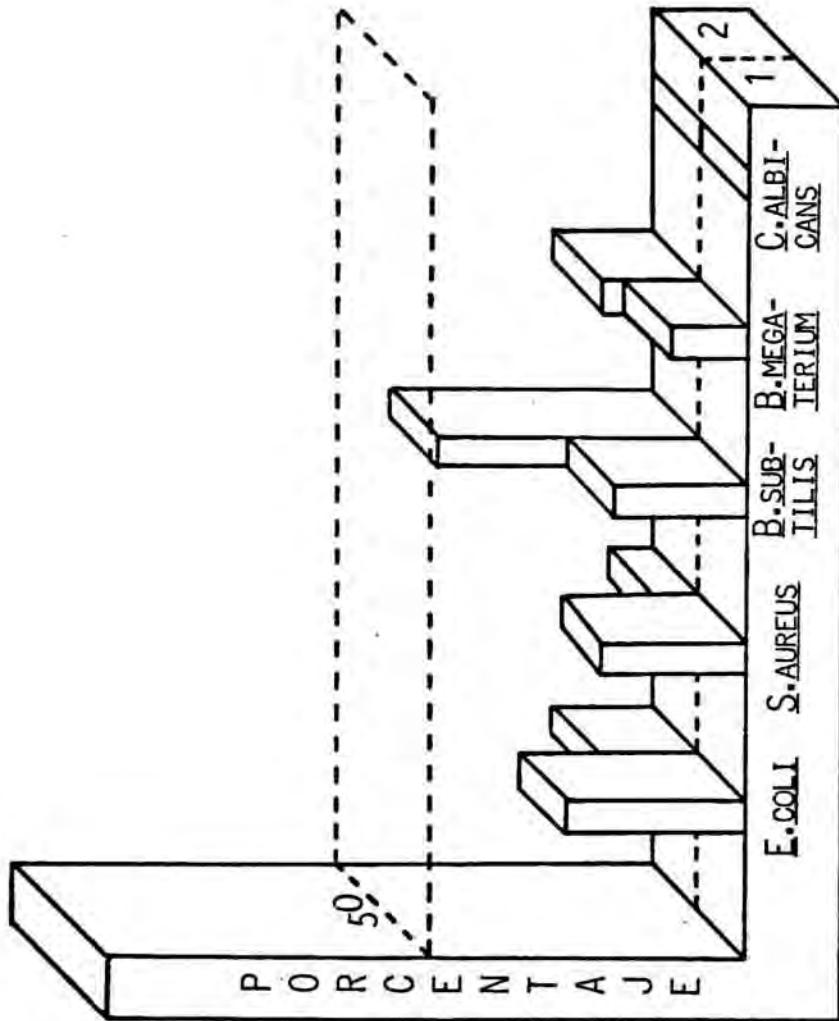
El estudio estadístico se ha llevado a cabo mediante el "test" del  $\chi^2$  (355 ), y en los casos en que fue necesario mediante el "test" exacto de Fisher (355 ).

En las GRAFICAS núms. 24 y 25 se observa la comparación entre el porcentaje de cepas activas, utilizando discos impregnados con el extracto crudo, y con el extracto clorofórmico, considerando todas las cepas (GRAFICA nº 24 ), las cepas productoras (GRAFICA nº 25 a) y las no productoras de aflatoxinas (GRAFICA nº 25 b).

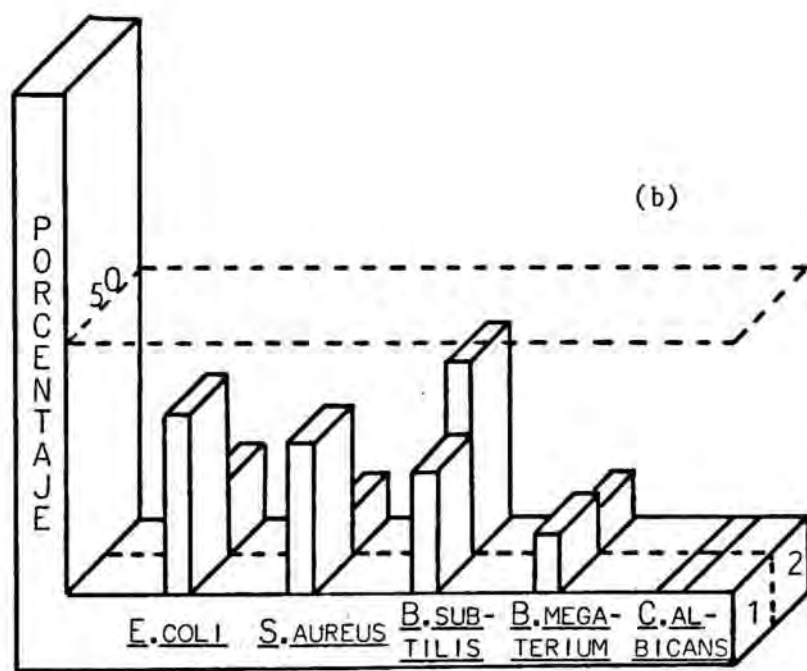
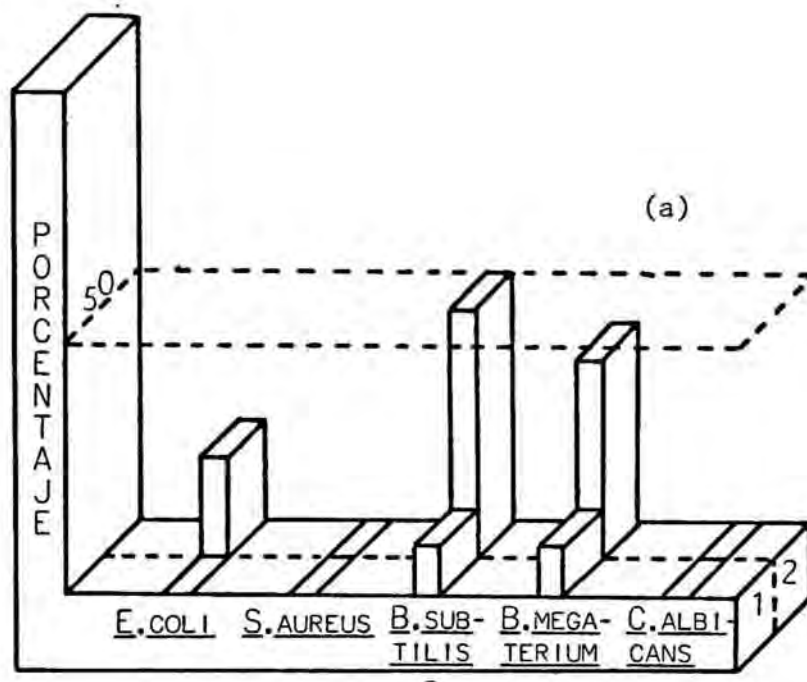
MICROORGANISMO	% CEPAS ACTIVAS AFLA +		% CEPAS ACTIVAS AFLA-		% TOTAL CEPAS ACTIVAS	
	E. crudo	E. cloroform.	E. crudo	E. cloroform.	E. crudo	E. cloroform.
<u>Escherichia coli</u>	-	20	36.36 *	15.15	27.91	16.28
<u>Staphylococcus aureus</u>	-	-	30.30 *	9.09	23.25 *	6.98
<u>Bacillus subtilis</u>	10	● 50	24.24	39.39	20.93 *	41.86
<u>Bacillus megaterium</u>	10	40	12.12	9.09	11.63	16.28
<u>Candida albicans</u>	-	-	-	-	-	-

TABLA n° 156 .- Estudio comparativo de la capacidad inhibidora de los extractos crudo y cloroformico, obtenidos del cultivo de las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas en el medio YES. ● Diferencias significativas, nivel de confianza entre el 90 y el 95%. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.





GRAFICA n° 24 .- Comparación entre el porcentaje de extractos crudos (1) y cloroformos (2) obtenidos a partir de cultivos en medio YES, activos frente a los microorganismos ensayados. \* Diferencias significativas, nivel de confianza del 95%.



Grafica nº 25 .- Comparación entre el porcentaje de extractos crudos (1) y clorofórmicos (2) procedentes de cepas productoras de aflatoxinas (a) y no productoras (b), activas frente a los microorganismos ensayados. Diferencias significativas, nivel de confianza: ● entre 90 y 95%, \* 95%.

En las TABLAS núms. 157 y 158 se observa el grado de inhibición del desarrollo de los microorganismos ensayados, producido por el extracto crudo y clorofórmico, respectivamente, de las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas, desarrolladas en el medio YES, siguiendo la técnica de los discos.

Para una mejor interpretación de las TABLAS, debe tenerse en cuenta:

Grado de inhibición:

0 = 0 mm de halo de inhibición

1 = Disminución de crecimiento, pero no se observa un halo definido

2 = Halo de inhibición de hasta 10 mm

3 = Halo de inhibición >10 a 15 mm

4 = Halo de inhibición >15 mm

Con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en el grado de inhibición producido por el extracto crudo y el extracto clorofórmico se ha realizado el "test" T (355).

MICROORGANISMO	EXTRACTO CRUDO				EXTRACTO CLOROFORMICO					
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	10	0	0	0	0	8	0	2	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0
<u>Bacillus subtilis</u>	9	0	1	0	0	5	1	4	0	0
<u>Bacillus megaterium</u>	9	0	1	0	0	6	2	1	0	1
<u>Candida albicans</u>	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0

TABLA nº 157 .- Grado de inhibición de los extractos crudos y cloroformicos procedentes del cultivo de las cepas productoras de aflatoxinas en el medio YES.

● Diferencias significativas, nivel de confianza entre 90 y 95%.

MICROORGANISMO	EXTRACTO CRUDO					EXTRACTO CLOROFORMICO				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
<u>Escherichia coli</u>	21	1	7	3	1	**	28	5	0	0
<u>Staphylococcus aureus</u>	23	2	6	2	0	•	30	0	2	1
<u>Bacillus subtilis</u>	25	3	3	1	1		20	1	11	0
<u>Bacillus megaterium</u>	29	3	0	0	1		30	0	3	0
<u>Candida albicans</u>	33	0	0	0	0		33	0	0	0

TABLA nº 158 .- Grado de inhibición de los extractos crudos y cloroformicos procedentes del cultivo de las cepas no productoras de aflatoxinas en el medio YES.

Diferencias significativas: \*\* Nivel de confianza del 99%.

• Nivel de confianza entre 90 y 95%.

### 5.7. RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION DE LOS PATRONES DE AFLATOXINAS

El límite de detección para cada uno de los patrones de aflatoxinas utilizado para la cuantificación de las aflatoxinas elaboradas por las cepas del grupo Aspergillus flavus en estudio se detallan a continuación.

MICOTOXINA	LIMITE DE DETECCION ( $\mu\text{g}$ )
Aflatoxina B <sub>1</sub>	0.0003
Aflatoxina B <sub>2</sub>	0.0003
Aflatoxina G <sub>1</sub>	0.0002
Aflatoxina G <sub>2</sub>	0.0002

## 6. D I S C U S I O N

## 6.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA ATMOSFERICA

El método empleado en el estudio de la micoflora atmosférica ha sido el gravimétrico, recomendado por diversos autores dada su sencillez en la recogida de muestras ( 13,62,63, 79,92,93,127, 137, 235, 236, 262, 292, 329 ). Este método, sin embargo, podría presentar como desventaja la dificultad de expresar con certeza el número de conidios por unidad de volumen, dato que se obtiene con mayor confianza al utilizar métodos volumétricos ( 61,156).

Payá en 1983 ( 294 ) indica que los dos métodos presentan resultados muy similares en cuanto a proporción y distribución en el tiempo de conidios siendo ambos igualmente válidos y recomendando el volumétrico en el caso de que sea necesario conocer la concentración de conidios por unidad de volumen.

El medio de cultivo empleado en esta Tesis ha sido el agar extracto de malta al 2%, medio general en el laboratorio de Micología, cuya eficacia en el estudio de la micoflora atmosférica fue demostrado por Calvo y cols. ( 64 ) en comparación con otros medios de cultivo. Al mencionado medio de cultivo se le adicionan 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina para inhibir el desarrollo bacteriano.

La toma de muestras se realizó mediante exposición de tres placas de Petri que contenían el medio de cultivo, distribuidas conve-



nientemente en la nave que alojaba a los animales ( 262 ), durante cinco minutos, tiempo recomendado por diversos autores ( 13,79, 127, 262 ) .

De los trabajos realizados sobre la micoflora presente en la atmósfera de granjas y explotaciones de distintas especies animales, citaremos los de Chute y Barden en 1964 que estudiaron la micoflora atmosférica de explotaciones aviares durante un año, utilizando la técnica de Andersen ( 99 ). Los géneros más frecuentemente aislados fueron Aspergillus (Aspergillus flavus y Aspergillus fumigatus), Penicillium y Scopulariopsis no encontrando diferencias estacionales en la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros.

Estos autores indican que dos explotaciones geográficamente cercanas pueden tener una micoflora distinta si la política de manejo y saneamiento son distintas.

Pinello y cols. en 1977 ( 303 ), estudiaron la micoflora presente en el aire de una granja de pavos, utilizando un método volumétrico.

Asimismo investigan la micoflora presente en la cama y en los tejidos de algunos animales. Los géneros más frecuentes en el aire son: Aspergillus, Penicillium, Petriella y Scopulariopsis.

Moreau en 1978 ( 262 ) estudia la micoflora presente en la atmósfera de distintas naves de una explotación porcina, utilizando el

método de sedimentación en placa. Concluye que en la nave de gestantes el número de conidios es menor que en la nave de cría, en la que los animales disponen de cama. En la nave de engorde el número es inferior debido a la existencia de cemento en el suelo. Los géneros aislados mayoritariamente son Aspergillus y Penicillium, en tanto que los conidios de los Phycomycetes al vehicularse con dificultad en la atmósfera son menos abundantes.

Eckman y Morgan-Jones en 1979 ( 127 ) estudiaron la micoflora atmosférica de explotaciones aviarias, utilizando la técnica de exposición de placas de Petri con medio de cultivo. La especie más frecuente fue Cladosporium cladosporioides, aislándose también diferentes especies del género Aspergillus, Penicillium, Fusarium y Acremonium, entre otros.

Sánchez Franco y cols. en 1981 ( 329 ) investigaron la micoflora atmosférica de explotaciones de codornices, utilizando la técnica de sedimentación en placas de Petri, conteniendo medio de cultivo.

Los géneros aislados mayoritariamente fueron Aspergillus, Penicillium, Scopulariopsis y Aureobasidium. Entre las especies del género Aspergillus, la más frecuente fue Aspergillus fumigatus.

González Cabo en 1985 ( 156 ) realizó un estudio de la micoflora

atmosférica en una explotación de conejos, utilizando un método volumétrico, así como de los hongos presentes en el pelo y aparato respiratorio de los animales muestreados. Los géneros mayoritariamente aislados de la atmósfera fueron Penicillium, Cladosporium y Aspergillus.

A lo largo de nuestro estudio, los géneros Penicillium, Aspergillus, Cladosporium, Alternaria y Candida se aislaron en más del 50% de las explotaciones muestreadas, además de colonias de micelios estériles dematiáceos (TABLA nº 7 ).

Los géneros Penicillium, Aspergillus, Cladosporium y Alternaria han sido los que se han aislado con mayor frecuencia en la atmósfera de distintas zonas geográficas ( 13, 61, 62, 64, 79 ). Los dos primeros son los más frecuentes en los estudios realizados en explotaciones animales ( 99,127,156,262,303,329 ). El género Cladosporium ocupa un lugar predominante sólo en algunos estudios ( 127,156 ) mientras que el género Alternaria presenta en general una escasa incidencia.

Debemos destacar la gran frecuencia de aislamiento del género Scopulariopsis en algunos estudios consultados ( 99,156, 303, 329 ) y que en nuestra investigación, sin embargo, ocupa el noveno lugar.

Los géneros Candida, Mucor y Fusarium que se encuentran en nuestro estudio entre los diez géneros aislados con mayor frecuencia de la atmósfera, tienen una escasa incidencia en los trabajos

consultados. Ninguno menciona la presencia del género Aphanocladium ( 127,156,303,329), aislado en el presente trabajo en el 27.27% de las explotaciones muestreadas.

Al comparar la frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos en la atmósfera de las granjas de vacas, cerdos, conejos y gallinas, se observaron diferencias significativas en seis géneros (TABLA nº 8 y GRAFICA nº 1 ).

El género Cladosporium ocupó el primer lugar en el orden de aislamientos, en la atmósfera de las explotaciones vacunas, siendo menor su incidencia en las porcinas. El género Alternaria fue mayoritario en la atmósfera de las explotaciones vacunas, alcanzando en las explotaciones cunícolas la menor frecuencia de aparición.

El género Candida se aisló mayoritariamente en la atmósfera de las explotaciones aviarias, siendo en las granjas cunícolas donde alcanzó una menor incidencia.

La frecuencia de aparición del género Mucor fue mayor en las explotaciones vacunas y porcinas, y el género Scopulariopsis por el contrario se aisló con mayor frecuencia en la atmósfera de las explotaciones cunícolas y aviarias.

El género Aphanocladium alcanzó una mayor incidencia en la atmósfera de las explotaciones porcinas y aviarias.

Las especies mayoritariamente aisladas del género Penicillium fueron P. viridicatum (24.67%) y P. chrysogenum (23.38%). Del género Aspergillus, fueron A. fumigatus (27.27%), A. candidus (18.18%) y A. flavus (16.88%), los más frecuentes. Al comparar la frecuencia de aislamiento de las especies de este género en la atmósfera de las explotaciones vacunas, porcinas, cunícolas y aviares, se observaron diferencias significativas en el caso de A. flavus, aislado mayoritariamente en las explotaciones porcinas y en el caso de A. tubingensis presente fundamentalmente en la atmósfera de las explotaciones vacunas (TABLA nº 10).

Las especies mayoritariamente aisladas del género Cladosporium fueron C. herbarum (32.47%) y C. cladosporioides (22.08%). En este último caso se observaron diferencias significativas, aislándose con mayor frecuencia en la atmósfera de las explotaciones vacunas y cunícolas (TABLA nº 10).

En el género Alternaria la especie más frecuente fue A. alternata y del género Candida, C. famata. Se observaron diferencias significativas en la frecuencia de aparición de esta levadura que se aisló en menor proporción en la atmósfera de las explotaciones cunícolas (TABLA nº 10).

Se observaron asimismo diferencias significativas en la frecuencia de aparición de Mucor racemosus (aislado en proporción más elevada en las explotaciones porcinas) y de Scopulariopsis brevicaulis y S. candida, aisladas mayoritariamente de la atmósfera

de las explotaciones cunícolas.

De entre las especies aisladas, destaca la aparición de Arthroderma benhamiae, teleomorfo de Trichophyton mentagrophytes y agente causal de dermatofitosis ( 312 ), en la atmósfera de dos explotaciones cunícolas, en las que los animales no mostraron afección fúngica alguna.

Asimismo se aislaron de la atmósfera diversas especies del género Chrysosporium, hongo queratinofílico de hábitat marcadamente geofílico, que ha sido aislado también de la atmósfera a lo largo de determinados estudios ( 121,156 ).

## 6.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN EL PELO O PLUMAS DE LOS ANIMALES

La micoflora presente en animales sanos ha sido estudiada por un reducido número de investigadores. Philpot y Berry ( 302 ) indican que Cladosporium y Alternaria son los géneros más comúnmente aislados del pelo de 72 perros estudiados, además de Mucor, Rhizopus, Penicillium, Epicoccum, Cephalosporium, Stemphylium, Aureobasidium y Botrytis.

Otros estudios realizados en perros son los de Kushida y cols. (216) y los de van Cutsem y cols.(111) que indican el aislamiento de algunas especies de dermatofitos junto con especies de Phyco-



mycetes, Scopulariopsis, Penicillium, Aspergillus y Alternaria en perros asintomáticos.

Valle Manzano y cols. ( 370 ) al estudiar la flora saprófita de perros y gatos con lesiones sospechosas de dermatofitosis señalan el aislamiento predominantemente de Aspergillus y Alternaria en las muestras en las que no se aislaron dermatofitos.

Caretta y cols. ( 81 ) investigaron la micoflora de 300 vacas aislando principalmente junto a hongos clásicamente considerados como queratinofílicos, especies de los géneros Chaetomium, Botryotrichum, Scopulariopsis, Alternaria, Acremoniella, Trichothecium, siendo escaso el aislamiento de Aspergillus, Penicillium, Fusarium y Cladosporium.

Aho ( 4 ) estudiando la micoflora saprófita del pelo de perros, gatos, caballos, vacas y animales de laboratorio, sospechosos de dermatofitosis, indica que las muestras de vacas, caballos y cobayos presentaron más especies saprófitas que las relativas a perros y gatos. Los géneros más frecuentes en todas las muestras fueron: Penicillium, Cladosporium, Aspergillus, Aureobasidium, Alternaria, Scopulariopsis, Trichoderma y Trichothecium, demostrando diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento de algunos géneros, según la especie animal investigada.

Marsella y cols. ( 243 ) en un estudio de la micoflora presente en pelos y plumas de animales en cautividad, aislaron además de

queratinofílicos, especies de Penicillium, Cladosporium, Geotrichum, Alternaria, Scopulariopsis y Cephalosporium.

Hubálek y cols. ( 190, 191) estudiaron la micoflora presente en el pelo y órganos internos de pequeños mamíferos y aislaron distintas cepas de los géneros Penicillium, Aspergillus y Alternaria de forma mayoritaria.

Caretta y Del Frate ( 80 ) al estudiar la micoflora del pelo de los conejos salvajes y plumas de gaviotas mencionan el aislamiento de Penicillium lilacinum, Fusarium oxysporum, Botryotrichum piluliferum y Scopulariopsis sp. además de Chrysosporium keratinophilum.

González Cabo ( 156 ) al estudiar la micoflora presente en el pelo de conejos, cita al género Scopulariopsis como el más frecuente, seguido de Penicillium y Aspergillus.

Coincidiendo con algunos de los resultados expuestos anteriormente, los géneros aislados con mayor frecuencia en el desarrollo de la Tesis fueron: Aspergillus, Penicillium, Mucor, Absidia y Alternaria (TABLA nº 11 ).

El género Scopulariopsis alcanzó menor incidencia (10.39%).

Al comparar la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros en el pelo de vacas, cerdos, conejos y plumas de gallinas sólo se observaron diferencias significativas en el género Penicillium



con un nivel de confianza del 99% (TABLA nº 12 , GRAFICA nº 2 ) que se aisló con mayor frecuencia de las plumas de gallina y con menor del pelo de vacas, coincidiendo con los resultados de Caretta y cols. ( 81 ).

Las especies del género Aspergillus más frecuentes fueron: A. fumigatus, A. candidus y A. tubingensis. Se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% al comparar la frecuencia de aislamiento de las muestras de vacas, cerdos, conejos y gallinas de la especie A. tubingensis (TABLA nº 14 ) que se aisló con mayor frecuencia en las muestras de pelos de vaca y no apareció en ninguna muestra de conejos ni gallinas.

Las especies del género Penicillium más frecuentes fueron P. chrysogenum y P. viridicatum y entre los Phycomycetes, Mucor racemosus y Absidia corymbifera.

Se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% al comparar la frecuencia de aparición de Alternaria alternata, una de las especies más frecuentes en las muestras de vacas, cerdos, conejos y gallinas (TABLA nº 14 ), al aislarse con mayor frecuencia en las muestras de pelos de conejo y con menor frecuencia en las muestras de pelos de cerdo.

Debe señalarse el aislamiento de Arthroderma benhamiae, teleomorfo de Trichophyton mentagrophytes, en dos muestras de pelo de conejos , sin lesión aparente. Esta especie es uno de los principales

agentes causales de dermatofitosis en conejos y ha sido aislado por otros autores en el pelo de animales sanos: roedores salvajes ( 171, 242, 249, 250, 286, 288 ), animales de laboratorio ( 138, 142, 183, 213, 232 ), plumas de animales ( 192 ), conejos ( 147 ), perros ( 111 ), demostrando con ello que muchos animales, en determinadas condiciones pueden comportarse como portadores.

### 6.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN PIENSOS, FORRAJES Y ENSILADOS

#### 6.3.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN PIENSOS

La micoflora presente en los piensos dependerá de la carga fúngica aportada por las materias primas que lo integran, que son principalmente de origen vegetal.

Los estudios realizados sobre la micoflora de los piensos compuestos para animales, son relativamente escasos y la mayoría se incluyen en trabajos destinados principalmente al estudio de la presencia de micotoxinas en este tipo de alimentos.

Ogundero ( 281 ) estudia la micoflora presente en cuarenta muestras de piensos para aves, indicando que las especies más frecuentes eran: Aspergillus fumigatus, Mucor pusillus y Thermoascus aurantiacus.

Le Bars ( 223 ) al estudiar la micoflora de piensos compuestos señala la presencia de diferentes especies de los géneros Penicillium, Cladosporium, Fusarium y Paecilomyces y de Phycomycetes.

En los estudios realizados por Lovett y cols. ( 233 ) se indica que en los piensos para aves los géneros predominantes son Penicillium, Aspergillus, Fusarium y Mucor.

Moreau ( 262 ) al investigar la micoflora presente en piensos para cerdos, establece la presencia de cuarenta especies fúngicas, principalmente incluídas entre los Phycomycetes y los géneros Aspergillus y Penicillium.

Moreno y Suárez ( 266 ) determinaron la micoflora de piensos comerciales para aves, indicando que los géneros aislados con mayor frecuencia son: Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Mucor, Cladosporium, además de distintas cepas de Levaduras, no clasificadas.

En nuestro estudio los géneros aislados con mayor frecuencia en las setenta y cinco muestras de pienso analizadas son Penicillium, Aspergillus, Fusarium y Candida (TABLA nº 15) coincidiendo con los resultados obtenidos por Moreno y Suárez ( 266 ) excepto en que al reunir estos autores todas las Levaduras en el mismo grupo ocupan el tercer lugar en la frecuencia de aislamiento y con los obtenidos por Lovett ( 233 ) a excepción del género Mucor situado en cuarto lugar.

Con respecto a los demás géneros aislados destaca la presencia de Aphanocladium que en nuestro estudio se aisló en el 28% de las muestras y no ha sido citado en la bibliografía consultada ( 223, 233, 262, 266, 281 ).

Al comparar la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros en los piensos destinados al consumo vacuno, porcino, cunícola y aviar se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 99% en tres géneros (TABLA nº 16, GRAFICA nº 3).

Los géneros Fusarium y Aphanocladium no se aislaron en ninguna muestra de piensos para conejos, en tanto que el género Candida se aisló con mayor frecuencia en los piensos destinados a gallinas.

La comparación entre los resultados correspondientes a las especies aisladas en el presente estudio (TABLA nº 17 ) con los trabajos realizados por otros autores se dificulta por el hecho de que son muy pocos los que llegan al nivel de especie en la clasificación de las cepas aisladas.

Las especies del género Penicillium más frecuentes en las muestras de pienso estudiadas fueron P. chrysogenum (38.67%) y P. viridicatum (24%).

Al comparar la frecuencia de aislamiento de las especies detec-

tadas en las muestras de piensos de vacas, cerdos, conejos y gallinas (TABLA nº 18 ), se observaron diferencias significativas con un 95% de confianza en el caso de P. chrysogenum, más frecuente en los piensos de conejos y P. viridicatum, más frecuente en los piensos de vacas.

En el caso de P. corylophilum, el nivel de confianza fue del 99%, al ser más frecuente en los piensos de vacas y no haberse aislado en ninguna muestra de piensos para gallinas y conejos.

En el género Aspergillus fueron A. flavus (44%), A. fumigatus (38.67%), A. candidus (21.33%) y A. chevalieri (21.33%) las especies más frecuentes, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros autores ( 223,262,266 ) en tanto que Ogundero ( 281 ) menciona únicamente el aislamiento de A. candidus y A. fumigatus.

Fusarium oxysporum y Candida famata fueron de las especies más frecuentes, observándose diferencias significativas con un 99% de confianza al igual que en el caso de Aphanocladium album al comparar la frecuencia de aislamiento de estas especies en los piensos de vacas, cerdos, conejos y gallinas (TABLA nº 18 ).

Candida famata y Aphanocladium album se aislaron con mayor frecuencia en los piensos de gallinas y Fusarium oxysporum en los piensos de vacas. En los piensos de conejos no se aisló

ninguna especie de Fusarium ni ninguna cepa de Aphanocladium album.

El número de UFC/g de muestra en los distintos piensos estudiados, fue muy variable, siendo el más bajo del orden de  $10^2$  en un pienso de conejos, y de  $10^8$  en un pienso de gallinas y en dos muestras de piensos de cerdos (TABLAS 19 a 22 ).

Lovett y cols. (233) mencionan un contenido fúngico del orden de  $10^2$  a  $10^5$  en piensos para aves y Moreno y Suárez (266) en el mismo tipo de piensos un valor medio de  $10^3$  a  $10^5$ .

Buckle (55) cita valores que llegan hasta  $10^8$  .

Es lógico pensar que en nuestro estudio la contaminación pueda ser superior ya que las muestras fueron tomadas directamente de los comederos de los animales, mientras que Moreno y Suárez (266) las obtienen de sacos cerrados.

Al comparar el contenido fúngico de las muestras de pienso destinadas a vacas, cerdos, conejos y gallinas se observan diferencias significativas con un nivel de confianza del 99% (GRAFICA nº 4 ) siendo las muestras destinadas a conejos las que presentaron una mayor carga fúngica.

Existe una gran variedad de factores que pueden incidir en la aparición de estas diferencias entre los que citaremos la



contaminación de las materias primas, formando parte en distintas proporciones de la composición de los piensos estudiados, la utilización de antifúngicos, la forma de presentación de éstos y la contaminación posterior a la elaboración.

Moreno y Suárez (266) encuentran menor contaminación en los gránulos que en las harinas destinadas a aves, indicando que podría ser debido al tratamiento térmico aplicado en la elaboración de los gránulos. A este respecto, debemos mencionar únicamente que las muestras de conejo eran las únicas en forma de gránulos, mientras que las restantes muestras estudiadas eran harinas, lo que podría explicar la menor contaminación observada en los piensos para conejos.

### 6.3.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN LOS FORRAJES

La micoflora presente en los forrajes dependerá de las condiciones físico-químicas del entorno, especialmente de la humedad relativa y de la temperatura ambiental. Incluso en un mismo lote de forraje existe una gran heterogenicidad, dependiendo del estado de la planta y del nivel de actividad de los enzimas de las células vegetales (222).

En los forrajes será lógico encontrar aquellos hongos miceliares y levaduras adaptados a la célula vegetal o fitoparásitos,

cuya persistencia dependerá de las condiciones de almacenamiento y manipulación.

Clevström y Ljunggren ( 106 ) indican que Cladosporium es el más abundante, seguido de Fusarium, Alternaria, Botrytis, Aspergillus, Penicillium y Mucor, variando su incidencia con el tiempo de conservación.

Le Bars ( 76 ) indica que en los forrajes secos, las especies predominantes son Aspergillus repens, A. versicolor y Scopulariopsis brevicaulis, mientras que otros autores ( 104 ) mencionan como mayoritarias a especies de los géneros Penicillium, Cladosporium y Trichothecium. Lacey ( 219 ) indica como principales constituyentes de la micoflora de los forrajes a Absidia spp., Aspergillus fumigatus, A. glaucus, Penicillium spp., A. nidulans y Cladosporium y Caretta y cols. ( 81 ) aislan fundamentalmente cepas de Aspergillus, Penicillium, Absidia, Alternaria y Chaetomium.

Pelhate y Agosin ( 229 ) indican que al principio de la recolección la micoflora está constituida principalmente por los denominados "hongos de campo" (Alternaria, Epicoccum y Fusarium). Cladosporium constituye la flora intermedia entre los anteriores y los denominados "hongos de almacenamiento" que se desarrollan después de la recolección si las condiciones son favorables.

En el estudio de la micoflora presente en las seis muestras de forraje (cuatro destinadas al consumo vacuno, una a cabras



y una a caballos) los géneros aislados mayoritariamente fueron: Alternaria, Aspergillus, Penicillium, Cladosporium y Scytalidium (TABLA nº 24 ) y las especies más frecuentes: Alternaria alter-nata, Aspergillus fumigatus, Cladosporium herbarum y Scytalidium lignicola, citados por Ellis (130, 131 ) como fitoparásitos.

El nº de UFC/g de muestra fue del orden de  $10^4$  a  $10^8$  (TABLA nº 26), resultados que concuerdan con los mencionados por Buckle ( 55 ).

### 6.3.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN ENSILADOS

Las peculiares características que poseen los ensilados hacen que no sean un sustrato favorable para el desarrollo de los hongos, pero en las capas superficiales, más aireadas, pueden desarrollarse distintas especies fúngicas, dependiendo del tiempo de conservación de los ensilados. Pelhate ( 298 ) realizó un estudio de la evolución fúngica en los ensilados. El cambio brusco producido por la falta de oxígeno repercute rápidamente en la micoflora presente en las plantas o en la contaminación producida durante su recolección y manipulación. En una primera fase, la actividad fermentativa la realizan principalmente las bacterias del ácido láctico y el pH del sustrato desciende hasta un pH de aproximadamente 4. En estas condiciones, pueden desarrollarse las levaduras, que mantendrán en óptimas condicio-

nes el ensilado. Paralelamente al crecimiento bacteriano pueden desarrollarse especies microaerófilas, fundamentalmente: Aspergillus fumigatus y Geotrichum candidum siendo esta última la que mejor puede desarrollarse junto a bacterias y levaduras.

El desarrollo de Monascus purpureus eleva el pH del sustrato y favorece el desarrollo de Phycomycetes, siendo los más frecuentes: Mucor hiemalis y M. racemosus que pueden ser sustituidos por Absidia corymbifera. En una fase siguiente pueden crecer distintas especies de Penicillium, Trichoderma y Paecilomyces.

En dos de las tres muestras de ensilado estudiadas, destinadas al consumo de vacas se aislaron únicamente Geotrichum candidum y Candida lusitaniae y en la otra muestra G. candidum, Absidia corymbifera y Aspergillus fumigatus (TABLA nº 28) datos que coinciden plenamente con los de Pelhate ( 298 ) expuestos anteriormente y con los indicados por Ceruti y cols. ( 88 ) y Caretta y cols. ( 81 ) aunque estos últimos no mencionan el aislamiento de levaduras.

El nº de UFC/g de muestra es elevado (orden  $10^7 - 10^8$ ) coincidiendo con Moon y Ely ( 258 ) (TABLA nº 29).

#### 6.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA PRESENTE EN MUESTRAS DE SUELOS

##### 6.4.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL

La bibliografía existente sobre el estudio de la micoflora del suelo de distintas zonas geográficas es muy numerosa, en comparación con los estudios específicos realizados en suelos directamente en contacto con animales, encaminados casi exclusivamente al aislamiento de hongos queratinofílicos.

Lovett y cols. ( 233 ) estudian la micoflora presente en la cama de explotaciones aviares y señalan como géneros predominantes Penicillium, Scopulariopsis, Candida y Aspergillus y una carga fúngica que varía desde  $2.7 \times 10^2$  a  $2.6 \times 10^7$  UFC/g de muestra.

Dyar y cols. ( 126 ) señalan en este mismo sustrato contajes del orden de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g.

Bacon y Burdick ( 20 ) en un estudio similar obtienen unos contajes que oscilan entre  $1.4 \times 10^2$  y  $5.3 \times 10^7$  UFC/g y señalan que los géneros más frecuentes son: Aspergillus, Penicillium, Trichoderma, Scopulariopsis, Cladosporium y Candida.

Pinello y cols. ( 303 ) señalan que los géneros aislados mayoritariamente de la cama de una explotación de pavos son: Penicillium, Petriella, Scopulariopsis y Aspergillus.

Otros estudios realizados en suelos de parques infantiles ( 68, 140 ) visitados con regularidad por perros y gatos especialmente, señalan como géneros mayoritarios Penicillium, Mucor, Aspergillus, Cladosporium y Cephalosporium ( 68 ) y Chaetomium, Trichosporiella, Penicillium y Coniothyrium ( 140 ).

Calvo y cols. ( 68 ) obtienen un contaje fúngico en las muestras que oscila entre  $10 \times 10^4$  y  $101 \times 10^6$  UFC/g.

Los géneros aislados a lo largo de la Tesis, en más de un 50% de muestras investigadas fueron: Penicillium, Aspergillus y Candida, coincidiendo en general con los resultados anteriormente citados ( TABLA nº 30 , GRAFICA nº 5 ).

No se observaron diferencias significativas al comparar la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros y especies en las muestras de suelos de explotaciones vacunas, porcinas, cunícolas y aviares.

Las especies más frecuentes fueron: Penicillium chrysogenum, P. viridicatum, Aspergillus fumigatus y Candida famata ( TABLA nº 31 ).

El recuento de hongos de las muestras estudiadas osciló entre  $11 \times 10^4$  en una muestra de una explotación de ovejas y  $413 \times 10^7$  UFC/g en una muestra procedente de una explotación de gallinas (TABLAS núms. 32 y 33), resultados que se hallan entre los límites señalados por los autores anteriormente mencionados.

Al realizar la comparación entre los valores de micoflora total de las muestras procedentes de las explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas estudiadas no se observaron diferencias significativas (GRAFICA nº 6 ).

#### 6.4.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LOS HONGOS QUERATINOFILICOS

El método para el aislamiento de hongos queratinofílicos descrito por Vanbreuseghem en 1952 ( 371 ) es el más utilizado y se basa en el hecho de que los dermatofitos al igual que la mayoría de hongos patógenos desarrollan una parte de su ciclo vital en el suelo ( 7, 8, 11, 24, 68, 73, 80, 81, 82, 83, 97, 132, 138, 140, 160, 164, 198, 199, 200, 248, 253, 254, 272, 304, 307, 377).

De Clerq y de Vroey ( 103) obtuvieron mejores resultados , manteniendo las muestras de tierra congeladas a  $-25^{\circ}\text{C}$  durante una semana antes de utilizar la técnica de Vanbreuseghem, evitando así la contaminación por ácaros y aumentando el número de colonias aisladas.

Tal como se observa en la TABLA nº 35 , el 56.1% de las muestras de suelos contenían hongos capaces de desarrollarse sobre la fuente de queratina.

Tan solo el 22% de las muestras fueron positivas respecto a la presencia de cepas de los géneros Microsporum, Trichophyton o Chrysosporium.

Atendiendo al origen de las muestras, en el 18% de las muestras de suelos de explotaciones vacunas (2/11), en el 66.7% (2/3) de las muestras de suelos de explotaciones porcinas, en el 26.7% (4/15) de las explotaciones aviares y en la única muestra de suelo de palomas, se aislaron uno de los tres géneros citados, como mínimo.

No se observó la presencia de estos hongos clásicamente considerados como dermatofitos en las seis muestras de suelos de explotaciones cunícolas, en las dos muestras de ovejas, en las dos de cabras ni en la única muestra de caballos.

Estos resultados de aislamiento son bajos si los comparamos con los obtenidos por otros autores, entre los que citaremos: Caretta y cols ( 81 ), indican que el 93% de las muestras de suelos de una explotación vacuna, son positivos; Alayeto y cols. ( 11 ) señalan que el 88.9% de las muestras tomadas de instalaciones del parque zoológico de Barcelona son positivas y los de Jain ( 200 ) que aisló hongos queratinofílicos en el

100% de las muestras de suelo de una explotación aviar y en el 85% de las muestras de una explotación vacuna.

Battelli y cols. ( 24 ) al estudiar la presencia de hongos queratinofílicos en suelos de madrigueras de marmota señalan su aislamiento en el 31.5% de las muestras y, solo en el 14.6% de las muestras de suelo cercanas a las madrigueras.

En los estudios realizados en diversas zonas geográficas los resultados obtenidos son variables. En las Islas Galápagos, Ajello y Padhye ( 8 ) obtienen el 31% de muestras positivas. En Israel, Feuerman y cols. (138) señalan el 38.3% y en Kenia, Muhammed y Lalji ( 272 ) el 29.9% de muestras positivas.

Battelli y cols. ( 24 ) indican que en estudios realizados en Italia, en suelos de distintas zonas geográficas el porcentaje de muestras positivas varía desde el 33% hasta el 100%.

Jain y cols. ( 200 ) en la India, aislaron hongos queratinofílicos en un 86.1% de las muestras de suelo de distintas procedencias y McAleer ( 248 ), en Australia, en el 90.6% de las muestras estudiadas.

Caretta y cols. en diversos estudios realizados en Italia aislaron un porcentaje de muestras de suelos positivas, variable según las zonas: 21.6% ( 80 ), 33.6% ( 79 ) y 51.4% ( 82 ).



Guarro y cols.(164 ) aislaron hongos queratinofílicos en un mayor porcentaje de muestras de suelos de Tarragona que el citado por Calvo y cols. (68) de las muestras procedentes de suelos de Parques y Jardines de Barcelona.

En el desarrollo de la Tesis la única especie del género Microsporium aislada fue M. gypseum que se aisló en una muestra de suelo de explotación vacuna, en una de explotación porcina y en dos muestras de explotaciones aviarias (TABLA nº 37). Esta especie es la más frecuente en los estudios comentados anteriormente a excepción de algunos, que no la mencionan ( 8,80, 82, 198, 304, 307 ).

En diversos trabajos destaca junto a esta especie, M. cookei ( 11, 82, 248, 253,254, 272) y de forma ocasional M. fulvum ( 199 ), M. canis ( 254 ), M. vanbreuseghemii ( 83, 254 ) y M. nanum ( 200 ).

La única especie del género Trichophyton aislada ha sido T. ajelloi que se aisló en una muestra de suelo de explotación vacuna y en una de aviar (TABLA nº 37). La frecuencia de esta especie en distintos tipos de suelos ha sido puesta de manifiesto por numerosos autores ( 7,11,24,68, 81, 97,164,248,253, 254, 272, 307 ). Algunos investigadores mencionan una notable incidencia de T. terrestre ( 7,24,81,82,97,138,253,254,300 ).



En relación con las especies del género Chrysosporium, en una muestra de suelo de explotación vacuna se aislaron C. keratinophilum y C. queenslandicum.

En una muestra de una explotación porcina se aislaron junto a Microsporium gypseum, Chrysosporium merdarium y C. tropicum.

En la muestra de suelos en contacto con palomas se aisló Chrysosporium queenslandicum.

En una muestra de suelo de explotación aviar se aislaron C. georgii y C. queenslandicum junto con Microsporium gypseum y Trichophyton ajelloi.

Chrysosporium merdarium se aisló conjuntamente con Microsporium gypseum en una muestra de suelos de explotaciones avícolas, mientras que fue C. indicum la única especie aislada en dos muestras de suelos de explotaciones aviares.

A excepción de C. georgii y C. queenslandicum las restantes especies han sido aisladas por numerosos autores: C. keratinophilum ( 7, 8, 11, 68, 73, 80, 81, 82, 138, 199, 200, 248, 253, 304, 307) C. merdarium ( 7 ), C. tropicum ( 7, 8, 68, 80, 82, 83, 164, 198, 199, 200, 248, 253, 304 ) C. indicum ( 8, 68, 73, 81, 199, 248, 304 ).

Griffin en 1960 (160) indicó que existe una sucesión en la colonización fúngica de las fuentes de queratina en contacto

con el suelo, iniciando su desarrollo aquellos hongos saprófitos competitivos como Penicillium, Fusarium, algunos Phycomycetes, Chaetomium, Gliocladium y Humicola entre otros que utilizarían los nutrientes menos complejos del sustrato. Por último aparecerían aquellos hongos capaces de utilizar los metabolitos finales y más resistentes del sustrato, entre los que destacan cepas de Microsporum gypseum y Trichophyton ajelloi.

De Vries ( 377 ) observó crecimiento de algunos hongos sobre queratina, tratándose de especies clásicamente consideradas como no queratinofílicas que formaban estrechas perforaciones de aproximadamente 1  $\mu$  de diámetro en la corteza del pelo, en situación perpendicular a su eje.

English ( 132 ) estableció cinco grupos en función del grado de crecimiento y ataque de la queratina. De los 25 géneros (33 especies) de Ascomycetes, Hyphomycetes y Phycomycetes, únicamente dos (Candida albicans y Geotrichum candidum) no fueron capaces de utilizar ningún sustrato queratinizado como medio de crecimiento.

En trabajos realizados por otros autores se señala también el aislamiento de otros géneros no considerados como dermatofitos ni queratinofílicos, utilizando la técnica de Vanbreuseghem ( 371 ).

Alayeto y cols. ( 11 ) indican el aislamiento de Penicillium,

Alternaria, Aspergillus, Paecilomyces y Verticillum.

Guarro y cols. ( 164 ) aislaron también: Fusarium, Penicillium, Alternaria, Aspergillus, Mucor, Pestalotia, Acremonium, Paecilomyces y Scopulariopsis.

Calvo y cols. ( 68 ) destacan un elevado porcentaje de Cephalosporium, Penicillium, Mucor, Alternaria y Cladosporium entre otros.

Mercantini y cols. ( 253,254 ) mencionan el aislamiento de Diheterospora, Paecilomyces, Cephalosporium, Fusarium, Geotrichum, Penicillium, Aspergillus, Gliocladium, Rhinocladiella, Trichothecium, Scopulariopsis, Alternaria y Rhizopus.

Piontelli y Caretta ( 304 ) añaden a la lista anterior los géneros Botryotrichum, Humicola, Mucor y Stemphylium.

Caretta y del Frate ( 80 ) señalan el aislamiento de Botryotrichum, Diheterospora y Penicillium.

Coincidiendo con los resultados anteriormente expuestos, en el estudio, objeto de la Tesis, los géneros aislados mayoritariamente además de Trichophyton, Microsporium y Chrysosporium fueron: Scopulariopsis, Penicillium, Alternaria y Geotrichum (TABLA nº 36 ).

Al realizar el análisis estadístico para comparar la frecuencia de aparición de cada uno de los géneros y especies aislados de las muestras de suelos de explotaciones de vacas, cerdos, conejos y gallinas, en las que se aislaron hongos queratinofílicos, no se observaron diferencias significativas.

Las especies mayoritariamente aisladas, además de las relativas a los géneros Trichophyton, Microsporum y Chrysosporium, comentadas anteriormente, han sido las siguientes: Scopulariopsis brevicaulis, S. candida, Penicillium martensii, Alternaria alternata y Geotrichum candidum.

#### 6.5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL PRESENTE EN EL HABITAT DE LOS ANIMALES INVESTIGADOS

Algunos autores han intentado establecer una relación entre la micoflora presente en diversos hábitats de explotaciones animales ( 81, 156, 191, 233, 262, 303 ).

Pinello y cols. ( 303 ) estudiaron la micoflora presente en el aire y camas de una explotación aviar con el fin de correlacionarla con la micoflora aislada de diversos tejidos.

En este estudio señalan que los géneros Scopulariopsis, Penicillium, Aspergillus y Petriella son los más frecuentes en el aire y en las camas, aislándolos asimismo de pulmones, hígao-

do o cerebro de los animales.

Hubálek y cols. ( 191 ) comparan la micoflora aislada en el pelo y en distintos órganos de pequeños mamíferos salvajes, encontrando en general los mismos géneros en ambos hábitats aunque la incidencia sea distinta.

Lovett y cols. ( 233 ) comparan la frecuencia de aislamiento de los hongos presentes en el pienso y en la cama de una explotación aviar, aislando mayor número de géneros en la cama que en el pienso y encontrando concordancias en los géneros mayoritarios.

Caretta y cols. ( 81 ) estudiando la presencia de hongos queratinofílicos en el pelo de vacas, suelo de la explotación, excrementos y forraje, aislan algunas especies en más de un hábitat aunque con distinta incidencia, mientras que otras se aislan sólo en uno de los hábitats investigados.

Moreau (262) al investigar la micoflora presente en la atmósfera y piensos de una explotación porcina, señala que la micoflora atmosférica es un reflejo cualitativo y cuantitativo de los hongos presentes en los piensos.

González Cabo ( 156 ) estudia la relación existente entre la micoflora presente en la atmósfera, aparato respiratorio y pelo de conejos e indica que no encontró diferencias significa-

tivas en la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros a excepción de Cladosporium, más frecuente en el aire, Paecilomyces, aislado mayoritariamente del aparato respiratorio y Scopulariopsis y Mucor más frecuentes en el pelo.

Al comparar la frecuencia de aparición de los distintos géneros aislados en todas las muestras investigadas a lo largo del presente estudio (TABLA nº 38 ) se observaron diferencias significativas en los géneros Alternaria, Aphanocladium, Aspergillus, Candida, Chrysosporium, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Scopulariopsis y Ulocladium. También se observaron diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento de micelios estériles dematiáceos. En todos los casos el nivel de confianza fue del 99%, a excepción del género Rhizopus que fue del 95%.

Aunque la mayoría de los hongos podían desarrollarse en todos los sustratos estudiados, estas diferencias indican que existen uno o unos hábitats preferentes.

Los géneros Alternaria, Cladosporium, Epicoccum y Ulocladium se aislaron con mayor frecuencia de la atmósfera que de la superficie del animal, de los alimentos y del suelo.

El género Aphanocladium, por el contrario, presentó una frecuencia de aislamiento de la atmósfera y de los alimentos, muy similar y superior en ambos casos a la frecuencia de aparición

observada de la superficie del animal (pelos o plumas) y del suelo.

Aspergillus y Penicillium fueron los dos géneros aislados de forma mayoritaria en todas las muestras estudiadas. Se observaron diferencias significativas ya que comparativamente el género Penicillium, se aisló con menor frecuencia del pelo y plumas de los animales y el género Aspergillus en mayor porcentaje de muestras de aire y alimentos que de pelos, plumas y suelos.

El género Candida presentó menor incidencia en las muestras de pelos y plumas de los animales y el género Fusarium apareció de forma mayoritaria en la atmósfera y en las muestras de alimentos.

Los Phycomycetes aislados (Absidia, Circinella, Mucor y Rhizopus) se encuentran distribuidos en todos los hábitats o sustratos estudiados, pero se observan diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento del género Mucor, con una mayor incidencia en la atmósfera y el animal y del género Rhizopus en los alimentos.

Cepas de Trichophyton, Microsporum y Chrysosporium se aislaron básicamente del suelo, aunque algunas cepas de este último género se aislaron también de la atmósfera.

El género Scopulariopsis que como ya hemos comentado fue el



género mayoritariamente aislado siguiendo la técnica de Vanbreuseghem, se detectó fundamentalmente en el suelo y con menor incidencia en la atmósfera.

Para cada explotación estudiada se consideró de interés destacar aquellas especies que se aislaron como mínimo en dos de los hábitats o sustratos estudiados, demostrándose así la fácil dispersión de la mayoría de los hongos en la atmósfera y su capacidad de desarrollarse en diversos sustratos. Por su inespecificidad, no se han considerado las coincidencias halladas en el caso de los micelios estériles.

#### 6.5.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES VACUNAS

En diecinueve de las veinte explotaciones vacunas estudiadas se han aislado 36 especies como mínimo en dos de los hábitats estudiados (TABLAS nº 40 a 58 ).

Las más frecuentes fueron: Absidia corymbifera, Alternaria alternata, Aspergillus fumigatus, Penicillium viridicatum, Aspergillus tubingensis y Fusarium oxysporum.

Alternaria alternata y Absidia corymbifera se aislaron principalmente del aire y pelo de los animales.



Aspergillus fumigatus se aisló mayoritariamente en el aire y pelo y Fusarium oxysporum del aire y pienso.

En las explotaciones núms. 14 y 15 (TABLAS núms. 42 y 43), Aspergillus fumigatus se aisló a la vez en todos los hábitats estudiados: aire, pelo, pienso y suelo.

Absidia corymbifera en las explotaciones núms. 73 y 81 (TABLAS núms. 52 y 57 ) se aisló en todos los hábitats estudiados: aire, pelo y pienso.

#### 6.5.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES DE CERDOS

En las veinte explotaciones porcinas investigadas, se han obtenido como mínimo en dos de los hábitats estudiados, 24 especies distintas (TABLAS nº 60 a 79 ). Las más frecuentes fueron Aphanocladium album, Aspergillus flavus, A. fumigatus, Candida famata y Fusarium oxysporum que se aislaron fundamentalmente del aire y del pienso.

En la explotación nº 52 (TABLA nº 75 ) se aisló en todos los hábitats investigados (aire, pelo y pienso) la especie Absidia corymbifera.

Candida famata en las explotaciones núms. 52 y 59 (TABLAS núms

75 y 79 ), se aisló conjuntamente del aire, pelo y pienos al igual que C. lusitaniae en la explotación nº 54 (TABLA nº 77).

Aspergillus flavus se identificó en la explotación nº 21 (TABLA nº 64 ) en todos los hábitats estudiados (aire, pelo y pienso) y lo mismo se observó en la explotación nº 22 (TABLA nº 65 ) con Aspergillus fumigatus.

En la explotación nº 36 (TABLA nº 69) se aisló en todos los hábitats investigados (aire, pelo y pienso) la especie Fusarium oxysporum, al igual que Mucor racemosus en la explotación nº 50 (TABLA nº 73 ).

En la explotación nº 2 (TABLA nº 60 ) Penicillium chrysogenum se aisló del aire, pelo, pienso y suelo.

### 6.5.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES DE CONEJOS

En catorce de las quince explotaciones cunícolas estudiadas, se aislaron en dos hábitats como mínimo 31 especies distintas (TABLAS nº 81 a 94 ). Las más frecuentes fueron Alternaria alternata y Penicillium chrysogenum.

A. alternata, se aisló fundamentalmente del aire y pelo de los animales, en tanto que P. chrysogenum se detectó con mayor

frecuencia en el pienso y pelo de los animales.

Aspergillus fumigatus en las explotaciones núms. 16 y 20 (TABLAS núms. 81 y 82) se aisló en todos los hábitats estudiados.

En la explotación nº 28 (TABLA nº 83) del aire, pelo, pienso y suelo se aisló Geotrichum candidum.

En la explotación nº 63 (TABLA nº 88), Mucor plumbeus y Trichothecium roseum se aislaron en todos los hábitats estudiados: aire, pelo, piensos y suelo.

#### 6.5.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES DE GALLINAS

En todas las muestras de explotaciones de gallinas se aislaron en dos hábitats como mínimo 27 especies distintas (TABLAS núms 96 a 110). Las más frecuentes fueron Candida famata, Aphanocladium album y Penicillium chrysogenum.

C. famata y P. chrysogenum se aislaron fundamentalmente de la atmósfera, pienso y suelo y A. album de aire, plumas y pienso.

C. famata en las explotaciones núms. 40, 61 y 78 (TABLAS núms 103, 106 y 110), se aisló de los cuatro hábitats estudiados

(aire, plumas, pienso y suelo). La misma coincidencia se observó en la explotación nº 61 (TABLA nº 106) en el caso de A. album y en las explotaciones núms. 25 y 30 (TABLAS núms. 100 y 101) en el de P. chrysogenum.

En la explotación nº 65 (TABLA nº 108) P. fellutanum, se aisló también en todos los hábitats estudiados.

#### 6.5.5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES DE OVEJAS

En las tres explotaciones de ovejas estudiadas se aislaron ocho especies distintas como mínimo en dos de los hábitats estudiados (TABLAS núms. 112a 114). Las más frecuentes fueron Absidia corymbifera y Candida famata. Esta última se aisló siempre del aire, pienso y suelo.

Ninguna de las especies halladas pudo aislarse a la vez en todos los hábitats estudiados.

#### 6.5.6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICOFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES DE CABRAS

En las dos granjas de cabras estudiadas se aislaron como mínimo en dos de los hábitats cuatro especies distintas (TABLAS núms

116 y 117), siendo las más frecuentes Alternaria alternata y Cladosporium herbarum.

Ninguna de las especies encontradas pudo aislarse a la vez en todos los hábitats estudiados.

### 6,5,7, DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA MICROFLORA TOTAL DE LAS EXPLOTACIONES DE CABALLO Y PALOMA

En la explotación de caballos estudiada se aislaron como mínimo en dos de los hábitats estudiados (TABLA nº 111) nueve especies diferentes pero ninguna de ellas pudo aislarse a la vez en todos los hábitats estudiados.

En la explotación de palomas estudiada se aislaron como mínimo en dos de los hábitats estudiados (TABLA nº 121 ) seis especies distintas. Únicamente Alternaria alternata se aisló a la vez del aire, plumas, pienso y suelo.

## 6.6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD TOXIGENICA DE LAS CEPAS DEL GRUPO ASPERGILLUS FLAVUS

### 6.6.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO YES

El medio YES descrito por Davis y cols. en 1966 (115) es uno de los medios semisintéticos más utilizados para la producción de aflatoxinas ( 25, 56, 57, 59, 167, 195, 226, 273, 290, 331, 332, 349, 353, 366, 380 ).

Según Davis y cols. (115) el pH inicial del medio de cultivo, no determina ninguna influencia en la elaboración de aflatoxinas, aunque la mayor producción de las mismas se acompaña de un pH final, de aproximadamente 4.

Park (290) utilizó el medio YES a un pH inicial de 6.6 y Huynh (195) a pH 6. Bullerman ( 59 ) señala que el pH inicial puede oscilar entre 5 y 6.5 y Tsai ( 366 ), propone la utilización de este medio a pH 5.5.

Sharma y cols. ( 345 ) demostraron que el crecimiento total del hongo es independiente del tamaño del inóculo, observando un incremento gradual en la producción de aflatoxinas al disminuir la cantidad de inóculo. Cuando el inóculo en el matraz es superior a  $10^3$  conidios, la curva de producción de toxinas es bifásica

con un máximo al noveno y catorceavo día. Cuando el inóculo es inferior a  $10^6$  conidios, la curva de elaboración es monofásica y el valor máximo se obtiene únicamente a los 14 días. El medio de cultivo utilizado por Sharma y cols. (345) es un medio de composición definida.

La concentración media de conidios por matraz, citada por la mayoría de autores (25, 59, 226, 349, 353) es del orden de  $10^6$ , aunque algunos investigadores mencionan inóculos más elevados (331, 380) o inferiores (290, 366).

Schroeder y Hein (337) afirman que la temperatura es el factor más importante en la actividad metabólica de los hongos. Por este motivo se han realizado diversos estudios sobre el efecto que la temperatura ejerce en la producción de aflatoxinas.

Jarvis (201) indica que a temperaturas inferiores a  $13^{\circ}\text{C}$  y superiores a  $42^{\circ}\text{C}$  no se elaboran aflatoxinas. Schroeder y Hein (337) establecen que la temperatura óptima se encuentra entre  $20^{\circ}\text{C}$  y  $35^{\circ}\text{C}$ , por lo que diversos autores proponen como idónea la temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  (56, 59, 115, 244, 290, 366). Otros investigadores, sin embargo señalan como temperatura más adecuada la de  $28^{\circ}\text{C}$ - $29^{\circ}\text{C}$  (125, 195, 267, 333, 353, 380).

El tiempo necesario para obtener la máxima producción de aflatoxina está relacionado con la temperatura y asimismo depende del medio de cultivo empleado.



Los autores que proponen la utilización del medio YES, indican tiempos de incubación variables: 7 días (226,353 ), 10 días ( 56,290,380 ), 12 días ( 115,273,331 ), 13 días ( 25 ), 14 días ( 57,59,167,195 ) y 15 días ( 349 ).

Otro factor considerado es la conveniencia de realizar la incubación del cultivo de forma estática o en agitación. Hayes ( 175 ) obtiene buenos resultados, tanto de formación de micelio como de producción de aflatoxinas, sometiendo los cultivos a agitación, sin embargo, otros autores, indican que por este método se consigue un incremento en la producción de micelio, pero que la máxima cantidad de aflatoxinas se obtiene en cultivos estáticos. ( 115,133,167,247,297,313,350 ).

También se ha estudiado el efecto que produce la luz sobre la formación de aflatoxinas. Los estudios realizados por Bennett y cols. ( 31,32 ) indican que se obtienen mejores resultados, realizando la incubación de los cultivos en oscuridad.

En base a los datos aportados por la bibliografía se ha realizado el cultivo de las cepas en el medio YES (pH inicial = 5.5) en ausencia de luz. El inóculo fue del orden de  $10^6$  conidios por matraz, incubándose a 28°C durante 14 días, en cultivo estático .



#### 6.6.1.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO CLO- ROFORMICO

A lo largo de nuestro estudio y siguiendo las condiciones de cultivo y extracción citadas en el apartado 4.4.1. se ha observado que sólo cinco cepas (13.5%) del grupo Aspergillus flavus ensayadas son productoras de aflatoxinas. Dos de ellas fueron aisladas de piensos de vacas (81t y 82n), una de piensos para cerdos (2i), una de piensos para gallinas (4x) y una de pienso para caballo (17 l).

Este porcentaje es relativamente bajo, si se compara con los resultados de Moreno ( 265 ) en los que un 38.9% de las cepas del grupo Aspergillus flavus aisladas de piensos compuestos para aves son productoras de aflatoxinas y Le Bars ( 223 ) quien indica que el 22% de las cepas del mismo grupo aisladas de piensos compuestos para cerdos son también capaces de elaborar aflatoxinas.

La mayoría de los estudios se han realizado a partir de materias primas destinadas a la fabricación de piensos y no con los productos elaborados. En este sentido podemos destacar los trabajos de Sanchis ( 332 ) que obtiene un 27% de cepas del grupo Aspergillus flavus, aisladas del maíz, productoras de aflatoxinas. Schroeder (337) resumen los resultados obtenidos desde 1969 hasta 1971 en distintos cereales, detectando porcen-

tajes de cepas productoras que varían desde un 20% hasta el 100%. Estas variaciones entre las cepas se suelen relacionar con el sustrato del que se aíslan y con su origen geográfico, indicándose que en general las cepas de origen tropical son más toxigénicas que las procedentes de regiones templadas ( 260 ).

Dorner y cols. ( 125 ) mencionan que la diferencia bioquímica más marcada entre Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus es que este último produce las cuatro clásicas aflatoxinas ( $B_1, B_2, G_1, G_2$ ) y A. flavus normalmente no elabora las aflatoxinas  $G_1$  y  $G_2$  .

En nuestro estudio las tres cepas de Aspergillus parasiticus ensayadas han elaborado las cuatro aflatoxinas.

Tres de las cepas de Aspergillus flavus (2i, 4x y 82n) produjeron  $B_1$  y  $G_1$  ; la cepa de A. flavus NRRL 3251 elaboró aflatoxinas  $B_1, B_2$  y  $G_1$  ; la cepa A. flavus NRRL 6412 produjo aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  y dos cepas (171 y A. flavus NRRL 6540) fueron capaces únicamente de elaborar aflatoxina  $B_1$  .

Masimango y cols. ( 245 ) y Bean y Fernando ( 29 ) detectan la producción tanto de aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  como de  $B_1$  y  $G_1$ , de  $B_1, B_2$  y  $G_1$  , y de  $B_1, B_2, G_1$  y  $G_2$  por parte de las distintas cepas de Aspergillus flavus, estudiadas. Lillard ( 226 ) detecta tres cepas de Aspergillus flavus productoras

de las cuatro aflatoxinas y Gosh y Häggblom ( 148 ) utilizan en sus estudios una cepa de Aspergillus flavus productora de las cuatro aflatoxinas B<sub>1</sub> , B<sub>2</sub> , G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>.

Bajo el punto de vista cuantitativo, la aflatoxina producida en mayor concentración por todas las cepas investigadas fue la B<sub>1</sub>, excepto en el caso de la cepa de Aspergillus parasiticus NRRL 3145 y la de Aspergillus flavus 4x que elaboraron una mayor concentración de aflatoxina G<sub>1</sub>. Generalmente, las concentraciones de aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> elaboradas son bajas en comparación con las detectadas de B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>. Considerando las cepas de Aspergillus parasiticus productoras de las cuatro aflatoxinas, la cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> representan aproximadamente el 95-98% del total de aflatoxinas elaboradas.

#### 6.6.1.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS ENSAYOS REALIZADOS CON EL EXTRACTO CRUDO Y EL MICELIO

##### 6.6.1.2.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA MEDICION DEL PH Y DEL PESO SECO DEL MICELIO

El valor medio del pH de las diez cepas productoras de aflatoxinas fue de 6.175 no observándose diferencias significativas con la media del pH alcanzado por las cepas no productoras (6.192) (TABLA nº 124).

Davis y cols. ( 115 ) indican que la mayor producción de aflatoxinas se alcanza en cultivos que tengan aproximadamente un pH final de 4.

En nuestro estudio, el pH del medio de cultivo correspondiente a las cepas que mayor concentración de aflatoxinas elaboraron, osciló entre 4.40 y 6.02 y el pH del medio de cultivo de las cepas que produjeron una menor concentración de aflatoxinas osciló entre 5.58 y 8.40 ( GRAFICA nº 10 ).

El valor medio del peso seco del micelio obtenido en el caso de las cepas productoras de aflatoxinas fue ligeramente inferior (1388 mg) al obtenido en las cepas no productoras (1448 mg), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa al realizar al análisis de la varianza.

Tanto en el caso de las cepas productoras como no productoras de aflatoxinas se encontró una correlación negativa entre el pH final y el peso seco del micelio (GRAFICAS núms. 8 y 9 ) hecho que también se deduce de los estudios de Masimango ( 244 ).

#### 6.6.1.2.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LAS AFLATOXINAS DETECTADAS EN EL EXTRACTO CRUDO

En 1984 Tsai y cols. ( 366 ) proponen un método simple para la

producción y cuantificación de aflatoxinas en medio de cultivo líquido, depositando directamente el extracto crudo obtenido del desarrollo de las cepas en medio YES, sin necesidad de realizar ningún proceso de extracción. Estos autores no observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos con este método y los hallados tras realizar una extracción clorofórmica. La misma técnica fue citada por Bullerman en 1985 ( 59 ).

En ninguna de las investigaciones citadas ( 59,366 ) se especifica el límite de detección propuesto por este método.

A lo largo de nuestra investigación no se han detectado al ensayar directamente el extracto crudo, algunas de las aflatoxinas elaboradas y puestas de manifiesto en el proceso de extracción (TABLA nº 125 ), especialmente cuando éstas se encuentran en concentraciones relativamente bajas. La cepa Aspergillus flavus NRRL 6142 que elaboró 200 µg/l de aflatoxina B<sub>1</sub> fue detectada por este método, pero no así tres cepas que fueron capaces de producir 200 µg/l (2i,171 y 82n) ni la cepa 4x que elaboró 600 µg/l.

En cuanto a la aflatoxinas B<sub>2</sub>, se detectó en todos los casos, a excepción de la cepa Aspergillus flavus NRRL 6412 que la produjo en cantidades muy pequeñas (5.5 µg/l).

La aflatoxina G<sub>1</sub> tampoco se detectó en cuatro de las cepas

que la habían elaborado a concentraciones del orden de 66.7; 133.3; 266.7 y 800 µg/l.

Las tres cepas productoras de aflatoxina G<sub>2</sub> fueron detectadas por este método ya que su concentración era alta (800; 2400 y 4800 µg/l).

A partir de los resultados obtenidos, consideramos que esta técnica es útil por su sencillez y rápida aplicación, pero puede dejar de detectar algunas aflatoxinas que no hayan sido elaboradas en gran cantidad. Debe tenerse en cuenta además que al no realizarse ninguna extracción, otros metabolitos secundarios pueden interferir y enmascarar los resultados obtenidos.

#### 6.6.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO REALIZADO CON LOS MEDIOS DE CULTIVO APA Y CAM

Los primeros métodos para la rápida detección de cepas productoras de aflatoxinas fueron propuestos en el año 1965 (375) y se basan fundamentalmente en el diseño de medios de cultivo que favorezcan la elaboración y acumulación de estos metabolitos y asimismo permitan detectar fluorescencia azul alrededor de las colonias cuando se examinan a la luz ultravioleta a 360 nm. A pesar de ser una metodología muy sencilla, no ha alcanzado la difusión que parecía deducirse sus caracte-

rísticas y utilidad ( 265 ).

En el año 1970, Hara y cols. ( 172 ) describieron el medio APA cuya composición está basada en una adecuada concentración de sales y en la adición de "corn steep liquor" que estimula la producción de aflatoxinas ( 334 ). Este mismo medio de cultivo ha sido utilizado por diversos autores ( 104, 202, 230, 265, 316, 330, 332, 353, 385 ).

En 1976, Lin y Dianese ( 229 ) describió el "coconut agar medium", con la misma composición que el medio APA, pero sustituyendo el "corn steep liquor" por extracto fresco de coco que es un buen sustrato para la producción de aflatoxinas ( 16 ). Este medio de cultivo ha sido empleado por algunos investigadores ( 332 ).

En 1976, Torrey y Marth ( 363 ) describieron un medio de cultivo basado en el empleo del silicagel para detectar las cepas aflatoxigénicas mediante la producción de fluorescencia azul cuando se observan las colonias desarrolladas en placas de vidrio a la luz ultravioleta.

El medio "Low salts medium" SLH, descrito por Reddy y cols. en 1971 (313), con la adición de un 2% de agar (SLA) permite determinar la presencia de cepas toxigénicas, ya que éstas producen fluorescencia azul a la luz ultravioleta, tal como indican Clevstron y cols. en 1981 ( 104 ).



### 6.6.2.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO APA

Las cepas que mostraron fluorescencia al desarrollarse en el medio APA, mostraron un diámetro de colonia menor al de las cepas no fluorescentes, siendo esta diferencia significativa con un nivel de confianza superior al 90% e inferior al 95%, sin embargo no se observaron diferencias significativas entre el diámetro que alcanzaron las cepas productoras de aflatoxinas en este medio de cultivo, presentaran o no fluorescencia, con el diámetro de las cepas no productoras de aflatoxinas.

Moreno (265) cita un diámetro medio de las colonias desarrolladas en el medio APA de 37 mm, considerando el total de cepas estudiadas y un diámetro superior, 43 mm, en el caso de las cepas fluorescentes. En el presente estudio el diámetro medio de todas las cepas fue de 41 mm y el de las tres cepas fluorescentes, por el contrario, inferior (32 mm).

Hara y cols. (172) mencionan el diámetro observado en las dos cepas control, utilizadas también en nuestro estudio (45 mm para la cepa Aspergillus parasiticus NRRL 2999 y 50 mm para la cepa Aspergillus flavus NRRL 3251) datos que no concuerdan plenamente con los obtenidos en nuestro estudio, en el que alcanzaron diámetros de 27 y 42 mm, respectivamente.



El 30% de las cepas capaces de elaborar y acumular aflatoxinas en el medio YES presentaron fluorescencia en el medio APA. Resultados comparables han sido citados por otros investigadores ya que Moreno (265) sólo detectó por fluorescencia el 33% de las cepas toxigénicas, Sanchis y cols. (332) el 38%, Jesenska y cols. (202) entre el 54% y el 76% y Wicklow (385) el 67%. En los trabajos mencionados el sustrato utilizado como referencia para detectar las aflatoxinas fue el trigo (265), el medio YES (332), el "Karlsbad biscuits" (202) y el maíz (385).

Sanchis (332) y Jesenska (202) detectaron fluorescencia en un bajo número de cepas no productoras de aflatoxinas, en los medios de cultivo de referencia, indicando por ello que el medio APA no es específico para este grupo de metabolitos, sino que además es capaz de favorecer la producción de otras sustancias que también manifiestan fluorescencia azul a la luz ultravioleta, como son la asperopterina A y B, el flavacol y el ácido deoxihidroaspergílico (332).

A pesar de ello, los restantes estudios (265, 385) indican que el medio APA no produce falsos resultados positivos, datos que coinciden con los obtenidos en esta Tesis, a pesar del bajo número de cepas detectadas, ya que ninguna de las cepas no productoras de aflatoxinas en el medio YES permitió detectar fluorescencia en el medio APA y por el contrario todas las cepas fluorescentes elaboraron estas micotoxinas en el medio

de cultivo citado (YES).

Las cepas ensayadas por Wicklow y cols. (385) que mostraron fluorescencia en el medio APA, produjeron más de 1400 ppb de aflatoxina B<sub>1</sub> en maíz, pero dos cepas no fluorescentes elaboraron más de 3000 ppb de dicha aflatoxinas en el mismo sustrato. Del mismo modo cepas no fluorescentes en el estudio realizado por Moreno (265) elaboraron concentraciones elevadas de aflatoxina B<sub>1</sub> en trigo (hasta 40000 µg/Kg) y en nuestro trabajo la cepa 8lt (Aspergillus parasiticus) no fluorescente produjo 10800 µg/Kg de B<sub>1</sub> en el medio YES.

A partir de los resultados obtenidos, no puede afirmarse que las cepas no fluorescentes sean aquellas potencialmente poco productoras en otros medios de cultivo naturales o semi-sintéticos.

Hara y cols. (172) detectaron en la cepa Aspergillus parasiticus NRRL 2999 aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> a las concentraciones de 4600, 570, 2600 y 300 ug/Kg, respectivamente. En nuestro estudio, se han obtenido valores superiores para las aflatoxinas B<sub>1</sub> (10334.9 µg/Kg) y G<sub>1</sub> (6889.9 µg/Kg) y ligeramente inferiores para la aflatoxina B<sub>2</sub> (287.1 µg/Kg) y G<sub>2</sub> (191.4 µg/Kg).

En la cepa de Aspergillus flavus NRRL 3251 los niveles detectados por Hara y cols. (172) fueron 2700 µg/Kg de aflatoxina B<sub>1</sub>

y 570  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de aflatoxina  $B_2$  . En nuestro estudio la cepa mencionada elaboró 3523.6  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de aflatoxina  $B_1$  y 704.7  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de aflatoxina  $B_2$  (TABLA nº 128).

Wicklow y cols. ( 385 ) indican que la cepa Aspergillus flavus NRRL 6412 no produjo aflatoxinas en el medio APA y sin embargo fue capaz de elaborarlas en maíz autoclavado, datos que concuerdan con el estudio llevado a cabo con esta misma cepa, observándose que no presentaba fluorescencia ni produjo aflatoxinas en el medio APA y en cambio elaboró aflatoxinas  $B_1$  y  $B_2$  en el medio YES.

De los trabajos consultados, sólo Moreno ( 265 ) lleva a cabo una cuantificación de las aflatoxinas producidas en el medio APA, detectándose en el 45% de las cepas productoras de aflatoxinas en trigo. En nuestro estudio el medio de Hara y cols. (172) favoreció su elaboración en el 50% de las cepas productoras en el medio YES.

Moreno ( 265 ) observó que las cepas productoras en APA que no mostraron fluorescencia habían elaborado una baja concentración de aflatoxinas (48  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) datos que coinciden con los obtenidos en nuestro estudio ya que las mencionadas cepas produjeron menos de 20  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en el citado medio de cultivo.

En el medio APA todas las cepas elaboraron una menor concentración de aflatoxinas  $B_1$  ,  $B_2$  ,  $G_1$  y  $G_2$ , datos que coinciden

con los aportados por Moreno (265) a excepción de la cepa Aspergillus flavus NRRL 3251 que produjo mayor cantidad de aflatoxina B<sub>1</sub> que en el medio de referencia (medio YES). Asimismo no se detectaron algunas aflatoxinas elaboradas por las cepas al desarrollarse en el medio YES (TABLA nº 134).

La cepas Aspergillus parasiticus 8lt productora de las cuatro aflatoxinas en el medio YES sólo produjo aflatoxinas B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> en el medio APA, y la cepa Aspergillus flavus NRRL 3251 productora de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>1</sub> en el medio YES sólo elaboró aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> al desarrollarse en el medio APA.

El medio APA, por tanto, no favorece la elaboración de aflatoxinas en todas las cepas productoras de las mismas en otros medios de cultivo. Cuando la concentración elaborada en el medio APA es baja (<100 µg/Kg) no aparece fluorescencia.

#### 6.6.2.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES AL ENSAYO EN MEDIO CAM

Las cepas que mostraron fluorescencia en el medio CAM, presentaron un diámetro de colonia, inferior al de las cepas no fluorescentes, siendo estas diferencias significativas, con un nivel de confianza superior al 90% pero inferior al 95%.

Las cepas fluorescentes presentaron un color anaranjado ama-

rillante en el reverso, que tal como indica Lin y Dianese ( 229 ) podría servir para identificar las cepas aflatoxigénicas incluso sin necesidad de utilizar la luz ultravioleta.

Esta característica, sin embargo, no ha sido citada por Sanchis y cols. (332).

No se observaron diferencias significativas al comparar el diámetro de las colonias productoras de aflatoxinas en este medio, presentaran o no fluorescencia, con el diámetro de las cepas que no fueron cepas de elaborarlas.

El diámetro de las cepas desarrolladas en el medio CAM (74.5mm). fue significativamente superior al alcanzado en el medio APA (41.5mm), con un nivel de confianza del 99%.

En el 40% de las cepas productoras de aflatoxinas en el medio YES apareció fluorescencia en el medio CAM, resultado bajo en comparación con el obtenido por Sanchis y cols. ( 332 ), que detectaron mediante fluorescencia el 97% de las cepas productoras de aflatoxinas en el medio YES.

A pesar de la baja eficacia detectada, este medio de cultivo, tampoco produce falsos positivos, dado que ninguna cepa no productora de aflatoxinas en el medio YES, dió lugar a la aparición de fluorescencia en el medio CAM y todas las cepas fluorescentes elaboraron estas micotoxinas en el medio YES

(TABLA nº133). En este sentido parece mejor la utilización de este medio en lugar del APA si se tiene en cuenta además que la lectura se realiza a los siete días y en el medio descrito por HARA y cols. (172) al cabo de 10 días.

Las cepas que no mostraron fluorescencia, elaboraron concentraciones inferiores a 1500 ppm de aflatoxinas en el medio YES.

En los trabajos revisados no se menciona la extracción de las aflatoxinas elaboradas en el medio CAM, ni su cuantificación. En nuestro estudio, en este medio de cultivo se detectó el 80% de las cepas productoras en YES y la concentración elaborada fue en general superior a la producida en el medio YES, y en todos los casos muy superiores a la detectada en el medio APA. El medio CAM, favoreció la producción de aflatoxinas no detectadas en el medio YES. La cepa Aspergillus flavus NRRL 6540 productora de aflatoxina B<sub>1</sub> en el medio YES elaboró aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>1</sub> en el medio CAM (TABLA nº 134).

Aunque ni el medio APA ni el medio CAM detectan todas las cepas del grupo Aspergillus flavus productoras de aflatoxinas, al no inducir falsos resultados positivos, son útiles en la detección rápida de cepas productoras de aflatoxinas. Las cepas que den resultados negativos en estos medios deben cultivarse sobre otros sustratos naturales o semisintéticos y confirmar posteriormente mediante técnicas analíticas la producción o no de aflatoxinas.



### 6.6.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LA DETECCION DE AFLATOXINAS POR LA TECNICA DE FILTENBORG

Para la detección de cepas aflatoxigénicas Filtenborg y Frisvad describieron en 1980 (141) una técnica basada en el hecho de que las toxinas extracelulares difunden en el sustrato y pueden detectarse al depositar discos de cultivo de pequeño diámetro en cromatoplasmas y realizando un proceso de cromatografía, después de retirarlos.

Este método ha sido utilizado por Frisvad en 1981 (143) en un intento de facilitar la clasificación de las cepas del género Penicillium de la Sección Asimétrica, en base a la producción de micotoxinas.

En 1983, Frisvad y Filtenborg (144) emplearon esta técnica para clasificar cepas del género Penicillium terverticiladas.

Mujica y cols. (273) ensayaron el método de Filtenborg, comparándolo con los resultados obtenidos en el medio Yes, observando que en una cepa productora de aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en medio líquido (YES) sólo se detectaba la presencia de aflatoxina B<sub>1</sub>, mediante la técnica de Filtenborg y no detectaron aflatoxinas en el caso de una cepa productora de B<sub>1</sub>

ni en una cepa que elaboró aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> en el medio YES.

En el citado estudio, no se menciona la concentración de aflatoxinas en ninguno de los medios de cultivo utilizados.

Carballo y Miguel ( 77 ) siguieron la metodología de Filtenborg comparándola con la producción de micotoxinas al desarrollarse las cepas en arroz y maíz troceados. Ensayaron la capacidad toxigénica de dos cepas de Aspergillus flavus aisladas de trigo y productoras de aflatoxinas B<sub>1</sub> en arroz y maíz y que tras el cultivo de las mismas en el medio GYA ( agar glucosa extracto de levadura ) fueron también detectadas mediante la técnica de Filtenborg. Dichas cepas elaboraron concentraciones del orden de 56000 y 140000 ug/Kg en arroz y 56000 y 100000 ug/Kg en maíz, respectivamente.

A partir de estos estudios, los autores citados, concluyen que la técnica es válida en el caso de las micotoxinas extracelulares. En el mencionado estudio no se cita la concentración de aflatoxinas elaborada por las cepas en estudio en el medio GYA (77).

Filtenborg ( 141 ) indica como límite de detección para la aflatoxina B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> : 0.1 ppm. Debe señalarse que no hace referencia a las aflatoxinas B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> y en el caso de la cepa Aspergillus parasiticus NRRL 2999, que produce los cuatro tipos de aflatoxi-



nas, sólo indican la detección de las aflatoxinas  $B_1$  y  $G_1$ . En nuestro estudio hemos considerado el mismo límite de detección para las cuatro aflatoxinas.

En base a este límite y conociendo la concentración de aflatoxinas elaboradas por las cepas en estudio en los medios APA y CAM, se ha evaluado la eficacia del método para detectar cepas toxigénicas.

Observando los resultados obtenidos con el método APA, que se resumen en la TABLA nº 138, se puede deducir que el límite propuesto es correcto ya que no se ha detectado ninguna aflatoxina elaborada a una concentración inferior a 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y sí, todas las elaboradas a una concentración superior al límite mencionado.

Por el contrario, en el medio CAM (TABLA nº 139) no se han detectado cuatro cepas productoras de aflatoxina  $B_1$  a una concentración superior a 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (526.6; 570.5; 1582.8 y 3182.7 respectivamente) y tampoco se ha detectado la producción de aflatoxina  $G_1$  en dos cepas que elaboraron 175.5 y 175.9  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  respectivamente de esta aflatoxina.

Dado el bajo número de cepas productoras, el análisis estadístico mediante el "test" exacto de Fisher (355) se ha realizado con los datos obtenidos conjuntamente en los medios de cultivo (TABLA nº 140).

En el caso de la aflatoxina B<sub>1</sub> no se observaron diferencias significativas entre los dos márgenes establecidos, ya que el número de cepas con una concentración superior a 100 µg/Kg que no fueron detectadas es bastante elevado (36.36%), por lo que consideramos que el límite para la aflatoxina B<sub>1</sub> debería ser superior a 0.1 ppm según los resultados obtenidos en nuestra investigación.

Para la aflatoxinas B<sub>2</sub> se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% y a pesar de no haber podido llevar a cabo análisis estadísticos para la aflatoxinas G<sub>2</sub> dado el número de cepas ensayadas, puede considerarse válido el límite de detección de 100 µg/Kg.

A pesar de que dos cepas no fueron detectadas como productoras de aflatoxinas, habiéndose demostrado su capacidad de elaborar concentraciones de G<sub>1</sub> superiores a 100 µg/Kg, se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%, entre los dos márgenes establecidos, pudiéndose considerar válido el límite fijado de 100 µg/Kg, teniendo en cuenta el número de cepas ensayadas.

#### 6.6.4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS CORRESPONDIENTES A LOS METODOS BIOLOGICOS PARA DETECTAR CEPAS CON CAPACIDAD TOXIGENICA

#### 6.6.4.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FRENTE A LARVAS DE ARTEMIA SALINA L.

La utilización de larvas de Artemia salina L. en ensayos de toxicidad se inició en la década de los años sesenta ( 52 ).

Brown y cols. en 1968 ( 52 ) describieron un bioensayo de A.salina para la aflatoxina B<sub>1</sub> . En las condiciones establecidas por los autores, una concentración de esta aflatoxina del orden de 0.5 µg/ml produjo más de un 60% de mortalidad en las larvas.

La técnica más utilizada es la de Harwig y Scott en 1971 (173) a partir de la cual se han realizado algunas modificaciones, principalmente el intervalo de tiempo en el que se realiza la lectura ( 66, 118, 122, 275, 359 ).

Como principal conclusión, después de estudiar la mortalidad ocasionada por diversos géneros de hongos miceliales sobre las larvas, todos los investigadores citados, indican que éstas son muy sensibles a los metabolitos tóxicos elaborados por las cepas en estudio, no siendo necesario para evaluar la capacidad toxigénica de las cepas, conocer los compuestos activos, ni que éstos estén purificados ( 52 ).

En los estudios realizados por Calvo y Caballé ( 66 ), con cepas

del grupo Aspergillus flavus se indica que el 40% de las cepas de Aspergillus parasiticus produjeron el 100% de mortalidad de las larvas. Suárez y cols. (359) señalan que el 95% de las cepas de Aspergillus flavus y el 92% de las de Aspergillus parasiticus estudiadas mostraron una marcada toxicidad frente a larvas de Artemia salina L. Al no mencionarse la capacidad de elaboración de aflatoxinas por las cepas investigadas, no se puede establecer una relación entre la mortalidad ocasionada y la producción de micotoxinas.

Resultados similares obtienen Sanchis y cols. (331) con cepas del grupo Aspergillus flavus, productoras de aflatoxinas al desarrollarse en medio YES, observando un porcentaje de mortalidad con los extractos metanólicos de dichos cultivos entre el 89 y 91% y de 36% con el extracto crudo.

En nuestro estudio, las cepas no productoras de aflatoxinas en el medio YES ocasionaron una mayor mortalidad de las larvas en comparación con las cepas productoras, tanto en los ensayos realizados con el extracto crudo como con el extracto acetónico. Estas diferencias fueron significativas, con un nivel de confianza entre el 90 y 95% en el caso de los extractos acetónicos.

La mortalidad ocasionada por las cepas productoras de aflatoxinas al desarrollarse en los medios APA y CAM fue superior a los obtenidos por las cepas que no elaboraron aflatoxinas en estos medios de cultivo, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente

significativas al realizar el análisis de la varianza.

Teniendo en cuenta la mortalidad ocasionada por las cuarenta y tres cepas investigadas al desarrollarse en los tres medios de cultivo estudiados, se obtuvieron diferencias significativas con un nivel de confianza del 99%, observándose un índice de mortalidad más elevado en los extractos acetónicos de los cultivos desarrollados en el medio YES, resultado que está en concordancia con los datos obtenidos por Sanchis y cols. ( 331 ) al estudiar la mortalidad ocasionada por los extractos crudos y metanólicos de los cultivos desarrollados en el medios YES.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no han sido los esperados, dado que las cepas productoras de una elevada concentración de aflatoxinas ocasionaron una mortalidad relativamente baja.

La utilización de larvas de Artemia salina L. para la detección de cepas toxigénicas es totalmente inespecífica ya que existen una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden presentar capacidad tóxica, por sí mismos o en asociación con otros, siendo difícil determinar cual es el metabolito específico al que se debe la actividad.

En este ensayo debe tenerse en cuenta además la variabilidad biológica debida a las propias larvas que pueden inducir a error en los resultados obtenidos.

Consideramos, sin embargo que la utilización de las larvas de Artemia salina L. puede servir aunque sólo sea a título orientativo para conocer la posible toxicidad de los metabolitos elaborados por una cepa fúngica.

#### 6.6.4.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA FRENTE A MICROORGANISMOS

Los ensayos microbiológicos basados en la inhibición del crecimiento bacteriano han sido propuestos por diversos autores para la detección de aflatoxinas. Burmeister y Hesselstine en 1966 (60) ensayaron la sensibilidad de 329 microorganismos (incluyendo bacterias, hongos, algas y protozoos) a la acción de las aflatoxinas empleando la técnica de la bioautografía. Dichos autores afirmaron que el estudio con un microorganismo sensible podría suplir el estudio de toxicidad en patitos de un día. La cepa Bacillus megaterium NRRL 1368 (ATCC 25848) fue la más sensible junto a B. brevis.

##### 6.6.4.2.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE WICKERHAM

El método de Wickerham ha sido citado por Raper y Thom (309) con el objeto de observar la producción de antibióticos por parte de distintas cepas del género Penicillium y otros saprófitos. Ha sido empleado para el estudio de la producción de sustancias inhibitoras elaboradas por especies de los géneros: Penicillium



(70), Aspergillus (66,69), Microsporium (67).

Recientemente Wlostowski ( 390 ) utiliza este método para observar la inhibición que diversos hongos aislados del suelo ejercen sobre una cepa de Aspergillus flavus productora de aflatoxinas. El medio utilizado por este autor es el de Czapek-Dox, en lugar de Wickerham.

Calvo y Caballé ( 66 ) citan que el 89% de las cepas del grupo Aspergillus flavus son activas frente a Staphylococcus aureus, el 79% frente a Bacillus megaterium y el 66% inhiben el crecimiento de Escherichia coli.

En nuestro estudio, por el contrario, el porcentaje de cepas activas frente a los mismos microorganismos fue inferior ( 53.5% de cepas activas frente a S. aureus y 34.9% frente a B. megaterium) y ninguna de las cepas inhibió el crecimiento de Escherichia coli.

El mayor porcentaje de cepas con capacidad inhibidora se observó frente a Bacillus subtilis (86%) y Candida albicans (72%).

#### 6.6.4.2.2. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE CAMPBELL

Este método ha sido utilizado para conocer la capacidad inhibidora de cepas de distintos microorganismos frente a bacterias, levaduras y hongos miceliares.

Entre ellos destacaremos los realizados con el género Arthrinium ( 65 ) y Penicillium ( 70 ).

#### MEDIO APA

Las cepas desarrolladas en el medio APA que elaboraron aflatoxinas en dicho medio de cultivo fueron más activas frente a Staphylococcus, Bacillus megaterium y Candida albicans que las cepas que no elaboraron estos metabolitos, observándose diferencias significativas en el caso de S. aureus (99% de confianza) y C. albicans (entre el 90 y el 95% de confianza) (TABLA nº 145, GRAFICA nº 14).

En ambos casos se observaron, asimismo, diferencias significativas al comparar el grado de inhibición desarrollado por las cepas (TABLA nº 146) con un nivel de confianza del 95%.

La inhibición observada frente a B. subtilis fue elevada tanto en el caso de las cepas productoras de aflatoxinas (80%) como en el de las que no las elaboraron en el medio APA (100%).

Un bajo porcentaje de cepas no productoras (15.8%) inhibieron el desarrollo de Escherichia coli. Este efecto no se observó en ninguna de las cepas productoras de aflatoxinas y por este motivo se detectaron diferencias significativas al comparar el grado de inhibición (TABLA nº 146) con un nivel de confianza del 95%.

Considerando todas las cepas en estudio, el microorganismo más



sensible fue Bacillus subtilis (TABLA nº 145, GRAFICA nº 14).

#### MEDIO CAM

Las cepas desarrolladas en el medio CAM productoras de aflatoxinas en dicho medio, mostraron actividad únicamente frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Bacillus megaterium, siendo el porcentaje de cepas activas frente a estos microorganismos superior al obtenido con las cepas no productoras de aflatoxinas. Estas diferencias fueron significativas con un 95% de confianza en el caso de Bacillus megaterium. El grado de inhibición desarrollado por las cepas frente a este mismo microorganismo fue también superior con un nivel de confianza entre el 90 y el 95% en el caso de las cepas productoras de aflatoxinas en el medio CAM.

El porcentaje de cepas no productoras de aflatoxinas que inhibieron el desarrollo de los microorganismos estudiados fue muy bajo, inferior al 3%, en el caso de las bacterias Gram positivas ensayadas, no observándose acción inhibidora alguna frente a Escherichia coli y Candida albicans.

Considerando todas las cepas en estudio el microorganismo más sensible fue B. megaterium, aunque como se observa en la GRAFICA nº 16 la capacidad inhibidora fue muy baja.

#### ESTUDIO COMPARATIVO

Comparando los resultados obtenidos al desarrollarse las cepas productoras de aflatoxinas en los medios APA y CAM, se observa

que el porcentaje de cepas activas frente a las bacterias Gram positivas y frente a Candida albicans son superiores en el caso de los cultivos en medio APA, siendo estas diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% en el caso de Staphylococcus aureus y Candida albicans y del 99% en el caso de Bacillus subtilis. El grado de inhibición mostrado por las cepas activas fue también superior y significativamente diferente frente a estos tres microorganismos, siendo el nivel de confianza del 95% en el caso de Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis y entre el 90 y 95% frente a Candida albicans.

El porcentaje de cepas no productoras de aflatoxinas desarrolladas en el medio APA, activas frente a los microorganismos ensayados fue superior en todos los casos a los resultados obtenidos en el medio CAM, observándose diferencias significativas con un nivel de confianza del 99% en el caso de Bacillus subtilis, B. megaterium y Candida albicans y del 95% para Escherichia coli. Considerando el grado de inhibición desarrollado por las cepas activas se observaron también diferencias significativas con un nivel de confianza del 99% frente a estos cuatro microorganismos.

Si consideramos todas las cepas estudiadas, al comparar los resultados obtenidos al desarrollarse las cepas en los medios APA y CAM, se observa que el porcentaje de cepas inhibidoras del crecimiento de los cinco microorganismos ensayados fue superior cuando éstas se desarrollaron en el medio APA, siendo estas diferencias significativas con un 99% de confianza en el caso de la actividad frente a B. subtilis, B. megaterium y C. albicans.

El bajo porcentaje de cepas activas, observado cuando éstas se desarrollaron en el medio CAM podría deberse a las características de crecimiento de las cepas en este medio de cultivo. Como ya se ha indicado anteriormente, el medio CAM favoreció el crecimiento y esporulación de todas las cepas estudiadas. Al realizar la técnica de Campbell se producía una gran dispersión de conidios por la superficie del medio de cultivo (TSA), que dificultaba la lectura de los diámetros de inhibición. Consideramos, por ello, que esta técnica no debería ser utilizada cuando los cultivos en estudio presentan una abundante esporulación.

#### 6.6.4.2.3. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR EL METODO DE LOS DISCOS

Clements en 1968 ( 102 ) propuso una técnica rápida de difusión en medio sólido, utilizando Bacillus megaterium NRRL 1368. Stott en 1975 ( 356 ) utilizó una metodología similar que permitía además una cuantificación de la patulina, ensayando su acción inhibidora sobre el desarrollo de B. megaterium.

Respecto a la sensibilidad de los microorganismos a las aflatoxinas, los resultados obtenidos son muy diversos.

Cantini y cols. ( 75 ) indican que las cepas de Aspergillus flavus no tienen acción inhibidora frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Candida albicans y sólo algunas cepas son activas frente a Bacillus subtilis.

El 95% de las cepas de Aspergillus flavus y el 54% de las cepas de Aspergillus parasiticus ensayadas por Suárez y cols. (359) mostraron acción inhibitoria del desarrollo de Bacillus megaterium.

Calvo y Caballé ( 66 ) por el contrario, indican que el 20% de las cepas del grupo Aspergillus flavus son activas frente a Staphylococcus aureus, el 27.14% frente a Bacillus megaterium y el 28.5% frente a Escherichia coli.

Los microorganismos Gram positivos y en especial distintas especies del género Bacillus son los más sensibles a la acción de aflatoxinas ( 50, 56, 60, 102 ).

Algunos autores comparan los resultados obtenidos utilizando esta técnica con la toxicidad provocada por los mismos extractos sobre embriones de pollo ( 56,271), indicando que existe en muchos casos una falta de correlación en los resultados obtenidos.

Suárez y cols. ( 359 ) al comparar la sensibilidad de Bacillus megaterium y de larvas de Artemia salina L. a los extractos obtenidos de cepas aisladas de almidones indican que son más sensibles las larvas.

#### EXTRACTO CRUDO

El porcentaje de extractos crudos de las cepas no productoras, activos frente a bacterias fue superior al porcentaje de extractos

crudos de las cepas toxigénicas, observándose diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% entre el porcentaje de extractos crudos activos frente a Escherichia coli y Staphylococcus aureus (TABLA nº 152 , GRAFICA nº 21 ). Dado que ningún extracto crudo procedente de las cepas aflatoxigénicas inhibió el desarrollo de estos dos microorganismos al comparar el grado de inhibición producido, se observaron en este caso diferencias significativas con un nivel de confianza del 99% (TABLA nº 153).

Considerando los extractos crudos obtenidos al cultivar todas las cepas en estudio en el medio YES, se observa que Escherichia coli fue el microorganismo más sensible, aunque debe considerarse que el porcentaje de extractos que produjeron inhibición del desarrollo de las bacterias estudiadas fue bajo, y que en ningún caso se observó acción inhibidora alguna sobre Candida albicans (TABLA nº 152, GRAFICA nº 20 ).

#### EXTRACTO CLOROFORMICO

El porcentaje de extractos clorofórmicos obtenidos a partir del cultivo de las cepas productoras de aflatoxinas en el medio YES activos frente a Escherichia coli, Bacillus subtilis y B. megaterium, fue superior al porcentaje de extractos clorofórmicos activos, obtenidos a partir de las cepas no aflatoxigénicas, observándose diferencias significativas con un nivel de confianza del 95% en el caso de Bacillus megaterium (TABLA nº 154, GRAFICA nº 23).

Dado que ningún extracto clorofórmico obtenido a partir de las cepas aflatoxigénicas presentó acción inhibitoria frente a Staphylococcus aureus, al comparar el grado de inhibición producido se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza entre el 90 y el 95% (TABLA nº 155).

Considerando los extractos clorofórmicos obtenidos al cultivar todas las cepas en estudio en el medio YES, se observa que el microorganismo más sensible fue Bacillus subtilis y que en ningún caso se detectó acción inhibitoria alguna frente a Candida albicans (TABLA nº 154, GRAFICA nº 22 ).

#### ESTUDIO COMPARATIVO

Al comparar los resultados obtenidos con los extractos crudos y clorofórmicos procedentes del cultivo de las cepas productoras de aflatoxinas se observa que el porcentaje de extractos clorofórmicos activos frente a Escherichia coli, Bacillus subtilis y B. megaterium es superior al porcentaje de extractos crudos activos, siendo esta diferencia significativa en el caso de Bacillus subtilis con un nivel de confianza entre el 90 y el 95% (TABLA nº 156, GRAFICA nº 25a). El mismo resultado se obtiene al comparar el grado de inhibición (TABLA nº 157).

En el caso de las cepas no aflatoxigénicas se observó que el porcentaje de extractos crudos activos frente a Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Bacillus megaterium es superior al porcen-



taje de extractos clorofórmicos activos, siendo esta diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% en el caso de Escherichia coli y Staphylococcus aureus ( TABLA nº 156, GRAFICA nº 25b). Al comparar el grado de inhibición obtenido, se observaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 99% en el caso de Escherichia coli y entre el 90 y el 95% para Staphylococcus aureus (TABLA nº 158).

Considerando los resultados obtenidos con los extractos crudos y clorofórmicos procedentes del cultivo de todas las cepas en estudio en el medio YES, se observa que el porcentaje de extractos crudos activos frente a Escherichia coli y Staphylococcus aureus es superior al porcentaje de extractos clorofórmicos activos, siendo esta diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% en el caso de Staphylococcus aureus.

En cambio el porcentaje de extractos clorofórmicos activos frente a Bacillus subtilis y B. megaterium es superior al porcentaje de extractos crudos activos, siendo esta diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% en el caso de Bacillus subtilis (TABLA nº 156 , GRAFICA nº 24 ).

## 7. CONCLUSIONES



Como resumen de los resultados obtenidos y a modo de conclusiones podemos señalar:

- 1.- El contenido fúngico de las muestras de piensos para conejos, en gránulos, fue significativamente inferior al de las muestras de piensos destinados a vacas, gallinas o cerdos, en forma de harinas.
- 2.- Al comparar la frecuencia de aislamiento de los distintos géneros identificados en todas las muestras, se observaron diferencias significativas en Alternaria, Aphanocladium, Aspergillus, Candida, Chrysosporium, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Scopulariopsis y Ulocladium. Estos resultados permiten afirmar que aún cuando la mayoría de hongos pueden desarrollarse en todos los sustratos, existen para algunos géneros hábitats preferentes.
- 3.- El género Aphanocladium que se sitúa entre los diez mayoritariamente aislados en nuestro estudio, tiene una incidencia escasa o nula en los trabajos sobre micoflora revisados.
- 4.- Candida famata, Aspergillus fumigatus, Absidia corymbifera y Penicillium chrysogenum fueron las especies que con mayor frecuencia pudieron aislarse de todos los hábitats estudiados en una misma explotación.

- 5.- La presencia en la atmósfera y pelo de conejos sanos de Arthroderma teleomorfo de Trichophyton mentagrophytes, corrobora su capacidad de dispersión y la viabilidad de sus estructuras de reproducción y determina que en algunas ocasiones los animales sanos puedan comportarse como portadores.
  
- 6.- Del total de cepas del grupo Aspergillus flavus aisladas de alimentos, tan sólo en el 13.5% pudo detectarse la producción de aflatoxinas, tras su desarrollo en el medio YES.
  
- 7.- Se observó una correlación negativa entre el pH final del medio de cultivo y el peso seco del micelio tras el desarrollo de todas las cepas del grupo Aspergillus flavus estudiadas en el medio YES.
  
- 8.- La cromatografía en capa fina del extracto crudo no permite detectar aquellas aflatoxinas elaboradas a una baja concentración. Asimismo debe tenerse en cuenta que al no realizarse extracción alguna, otros metabolitos secundarios pueden interferir en los resultados obtenidos.
  
- 9.- Aunque ni el medio APA ni el medio CAM permiten detectar mediante fluorescencia todas las cepas del grupo Aspergillus flavus productoras de aflatoxinas, al no inducir falsos resultados positivos, son útiles para la detección

rápida de cepas aflatoxigénicas. Las cepas que den resultados negativos en estos medios, deben cultivarse sobre otros sustratos naturales o semisintéticos y confirmar posteriormente la producción o no de micotoxinas mediante técnicas analíticas.

10.- La concentración de aflatoxinas elaboradas en el medio CAM fue en general superior a la producida por las mismas cepas en el medio YES, y en ambos casos muy superiores a las detectadas en el medio APA.

11.- Mediante la técnica de Filtenborg se detectan las cepas productoras de aflatoxinas, siempre que las concentraciones elaboradas sean superiores a 0.1 ppm, aunque consideramos que para la aflatoxina B<sub>1</sub> el límite de detección debería ser más elevado.

12.- Dada la variabilidad biológica y la detección inespecífica de metabolitos secundarios a través de ensayos biológicos, consideramos que éstos sólo deberían utilizarse a título orientativo para establecer la posible capacidad toxigénica de cepas fúngicas.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABDEL-KADER, M.I.A., A.H. MOUBASHER y S.I.I. ABDEL-HAFEZ.- 1979. Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. *Mycopathologia* 68 (3): 143-147.
- 2.- AFZAL, M., R.A. CHEEMA y R.A. CHAUDHRAY.- 1979. Incidence of aflatoxins and aflatoxin producing fungi in animal feedstuffs. *Mycopathologia* 69 (3): 149-151.
- 3.- AHO, R. - 1980. Studies on fungal flora in hair from domestic and laboratory animals suspected of Dermatophytosis. I. Dermatophytes. *Acta Path. microbiol. scand. Sect. B.* 88: 79-83.
- 4.- AHO, R.- 1983. Saprophytic fungi isolated from the hair of domestic and laboratory animals with suspected dermatophytosis. *Mycopathologia* 83: 65-73.
- 5.- AINSWORTH, G.C. y P.K.C. AUSTWIK .- 1973. *Micosis de los animales*. Ed. Academia. León.
- 6.- AJELLO, L.- 1953. The dermatophyte Microsporum gypseum as a saprophyte and parasite. *J. Invest. Derm.* 21: 157-171.
- 7.- AJELLO, L., A. MANTOVANI y A. MAZZONI.- 1966. Ricerche sui funghi patogeni e cheratinofilici dei terreni dell'Emilia-Romagna. *Rivista Italiana d'Igiene* 26 (3-4): 321-330.
- 8.- AJELLO, L. y A. PADHYE.- 1974. Keratinophilic fungi of the Galapagos Islands. *Mykosen* 17 (10): 239-243.

- 9.- AJELLO, L. y A. PADHYE.- 1980. Dermatophytes and the agents of superficial mycoses. Manual of Clinical Microbiology. Ed. E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler y J.D. Truant 3ª Ed. A.S.M. Washington : 541-552.
- 10.- AKKMETELI, M.A.- 1977. Epidemiological features of the mycotoxicoses. Ann. Nutr. Alim. 31: 957-976.
- 11.- ALAYETO ORTEGA, J., J.M. RUIZ MARTIN y J.M. TORRES RODRIGUEZ.- 1985. Micoflora queratinófila aislada a partir del suelo de las instalaciones del parque zoológico de Barcelona. Rev. Iber.Micol,2 (1): 20-28.
- 12.- ALDERMAN, G.G. y E.H. MARTH.- 1974. Experimental production of aflatoxin on intact citrus fruit. J. Milk Food Technol. 37 (9): 451-456.
- 13.- ALLER, B., M.REY y A. MARTINEZ.- 1971. Estudio de la incidencia de los hongos en el aire de León durante un año. Anales de la Facultad de Veterinaria de León, 17: 13-20.
- 14.- ALOZIE; T.C., C.N. ROTOMI y B.B. OYIBO.- 1980. Production of aflatoxin by Aspergillus flavus (UBMI) in some nigerian indigenous beverages and foodstuffs. Mycopathologia 70 (2): 125-128.
- 15.- A.O.A.C.- 1980. Official Methods of Analysis. 13ª Ed. Arlington, V.A.

- 16.- ARSECULERATNE, S.N., L.M. de SILVA, S. WIJESUNDERA y C.H.S.R. BANDUNATHA.- 1969. Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* 18 (1): 88-94.
- 17.- ARX, J.A. von.- 1974. The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer. Vaduz. Germany.
- 18.- ARX, J.A. von.- 1984. A revaluation of Chaetomium and Chaetomiaceae. *Persoonia* 12: 169-179.
- 19.- AUFFRAY, Y., P. BOUTIBONNES y S. LEMARINIER.- 1984. Formes filamenteuses de Bacillus thuringiensis (Berliner) obtenues en présence de mycotoxines présentant une activité génotoxique *M.A.N.* 2: 59-67.
- 20.- BACON, C.W. y D. BURDIK.- 1977. Growth of fungi in broilers houses. *Poultry Science*, 56: 653-661.
- 21.- BAHK, J. y E.H. MARTH.- 1983. Aflatoxin production is inhibited by selected herbal drugs. *Mycopathologia* 83: 129-134.
- 22.- BARNETT, H.L. y B.B. HUNTER.- 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Minnessota.
- 23.- BARRON, G.L.- 1972. The genera of Hyphomycetes from soil. Williams & Wilkins Company, USA.

- 24.- BATELLI, G., M. BIANCHEDI, W. FRIGO, P. AMORATI, A. MANTOVANI y A. PAGLIANI.- 1978. Survey of keratinophilic fungi in Alpine marmot (Marmota marmota) burrow soil and in adjoining soils. Sabouraudia, 16: 83-86.
- 25.- BAUER, J., M. GAREIS, A.v. MONTGELAS y B. GEDEK.- 1983. Effects of food preservatives on mycotoxin production. M.A.N. 1: 203-209.
- 26.- BAXTER, M.- 1973. Ringworm due to Microsporum canis in cats and dogs in New Zealand. N.Z. Vet. J. 21: 33-37.
- 27.- BBL.- 1973. Manual of products and Laboratory Procedures. U.S.A.
- 28.- BEAN, G.A. y A. SOUTHALL.- 1983. Effect of Pyridazinone herbicides on growth and aflatoxin release by Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. Appl. Environ. Microbiol. 46 (2): 503-505.
- 29.- BEAN, G. y T. FERNANDO.- 1985. Winged bean (Psophocarpus tetragonolobus (L.) DC) as a substrate for growth and aflatoxin production by aflatoxigenic strains of Aspergillus spp. Mycopathologia 90: 141-145.
- 30.- BENNET, J.W., L.S. LEE y A.F. CUCULLU.- 1976. Effect of Dichlorvos on aflatoxin and versicolorin A production in Asper-



gillus parasiticus. Bot. Gaz. 137 (4): 318-324.

- 31.- BENNET, J.W., F.A. FERNHOLZ y L.S. LEE.- 1978. Effect of light on aflatoxins, antraquinones and sclerotia in Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. Mycologia 70 (1): 104-116.
- 32.- BENNET, J.W., J.J. DUNN y C.I. GOLDSMAN.- 1981. Influence of white light on production of aflatoxins and antraquinones in Aspergillus parasiticus. Appl. Environ. Microbiol. 41 (2): 488-491.
- 33.- BEUCHAT, L.R.- 1984. Survival of A. flavus conidiospores and other fungi on cowpeas during long-term storage under various environmental conditions. J.stored Prod. Res. 20 (3): 119-123.
- 34.- BEUCHAT, L.R.- 1984. Comparison of Aspergillus differential medium and Aspergillus flavus/parasiticus agar for enumerating total yeasts and molds and potentially aflatoxigenic aspergilli in peanuts, cornmeal and cowpeas. Journal of Food Protection 47 (7): 512-519.
- 35.- B.O.E. de 6 de Septiembre de 1976. Orden de 23 de Junio. Autorización y registro de las sustancias y productos que intervienen en la alimentación de los animales pp 17366-17392.

- 36.- B.O.E. de 14 de Octubre de 1981. Orden de 17 de Septiembre. Métodos Oficiales de análisis. Anejo VII. Piensos. 15. Aflatoxina B<sub>1</sub> pp.24015-24017.
- 37.- BOEREMA, G.H. y M.M.J. DORENBOSCH.- 1973. The Phoma and Ascochyta species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. Studies in Mycology N°3. C.B.S. Baarn.
- 38.- BOOTH, C.- 1971. The genus Fusarium. C.M.I. Kew, Surrey. England.
- 39.-BOOTH, C.- 1977. Fusarium. Laboratory guide to the identification of the major species. C.M.I. Kew, Surrey. England
- 40.- BOTHAST, R.J. y D.I. FENNELL.- 1974. A medium for rapid identification and enumeration of Aspergillus flavus and related organisms. Mycologia 66: 365-369.
- 41.- BOUTIBONNES, P. y J. JACQUET.- 1967. Recherches sur la production de toxine par Aspergillus flavus. Bull. Acad. Vet. 40: 393-403.
- 42.- BOUTIBONNES, P.-1976. Effet antibactérien de quelques mycotoxines et metabolites fongiques vis à vis de souches de Bacillus thuringiensis (Berliner) sensibles ou résistantes à l'aflatoxine B<sub>1</sub>. Can J. Microbiol 22: 884-886.

- 43.- BOUTIBONNES, P.- 1977. Effet de l'aflatoxine B<sub>1</sub> sur les activités enzymatiques de Bacillus thuringiensis (Berliner). Can. J. Microbiol. 23: 931-932.
- 44.- BOUTIBONNES, P.- 1977. Effect of food additives and drugs on cytotoxic activity of Aflatoxin B<sub>1</sub> on bacterial cell. I.R.C.S. Med. Sci. 5: 560.
- 45.- BOUTIBONNES, P.- 1977. Effect of temperature on antimicrobial activity of Aflatoxin B<sub>1</sub> and other drugs. I.R.C.S. Med. Sci. 5: 72.
- 46.- BOUTIBONNES, P. y Y. AUFFRAY.- 1977. Propriétés antibactériennes de l'aflatoxine B<sub>1</sub> : ses effets cytotoxique chez Bacillus thuringiensis (Berliner). Ann. Nutr. Alim. 32 : 831-840.
- 47.- BOUTIBONNES, P.- 1978. A preliminary report about antibacterial properties of the mycotoxin zearalénone. I.R.C.S. Med. Sci. 6: 491.
- 48.- BOUTIBONNES, P. y S. LEMARINIER.- 1981. Altérations cytologiques induites par la zearalénone chez Bacillus thuringiensis (Berliner). Mycopathologia 74: 107-111.
- 49.- BOUTIBONNES, P., C. MALHERBE, Y. AUFFRAY, W. KOGBO y C. MARAIS  
.- 1983. Mycotoxin sensitivity of Bacillus thuringiensis  
I.R.C.S. Med. Sci. 11: 430-431.

- 50.- BOUTIBONNES, P., C. MALHERBE, W. KOGBO y C. MARAIS.- 1983. Proprietes antibacteriennes de 49 mycotoxines vis-a-vis de Bacillus thuringiensis. M.A.N. 1: 259-264.
- 51.- BOUTIBONNES, P., Y. AUFRAY, C. MALHERBE, W. KOGBO y C. MARAIS .- 1984. Proprietés antibacteriennes et genotoxiques de 33 mycotoxines. Mycopathologia 87: 43-49.
- 52.- BROWN, R.F., J.D. WILDMAN y R.M. EPPLEY.- 1968. Temperature-dose relationship with aflatoxin on the brine shrimp, Artemia salina. J.A.O.A.C. 51: 905-906.
- 53.- BUCHANAN, R.L. y D.F. LEWIS.- 1984. Regulation of aflatoxin biosynthesis: effect of glucose on activities of various glycolytic enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 48 (2): 306-310.
- 54.- BUCHANAN, R.L. y H.G. STAHL.- 1984. Ability of various carbon sources to induce and support aflatoxin synthesis by Aspergillus parasiticus. Journal of Food safety 6: 271-279.
- 55.- BUCKLE, A.E.- 1983. The occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs. Veterinary Research Communications 7: 171-186.
- 56.- BULLERMAN, L.B. y F.J. OLIVIGNI.- 1974. Mycotoxin producing-potential of molds isolated from cheddar cheese. Journal of Food Science 39: 1166-1168.

- 57.- BULLERMAN, L.B.- 1976. Examination of swiss cheese for incidence of mycotoxin producing molds. *Journal of Food Science*, 41: 26-28.
- 58.- BULLERMAN, L.B., L.L. SCHROEDER y K.Y. PARK.- 1984. Formation and control of mycotoxins in Food. *Journal of Food Protection*, 47 (8): 637-646.
- 59.- BULLERMAN, L.B.- 1985. Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.* 18: 197-200.
- 60.- BURMEISTER, H.R. y C.W. HESSELTINE.- 1966. Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin. *Appl. Microbiol.* 14 (3): 403-404.
- 61.- CALVO TORRAS, M<sup>a</sup> A.- 1978. Contribución al estudio de la micoflora atmosférica de la ciudad de Barcelona. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia de Barcelona.
- 62.- CALVO TORRAS, M<sup>a</sup> A., J. GUARRO ARTIGAS, E. VICENTE y G. SUAREZ FERNANDEZ.- 1978. Estudio comparativo de la micoflora atmosférica de dos ciudades del área mediterránea. *Revista Clínica Española* 151 (3): 203-206.
- 63.- CALVO, M.A., J. GUARRO y E. VICENTE.- 1978. Presencia de Aspergillus fumigatus Fresenius en la atmósfera urbana. *Anales*

- de Medicina y Cirugía, 69: 219-223.
- 64.- CALVO, M.A., J. GUARRO, G. SUAREZ y C. RAMIREZ.- 1980. Airborne fungi in Barcelona city (Spain). I.A two-year study (1976-1978). *Mycopathologia* 71: 89-93.
- 65.- CALVO, M.A., M.A. VIA, R.M. ALIS y R.M. CALVO.- 1982. Pouvoir antibiotique d'Arthrinium aureum Calvo et Arthrinium phaeospermum (Corda) Ellis. *Crypt., Mycol.* 3: 145-150.
- 66.- CALVO TORRAS, M.A. y I. CABALLE MARTIN.- 1982. Comparative study of some techniques for detecting toxicogenic fungi. *Mycopathologia* 80: 129-131.
- 67.- CALVO, M.A., M.T. BRUGUERA y F.J. CABAÑES.- 1984. Correlation between morphological and physiological characteristics in species of Microsporium. *Microbiologica* 7 (2): 187-191.
- 68.- CALVO, A., M. VIDAL y J. GUARRO.- 1984 . Keratinophilic fungi from urban soils of Barcelona, Spain. *Mycopathologia* 85: 145-147.
- 69.- CALVO, M.A., L. ABARCA, T. BRUGUERA, J. CABAÑES y R.M. CALVO.- 1985. Contribution to the study of Aspergillus fumigatus Fresenius. *Mycopathologia* 84: 49-50.
- 70.- CALVO, M.A., R.M. ALIS, T. BRUGUERA y F.J. CABAÑES.- 1985.

A further contribution to the study of the genus Penicillium.  
Microbios 44: 253-259.

71.- CAMPBELL, A.D., O.J. FRANCIS, R.A. BEEBE y L. STOLOFF.- 1984.  
Determination of aflatoxins in peanut butter using two liquid  
chromatographic methods: collaborative study. J.A.O.A.C.  
67 (2): 312-316.

72.- CAMPBELL, A.H.- 1960. British Medical Bull. 16: 82-85.

73.- CANO, J., L. PUNSOLA y J. GUARRO.- 1985. Distribución geográfica,  
según climas y tipos de suelo, del género Chrysosporium  
en Catalunya. Rev. Iber. Micol. 2 (2): 91-108.

74.- CANTINI, G. y J. CERUTI SCURTI.- 1965. Prime indagini sulla  
tossicità di miceti isolati da mangimi (Nota preliminare).  
Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino, 15:  
1-8.

75.- CANTINI, G., J. CERUTI SCURTI, V. FILLIPELLO MARCHISIO y  
M. JORIO.- 1968. Relazione tra tossicità ed antibiosi di  
miceti isolati da mangimi e da insilati. Allionia, 14: 97-  
112.

76.- CARANTINO, S., J. POISSON y B. CAHAGNIER.- 1976. La microflore  
des graines de féverole: son evolution au cours d'essais  
de stockage en fonction des conditions hydriques réalisées.



Revue de Mycologie, 40: 223-243.

- 77.- CARBALLO, M. y J.A. MIGUEL.- 1985. Micoflora y mohos toxigénicos en trigo. Re. Iber. Micol. 2 (2): 119-125.
- 78.- CARDEILHAC, P.T. y K.P.C. NAIR.- 1974. Hazards presented by mycotoxins and toxigenic-mold spores in feeds. Toxicology and Applied Pharmacology, 30: 299-308.
- 79.- CARETTA, G., E. PIONTELLI, G. del FRATE, A. CRIPPA, L. SAVINI y F. TODARO.- 1975. Spore fungine dell'atmosfera urbana di Pavia; risultati ottenuti con il metodo di esposizione delle piastre. Rivista di Patologia Vegetale, 11: 5-23.
- 80.- CARETTA, G. y G. del FRATE.- 1976. Funghi cheratinofili dell'isola di Motecristo: isolamenti da suolo, escrementi e pelo di animali e piume di ucelli. Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia, 11: 203-208.
- 81.- CARETTA, G., G. del FRATE, E. PIONTELLI y F. TODARO.- 1976. Micoflora cheratinophila del pelo e dello sterco di mucca, del foraggio e del suolo di fattoria: considerazioni sulla loro distribuzione. Rivista di Parasitologia, 37 (2-3): 331-361.
- 82.- CARETTA, G., G. del FRATE, E. PIONTELLI y F. TODARO.- 1977.- Distribuzione di funghi cheratinofili nel suolo del vulcano



- Etna (Sicilia). *Rivista di Parasitologia* 38 (1): 115-127.
- 83.- CARETTA, G. y E. PIONTELLI.- 1975. Isolation of keratinophilic fungi from soil in Pavia, Italy. *Sabouraudia* 13: 33-37.
- 84.- CARMICHAEL, J.W.- 1957. Geotrichum candidum. *Mycologia* 49 (6): 820-830.
- 85.- CARMICHAEL, J.W.- 1962. Chrysosporium and some other aleurioporic Hyphomycetes. *Can. J. Bot.* 40: 1137-1173.
- 86.- CARMICHAEL, J.W., W.B. KENDRICK, I.L. CONNERS, L. SIGLER.- 1980. *Genera of Hyphomycetes*. The University of Alberta Press. Edmonton, Alberta. Canada.
- 87.- CARTER, A.- 1983. Three new species in the genus Chaetomium. *Can. J. Bot.* 61: 2603-2607.
- 88.- CERUTI SCURTI, J., G. CANTINI y B. COLOMB.- 1968. Ricerche sui miceti di forragi conservati e sulla loro tossicità. *Allionia*, 14: 113-122.
- 89.- CHAKRABARTI, A.G.- 1984. Fluorometric assay for aflatoxins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 33: 515-517.
- 90.- CHANG-YEN, I., V.A. STOUTE y J.B. FELMINE.- 1984. Effect of solvent composition on aflatoxin fluorescence. *J.A.O.A.C.*

67 (2): 306-308.

- 91.- CHARPENTIE, M.J., J. POISSON y B. CAHAGNIER.- 1976. Evolution de la microflore du pois en fonction des conditions de stockage. *Revue de Mycologie*, 40: 401-415.
- 92.- CHARPIN, J., H. CHARPIN, J. AUBERT, C. BOUTIN, E. GUCHO, M. LAURIOL y M. RENARD.- 1985. Recensement atmosphérique des spores de moisissures. Essai d'évaluation de leur rôle allergénique. *Le Poumon et le Coeur*, 21: 45-64.
- 93.- CHARPIN, J., J. AUBERT, H. CHARPIN, C. BOUTIN y M. MALEA-L'AURIOL.- 1968. Interêt du recensement des spores fongiques atmosphériques dans l'allergie respiratoire. *Biol. Med.* 67: 201-246.
- 94.- CHAUAN, H.V.S., G.J. JHA, P.N. SINGH, K.K. SINGH y N. KUMAR.- 1984. Hepatocellular carcinoma associated with aflatoxicosis in pigs. *Indian vet. J.* 61: 1009-1014.
- 95.- CHINNICI, J.P. y D.A. BETTINGER.- 1984. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and caffeine on viability in natural strains of Drosophila melanogaster. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44: 263-266.
- 96.- CHIPLEY, J.R. y N. URAIH.- 1980. Inhibition of Aspergillus growth and aflatoxin release by derivatives of benzoic acid.

Appl. Environ. Microbiol 40 (2): 352-357.

- 97.- CHMEL, L. y A. VLACILIKOVA.- 1975. The ecology of keratinophilic fungi at different depths of soil. *Sabouraudia*, 13: 185-191.
- 98.- CHRISTENSEN, C.M. y H.H. KAUFMANN.- 1965. Deterioration of stored grains by fungi. *Ann. Rev. Phitopathol.* 3: 69-84.
- 99.- CHUTE, H.L. y E. BARDEN.- 1964. The fungous flora of chick hatcheries. *Avian. Dis.* 8(1): 13-19.
- 100.- CLARK, J.D., R.C. HATCH, D.M. MILLER y A.V. JAIN.- 1984. Caprine aflatoxicosis: experimental disease and clinical pathologic changes. *Am. J. Vet. Res.* 45 (6): 1132-1135.
- 101.- CLARKE, J.H. y S.T. HILL.- 1981. Mycoflora of moist barley during sealed storage in farm and laboratory silos. *Trans. Br. mycol. Soc.* 77 (2): 557-565.
- 102.- CLEMENTS, N.L.- 1968. Note on a microbiological assay for Aflatoxin B<sub>1</sub>: A rapid confirmatory test by effects on growth of Bacillus megaterium. *J.A.O.A.C.* 51 (3): 611-612.
- 103.- CLERQ, D. de y Ch. de VROEY.- 1981. Procède favorisant l'isolement de champignons keratinophiles par la technique de Vanbreuseghem. *Bull. Soc. Mycol. Méd.* 10 (1): 29-32.

- 104.- CLEVSTROM, G., B. GORANSSON, R. HLODVERSSON y H. PETERSSON.-  
1981. Aflatoxin formation in hay treated with formic acid  
and in isolated strains of Aspergillus flavus. J. stored  
Prod. Res. 17: 151-161.
- 105.- CLEVSTROM, G., H. LJUNGGREN, S. TEGELSTROM y K. TIDEMAN.-  
1983.- Production of aflatoxin by an Aspergillus flavus  
isolate cultured under a limited oxygen supply. Appl. Envi-  
ron. Microbiol. 46 (2): 400-405.
- 106.- CLEVSTROM, G. y H. LJUNGGREN.- 1984. Occurrence of storage  
fungi, especially aflatoxin-forming Aspergillus flavus,  
in soil, greenstuff and prepared hay. J. stored Prod. Res.  
20 (2): 71-82.
- 107.- CLEVSTROM, G. y H. LJUNGGREN.- 1985. Aflatoxin formation  
and the dual phenomén in Aspergillus flavus Link. Mycopatho-  
logia, 92: 129-139.
- 108.- COLVIN, B.M., L.R. HARRISON, H.S. GOSSER y R.F. HALL.- 1984.  
Aflatoxicosis in feeder cattle. J.A.V.M.A. 184 (8): 956-  
958.
- 109.- CONNOLE, M.D.- 1965. Keratinophilic fungi on coats and dogs.  
Sabouraudia 4: 45-48.
- 110.- COOKE, R.C. y A.D.M. RAYNER.- 1984. Ecology of saprotro-

phic fungi. Ed. Longman group Ltd. Essex.England

- 111.- CUTSEM, J.van, H. de KEYSER, F. ROCHETTE y M. van der FLAES.- 1985. Survey of fungal isolates from alopecic and asymptomatic dogs. The Veterinary Record, 116: 568-569.
- 112.- CUTULI de SIMON, M.T. y G. SUAREZ FERNANDEZ.- 1984. Determination of aflatoxins in bread and bakery products. Journal of Food Protection, 47 (8): 627-628.
- 113.- DABINETT, P.E. y A.M. WELLMAN.- 1978. Numerical taxonomy of certain genera of fungi imperfecti and Ascomycotina. Can. J. Bot. 56 (17): 2031-2049.
- 114.- DAMON, S.C.- 1952. Two noteworthy species of Sepedonium. Mycologia, 44: 86-96.
- 115.- DAVIS, N.D., U.L. DIENER y D.W. ELDRIDGE.- 1966. Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> by A. flavus in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol. 14: 378-380.
- 116.- DAVIS, N.D., U.L. DIENER y V.P. AGNIHOTRI.- 1967. Production of aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> in chemically defined medium. Mycopathologia et Mycologia applicata, 31: 251-256.
- 117.- DAVIS, N.D. y U. L. DIENER.- 1968. Growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus from various carbon

- sources. Appl. Microbiol. 16 (1): 158-159.
- 118.- DAVIS, N.D., R.E. WAGENER, G. MORGAN-JONES y U.L. DIENER.-  
1975. Toxigenic thermophilic and thermotolerant fungi.  
Appl. Microbiol. 29 (4): 455-457.
- 119.- DAVIS, N.D.- 1981. Sterigmatocystin and other mycotoxins  
produced by Aspergillus species. Journal of Food Protection,  
44 (9): 711-714.
- 120.- DEBEAUPUIS, J.P.- 1983. Mycotoxicoses experimentales chez  
un cyprinide: Brachydanio rerio H.-B. M.A.N. 1: 153-162.
- 121.- DELLA FRANCA, P. y G. CARETTA.- 1984. Keratinophilic fungi  
isolated from the air at Pavia. Mycopathologia, 85: 65-68.
- 122.- DIENER, U.L., G. MORGAN-JONES, R.E. WAGENER y N.D. DAVIS.-  
1981. Toxigenicity of fungi from grain sorghum. Mycopatholo-  
gia, 75: 23-26.
- 123.- DIFCO.- 1984. Manual de Microbiología. 10ª Ed. Madrid.
- 124.- DOMSCH, K.H. y W. GAMS.- 1970. Pilze aus Agrarböden. Gustav  
Fisher Verlag. Stuttgart.
- 125.- DORNER, J.W., R.J. COLE y U.L. DIENER.- 1984. The relation-  
ship of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus with

- reference to production of aflatoxins and cyclopiazonic acid. Mycopathologia, 87: 13-15.
- 126.- DYAR, P.M., O.J. FLETCHER y R.K. PAGE.- 1984. Aspergillosis in turkeys associated with use of contaminated litter. Avian Dis. 28 (1): 250-255.
- 127.- ECKMAN, M.K. y G. MORGAN-JONES.- 1979. Fungus species isolated from commercial hatcheries in Alabama. Avian Dis. 23 (1): 204-208.
- 128.- EHRLICH, K. y A. CIEGLER.- 1984. Effect of phytate on aflatoxin formation by Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus in synthetic media. Mycopathologia, 87: 99-103.
- 129.- EHRLICH, K.C. y L.S. LEE.- 1984. Mycotoxins in grain dust: Method for analysis of aflatoxin, ochratoxin A, zealarenone, vomitoxin and secalonic acid D. J.A.O.A.C. 67 (5): 963-967.
- 130.- ELLIS, M.B.- 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. C.M.I. Kew, Surrey. England.
- 131.- ELLIS, M.B.- 1976. More dematiaceous Hyphomycetes. C.M.I. Kew, Surrey. England.

- 132.- ENGLISH, M.P.- 1965. The saprophytic growth of non-keratinophilic fungi on keratinized substrata, and a comparison with keratinophilic fungi. Trans. Br. mycol. Soc. 48 (2): 219-235.
- 133.- FANELLI, C. y A.A. FABBRI.- 1981. Aflatoxin production by Aspergillus flavus during incubation with lipid sources in culture media. Trans. Br. mycol. Soc. 77 (2): 416-419.
- 134.- FANELLI, C., A.A. FABBRI, E. FINOTTI, G. PANFILI y S. PASSI.- 1983. Cerulenin and tetrahydrocerulenin: stimulating factors of aflatoxin biosynthesis. Trans. Br. mycol. Soc. 81 (2): 201-204.
- 135.- FANELLI, C., A.A. FABBRI, S. PIERETTI; G. PANFILI y S. PASSI. 1985. Effect of organics solvents on aflatoxin production in cultures of Aspergillus parasiticus. Trans. Br. mycol. Soc. 84 (4): 591-593.
- 136.- F.A.O., PNUMA.- 1979. La vigilancia de las micotoxinas. Directrices. Serie inspección de alimentos nº 4. Roma.
- 137.- FARACO, B.F.C. y B.A. FARACO.- 1974. Poluição micológica da atmosfera. Rev. Brasileirs de Medicina, 31:11.
- 138.- FEUERMAN, E., I. ALTERAS, E. HONIG y N. LEHRER.- 1975. Saprophytic occurrence of Trichophyton mentagrophytes and Micros-



- porum gypseum in the coats of healthy laboratory animals. Mycopathologia 55 (1): 13-15.
- 139.- FEUERMAN, E., I. ALTERAS, E. HONIG y N. LEHRER.- 1975. The isolation of keratinophilic fungi from soils in Israel. A preliminary report. Mycopathologia, 56 (1): 41-46.
- 140.- FILIPELLO MARCHISIO, V. y A.M. LUPPI MOSCA.- 1982. Mycological analysis of the sands of a box for children's play. Mycopathologia, 80: 43-54.
- 141.- FILTENBORG, O. y J.C. FRISVAD.- 1980. A simple screening-method for toxigenic moulds in pure cultures. Lebensm. Wiss. Technol. 13: 128-130.
- 142.- FISCHMAN, O., Z.P. de CAMARGO y M. GRINBLAT.- 1976. Trichophyton mentagrophytes infection in laboratory white mice. Mycopathologia, 59 (2): 113-115.
- 143.- FRISVAD, J.C.- 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric Penicillia. Appl. Environ. Microbiol. 41 (3): 568-579.
- 144.- FRISVAD, J.C. y O. FILTENBORG.- 1983. Classification of Terverticillate Penicillia based on profiles of mycotoxins and other secondary metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 46 (6): 1301-1310.

- 145.- GALTIER, P., C. BARADAT y M. ALVINERIE.- 1977. Etude de l'elimination d'ochratoxine A par le lait chez la lapine. Ann. Nutr. Alim. 31: 911-918.
- 146.- GAMS, W.- 1971. Cephalosporium - artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- 147.- GARCIA DE LOMAS, J., A. SUAY, J.M. NOGUEIRA, C. SEGARRA y P. OLMOS.- 1980. Presencia de Trichophyton mentagrophytes var. granulosum en conejos. Estudio epidemiológico. Rev. San. Hig. Pub. 54: 1009-1018.
- 148.- GHOSH, J. y P. HAGGBLOM.- 1985. Effect of sublethal concentrations of propionic or butyric acid on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus. International Journal of Food Microbiology, 2: 323-330.
- 149.- GILMAN, J.C.- 1971. A manual of soil fungi. Iowa State University Press. USA.
- 150.- GIMENO, A.- 1979. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zealarenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. J.A.O.A.C. 62 (3): 579-585.
- 151.- GIMENO, A. y M.L. MARTINS.- 1982. Multimycotoxin method for analysys of 17 mycotoxins in raw materials, mixed feeds,

food products and animal tissues by thin layer chromatography  
V International IUPAC Symposium on mycotoxins and phytotoxins  
Abstracts : 24-27.

- 152.- GIMENO, A. y M.L. MARTINS.- 1983. Rapid thin layer chromatographic determination of patulin, citrinin and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. J.A.O.A.C. 66 (1): 85-91.
- 153.- GIMENO, A. y J.A. QUINTANILLA.- 1983. Analytical and mycological study of a natural outbreak of zealarenone mycotoxicosis in horses. Proc. Int. Symp. Mycotoxins : 387-392.
- 154.- GIP, L. y B. MARTIN.- 1964. Isolation of Trichophyton terrestre, T. mentagrophytes var. asteroides and T. rubrum from dogs. Acta Dermato-Venereologica, 44: 248-250.
- 155.- GOLUMBIC, C.- 1973. Potential mycotoxin problems in high moisture grain. Ann. Technol. agric. 22 (3): 435-447.
- 156.- GONZALEZ CABO, J.F.- 1985. Aportaciones al estudio de la micoflora de la piel y vías respiratorias de la especie Oryctolagus cuniculus y su relación con el medio ambiente. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.
- 157.- GORDON, M.A.- 1953. The occurrence of the dermatophyte Microsporum gypseum as a saprophyte in soil. J. invest. Derm. 3: 206.

- 158.- GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J., P. GOLINSKI, J. CHELKOWSKI y K. Szebiotko.- 1985. Mycotoxins in cereal grain. Part XI. Simple multidetection procedure for determination of 11 mycotoxins in cereals. *Die Nahrung*, 29 (3): 229-240.
- 159.- GREGORY, P.H.- 1961. The microbiology of the atmosphere. Interscience Publishers Inc. New York.
- 160.- GRIFFIN, D.M.- 1960. Fungal colonization of sterile hair in contact with soil. *Trans. Br. mycol. Soc.* 43 (4): 583-596.
- 161.- GRIGORIU, A., D. GRIGORIU y J. DELACRETAZ.- 1985. Multiple fungal infections in skin diseases. *Mykosen*, 28 (11): 559-568.
- 162.- GUARRO, J., M.A. CALVO y G. SUAREZ.- 1979. Los hongos como contaminantes en la Industria farmacéutica (IV). Estudio toxicológico de 60 cepas aisladas de excipientes. *Circ. Farm.* 264: 289-294.
- 163.- GUARRO, J., M.A. CALVO y G. SUAREZ.- 1980. Los hongos como contaminantes en la Industria Farmacéutica (VI). Método rápido para detectar micotoxinas. *Circ. Farm.* 267: 245-249.
- 164.- GUARRO, J., L. PUNSOLA y M.A. CALVO.- 1981. Keratinophilic

- fungi from soil of Tarragona, Catalunya. *Mycopathologia* 76: 69-71.
- 165.- GUNASEKARAN, M.- 1981. Optimum culture conditions for aflatoxin B<sub>2</sub> production by a human pathogenic strain of Aspergillus flavus. *Mycologia*, 73: 697-704.
- 166.- GUNST, K., J.P. CHINNICI y G.C. LLEWELLYN.- 1982. Effects of aflatoxin B<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>2</sub>, aflatoxin G<sub>1</sub> and sterigmatocystin on viability, rates of development and body length in two strains of Drosophila melanogaster (Diptera). *Journal of Invertebrate Pathology*, 39: 388-394.
- 167.- GUPTA, S.R., L. VISWANATHAN y T.A. VENKITASUBRAMANIAN.- 1971. A comparative study of toxigenic and non-toxigenic strains of Aspergillus flavus. *Journal of General Microbiology*, 65: 243-247.
- 168.- GUPTA, S.K., K.K. MAGGON y T.A. VENKITASUBRAMANIAN.- 1976. Inhibition of aflatoxin formation by 2-mercaptoethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (3): 324-326.
- 169.- GUPTA, S.K., K.K. MAGGON y T.A. VENKITASUBRAMANIAN.- 1976. Effect of Zinc on adenine nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in Aspergillus parasiticus. *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (6): 753-756.

- 170.- HAJINI, G.H., K.C. KANDHARI, L.N. MOHAPATRA y L.K. BHUTANI.-  
1970. Effect of hairs oils and fatty acids on the growth  
of dermatophytes and their in vitro penetration of human  
scalp hair. *Sabouraudia*, 8: 174-176.
- 171.- HAJTOS, I., B. HARRACH, G. SZIGETI, L. FODOR, G. MALIK y  
J. VARGA.- 1983. Stachybotryotoxicosis as a predisposing  
factor of ovine systemic pasteurellosis. *Acta Veterinaria  
Hungarica*, 31 (4): 181-188.
- 172.- HARA, S., D.I. FENNELL y C.W. HESSELTINE.- 1974. Aflatoxin-  
producing strains of Aspergillus flavus detected by fluores-  
cence of agar medium under ultraviolet light. *Appl. Micro-  
biol.* 27 (6): 1118-1123.
- 173.- HARWIG, J. y P.M. SCOTT.- 1971. Brine Shrimp (Artemia salina  
L.) larvae as a screening system for fungal toxins. *Appl.  
Microbiol.* 21 (6): 1011-1016.
- 174.- HAUCK, H.- 1980. Pet rodents as a source of dermatophytic  
infections in humans. *Medical mycology. Zbl. Bakt. Suppl.*  
8: 381-386.
- 175.- HAYES, A.W., N.D. DAVIS y U.L. DIENER.- 1966. Effect of  
aeration on growth and aflatoxin production by Aspergillus  
flavus in submerged culture. *Appl. Microbiol.* 14 (6): 1019-  
1021.

- 176.- HENSARLING, T.P., T.J. JACKS, L.S. LEE y A. CIEGLER.- 1983. Production of aflatoxins on soybean and cottonseed meals. *Mycopathologia*, 83: 125-127.
- 177.- HESSELTINE, C.W.- 1974. Natural occurrence of mycotoxins in cereals. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 53: 141-153.
- 178.- HESSELTINE, C.W., O.L. SHOTWELL, W.F. KWOLEK, E.B. LILLEHOJ, W.K. JACKSON y R.J. BOTHAST.- 1976. Aflatoxin occurrence in 1973 corn at harvest. II. Mycological studies. *Mycologia*, 68 (2): 341-353.
- 179.- HESSELTINE, C.W., R.F. ROGERS y O.L. SHOTWELL.- 1981. Aflatoxin and mold flora in North Carolina in 1977 corn crop. *Mycologia*, 73 (2): 216-228.
- 180.- HESSELTINE, C.W. y R.F. ROGERS.- 1982. Longevity of Aspergillus flavus in corn. *Mycologia*, 74 (3): 423-426.
- 181.- HILL, D.W., T.R. KELLEY, K.J. LANGNER y K.W. MILLER.- 1984. Determination of mycotoxins by gradient high-performance liquid chromatography using an alkylphenone retention Index system. *Analytical chemistry*, 56 (13): 2576-2579.
- 182.- HILL, R.A. y J. LACEY.- 1984. Penicillium species associated with barley grain in the U.K. *Trans. Br. mycol. Soc.* 82 (2): 297-303.



- 183.- HIRONAGA, M., T. FUJIGATI y S. WATANABE.- 1981. Trichophyton mentagrophytes skin infections in laboratory animals as a cause of zoonosis. *Mycopathologia*, 73: 101-104.
- 184.- HITOKOTO, H., S. MOROZUMI, T. WAUKE, S. SAKAI y H. KURATA.- 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 (4): 818-822.
- 185.- HODGES, F.A., J.R. ZUST, H.R. SMITH, A.A. NELSON, B.H. ARM-BRECHT y A.D. CAMPBELL.- 1964. Mycotoxins: aflatoxin isolated from Penicillium puberulum. *Science*, 145: 1439.
- 186.- HOLMQUIST, G.U., H.W. WALKER y H.M. STAHR.- 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of Aspergillus flavus and A. parasiticus. *Journal of Food Science*, 48: 778-782.
- 187.- HOOG, G.S. de .- 1972. The genera Beauveria, Isaria, Tritirachium and Acrodontium, Gen. nov. *Studies in Mycology* N<sup>o</sup> 1. C.B.S. Baarn.
- 188.- HOWELL, A.- 1939. Studies on Histoplasma capsulatum and similar form species. I. Morphology and development. *Mycologia*, 31: 191-216.
- 189.- HUBALEK, Z.- 1978. Coincidence of fungal species associated



- with birds. *Ecology*, 59: 438-442.
- 190.- HUBALEK, Z., B. ROSICKY y M. OTCENASEK.- 1979. Fungi on the hair of small wild mammals in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Ces. Mykol.* 33: 81-93.
- 191.- HUBALEK, Z., B. ROSICKY y M. OTCENASEK.- 1980. Fungi from interior organs of free-living small mammals in Czechoslovakia and Yugoslavia. *Folia Parasitologica (PRAHA)*, 27: 269-279.
- 192.- HUMPOLICKOVA, V. y M. OTCENASEK.- 1981. Keratinophilic fungi from the feathers of free-living birds. *Folia Parasitologica (PRAHA)*, 28: 179-186.
- 193.- HUTCHINS, J.E. y W.M. HAGLER.- 1983. Rapid liquid chromatographic determination of aflatoxins in heavily contaminated corn. *J.A.O.A.C.* 66 (6): 1458-1465.
- 194.- HUYNH, V.L., R.G. GERDES y A.B. LLOYD.- 1984. Synthesis and degradation of aflatoxins by Aspergillus parasiticus II. Comparative toxicity and mutagenicity of aflatoxin B<sub>2</sub> and its autolytic breakdown products. *Aust. J. Biol. Sci.* 37: 123-129.
- 195.- HUYNH, V.L. y B.L. LLOYD.- 1984. Synthesis and degradation of aflatoxins by Aspergillus parasiticus. I. Synthesis of

aflatoxin B<sub>1</sub> by young mycelium and its subsequent degradation in aging mycelium. Aust. J. Biol. Sci. 37: 37-43.

196.- JACQUET, J. y P. BOUTIBONNES.- 1969. Fluorescence des aflatoxines et des Aspergillus. Comptes rendus des Séances de la Société de Biologie, 163 (11): 2289-2293.

197.- JACQUET, J. y A. TANTAOUI-ELARAKI.- 1975. Recherche d'un milieu synthétique pour la croissance et la toxicogènese des Aspergillus du groupe flavus. Bull. Acad. Vét. 48: 457-466.

198.- JAIN, P.C. y S.G. AGRAWAL.- 1977. Keratinophilic fungi from soils of Mount Abu (India). Geobios, 4: 136-138.

199.- JAIN, P.C.- 1983. Prevalence of keratinophilic fungi in soils of Madhya Pradesh and Uttar Pradesh, India. Geobios new Reports, 2: 10-13.

200.- JAIN, M., P.K. SHUKLA y O.P. SRIVASTAVA.- 1985. Keratinophilic fungi and dermatophytes in Lucknow soils with their global distribution. Mykosen, 28 (3): 148-153.

201.- JARVIS, B.- 1971. Factors affecting the production of mycotoxins. J. Appl. Bact. 34 (1): 199-213.

202.- JESENSKA, Z., M. POLSTER, J. MATYASOVA y L. POLAKOVA.- 1980.

Collaborative study of the effectiveness of the screening test on APA medium for Aflatoxin producing aspergilli. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 171: 408-415.

203.- JOFFE, A.Z.- 1974. A modern system of Fusarium taxonomy. Mycopathol. Mycol. Appl. 53: 201-228.

204.- JOLY, P.- 1964. Le genre Alternaria. Encycl. Mycol. N° 33. Paris.

205.- KARAIOANNOGLOU, P.- 1984. Aflatoxin production on white brined Feta cheese. Milchwissenschaft, 39 (11): 671-674.

206.- KHAN, S.N., K.K. MAGGON y T.A. VENKITASUBRAMANIAN.- 1978. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by tol-naltate. Appl. Environ. Microbiol. 36 (2): 270-273.

207.- KHIEN, T.E., F.F. EDWARDS, D. TOM, G. LIEBERMAN, E.M. BERNARD y D. AMSTRONG.- 1985. Evaluation of the Quantum II yeast identification system. J. Clin. Microbiol. 22 (2): 216-219.

208.- KIRKSEY, J.W. y R.J. COLE.- 1974. Screening for toxin-producing fungi. Mycopathol. Mycol. Appl. 54 (3): 291-296.

209.- KORDIK, B.-1979. Field and laboratory studies of swine mycotoxicosis in the S.R. of Serbia (Yugoslavia). Zbl. Vet.

Med. B. 26: 540-550.

- 210.- KREGER-van RIJ, N.J.W.- 1984. The yeasts. A taxonomic study. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- 211.- KULIK, M.- 1968. A compilation of descriptions of new Penicillium species. U.S. Dep. Agric. Handb N° 351.
- 212.- KUNERT, J.- 1972. Thiosulphate esters in keratin attacked by dermatophytes in vitro. *Sabouraudia*, 10: 6-13.
- 213.- KUNSTYR, I.- 1980. Laboratory animals as a possible source of dermatophytic infections in humans. *Medical Mycology. Zbl. Bakt. Suppl.* 8: 361-367.
- 214.- KURATA, H. y M. ICHINOE.- 1967. Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs. I. Fungal flora of flour-type foodstuffs. *J. of Food Hygienic Society of Japan*, 8 (3): 237-246.
- 215.- KURATA, H., S. UDAGAWA, M. ICHINOE, Y. KAWASAKI, M. TAZAWA, J. TANAKA, M. TAKADA y H. TANABE.- 1968. Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs. V. Acute toxicity test for representative species of fungal isolates from milled rice harvested in 1965. *J. Food. Hygienic Society of Japan*, 9 (5): 379-384.

- 216.- KUSHIDA, T., K. IMAMURA, S. KUWAHARA, H. KUWAHARA, Y. SHIMADA  
T. TAKAHASHI, S. TAHARA, K. NISHIMURA y T. YAMADA.- 1972.  
Keratinophilic fungi on hair of dogs and cats without visible  
skin lesions in Kyoto. J. Jap. Vet. Med. Ass. 32: 552-554.
- 217.- LAFONT, J., A. ROMAND y P. LAFONT.- 1983. Effets de mycotoxi-  
nes sur des phenomenes genetiques bacteriens. M.A.N. 1:  
251-258.
- 218.- LAFONT, P. y J. LAFONT.- 1969. Pollution par des Aspergillus  
de produits végétaux. Ann. Inst. Pasteur, 116 (2): 237-  
245.
- 219.- LACEY, J.- 1975. Potential hazards to animals and man from  
microorganisms in fodders and grain. Trans Br. mycol. Soc.  
65 (2): 171-184.
- 220.- LE BARS, J.- 1968. Flore atmosphérique des locaux d'élevage  
en aviculture. Propriétés physiques et biologiques. Pénétra-  
tion dans l'appareil respiratoire. Conséquences pour l'assai-  
nissement de l'air. Rec. Méd. Vét. 144: 1163-1189.
- 221.- LE BARS, J.-1968. Dynamique de la pollution bactérienne  
et fongique de l'atmosphère des locaux d'élevage en avicultu-  
re. Rech. Vétér. 1: 141-166.
- 222.- LE BARS, J.- 1976. Mycoflore des fourrages secs: croissance

et développement des especes selon les conditions hydrothermiques de conservation. *Revue de Mycologie*, 40: 347-360.

- 223.- LE BARS, J.- 1982. Contamination fongique et mycotoxique d'aliments composés fabriqués à la Guadeloupe. *Sci. Aliments*, 2: 61-66.
- 224.- LE BARS, J.- 1983. Recommandations pour les prélèvements destinés a l'examen mycologique et la recherche de mycotoxines. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 159 (11): 1017-1021.
- 225.- LENETTE, E.H., A. BALOWS, W.J. HAUSLER y J.P. TRUANT (Eds).- 1980. *Manual of Clinical Microbiology*. 3<sup>a</sup> Ed. American Society for Microbiology. Washington.
- 226.- LILLARD, H.S., R.T. HANLIN y D.A. LILLARD.- 1970. Aflatoxigenic isolates of Aspergillus flavus from pecans. *Appl. Microbiol.* 19 (1):: 128-130.
- 227.- LILLEHOJ, E.B., W.J. GARCIA y M. LAMBROW.- 1974. Aspergillus flavus infection and aflatoxin production in corn: Influence of trace elements. *Appl. Microbiol.* 28 (5): 763-767.
- 228.- LILLEHOJ, E.B., W.F. KWOLEK, E.E. VANDEGRAFT, M.S. ZUBER, O.H. CALVERT, N. WIDSTROM, M.C. FUTRELL y A.J. BOCKHOLT.- 1975. Aflatoxin production in Aspergillus flavus inoculated

- ears of corn grown at diverse locatios. Crop science, 15: 267-270.
- 229.- LIN, M.T. y J.C. DIANESE.- 1976. A Coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by Aspergillus spp. Phytopathology, 66: 1466-1469.
- 230.- LIN, C.C.S. y D.Y.C. FUNG.- 1983. Effect of BHA, BHT, TBHQ and PG on growth and toxigenesis of selected Aspergilli. J. Food Sci. 48: 576-580.
- 231.- LOPEZ-MARTINEZ, R.- 1980. Isolation of dermatophytes from different natural sources. Proceedings of the Fifth International Conference on the Mycoses. Caracas, Venezuela. (P.A.H. O. n° 396). Washington D.C.: 205-210.
- 232.- LOPEZ MARTINEZ, R., T. MIER, y M. QUIRARTE.- 1984. Dermatophytes isolated from laboratory animals. Mycopathologia, 88: 111-113.
- 233.- LOVETT, J., J. W. WESSER y R.B. READ.- 1971. The microflora of southern Ohio poultry litter. Poultry Science, 50 (3): 746-751.
- 234.- LOVETT, J.-1972. Toxigenic fungi from poultry feed and litter Polutry Science, 51: 309-313.



- 235.- LUMPKINS, E.D., S.L. CORBIT y G.M. TIEDEMAN.- 1973. Airborne fungi survey. I. Culture-plate survey of the home environment. Ann. Allergy, 31: 361-370.
- 236.- LUMPKINS, E.D. y S. CORBIT.- 1976. Airborne fungi survey. II. Culture plate survey of the home environment. Ann. Allergy, 36 (1): 40-44.
- 237.- MABROUK, S.S., N.M.A. EL-SHAYEB, A.H. EL-REFAI, L.A.R. SALLAM y A.A. HAMDY.- 1985. Inhibitory activities of some marine algae on aflatoxin accumulation. Appl. Microbiol. Biotechnol 22: 152-155.
- 238.- MADHYASTHA, M.S. y R.V. BHAT.- 1984. Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin production on black and white pepper and their inhibitory action of their chemical constituents. Appl. Environ. Microbiol. 48 (2): 376-379.
- 239.- MAING, I.Y., J.C. AYRES y P.E. KOEHLER.- 1973. Persistence of aflatoxin during the fermentation of soy sauce. Appl. Microbiol. 25 (6): 1015-1017.
- 240.- MANGIAROTTI, A.M. y G. CARETTA.- 1984. Keratinophilic fungi isolated from a small pool. Mycopathologia, 85: 9-11.
- 241.- MANTOVANI, A. y L. MOROANTI.- 1977. Dermatозoonoses in Italy. Vet. Sci. Comun. 1: 171-177.



- 242.- MARIAT, F., J. CHATELAIN y M.A. ROUFFAUD.- 1976. Etude sur la contamination par les champignons dermatophytes d'une population de petits mammiferes sauvages en Alsace. *Mycopathologia*, 58 (2): 71-78.
- 243.- MARSELLA, R., R. MERCANTINI, P. SPINELLI y L. VOLTERRA.- 1985. Occurrence of keratinophilic fungi in animals of the zoological park of Rome. *Mykosen*, 28 (10): 507-512.
- 244.- MASIMANGO, N., J.L. RAMAUT y J. REMACLE.- 1977. Production de l'aflatoxine B<sub>1</sub> "in vitro" en fonction de diverses conditions de culture. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 583-605.
- 245.- MASIMANGO, N., J.L. RAMAUT y J. REMACLE.- 1977. Aflatoxines et champignons toxigenes dans des denrées alimentaires zairoises. *Rev. Ferm Ind. Alim.* 32 (6): 164-170.
- 246.- MASIMANGO, N., J.L. RAMAUT y J. REMACLE.- 1978. Contribution a l'etude du role des aditifs chimiques dans la lutte contre l'aflatoxine. *Rev. Ferm. Ind. Alim.* 33 (4): 116-123.
- 247.- MAYURA, K., S.C. BASAPPA y V. SREENIVASA MURTHY.- 1985. Studies on some factors affecting aflatoxin production by Aspergillus flavus and A. parasiticus. *J. Food Sci. Technol.* 22: 126-129.
- 248.- Mc ALLER, R.- 1980. Investigation of keratinophilic fungi

from soils in Western Australia. A preliminary survey. *Mycopathologia*, 72: 155-165.

249.- McKEEVER, S., R.W. MENGES, W. KAPLAN y L. AJELLO.- 1958. Ringworm fungi of feral rodents in Southwestern Georgia. *Am. J. Vet. Res.* 19 (73): 969-972.

250.- McKEEVER, S., W. KAPLAN y L. AJELLO.- 1958. Ringworm fungi of large wild mammals in Southwestern Georgia and Northwestern Florida. *Am. J. Vet. Res.* 19 (73): 973-975.

251.- MEGALLA, S.E.- 1983. Rapid, economical, qualitative method for separation of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, & G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> by dry column chromatography. *Mycopathologia*, 84: 45-47.

252.- MEHROTA, B.S. y M. BASU.- 1975. Survey of the microorganisms associated with cereal grains and their milling fractions in India. Part I. Imported wheat. *Int. Biodetn. Bull.* 11 (2): 56-63.

253.- MERCANTINI, R., R. MARSELLA y F. CAPRILLI.- 1978. Isolation of keratomycetes from soil of wild animal cages and enclosures in the zoo of the Parco Nazionale d'Abruzzo, Italy. *Sabouraudia*, 16: 285-289.

254.- MERCANTINI, R., R. MARSELLA, F. CAPRILLI y G. DOVGIALLO.- 1980. Isolation of dermatophytes and correlated species

from the soil of public gardens and parks in Rome. *Sabouraudia*, 18: 123-128.

255.- MILLS, J.T. y D. ABRAMSON.- 1981. Microflora and condition of flood-damaged grains in Manitoba, Canada. *Mycopathologia* 73: 143-152.

256.- MISLIVEC, P.B., J.H. HUNTER y J. TUIE.- 1968. Assay for aflatoxin production by the genera Aspergillus and Penicillium. *Appl. Microbiol.* 16 (7): 1053-1055.

257.- MISLIVEC, P.B., C.T. DIETER y V.R. BRUCE.- 1975. Mycotoxin-producing potential of mold flora of dried beans. *Appl. Microbiol.* 29 (4): 522-526.

258.- MOON, N.J. y L.O. ELY.- 1979. Identification and properties of yeasts associated with the aerobic deterioration of wheat and alfalfa silage. *Mycopathologia*, 69 (3): 153-156.

259.- MOREAU, C.- 1973. L'Absidia corymbifera (Cohn)Sacc. et Trott, cause possible d'accidents chez des poules pondeuses. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 89: 73-78.

260.- MOREAU, C.- 1974. Moissures toxiques dans l'alimentation. Masson et Cie. Paris.

261.- MOREAU, C.- 1974. Trois cas de paralysie chez des porcs

- et des volailles vraisemblablement liés a une action toxique du Fusarium moniliforme Sheld. Bull. Soc. Myc. Fr. 90: 201-208.
- 262.- MOREAU, C.- 1978. Moisissures des aliments dans une ferme d'élevage porcin. Bull. Soc. Myc. Fr. 94 (4): 359-369.
- 263.- MOREAU, C.- 1979. Moisissures des torteaux de soja. Evolution de la mycoflore au cours du stockage. Oléagineux, 34 (1): 29-32.
- 264.- MOREAU, C.- 1979. Troubles nerveux et digestifs liés à la consommation, par les animaux, d'aliments contaminés par Aspergillus, Penicillium et Fusarium. Rev. de Mycol. 43: 227-238.
- 265.- MORENO ROMO, M.A.- 1984. Micoflora y micotoxinas en piensos comerciales para aves. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- 266.- MORENO ROMO, M.A. y G. SUAREZ FERNANDEZ.- 1985. Variaciones en la micoflora de piensos compuestos en función de su destino y forma de presentación. Zootechnia 34 (4-5-6): 61-63.
- 267.- MORENO ROMO, M.A., G. SUAREZ FERNANDEZ y M.C. RAMOS CARTAGENA.- 1985. Experimental short time production of aflatoxin by Aspergillus parasiticus in mixed feeds. Mycopathologia, 92: 49-52.

- 268.- MORI, H., K. KAWAI, F. OHBAYASHI, T. KUNIYASU, M. YAMAZAKI, T. HAMASAKI y G.M. WILLIAMS.- 1984. Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using Rat and mouse hepatocytes. *Cancer Research*, 44 : 2918-2923.
- 269.- MOUBASHER, A.H., M.A. ELNAGHY y S.I. ABDEL-HAFEZ.- 1972. Studies on the fungus flora of three grains in Egypt. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 47 (3): 261-274.
- 270.- MOUBASHER, A.H. , M.A. ELNAGHY y S.I. ABDEL-HAFEZ.- 1974. Effect of fumigation of three grains with formalin and carbon disulphide on the grain-borne fungi. *Bulletin of Faculty of Science*, 3 (2): 13-27.
- 271.- MOUBASHER, A.H., M.I.A. ABDEL-KADER y I.A. EL-KADY.- 1978. Toxigenic fungi isolated from Roquefort cheese. *Mycopathologia*, 66 (3): 187-190.
- 272.- MUHAMMED, S.I. y N. LALJI.- 1978. The distribution of geophilic dermatophytes in Kenyan soils. *Mycopathologia*, 63 (2): 95-97.
- 273.- MUJICA, M.T., G.N. UMANSKY y B.J.C. de BRACALENTI.- 1983. Comparación de dos métodos rápidos para revelar la presencia de hongos toxicogénicos. *Rev Lat-amer. Microbiol.* 25: 193-196.

- 274.- MULLER, G.H., R.W. KIRK y D.W. SCOTT.- 1983. Small animal Dermatology. W.B. Saunders Co. London.
- 275.- MULLER, T.H. y P. LEPOM.- 1985. Nachweis von T-2-Toxin und Diacetoxyscirpenol in Grobfutterstoffen mit Salinenkrebsslarven (Artemia salina L.). Mh. Vet.-Med. 40: 486-489.
- 276.- MUNTAÑOLA-CVETKOVIC, M. y J. BORISAVLJEVIC.- 1979. Mycopopulations in non-dried and dried corn grains. Biosistematika 5 (1): 1-21.
- 277.- NANDI, B. y P. HAGGBLOM.- 1984. Production of aflatoxin in rough rice under different storage conditions. Acta Agric. Scand. 34: 128-132.
- 278.- NORRED, W.P.- 1979. Effect of ammoniation on the toxicity of corn artificially contaminated with aflatoxin B<sub>1</sub>. Toxicol. Appl. Pharmacol. 51: 411-416.
- 279.- NUEHRING, L.P., G.N. ROWLAND, L.R. HARRISON, R.J. COLE y J.W. DORNER.- 1985. Cyclopiazonic acid mycotoxicosis in the dog. Am. J. Vet. Res. 46 (8): 1670-1676.
- 280.- OBIDOA, O. y I.E. NDUBUISI.- 1981. The role of zinc in the aflatoxigenic potential of Aspergillus flavus NRRL 3251 on foodstuffs. Mycopathologia, 74: 3-6.

- 281.- OGUNDERO, V.W.- 1980. Fungal flora of poultry feeds. *Mycologia*, 72: 200-202.
- 282.- OLIVIGNI, F.J. y L.B. BULLERMAN.- 1978. A microbiological assay for Penicillic acid. *J. Food. Protection*, 41 (6): 432-434.
- 283.- OORSCHOT, C.A.N. van.-1977. The genus Myceliophthora. *Persoonia*, 9: 401-409.
- 284.- OORSCHOT, C.A.N. van .- 1980.- A revision of Chrysosporium and allied genera. *Studies on Mycology* N° 20. CBS. Baarn.
- 285.- OTCENASEK, M. y J. DVORAK.- 1975. Ecological classification of dermatophytes. *Mykosen*, 18: 425-434.
- 286.- OTCENASEK, M., Z. HUBALEK y W. SIXL.- 1980. Survey of dermatophytes in the air of small mammals from Austria. *Folia Parasitologica (PRAHA)*, 27: 83-87.
- 287.- OXOID.- 1981. Manual. 4<sup>a</sup> Ed. Madrid.
- 288.- OZEGOVIC, L.- 1980. Wild animals as reservoirs of human pathogenic dermatophytes. *Medical Mycology. Zbl. Bakt. Suppl.* 8: 369-380.
- 289.- OZEGOVIC, L. y D. HLUBNA.- 1983. Molds and mycotoxin ochrato-



- xin A in regions of endemic nephropathy in Srbsosnia and Herzegovina. M.A.N. 1: 123-125.
- 290.- PARK, K.Y. y L.B. BULLERMAN.- 1983. Effects of substrate and temperature on aflatoxin production by Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus. J. Food. Prot. 46 (3): 178-184.
- 291.- PASSI, S., C. FANELLI, A.A. FABBRI, E. FINOTTI, G. PANFILI y M. NAZZARO-PORRO.- 1985. Effect of halomethanes on aflatoxin induction in cultures of Aspergillus parasiticus. J. General Microbiol. 131: 687-691.
- 292.- PATIL, S.D. y V.B. VYAWAHARE.- 1982. Aeromycoflora of the Ganeshkhind area (India). Maharashtra Vidnyan. Mandir Patrika 16 (1/2): 1-4.
- 293.- PATTERSON, D.S.P.- 1983. Aflatoxicosis in farm animals. Vet. Res. Commun. 7: 135-140.
- 294.- PAYA VICENS, M.J.- 1983. Contribución al estudio de la micoflora atmosférica de la ciudad de Madrid. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- 295.- PAYEN, J., T. GIRARD, J.C. BASILICO, S. TABBACHE y M. HASSAN. - 1983. Methodes biologiques rapides de detection des mois-



ssures toxinogenes. M.A.N. 1: 211-219.

- 296.- PAYEN, J., S. TABBACHE, T. GIRARD y M. ROUILLER.- 1983. Activités toxinogènes des Fusarium des denrées alimentaires. I. Activités mutagènes comparées de 885 extraits de Moisissures des orges de brasserie et des Malts. M.A.N. 1: 343-352.
- 297.- PAYNE, G.A. y W.M. HAGLER.- 1983. Effect of specific amino acids on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus and Aspergillus flavus in defined media. Appl. Environ. Microbiol. 46 (4): 805-812.
- 298.- PELHATE, J.- 1974-1975. Mycoflore des mais-fourrages ensilés Revue de Mycologie, 29: 65-95.
- 299.- PELHATE, J. y E. AGOSIN.- 1985. Mycoflore spontanée des pailles de blé. Cryptogamie, Mycol. 6: 1-19.
- 300.- PEREIRO MIGUENS, M.- 1985. Aislamiento del suelo de agentes de micosis oportunistas. Rev. Iber. Micol. 2 (2): 141-157.
- 301.- PHILLIPS, D.J., B. MACKEY, W.R. ELLIS y T.N. HANSEN.- 1979. Occurrence and interaction of Aspergillus flavus with other fungi on almonds. Phytopathology, 69 (8): 829-831.
- 302.- PHILPOT, C.M. y A.P. BERRY.- 1984. The normal fungal flora

of dogs. A preliminary report. Mycopathologia, 87 : 155-157.

303.- PINELLO, C.B., J.L. RICHARD y L.H. TIFFANY.- 1977. Mycoflora of a turkey confinement brooder house. Poultry Science, 56: 1920-1926.

304.- PIONTELLI, E. y G. CARETTA.- 1974. Considerazioni ecologiche su alcuni geomiceti isolati su substrati cheratinici, in localita montagnose delle Ande del Cile. Rivista di Patologia Vegetale 10 (3): 261-314.

305.- PITT, J.I.- 1979. The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces. Ed. Academic Press. London.

306.- PITT, J.I., A.D. HOCKING y D.R. GLENN.- 1983. An improved medium for the detection of Aspergillus flavus and A. parasiticus. J. Appl. Bacteriol. 54: 109-114.

307.- PUGH, G.J.F. y G.C. HUGHES.- 1975. Epistolae mycologicae V. Keratinophilic fungi from British Columbia coastal habitats. Syesis, 8: 297-300.

308.- PUNSOLA, L. y J. GUARRO.- 1984. Distribution of mating types of the "Microsporium gypseum Complex" in spanish soils. Mykosen, 27 (4): 191-193.

- 309.- RAPER, K.B. y C. THOM.- 1949. A manual of Penicillia. Williams & Wilkins Co., Baltimore. USA.
- 310.- RAPER, K.B. y D.I. FENNEL.- 1965. The genus Aspergillus. Williams & Wilkins Co., Baltimore. USA.
- 311.- RAY, L.L. y L.B. BULLERMAN.- 1982. Preventing growth of potentially toxic molds using antifungal agents. J. Food. Prot. 45 (10): 953-965.
- 312.- REBELL, G. y D. TAPLIN.- 1974. Dermatophytes, their recognition and identification. Univ. of Miami Press. Florida.
- 313.- REDDY, T.V., L.VISWANATHAN y T.A. VENKITASUBRAMANIAN.- 1971. High aflatoxin production on a chemically defined medium. Appl. Microbiol. 22 (3): 393-396.
- 314.- REIB, J.- 1982. Development of Aspergillus parasiticus and formation of Aflatoxin B<sub>1</sub> under the influence of conidogenesis affecting compounds. Arch. Microbiol. 133: 236-238.
- 315.- REISS, J.- 1975. Mycotoxin bioassay using Bacillus stearothermophilus. J.A.O.A.C. 58: 624-625.
- 316.- REISS, J. 1976.- Comparison of three culture media for the detection of aflatoxin forming strains of Aspergillus

- flavus in bread. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B, 163: 536-539.
- 317.- RICHARD, J.L., S.J. CYSEWSKI.- 1971. Occurrence of aflatoxin producing strains of Aspergillus flavus Link in stored corn. Mycopathol. Mycol. Appl. 44 (3): 221-229.
- 318.- RICHARD, J.L. y R.T. GALLAGHER.- 1979. Multiple toxin production by an isolate of Aspergillus flavus. Mycopathologia, 67 (3): 161-163.
- 319.- RIFAI, M.A.- 1969. A revision of the genus Trichoderma. Mycological Papers N<sup>o</sup> 116. C.M.I., Kew, Surrey, England.
- 320.- RIPPON, J.W.- 1977. Pathogenesis and epidemiology of opportunistic mycotic infections: a review. Am. J. Med. Technol. 43: 226-228.
- 321.- ROBB, J., K.S. KIRKATRICK y M. NORVAL.- 1982. Association of toxin-producing fungi with disease in broilers. Vet. Rec. 111: 389-390.
- 322.- ROBB, J. y M. NORVAL.- 1983. Comparison of cytotoxicity and thin layer chromatography methods for detection of mycotoxins. Appl. Environ. Microbiol. 46 (4): 948-950.
- 323.- ROMAND, A. y J. LAFONT.- 1983. Effects de mycotoxins sur

- le phenomene de transformation chez Streptococcus sanguis.  
M.A.N. 1: 271-275.
- 324.- RUFFIN, P., S. ANDREU, G. BISERTE y J. BIGUET.- 1976. Sulphitolysis in keratinolysis. Biochemical proof. Sabouraudia, 14: 181-184.
- 325.- SALKIN, I.F., G.E. HOLLIICK, N.J. HURD y M.E. KEMNA.- 1985. Evaluation of human hair sources for the in vitro hair perforation test. Journal of Clinical Microbiology, 22 (6): 1048-1049.
- 326.- SAMSON, R.A.- 1974. Paecilomyces and some allied Hyphomycetes Studies in Mycology N° 6. C.B.S. Baarn.
- 327.- SAMSON, R.A.- 1979. A compilation of the Aspergilli described since 1965. Studies in Mycology N° 18. C.B.S. Baarn.
- 328.- SAMSON, R.A., E.S. HOEKSTRA y C.A.N. van OORSCHOT.- 1984. Introduction to food-borne fungi. 2ª Ed. C.B.S. Baarn.
- 329.- SANCHEZ FRANCO, A., M.I. LACASA MILLAN, F.J. GUTIERREZ GALINDO, J.L. MUZQUIZ MORACHO y J.L. ALONSO MARTINEZ.- 1981. Environmental fungous flora in quail-breeding farms. Avian Dis. 25 (2): 254-259.
- 330.- SANCHIS, V., A. SAMO, J. HERNANDEZ y E. HERNANDEZ.- 1980.

Contenido de aflatoxinas y Aspergillus flavus en maiz almacenado en silos comerciales. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 20 (3): 371-380.

331.- SANCHIS, V., I. VIÑAS, M. JIMENEZ, M.A. CALVO y E. HERNANDEZ.-1982. Mycotoxin-producing fungi isolated from bin-stored corn. Mycopathologia, 80: 89-93.

332.- SANCHIS, V., I. VIÑAS, M. JIMENEZ y E. HERNANDEZ.- 1983. Detección rápida de cepas de Aspergillus flavus productoras de aflatoxinas. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 23 (1):54-59.

333.- SCHINDLER, A.F., J.G. PALMER y W.V. EISENBERG.- 1967. Aflatoxin production by Aspergillus flavus as related to various temperatures. Appl. Microbiol. 15 (5): 1006-1009.

334.- SCHROEDER, H.W.- 1966. Effect of corn steep liquor on mycelial growth and aflatoxin production in Aspergillus parasiticus. Appl. Microbiol. 14 (3): 381-385.

335.- SCHROEDER, H.W. y H.HEIN.- 1967. Aflatoxins: Production of the toxins in vitro in relation to temperature. Appl. Microbiol. 15 (2): 441-445.

336.- SCHROEDER, H.W. y H. HEIN.- 1968. Effect of diurnal temperature cycles on the production of aflatoxin. Appl. Microbiol. 16 (7): 988-990.

- 337.- SCHROEDER, H.W. y R.A. BOLLER.- 1973. Aflatoxin production of species and strains of the Aspergillus flavus group isolated from field crops. Appl. Microbiol. 25 (6): 885-889.
- 338.- SCHUDEBOOM, L.J.- 1983. Development of legislation concerning mycotoxins in dairy products in The Netherlands. M.A.N. 1: 179-185.
- 339.- SCOTT, B.- 1965. Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. Mycopathol. Mycol. Appl. 25: 213-222.
- 340.- SCOTT, P.M., W. van WALBEEK y J. FORGACS.- 1967. Formation of aflatoxins by Aspergillus ostianus Wehmer. Appl. Microbiol. 15 (4): 945.
- 341.- SCOTT, P.M., J.W. LAWRENCE y W. van WALBEEK.- 1970. Detection of mycotoxins by thin layer chromatography: application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol. 20 (5): 839-842.
- 342.- SCOTT, P.M.- 1978. Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin. J. Food Protection, 41 (5): 385-398.
- 343.- SCOTT, P.M.- 1982. Mycotoxin analysis by TLC. en Advances in thin layer chromatography. J.C. Touchstone (Ed.). Jhon Willey & sons, Inc. New York: 321-342.



- 344.- SEENAPA, M. y A.G. KEMPTON.- 1980. Aspergillus growth and aflatoxin production on black pepper. Mycopathologia, 70 (3): 135-137.
- 345.- SHARMA, A., A.G. BEHERE, S.R. PADWAL-DESAI y G.B. NADKARNI.- 1980. Influence of inoculum size of Aspergillus parasiticus spores on aflatoxin production. Appl. Environ. Microbiol. 40 (6): 989-993.
- 346.- SHARMA, A. y S.R. PADWAL-DESAI.- 1985. On the relationship between pellet size and aflatoxin yield in Aspergillus parasiticus . Biotechnology and Bioengineering, 27: 1577-1580.
- 347.- SHIH, C.N. y E.H. MARTH.- 1972. Experimental production of aflatoxin on brick cheese. J. Milk Food Technol. 35 (10): 585-587.
- 348.- SHIH, C.N. y E.H. MARTH.- 1973. Release of aflatoxin from the mycelium of Aspergillus parasiticus into liquid media. Z. Lebensm. Unters.- Forsch. 152: 336-339.
- 349.- SHIH, C.N. y E.H. MARTH.- 1974. Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by Aspergillus parasiticus. Appl. Microbiol. 27 (3): 452-456.
- 350.- SHIH, C.N. y E.H. MARTH.- 1974. Aflatoxin formation, lipid synthesis and glucose metabolism by Aspergillus parasiticus



during incubation with and without agitation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 338: 286-296.

351.- SHOTWELL, O.L., C.W. HESSELTINE, R.D. STUBBLEFIELD y W.G. SORENSON.- 1966. Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.* 14 (3): 425-428.

352.- SHREEVE, B.J., D.S.P. PATTERSON y B.A. ROBERTS.- 1975. Investigation of suspected cases of mycotoxicoses in farm animals in Britain. *Vet. rec.* 97 (15): 275-278.

353.- SIM, T.S., T. TEO y T.F. SIM.- 1985. A note on the screening of dried shrimps, shrimps paste and raw groundnut kernels for aflatoxin-producing Aspergillus flavus. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 29-34.

354.- SIRIWARDANA, M.- 1983. Action of the aflatoxin B<sub>1</sub> on the yeast Saccharomyces cerevisiae genetics. *M.A.N.* 1: 265-269.

355.- SNEDECOR, G.W. y W.G. COCHRAN.- 1982. Métodos estadísticos. 9ª Ed. C.E.C.S.A. Mexico.

356.- STOTT, W.T. y L.B. BULLERMAN.- 1975. Microbiological assay of patulin, using Bacillus megaterium. *J.A.O.A.C.* 58 (3): 497-499.

357.- STUBBLEFIELD, R.D., D.L. SHOTWELL, C.W. HESSELTINE, M.L.

- SMITH y H.H. HALL.- 1967. Production of aflatoxin on wheat and oats: measurement with a recording densitometer. *Appl. Microbiol.* 15 (1): 186-190.
- 358.- STUTZ, H.K. y P.H. KRUMPERMAN.- 1976. Effect of temperature cycling on the production of aflatoxin by Aspergillus parasiticus. *Appl. Environ. Microbiol.* 32 (3): 327-332.
- 359.- SUAREZ, G., J. GUARRO y M.A. CALVO.- 1981. Toxicological study of fungi isolated from starches intended for human consumption. *Mycopathologia*, 75: 27-31.
- 360.- TARTER, E.J., J.P. HANCHAY y P.M. SCOTT.- 1984. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities. *J.A.O.A.C.* 67 (3): 597-600.
- 361.- THOMAS, F., R.M. EPPLEY y M.W. TRUCKSESS.- 1975. Rapid screening method for aflatoxins and zealarenone in corn. *J.A.O.A.C.* 58 (1): 114-116.
- 362.- TIWARI, R.P., C.K. DHAM, T.C. BHALLA, S.S. SAINI y D.V. VADEHRA.- 1985. Mechanism of action of aflatoxin B<sub>1</sub> in Bacillus megaterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (4): 904-907.
- 363.- TORREY, G.S. y E.H. MARTH.- 1976. Silica gel medium to

- detect molds that produce aflatoxin. Appl. Environ. Microbiol. 32 (3): 376-380.
- 364.- TRENK, H.L. y P.A. HARTMAN.- 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. Appl. Microbiol. 19 (5): 781-784.
- 365.- TRUCKSESS, M.W., W.C. BRUMLEY y S. NESHEIM.- 1984. Rapid quantification and confirmation of aflatoxins in corn and peanut butter, using a disposable silica gel column, thin layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. J.A.O.A.C. 67 (5): 973-975.
- 366.- TSAI, W.Y.J., J.D. LAMBERT y L.B. BULLERMAN.- 1984. Simplified method for microscale production and quantification of aflatoxin in broth. J. Food Protection, 47 (7): 526-529.
- 367.- TUIITE, J., R. SENSMEIER, C. KOH-KNOX y R. NOEL.- 1984. Preharvest aflatoxin contamination of dent corn in Indiana in 1983. Plant Disease, 68: 893-895.
- 368.- TUIITE, J., C. KOH-KNOX, R. STROSHINE, F.A. CANTONE y L.F. BAUMAN.- 1985. Effect of physical damage to corn kernels on the development of Penicillium species. Phytopathology 75 (10): 1137-1140.

- 369.- UDAGAWA, S.I.- 1963. Microascaceae in Japan. J. Gen. Appl. Microbiol. 9 (2): 137-147.
- 370.- VALLE MANZANO, J., M.J. PAYA VICENS, S. VADILLO MACHOTA y G. SUAREZ FERNANDEZ.- 1985. Dermatofitos y flora saprófita en perros y gatos con lesiones sospechosas de dermatofitosis. Rev. Iber. Micol. 2 (2): 109-118.
- 371.- VANBREUSEGHEM, R.- 1952. Technique biologique pour l'isolement des dermatophytes du sol. Ann. Soc. Belge Méd. Trop. 32: 175-178.
- 372.- VANBREUSEGHEM, R.- 1952. Intérêt théorique et pratique d'un nouveau dermatophyte isolé du sol: Keratinomyces ajelloi gen. nov. sp.nov. Bull. Acad. Roy. Belg. Cl. Sci. 38: 1068-1077.
- 373.- VERRET, M.J., J.P. MARLIAC y J. McLAUCHIN.- 1964. Use of the chicken embryo in the assay of aflatoxin toxicity. J.A.O.A.C. 47 (6): 1003-1006.
- 374.- VESELY, D., D. VESELA y R. JELINEK.- 1982. Nineteen mycotoxins tested on chicken embryos. Toxicology letters, 13: 239-245.
- 375.- VOGEL, P. de, R. van RHEE y B. KOELENSMID.- 1965. A rapid screening test for aflatoxin-synthesizing aspergilli of

- the flavus-oryzae group. J. Appl. Bacteriol. 28: 213-220.
- 376.- VRIES, G.A. de .- 1952. Contribution to the genus Cladosporium Baarn. Reprint J. Cramer, Lehre, Germany.
- 377.- VRIES, G.A. de .- 1962. A keratinophilic fungi and their action. Antonie van Leeuwenhoek, 28: 121-133.
- 378.- WALLACE, H.A.H. y R.N. SINHA.- 1975. Microflora of stored grain in international trade. Mycopathologia, 57 (3): 171-176.
- 379.- WEBB, T.A. y J.O. MUNDT.- 1978. Molds on vegetables at the time of harvest. Appl. Environ. Microbiol. 35 (4): 655-658.
- 380.- WECKBACH, L.S. y E.H. MARTH.- 1977. Aflatoxin production by Aspergillus parasiticus in a competitive environment. Mycopathologia, 62 (1): 39-45.
- 381.- WELLS, J.M. y J.A. PAYNE.- 1975. Mycoflora of pecans treated with heat, low temperatures or methyl bromide for control of the pecan weevil. Phytopathology, 65 (12): 1393-1395.
- 382.- WELLS, J. y J.A. PAYNE.- 1976. Toxigenic species of Penicillium, Fusarium and Aspergillus from weevil-damaged pecans.

- method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zealarenone, penicillic acid and citrinin. J.A.O.A.C. 59 (1): 125-127.
- 389.- WILSON, D.M., L.T. SANGSTER y D.M. BEDELL.- 1984. Recognizing the signs of porcine aflatoxicosis. Vet. Med. : 974-977.
- 390.- WLOSTOWSKI, T.- 1984. Effect of soil fungi on the growth of Aspergillus flavus Link ex Fries and production of Aflatoxin B<sub>1</sub> . Ekol. pol. 32 (1): 177-187.
- 391.- WU, M.T., J.C. AYRES y P.E. KOEHLER.- 1974. Toxigenic Aspergilli and Penicillia isolated from aged, cured meats. Appl. Microbiol. 28 (6): 1094-1096.
- 392.- WYLLIE, T.D. y L.G. MOREHOUSE (Eds).- 1977. Mycotoxic fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses. Vol I-III. Marcel Dekker Inc. New York.
- 393.- YATES, I.E.- 1985. Cytotoxicity and mutagenicity of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in Photobacterium phosphoreum. J. Microbiol. Methods, 3: 181-186.
- 394.- YOUNG, J.C. y R.G. FULCHER.- 1984. Mycotoxins in grains: causes, consequences and cures. Cereal Foods World, 29 (11): 725-728.

- 395.- YOUSEF, A.E. and E.H. MARTH.- 1981. Growth and synthesis of aflatoxin by Aspergillus parasiticus in the presence of sorbic acid. J. Food Protection, 44 (10): 736-741.
- 396.- YOUSEF, A.E. y E.H. MARTH.- 1983. Kinetics of aflatoxin biosynthesis by Aspergillus parasiticus in the presence of N<sup>α</sup>-Palmitoyl-L-lysyl-L-lysine-Ethyl Ester Dihydrochloride or Dichlorvos. Biotechnol. Bioeng. 25: 671-685.
- 397.- YOUSEF, A.E. y E.H. MARTH.- 1983. Incorporation of (<sup>14</sup>C) Acetate into aflatoxin by resting cultures of Aspergillus parasiticus in the presence of antifungal agents. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 103-108.
- 398.- YOUSEF, A.E. y E.H. MARTH.- 1984. Kinetics of growth and accumulation of aflatoxin B<sub>1</sub> by Aspergillus parasiticus in the presence of butylated hydroxyanisole, isoprothiolane and nystatin. Biotechnol. Bioeng. 26: 6-11.
- 399.- ZERFIRIDIS, G.K.- 1985. Potential aflatoxin hazards to human health from direct mold growth on Teleme cheese. J. Dairy Sci. 68: 2184-2188.
- 400.- ZERFIRIDIS, G.K.- 1985. Production of aflatoxins on inoculated Teleme cheese. J. Food Protection, 48 (11): 961-964.
- 401.- ZYCHA, H. y R. SIEPMANN.- 1969. Mucorales. J. Cramer, Lehre. Germany.