



Nota Técnica

Parámetros cinéticos como herramienta para la caracterización de aislados de *Aspergillus* sección *Nigri*

Kinetic parameters as tool for characterization of isolates of *Aspergillus* section *Nigri*

María Silvina **Sobrero**^{1*}, Laura N. **Frisón**², Carolina A. **Chiericatti**², E. Elena **Aríngoli**²,
Juan C. **Basílico**², María L. Z. **Basílico**²

¹Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Paraje El Pozo.

²Facultad de Ingeniería Química. Santiago del Estero 2829.

Universidad Nacional del Litoral (3000). Santa Fe, Argentina.

*Autora para correspondencia: ssobrero@fcb.unl.edu.ar

Aceptado 26-Agosto-2013

Resumen

Las especies de *Aspergillus* dentro de la sección *Nigri* son importantes en procesos biotecnológicos, así como en el biodeterioro. Bajos condiciones de cultivo controladas, la velocidad de crecimiento es una característica de las especies de hongos y algunos autores utilizan la medida del diámetro de las colonias como herramienta de identificación. El objetivo de este estudio fue determinar si la velocidad de crecimiento obtenida por la Microbiología Predictiva puede ser utilizada como herramienta para la caracterización de aspergilos negros. Se construyeron las curvas de crecimiento de 5 aislados de aspergilos negros obtenidos de alimentos y ambiente de industria láctea. Estos aislados, también fueron estudiados por sus características morfológicas y estudios de microscopía electrónica. Se identificaron como *A. awamori*, *A. niger* (2 aislados), *A. foetidus* y *A. carbonarius*. Las velocidades máximas de crecimiento en medio Agar Extracto de Malta a 25 °C fueron: 3,51; 4,85; 4,52; 12,73; y 5,84 mm/día, respectivamente. *A. foetidus* fue el único que presentó fase de latencia y alcanzó el mayor radio. Con la ayuda de la Microbiología Predictiva se pudieron separar *A. awamori* de *A. foetidus*, pero las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) para los otros aislados. Los caracteres morfológicos permitieron diferenciar a *A. carbonarius*. Los datos cinéticos por sí solos no fueron suficientes para diferenciar especies cercanas.

Palabras claves: *Aspergillus* sección *Nigri*, aspergilos negros, caracterización, especies de *Aspergillus*, micología predictiva, velocidad de crecimiento.

Abstract

Aspergillus species within section *Nigri* are important in biotechnological processes as well as in the biodeterioration. Low controlled culture conditions, the growth rate is a characteristic of the species of fungi and some authors use the measurement of colony diameter as identification tool. The aim of this study was to determine if the growth rate obtained by Predictive Microbiology can be used as a tool for the characterization of black aspergilli. Growth curves of 5 black aspergilli isolates obtained from food and dairy environment were constructed. These isolates were also studied for their morphological and electron microscopy studies. Were identified as *A. awamori*, *A. niger* (2 isolates), *A. foetidus* and *A. carbonarius*. Maximum growth rates in Malt Extract Agar at 25 °C were: 3.51, 4.85, 4.52, 12.73 and 5.84 mm/day, respectively. The only one showing a phase of latency and achieved the largest radius was *A. foetidus*. Could be separated *A. awamori* of *A. foetidus* with the help of Predictive Microbiology, but the differences were not significant ($p > 0.05$) for the other isolates. Morphological characters were able to differentiate to *A. carbonarius*. Kinetic data alone were not sufficient to differentiate closely related species.

Key words: *Aspergillus* section *Nigri*, *Aspergillus* species, black aspergilli, characterization, growth rate, predictive mycology.

INTRODUCCIÓN

Los *Aspergillus* dentro de la sección *Nigri* son importantes en procesos biotecnológicos y producción de extrolitos como: ácidos orgánicos y enzimas extracelulares, así como también en el biodeterioro de una gran variedad de sustratos (Wösten, 2007; Meijer *et al.*, 2011). *A. niger*, *A. awamori* y algunos de sus productos son considerados GRAS ('generalmente reconocido como seguro') por la United States Food and Drug Administration (USDA) (Bigelis y Lasure, 1987; Carlile *et al.*, 2001). En cambio se ha informado la capacidad de producción de ocratoxina A (micotoxina) por algunos representantes de este grupo (Abarca *et al.*, 1994; Samson *et al.*, 2004).

Desde la publicación de Raper y Fennell (1965) para la identificación del género *Aspergillus* basada en criterios morfológicos,

todas las especies con cabezas conidiales en tonos de negro se incluían en: *Aspergillus* sección *Nigri*. Los representantes de este grupo se encuentran distribuidos ubicuamente y pueden crecer en una amplia variedad de sustratos (Varga *et al.*, 2011). A veces el mismo aislado es preservado en colecciones de cultivos bajo diferentes nombres, causando una identificación ambigua, ya que la taxonomía de los aspergilos negros no es clara y en algunos casos las diferencias entre las especies son muy sutiles (Abarca *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011). Muchos autores la han revisado utilizando diferentes técnicas para ello, como: el aspecto de la colonia, la microscopía óptica y electrónica, fisiología, producción de metabolitos y en los últimos años técnicas de biología molecular (Al-Musallam, 1980; Klich y Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989; Pitt, 2000; Samson *et al.*, 2007; Geiser *et al.*, 2007; Perrone *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Bajo condiciones controladas de cultivo, la velocidad de crecimiento es una característica de la especie fúngica (Carlile *et al.*, 2001), y algunos autores utilizan la medida del diámetro de las colonias en un momento específico como una herramienta de identificación (Samson *et al.*, 2007; Pitt y Hocking, 2009). El modelo matemático desarrollado por Baranyi y Roberts (1995) permite utilizar la Microbiología Predictiva para construir las curvas de crecimiento de microorganismos (Dantigny *et al.*, 2005; Samapundo *et al.*, 2007). Hasta ahora los datos cinéticos no han sido utilizados como herramienta taxonómica.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la velocidad de crecimiento obtenida por la Microbiología Predictiva puede ser utilizada como herramienta para la caracterización de aspergilos negros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para el aislamiento se trabajó de acuerdo a la metodología de Pitt y Hocking (2009). Se seleccionaron muestras de uvas, maíz, tomate y pasas de uva visiblemente alterados de comercios minoristas de la ciudad de Santa Fe (Argentina). Las colonias superficiales se tomaron con ansa aguja y se sembraron sobre el medio de aislamiento. Las muestras de aire de ambiente de industria láctea de la zona, se obtuvieron utilizando un equipo de muestreo de aire centrífugo Standard RCS (Biotest Diagnostics Corporation, Denville, New Jersey, USA), el cual opera bajo el principio de impacto de un volumen de aire de 40 L/min sobre tiras multipocillo con medio de aislamiento. El tiempo utilizado para la toma de cada muestra fue de 30 segundos, en los días de toma de muestra la temperatura y la humedad relativa promedio fueron de 18 °C y de 75 %, respectivamente. El muestreador fue descontaminado con alcohol isopropílico al 70

% (v/v) antes de cada muestreo, siguiendo la metodología descrita en Aríngoli *et al.* (2008). Para el aislamiento se utilizó como medio de cultivo Agar Extracto de Malta (MEA, 'Malt Extract Agar') con agregado de cloranfenicol (100 mg/L) para inhibir el crecimiento bacteriano, incubando a 25 °C por 7 días.

Las placas fueron observadas bajo un estereomicroscopio Leica ZOOM 2000, modelo Z45 V (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Los aspergilos negros fueron sembrados individualmente sobre placas de medio MEA e incubando como se indicó anteriormente hasta obtener colonias puras. Se obtuvieron 5 aislados de aspergilos negros: aislado 1 (A1) obtenido de uvas, aislado 2 (A2) de maíz, aislado 3 (A3) de tomate, aislado 4 (A4) de ambiente de industria láctea y aislado 5 (A5) de pasas de uva. Se almacenaron en crioviales con 0,2 % de agar-agua (m/v) a 7 °C hasta su uso. Estos cultivos fueron conservados en el Cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química (LMFIQ) de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

Observaciones morfológicas

Para las caracterizaciones morfológicas de los cultivos se siguió la metodología de Klich (2002). Los cultivos fueron sembrados por 3 toques sobre placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio MEA, Agar Extracto de Levadura Czapek (CYA, 'Czapek Yeast Extract Agar') y Agar Czapek-Dox (CZ) e incubando a 25 °C. También se incubó a 37 °C sobre medio CYA. Los cultivos fueron examinados macro y microscópicamente a los 7 y 14 días. También se realizaron cultivos sobre Agar Creatina Sacarosa (CREA, 'Creatine Sucrose Agar') de acuerdo a Samson *et al.* (2007). El crecimiento y esporulación de la colonia o producción de ácido luego de la incubación por 7 días a 25 °C en el medio CREA se pueden utilizar como complemento para la identificación. Para verificar la producción de alcaloides se utilizó

el test de Ehrlich (Lund, 1995; Samson *et al.*, 2007).

Microscopía electrónica de barrido (SEM, 'Scanning Electron Microscopy')

Para caracterizar las formas y superficies de los conidios se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM). Los aislados se sembraron en Agar Czapek (ACZ) y se incubaron a 25 °C por 5 semanas (Kozakiewicz, 1989). Las muestras se recubrieron con oro con un equipo SPI Module™ Sputter, SPI 12157-AX (SPI® Supplies/Structure Probe, Inc., West Chester, PA, USA), operado en atmósfera de argón. Se observaron con un microscopio electrónico de barrido marca JEOL, modelo JSM-35C (JEOL, Ltd., Tokio, Japón) equipado con un sistema de imagen. Las fotografías se tomaron bajo la apariencia de imágenes de electrones secundarios con un voltaje de aceleración de 20 y/o 22 kV. Finalmente se ingresó con todos los datos a las claves publicadas por Kozakiewicz (1989).

Preparación del inóculo y evaluación del crecimiento

La suspensión de conidios se preparó suspendiendo en Tween® 80 (0,1 % m/v) los conidios obtenidos por raspado de la superficie de las placas de MEA (previamente incubadas por 10 días a 25 °C). La concentración se ajustó a 10^7 - 10^8 conidios/mL. Se inocularon 2 μ L de la suspensión de conidios en el centro de placas con medio MEA. Se trabajó por quintuplicado incubando a 25 °C. Se midieron los radios por sextuplicado diariamente durante 10 días.

Análisis estadístico de los resultados

La medida de los radios de las colonias de cada aislado se ajustaron de acuerdo al programa DMFit (Institute of Food Research, Norwich, UK), descrito por Baranyi y Roberts

(1995). Permite la determinación de los parámetros de crecimiento de las colonias $\mu_{\text{máx}}$ (mm/día), fase de latencia λ (días), radio inicial de la colonia y_0 (mm) y radio máximo de la colonia $y_{\text{máx}}$ (mm) al final de la fase exponencial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observaciones morfológicas

Las características de los diferentes aislados se resumen en el Cuadro 1. En todos los medios de cultivo sembrados y para todos los aislados estudiados, las características macroscópicas de las colonias fueron: color de la colonia entre marrón oscuro a negro presentando un aspecto granuloso en medio CYA a 25 °C y 37 °C, y en CZ a 25 °C. En medio MEA eran inconspicuas. El reverso de las mismas fue amarillo claro o crema a excepción de A3 que presentó color amarillo opaco intenso. En ningún caso se observó exudado, pigmento soluble o presencia de esclerocios.

El crecimiento en medio CREA para los aislados A1, A2, A3 y A4 fue bueno. En todos los casos el reverso de las colonias y el medio de cultivo circundante era amarillo por el viraje del indicador púrpura de bromocresol por producción de ácido. En el caso de A5 el desarrollo fue menor, el reverso de la colonia amarilla pero el medio de cultivo circundante permaneció de color púrpura.

El Test de Ehrlich (Samson *et al.*, 2007) mostró diferencias en las coloraciones observadas. El A1 presentó color azul, mientras que A2, A3 y A4 mostraron color amarillo.

En cuanto a las características microscópicas, todos los aislados fueron biseriados con vesículas globosas y estipes de paredes lisas. Los conidios presentaron color marrón oscuro a negro. La característica distintiva entre los aislados estudiados fue que A2 y A4 presentaron vesículas y métulas más largas que los demás. En cuanto a la longitud de

Cuadro 1.- Características macroscópicas y microscópicas de los aislados de aspergilos negros.

Características	Aislado				
	A1	A2	A3	A4	A5
Diámetro de las colonias (mm)*					
CYA 25 °C	48-66	53-63	55-60	55-62	61-70
MEA 25 °C	50-60	46-57	60-73	47-56	60-69
CYA 37 °C	65-70	58-69	58-61	59-70	18-29
CZ 25 °C	30-60	42-54	31-38	42-53	30-41
CREA 25 °C	45-50	48-52	38-41	48-51	18-22
Test de Ehrlich	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo
Aspecto microscópico (µm)**					
Estipes	598-1425	570-2500	320-750	600-2650	1500-3250
Vesículas	31-47	40-65	42-47	38-70	75-80
Métulas	11-18	12-18	9-15	13-17	23-38
Conidios	4,0-4,5	4,0-4,5	4,2-4,5	3,9-4,4	6,9-8,8

* Diámetro de la colonia luego de 7 días de incubación.

** Datos en MEA luego de 7 días a 25 °C (observados con objetivo de 100X).

las estipes, A3 presentó estipes cortas (320 - 750 µm) mientras que A5 muy largas (1500 - 3250 µm). Se pudieron observar diferencias en la rugosidad de los conidios. A1 y A3 presentaron conidios ligeramente rugosos a lisos, A2 y A4 conidios rugosos y A5 conidios muy rugosos y de mayor tamaño que los otros aislados (6,9 - 8,8 µm).

El crecimiento en medio CREA para los aislados A1, A2, A3 y A4 fue bueno. En todos los casos el reverso de las colonias y el medio de cultivo circundante era amarillo por el viraje del indicador púrpura de bromocresol por producción de ácido. En el caso de A5 el desarrollo fue menor, el reverso de la colonia amarilla pero el medio de cultivo circundante permaneció de color púrpura.

El Test de Ehrlich (Samson *et al.*, 2007) mostró diferencias en las coloraciones observadas. El A1 presentó color azul, mientras que A2, A3 y A4 mostraron color amarillo.

En cuanto a las características microscópicas, todos los aislados fueron biseriados con vesículas globosas y estipes de paredes lisas. Los conidios presentaron color marrón oscuro a negro. La característica distintiva entre los aislados estudiados fue que A2 y A4 presentaron vesículas y métulas más largas que los demás. En cuanto a la longitud de las estipes, A3 presentó estipes cortas (320 - 750 µm) mientras que A5 muy largas (1500 - 3250 µm). Se pudieron observar diferencias en la rugosidad de los conidios. A1 y A3 presentaron conidios ligeramente rugosos a lisos, A2 y A4 conidios rugosos y A5 conidios

muy rugosos y de mayor tamaño que los otros aislados (6,9 - 8,8 μm).

Con los datos suministrados por el Cuadro 1, se comparó con las claves de Klich (2002). En estas claves para diferenciar *A. awamori* de *A. foetidus* es necesario contar con los datos de las colonias en CYA a 37 °C y en CY 20S. Como este último no se realizó, para discriminar entre estos 2 aislados se utilizó el dato adicional de las diferencias que presentaron en el Test de Ehrlich. Los aislados se identificaron acorde a Klich (2002) como: A1 *Aspergillus awamori* Nakazawa, A2 y A4 *A. niger* van Tieghem, A3 *A. foetidus* Thom y Raper y A5 *A. carbonarius* (Bainier) Thom.

Las microfotografías obtenidas por SEM (Fig. 1) mostraron que los aislados A1, A2, A3 y A4 presentaban conidios verrucosos, mientras que los de A5 eran equinulados. Estas microfotografías fueron comparadas con las publicadas por Kozakiewicz (1989).

Los aislados se identificaron según Kozakiewicz (1989) basado en SEM como: A1 *A. niger* var. *awamori* (Nakazawa) Al-Musallam, A2 y A4 como *A. niger* var. *niger* van Tieghem, A3 *A. niger* var. *ficuum* (Reichardt) Kozakiewicz y A5 como *A. carbonarius* (Bainier) Thom.

De acuerdo con lo tabulado por Perrone *et al.* (2007), la nomenclatura para *A. niger* var. *niger* van Tieghem (A2 y A4) y para el *A. carbonarius* (A5) se ha mantenido a través del tiempo, desde Raper y Fennell (1965) hasta Samson *et al.* (2004). En cambio, *A. awamori* (A1) de Raper y Fennell (1965), se llama actualmente para Samson *et al.* (2004) *A. costaricaensis*. La especie para la cual la taxonomía puede ocasionar mayores confusiones es *A. foetidus* (A3) de Raper y Fennell (1965). Fue la que sufrió más cambios a través de los años. Al-Musallam (1980) la llamó *A. niger* var. *usamii*, Kozakiewicz (1989) *A. niger* var. *ficuum* y Samson *et al.* (2004) *A. piperis*.

La identificación de los aspergilos negros mostró que las especies biseriadas

incluidas en la sección *Nigri* son difíciles de diferenciar por sus caracteres morfológicos y fisiológicos. Estas conclusiones son coincidentes con Abarca *et al.* (2004) quienes señalaron que todos los taxones incluidos en *A. niger* agregado, son morfológicamente indistinguibles. Los caracteres morfológicos si permitieron diferenciar a *A. carbonarius*.

Los datos aportados por SEM, solo permitieron dividir los aislados con conidios verrucosos de los equinulados.

Cinética del crecimiento fúngico

El Cuadro 2 y la Fig. 2 muestran los parámetros cinéticos y las curvas de crecimiento que se obtuvieron al ajustar los resultados (150 datos experimentales para cada aislado) con el modelo de Baranyi y Roberts (1995) y el programa DMFit.

Como los datos no presentaron una distribución normal, se utilizó el test de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre los valores $\mu_{\text{máx}}$ e $y_{\text{máx}}$.

La comparación de los pares de valores de $\mu_{\text{máx}}$ mostraron diferencias significativas en 3 casos (Cuadro 2): A1 con respecto a A2, A4 y A5 ($p = 0,0143$), mientras que la comparación de A2, A4 y A5 no presentaron diferencias significativas ($p = 0,0846$). El valor de $\mu_{\text{máx}}$ de A3 fue mucho mayor que la de los otros aislados y fue el único que presentó fase lag ($\lambda = 0,33$ días).

El análisis de $y_{\text{máx}}$ permitió separar los aislados en 2 grupos, en el primero se incluyeron A1, A2 y A4 que se separaron del otro grupo formado por A3 y A5 ($p = 0,0016$).

A los 2 días, los radios de las colonias alcanzaron entre 5 y 10 mm. A los 4 días A3 alcanzó su máximo crecimiento; A2 y A4 lo hicieron a los 5 días, mientras que A5 a los 6 días. A1 (el más lento) lo hizo a los 8 días (Fig. 2).

Los valores obtenidos en el presente trabajo mostraron que a pesar de que el aislado A1 compartió el mismo $y_{\text{máx}}$ luego de una

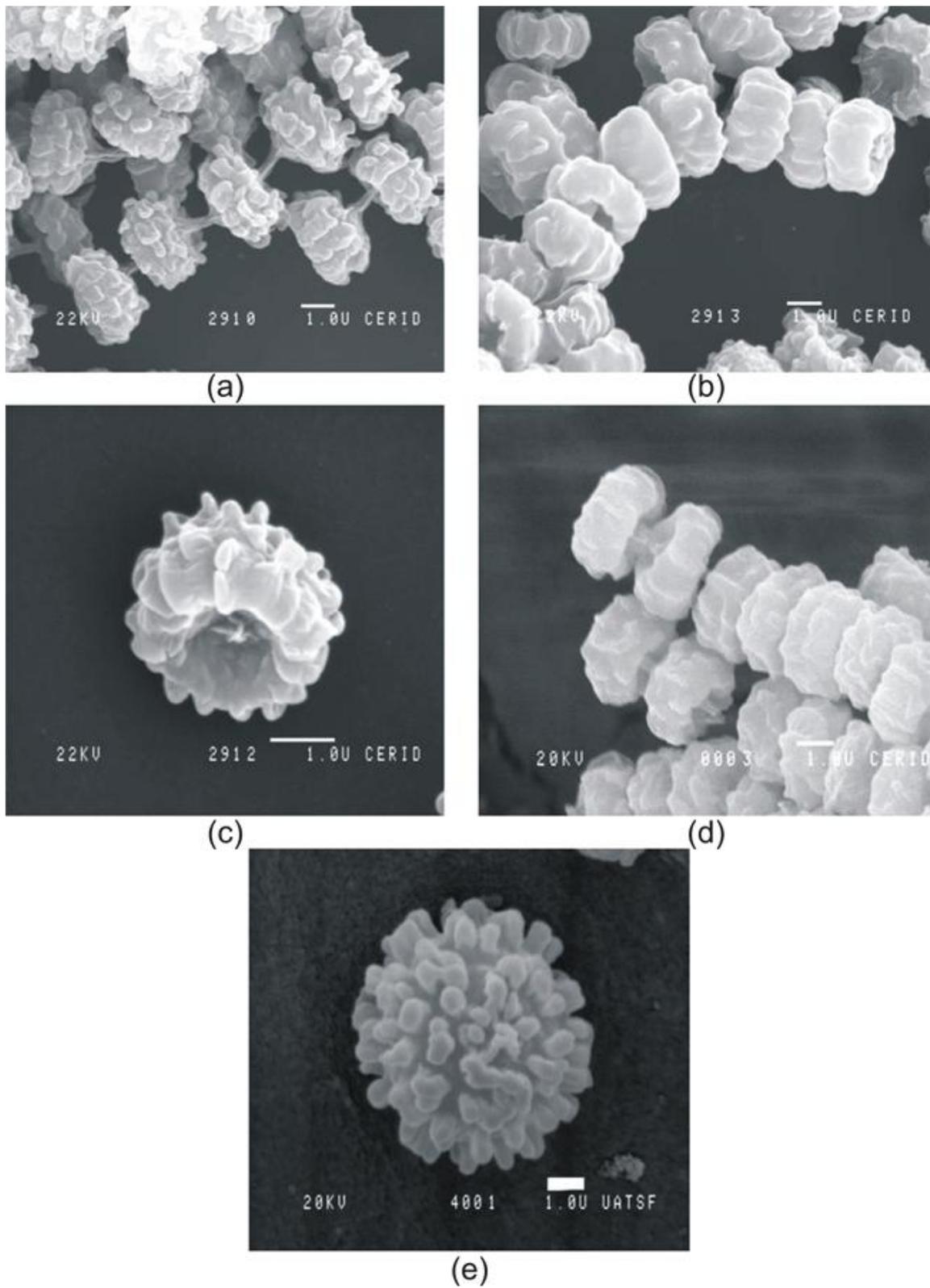


Figura 1.- Ornamentación de los conidios de los aislados A1 (a), A2 (b), A3 (c), A4 (d) y A5 (e).

Cuadro 2.- Parámetros de crecimiento de los aspergilos negros estimados con la ecuación de Baranyi y Roberts en medio MEA a 25 °C.

Aislados	Parametros de la curva				
	$\mu_{m\acute{a}x}$ (mm/día)	λ (día)	y_0 (mm)	$y_{m\acute{a}x}$ (mm)	R^2
1	3,51 ^(a)	$< 10^{-4}$	5,05	28,57 ^(d)	0,98
2	4,85 ^(b)	$< 10^{-4}$	5,87	27,41 ^(d)	0,93
3	12,73 ^(c)	0,33	3,27	37,28 ^(e)	0,99
4	4,52 ^(b)	$< 10^{-4}$	5,66	25,42 ^(d)	0,95
5	5,84 ^(b)	$< 10^{-4}$	5,79	36,14 ^(e)	0,94

$\mu_{m\acute{a}x}$: velocidad máxima de la colonia. λ : duración de la fase lag. y_0 : radio inicial de la colonia. $y_{m\acute{a}x}$: radio máximo de la colonia. R^2 : coeficiente de determinación.

(a), (b), (c) : Representan los grupos de $\mu_{m\acute{a}x}$ que resultaron significativamente diferentes con el Test de Kruskal-Wallis.

(d), (e) : Representan los grupos de $y_{m\acute{a}x}$ que resultaron significativamente diferentes con el Test de Kruskal-Wallis.

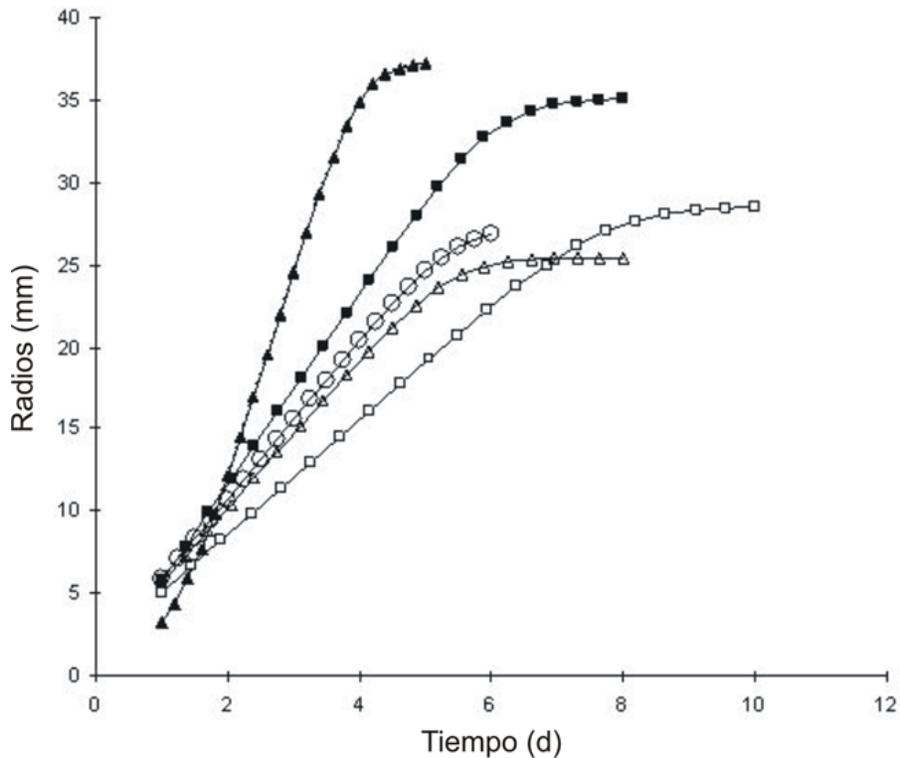


Figura 2.- Curvas de crecimiento radial de aspergilos negros incubados a 25 °C en Extracto de Malta Agar ajustados con la ecuación de Baranyi y Roberts. Aislado 1 (□), Aislado 2 (○), Aislado 3 (▲), Aislado 4 (△) y Aislado 5 (■).

semana de incubación en condiciones estándar con A2 y A4; A1 alcanzó ese valor con una velocidad de crecimiento mucho menor, característica que no se ha descrito hasta el presente. Dentro de los aspergilos que presentan conidios verrucosos, el único aislado que presentó una mayor velocidad de crecimiento fue A3 cuyo $\mu_{\text{máx}}$ duplicó o triplicó en algunos casos la de los demás aislados.

Varga *et al.* (2011) basado en el análisis filogenético de la secuencia de calmodulina incluyó en el clado de *A. niger* a las especies de *A. niger*, *A. foetidus*, *A. piperis* y *A. awamori*. En este estudio con la ayuda de la Microbiología Predictiva se pudieron separar *A. awamori* de *A. foetidus*, pero las diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) para los otros aislados.

Para poder clasificar las diferentes especies fúngicas, es necesario combinar los caracteres anteriores con técnicas de biología molecular con el objetivo de clarificar la identificación de las especies (Al-Musallam, 1980; Kozakiewicz, 1989; Klich, 2002; Frisvad *et al.*, 2007; Geiser *et al.*, 2007; Palencia *et al.*, 2009; Meijer *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIÓN

- Los resultados de las características morfológicas no fueron concluyentes para la identificación taxonómica de los aislados estudiados, excepto para el caso de *A. carbonarius*.
- Los parámetros cinéticos aportados por la Microbiología Predictiva permitieron distinguir *A. awamori* de *A. foetidus* pero no pudieron discriminar entre *A. niger* y *A. carbonarius*.
- La información preliminar obtenida podría ser aplicada a un mayor número de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* que junto con las demás metodologías darían los datos necesarios para poder llegar a una buena identificación taxonómica.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el financiamiento de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, a través del Programa CAI+D 15-92, 2009-2012.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, M.L.; Accensi, F.; Cano, J. and Cabañes, F.J. 2004. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek*. 86(1):33-49.
- Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castellá, G. and Cabañes, F.J. 1994. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(7):2650-2652.
- Al-Musallam, Azza. 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. Ph. D. Thesis. Rijksuniversiteit Utrecht, Utrecht, The Netherlands.
- Aríngoli, E. Elena; Z. Basílico, María de la Luz; Altahus, Rafael L.; Basílico, Juan Carlos. 2008. Multivariate analysis of fungal associations in the indoor air of Argentinean houses. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 62(3):281-286.
- Baranyi, József and Roberts, Terry A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 26(2):199-218.
- Bigelis, R. and Lasure, L.L. 1987. Fungal enzymes and primary metabolites used in food processing. In *Food and beverage mycology*. (pp. 473-516). New York, NY, USA: Van Nostrand Reinhold.
- Carlile, Michael J.; Watkinson, Sarah C. and Gooday, Graham W. 2001. *The fungi*. London, UK: Academic Press. pp. 85-184.
- Dantigny, Philippe; Guilmart, Audrey and Bensoussan; Maurice. 2005. Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*. 100(1-3):187-196.

- Frisvad, J.C.; Larsen, T.O.; de Vries, R.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Cabañes, F.J.; Ehrlich, K. and Samson, R.A. 2007. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. *Studies in Mycology*. 59:31-37.
- Geiser, D.M.; Klich, M.A.; Frisvad, J.C.; Peterson, S.W.; Varga, J. and Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 59:1-10.
- Klich, Maren A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Klich, Maren A. and Pitt, John Ingram. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, New South Wales, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO), Division of Food Processing.
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers*. N° 161. Wallingford, UK: CAB International Mycological Institute. pp. 1-188.
- Lund, F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*. 20(4):228-231.
- Meijer, M.; Houbraken, J.A.M.P.; Dalhuijsen, S.; Samson, R.A. and de Vries, R.P. 2011. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Studies in Mycology*. 69(1):19-30.
- Palencia, Edwin R.; Klich, Maren A.; Glenn, Anthony E. and Bacon, Charles W. 2009. Use of a rep-PCR system to predict species in the *Aspergillus* section *Nigri*. *Journal of Microbiological Methods*. 79(1):1-7.
- Perrone, G.; Susca, A.; Cozzi, G.; Ehrlich, K.; Varga, J.; Frisvad, J.C.; Meijer, M.; Noonim, P.; Mahakarnchanakul, W. and Samson, R.A. 2007. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology*. 59:53-66.
- Perrone, Giancarlo; Stea, Gaetano; Epifani, Filomena; Varga, János; Frisvad, Jens C. and Samson, Robert A. 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biology*. 115(11):1138-1150.
- Pitt, J.I. 2000. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*. 56(1):184-192.
- Pitt, John I. and Hocking, Alisa D. 2009. *Fungi and food spoilage*. (3th. ed.). New York, USA: Springer Science + Business Media, LLC.
- Raper, Kenneth B. and Fennell, Dorothy I. 1965. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- Samapundo, S.; Devlieghere, F.; Geeraerd, A.H.; De Meulenaer, B.; Van Impe, J.F. and Debevere, J. 2007. Modelling of the individual and combined effects of water activity and temperature on the radial growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on corn. *Food Microbiology*. 24(5):517-529.
- Samson, R.A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J.C. and Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*. 59:129-145.
- Samson, Robert A.; Houbraken, Jos A.M.P.; Kuijpers, Angelina F.A.; Frank, J. Mick and Frisvad, Jens C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 50:45-61.
- Serra, Rita; Cabañes, F. Javier; Perrone, Giancarlo; Castellá, Gemma; Venâncio, Armando; Mulè, Giuseppina and Kozakiewicz, Zofia. 2006. *Aspergillus*

- ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia*. 98(2):295-306.
- Silva, Daiani M.; Batista, Luíz R.; Rezende, Elisângela F.; Fungaro, Maria Elena P.; Sartori, Daniele and Alves, Eduardo. 2011. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(2):761-773.
- Varga, J.; Frisvad, J.C.; Kocsubé, S.; Brankovics, B.; Tóth, B.; Szigeti, G.; Samson, R.A. 2011. New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*. 69(1):1-17.
- Wösten, Han A.B.; Scholtmeijer, Karin and de Vries, Ronald P. 2007. Hyperproduction of enzymes by fungi. In *Food mycology. A multifaceted approach to fungi and food*. (pp. 183-196). Boca Raton, FL, USA: CRC Press - Taylor & Francis Group, LLC.