



Comunicación

Identificación y caracterización de especies de *Neosartorya* aisladas de frutillas (*Fragaria* spp.) frescas y tratadas térmicamente

Identification and characterization of *Neosartorya* species isolated from fresh and thermally treated strawberries (*Fragaria* spp.)

Laura **Frisón**^{1*}, Silvina **Sobrero**², Juan **De Jesús**¹, María **de Basílico**¹, Juan **Basílico**¹

¹Cátedra de Microbiología, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829 (3000), Santa Fe, Argentina.

²Química General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria (3000), Santa Fe, Argentina.

*Autora para correspondencia: lfrison@fiq.unl.edu.ar

Aceptado 23-Diciembre-2012

Resumen

El género *Aspergillus* es uno de los géneros fúngicos más estudiados y de gran impacto a nivel industrial. La sección *Fumigati* incluye unas pocas especies anamorfias del género *Aspergillus*. Las especies que son teleomorfias se encuentran dentro del género *Neosartorya*. Este es un moho resistente al calor que causan problemas en las industrias alimentarias o enfermedades en los seres humanos. Sus ascosporas han sido aisladas a partir de frutas, pulpas y jugos, ya que pueden sobrevivir a los tratamientos de térmicos industriales pudiendo aparecer la contaminación post-pasteurización. El objetivo fue caracterizar aislados de *Neosartorya* de frutillas frescas recién cosechadas y tratadas térmicamente, analizando la ornamentación de las ascosporas, toxicidad y resistencia térmica. Se aislaron las colonias, y se identificaron macro y microscópicamente siguiendo la metodología de Pitt y Hocking (2009), de 60 muestras. Se caracterizaron las ascosporas por microscopía electrónica de barrido. Se determinó la capacidad toxicogénica de los extractos por cromatografía líquida de alta eficiencia. Se evaluó la resistencia térmica a diferentes temperaturas. Se aislaron 18 cepas de *Neosartorya* de frutillas recién cosechadas, y otros mohos termorresistentes como *Arthrinium*

phaeospermum, *Byssochlamys nivea* y *Talaromyces macrosporus*. En las frutillas tratadas térmicamente no se aislaron mohos termorresistentes. Trece aislados mostraron ascosporas coincidentes con *N. fischeri*, el resto con *N. spinosa*. Los aislados de *N. fischeri* produjeron fumitremorgina A y B y verruculógeno en arroz, pero no lo hicieron en frutillas frescas. Los parámetros de resistencia térmica fueron: $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 20 - 22 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 9 - 11 minutos, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 2 - 3 minutos y z : 10 - 11 °C para *N. fischeri* y $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: > 120 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 11 - 94 minutos, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 3 - 15 minutos y z : 6 - 9 °C para *N. spinosa*. Es indispensable aplicar buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura porque es muy difícil su eliminación o control.

Palabras claves: frutillas o fresas, morfología, *Neosartorya*, resistencia térmica, toxicidad.

Abstract

The genus *Aspergillus* is one of the most studied fungal genera and has great impact in industry. *Fumigati* section includes a few species of the genus *Aspergillus* anamorphs. Teleomorphs species are found within the genus *Neosartorya*. This is a heat-resistant mold that cause problems in food industries or cause disease in humans. Their ascospores have been isolated from fruit pulps and juices as they can survive the industrial thermal treatments can appear post-pasteurization contamination. The purpose was to characterize *Neosartorya* isolates from fresh strawberries and heat treated, analyzing the ornamentation of ascospores, toxicity and heat resistance. The colonies were isolated, and identified macro and microscopically following the methodology of Pitt and Hocking (2009), from 60 samples. Ascospores were characterized by scanning electron microscopy. The toxicogenic capacity of extracts was assessed by high performance liquid chromatography. The thermal resistance at different temperatures was evaluated. *Neosartorya* (18 strains) were isolated from freshly harvested strawberries and other molds resistant: *Arthrinium phaeospermum*, *Byssochlamys nivea* and *Talaromyces macrosporus*. Heat-resistant molds from thermally treated strawberry were not isolated. Thirteen isolates showed ascospores coincident with *N. fischeri*, the rest with *N. spinosa*. The isolates of *N. fischeri* produced fumitremorgin A and B and verruculogen in rice, but did not produce in fresh strawberries. Thermal resistance parameters were: $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 20 - 22 minutes, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 9 - 11 minutes, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 2 - 3 minutes and z : 10 - 11 °C for *N. fischeri* and $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: > 120 minutes, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 11 - 94 minutes, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 3 - 15 minutes and z : 6 - 9 °C for *N. spinosa*. It is essential to follow good agricultural practices and good manufacturing practices because it is very difficult to remove or control.

Keywords: morphology, *Neosartorya*, strawberries, thermal resistance, toxicity.

INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* es uno de los géneros fúngicos más estudiados y de gran impacto a nivel industrial. La sección *Fumigati* incluye unas pocas especies anamorfas del género *Aspergillus*; las especies que son teleomorfos se encuentran dentro del género *Neosartorya* (Brakhage y Langfelder, 2002;

Samson *et al.*, 2007). Esta sección incluye en la actualidad 26 especies, varias de ellas han sido descritas como agentes causantes de enfermedades en humanos tales como: aspergilosis invasiva, osteomielitis, endocarditis y queratitis micótica, o bien como productoras de micotoxinas que representan un serio peligro latente para la salud humana (Pitt *et al.*, 2000; Samson, 2000; Horie *et al.*, 2003;

Järv *et al.*, 2004; Balajee *et al.*, 2005; 2006; Hong *et al.*, 2005; 2006; Larsen *et al.*, 2007; Samson *et al.*, 2007; Vinh *et al.*, 2009; Serrano *et al.*, 2011).

Todas las especies de *Neosartorya* producen ascosporas resistentes al calor por lo que es frecuente encontrarlas en diferentes productos alimenticios tratados térmicamente como jugos de frutos y otros productos a base de frutos procesados por calor, ya que pueden sobrevivir a los tratamientos de pasteurización aplicados industrialmente. En estos procesos se eliminan los microorganismos competidores y se activan las ascosporas pudiendo aparecer la contaminación post-pasteurización (Rajashekhara *et al.*, 1998; Sobrero *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2007; Yaguchi *et al.*, 2012).

La ornamentación de las ascosporas es una importante característica morfológica para distinguir las diferentes especies. *N. fischeri*, *N. glabra* y *N. spinosa* pueden ser separadas teniendo en cuenta esta ornamentación, el perfil de micotoxinas y los parámetros de resistencia térmica (Kozakiewicz, 1989; Samson *et al.*, 1990; 1992; Nielsen, 1991; Horie *et al.*, 2003). *N. glabra* y *N. spinosa* son las variedades más termorresistentes, mientras que *N. fischeri* es la especie productora de toxinas tremorgénicas. Estas son neurotoxinas que en bajas dosis producen temblores en animales por largos períodos de tiempo, pero cuando se incrementa la dosis pueden ser letales para los mismos. *N. fischeri* produce fumitremorgina A, B y C y verruculógeno (Cole *et al.*, 1972; Liu *et al.*, 1996; Khoufache *et al.*, 2007; Salomão *et al.*, 2008).

Por otra parte, la frutilla (*Fragaria* spp.) es una planta de la familia Rosaceae. Lo que se conoce como frutilla o fresa, es un receptáculo floral engrosado sobre el que se encuentran incrustados, en su superficie, los verdaderos frutos (aquenios). Botánicamente, la frutilla es un eterio (Navarro-Aranda y Muñoz-Garmendia, 1998; Lavín-A. y Maureira-C., 2002). El principal componente, después del agua lo constituyen los hidratos de carbono (con una

cantidad moderada alrededor del 5 % de su peso), fundamentalmente fructosa y glucosa. Son muy ricas en vitamina C (con un porcentaje superior, en ocasiones, al que posee la naranja) y ácido fólico. Entre los minerales se destacan el hierro, yodo y calcio, además del fósforo, magnesio y potasio. Son buena fuente de fibra. Contienen diversos ácidos orgánicos, entre los que destacan el ácido cítrico, málico, oxálico y también contienen pequeñas cantidades de ácido salicílico. La capacidad antioxidante, no sólo se debe a su contenido en antocianinas, sino a la presencia en su composición de cantidades importante de polifenoles (ácido elágico) y de vitamina C (Murcia *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Koyunku y Dilmaçunal, 2010; Carvajal de Pabón *et al.*, 2012). Debido a todas estas propiedades, el consumo de frutillas como producto fresco o procesado como confitura, mermelada, helado, yogurt se ha incrementado notablemente.

En Argentina se producen 30.000 t anuales de frutillas en un área de 1.000 a 1.150 ha, de las cuales el 30 % corresponde a Coronda (Provincia de Santa Fe), 40 % a la Provincia de Tucumán y el resto a otras zonas productoras como Corrientes (6 %), Buenos Aires (15 %), Mendoza (1 %) y provincias del sur del país (8 %). La región de Coronda (Departamento San Jerónimo, Santa Fe) concentra el 30 % de la superficie sembrada del cultivo (Sordo, 2012) y además de Coronda se produce en los distritos Desvío Arijón y Arocena. La producción regional tiene gran importancia por su historia, ubicación geográfica y especialización. Las características propias de la región (suelo arenoso, clima benigno y calidad de agua de riego) han proporcionado factores determinantes del buen desarrollo de las plantas.

Teniendo en cuenta los inconvenientes que la presencia de *Neosartorya* puede ocasionar a la industria, se propuso identificar y caracterizar las especies aisladas de frutillas frescas y tratadas térmicamente que se utilizan para agregar a yogurt, helado u otros

productos de pastelería, analizando la ornamentación de las ascosporas, la toxicidad y la resistencia térmica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras de frutillas (*Fragaria vesca*) frescas fueron cosechadas a granel de una plantación comercial de la zona de Coronda (Santa Fe, Argentina); las frutillas enteras tratadas térmicamente (producto enlatado) para adicionar a helados y productos de pastelería, procedían de una empresa de la misma zona. Las frutillas para agregar a yogurt se tomaron de góndolas de supermercados de la ciudad de Santa Fe. Se procesaron 60 muestras en total (20 de frutillas frescas, 20 de frutillas enteras enlatadas tratadas térmicamente y 20 de frutillas tratadas térmicamente para agregar a yogurt).

Aislamiento

Las frutillas frescas fueron lavadas con agua estéril, se retiraron los cabos y sépalos en condiciones de esterilidad. Estas muestras, y las comerciales, se colocaron en bolsas estériles, se trituraron y homogeneizaron en un Stomacher 400 Lab Blender (Seward Medical, London, UK) hasta obtener una pulpa. Las pulpas se sometieron a un tratamiento térmico de 80 °C durante 15 minutos en un baño termostático marca Dalvo, modelo BMK (Tecno Dalvo, Santa Fe, Argentina) para eliminar los mohos no termorresistentes y activar las ascosporas. Se enfrió en un equipo de baño maría, marca ICSA, modelo BMS2G (Instrumentación Científica, S. A., Buenos Aires, Argentina) y se mezcló en proporción 1:1 con los medios de cultivo preparados con doble concentración. Los medios utilizados fueron: Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Papa Dextrosa (PDA), ambos con agregado de cloranfenicol (100 mg/L) y Diclorán Rosa de Bengala

Cloranfenicol (DRBC). Se incubó en estufa durante 30 días a 28 °C. Los medios MEA y PDA fueron elegidos por estar recomendados dentro del protocolo especial para mohos resistentes al calor (Hocking y Pitt, 1992; Pitt y Hocking, 2009).

Purificación, identificación y conservación

Los aislados se sembraron en placas con medio MEA incubando a 28 °C por 7 días. Las colonias de *Neosartorya* aisladas se identificaron macro y microscópicamente, siguiendo la metodología de Pitt y Hocking (2009). Para caracterizar las formas y superficies de las ascosporas se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM, 'Scanning Electron Microscope'). Los aislados se incubaron en Agar Czapek (ACZ), a 25 °C durante 21 días (Kozakiewicz, 1989). Las muestras se recubrieron con oro en un equipo SPI Module™ Sputter, SPI 12157-AX (SPI@ Supplies/Structure Probe, Inc., West Chester, PA, USA), operado bajo una atmósfera de argón. Se observaron con un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL, modelo JSM-6400 (JEOL, Ltd., Tokyo, Japón). Las fotografías se tomaron bajo la apariencia de imágenes de electrones secundarios con un voltaje de aceleración de 15 kV, y aumento a 8000X. Finalmente, con todos los datos, se comparó morfológicamente con las claves publicadas por Horie *et al.* (2003), Samson *et al.* (2007) y Hong *et al.* (2008).

Los diferentes aislados ya identificados se conservaron en viales con agar agua (0,2 % m/v) por raspado de las ascosporas de las superficies de la placa de MEA y guardaron a 5 °C hasta su uso.

Determinación de la capacidad toxicogénica

Se sembró cada aislado de *Neosartorya* en arroz integral estéril con 25 % de humedad y

se cultivó durante 1 mes a 28 °C (Liu *et al.*, 1996). Las toxinas se extrajeron con cloroformo. Los extractos se filtraron y concentraron al 50 %, en rotavapor marca BÜCHI, modelo RE 111 (BÜCHI Labortechnik AG, Suiza), a 70 °C. Se realizó un ‘screening’ por Cromatografía en Capa Delgada (TLC, ‘Thin Layer Chromatography’) según Cole y Cox (1981), para evaluar la presencia de fumitremorgina A (FTA), fumitremorgina B (FTB) y verruculógeno (VC).

Los resultados positivos se confirmaron por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, ‘High Performance Liquid Chromatography’). Se utilizó un cromatógrafo líquido KONIK® 500 (KONIK-Tech, Barcelona, España), equipado con una columna Phenomenex® RP C18 ODS (250 x 4,6 mm) (Phenomenex, Inc., Torrance, CA, USA) con detector KONIK® UV-Vis 200 (KONIK-Tech, España) y con un integrador Spectra-Physics (Spectra-Physics, Inc., San Jose, CA, USA) (Samson *et al.*, 1992). Las condiciones fueron: para FTA el tiempo de retención del estándar fue 14,56 minutos y para la muestra de 14,53 minutos. La fase móvil acetonitrilo-agua (gradiente de 15 % a 90 % en 15 min.), caudal 1,0 mL/minutos, longitud de onda 235 nm. Para FTB el tiempo de retención del estándar fue de 8 minutos y para la muestra de 7,97 minutos. La fase móvil y condiciones de corrida fueron similares a la de FTA pero la longitud de onda de 230 nm. Para VC el tiempo de retención del estándar fue de 5,06 minutos y para la muestra de 5,12 minutos. La fase móvil fue acetonitrilo-agua (15:85), caudal 0,8 mL/minutos, longitud de onda 254 nm. En todos los casos la velocidad de la carta fue de 0,25 cm/min y la atenuación de 128.

Resistencia térmica de las ascosporas

Se siguió la metodología propuesta por Nielsen y Samson (1992). Se prepararon suspensiones de 10^6 ascosporas/mL y se inocularon en jugo de manzana estéril. Luego

se calentaron a 80, 85 y 90 °C por diferentes espacios de tiempo, enfriando inmediatamente en baño de hielo. Se realizaron diluciones en agua de peptona estéril (0,1 % m/v) que se sembraron en medio Agar Extracto de Levadura Czapek (CYA) de pH 3,5 enriquecido con sacarosa 10 % m/v y Rosa de Bengala 20 mg/L. Las placas se incubaron durante 7 días a 28 °C. Luego de realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) se procedió a calcular los parámetros D o tiempo de reducción decimal (minutos) y z o constante de resistencia térmica (°C), que caracterizan la destrucción de las ascosporas por el calor. En todos los casos se realizaron 5 repeticiones. El parámetro D se calculó graficando el log N vs t (Ec.1).

$$\text{Ecuación (1)} \quad D = \Delta t / (\log N_0 - \log N_t)$$

Donde: N_0 es la concentración inicial de microorganismos y N_t es la concentración final de microorganismos. El parámetro z se calculó graficando el log D vs T (Ec. 2).

$$\text{Ecuación (2)} \quad z = T_2 - T_1 / (\log D_2 - \log D_1)$$

Donde D_1 y D_2 son los tiempos de reducción decimal a las temperaturas T_1 y T_2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislados e identificación

Se aislaron 18 cepas de *Neosartorya* de frutillas naturales recién cosechadas. De los medios utilizados (MEA, PDA, DRBC); en el medio MEA se obtuvo el mayor porcentaje de recuperación (50 %). Otros mohos termorresistentes que se identificaron fueron: *Arthrinium phaeospermum*, *Byssosclamyces nivea* y *Talaromyces macrosporus*. Estos resultados coinciden con los citados en la literatura para frutos, pulpa de frutos y jugos (Splittstoesser, 1991; Samson *et al.*, 1992; Tournas, 1994; Beuchat y Pitt, 2001; Javoreková *et al.*, 2009).

En las frutillas comerciales no se aislaron mohos termorresistentes. Esto indicaría que los tratamientos utilizados, combinado con la adición de sorbato de potasio como conservante resultarían adecuados o bien que las mismas no estaban inicialmente contaminadas, o que los procesos de selección y lavado fueron eficientes.

Trece aislados presentaron en SEM ascosporas con superficies convexas y 2 crestas anastomosadas. *N. fischeri*, *N. tatenoi* y *N. hiratsukae* presentan estas características. Su diferenciación es compleja, en que en la primera las ascosporas presentan un reticulado irregular o débilmente reticulado, la segunda un microreticulado regular con vesículas semiesféricas en forma de botella y la tercera un reticulado fino (Yaguchi *et al.*, 1994; Varga *et al.*, 2000; Horie *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2010). El resto de los aislados mostraron ascosporas con 2 crestas ecuatoriales bien separadas y sobre las 2 superficies convexas se pueden ver proyecciones con forma de espinas (Fig. 1). Estas mismas características se observan en *N. spinosa*, *N. coreana* y *N. laciniosa* (Horie *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2006; 2008; 2010).

Capacidad toxicogénica

Los aislados coincidentes con las características de *Neosartorya fischeri* o *N. tatenoi* o *N. hiratsukae* al someterlos al método de 'screening' para detectar FTA, FTB y VC resultaron positivos; se confirmaron por HPLC. Se pudo comprobar que todos los aislados mostraron capacidad de producir al menos una de las toxinas. Se obtuvieron 46,1 % de cepas productoras solo de FTA; 15,4 % solo de FTB o VC. Una sola cepa produjo VC + FTB (7,6 %); no hubo producción de VC + FTA, ni producción de FTA + FTB conjuntamente. El 15,4 % restante generó las 3 toxinas simultáneamente. Las cepas productoras de toxinas tremorgénicas se identificaron como *N. fischeri*. Se repitió el ensayo reemplazando

al arroz integral por frutillas frescas estériles. Se comprobó que el moho creció muy bien sobre las frutillas frescas, pero no produjo FTA, FTB, ni VC en este sustrato.

Resistencia térmica

Los 5 aislados restantes se estudiaron desde el punto de vista de la resistencia térmica, ya que información en la literatura muestra lo resistentes al calor que son las ascosporas de *N. spinosa* y los problemas tecnológicos que ellas podrían causar (Beuchat, 1986; Nielsen y Samson, 1992; Yaguchi *et al.*, 2012).

Los valores promedios encontrados para el tratamiento térmico de las ascosporas en jugo de manzana para *N. fischeri* fueron $D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 20 - 22 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 9 - 11 minutos y $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 2 - 3 minutos. El valor $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$ coincidió con el indicado para *N. fischeri* IMI 16143 por Samson *et al.* (1992) y el publicado por Salomão *et al.* (2007). Con respecto al valor z , el hallado fue 10 - 11 $^{\circ}\text{C}$, igual que para *N. fischeri* IMI 16143 (Samson *et al.*, 1992), mientras que el valor publicado por Salomão *et al.* (2007) fue 5 $^{\circ}\text{C}$. El valor de $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 2 - 3 minutos, mostró que es menos resistente al calor que *N. spinosa* ($D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 3 - 15 minutos). Los resultados de resistencia térmica para las 5 cepas restantes se muestran en el Cuadro 1.

Estos datos son comparables con datos bibliográficos correspondientes a *N. spinosa* H37 ($D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: > 120 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 96 minutos, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 9 minutos, z : 5 $^{\circ}\text{C}$), FRR 2334 ($D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: > 120 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 21 minutos, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 4 minutos, z : 6 $^{\circ}\text{C}$), CBS 483.65 ($D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: > 120 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 11 minutos, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 5 minutos, z : 7 $^{\circ}\text{C}$), IBT 3001 ($D_{80\text{ }^{\circ}\text{C}}$: > 120 minutos, $D_{85\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 10 minutos, $D_{90\text{ }^{\circ}\text{C}}$: 3 minutos, z : 6 $^{\circ}\text{C}$) (Nielsen y Samson, 1992). No se conocen datos de resistencia térmica para *N. coreana* y *N. laciniosa*.

Al realizar el estudio utilizando como medio de calentamiento pulpa de frutilla estéril sin conservante, se encontró que 15 minutos a 90 $^{\circ}\text{C}$ no fueron suficientes para eliminar a *N.*

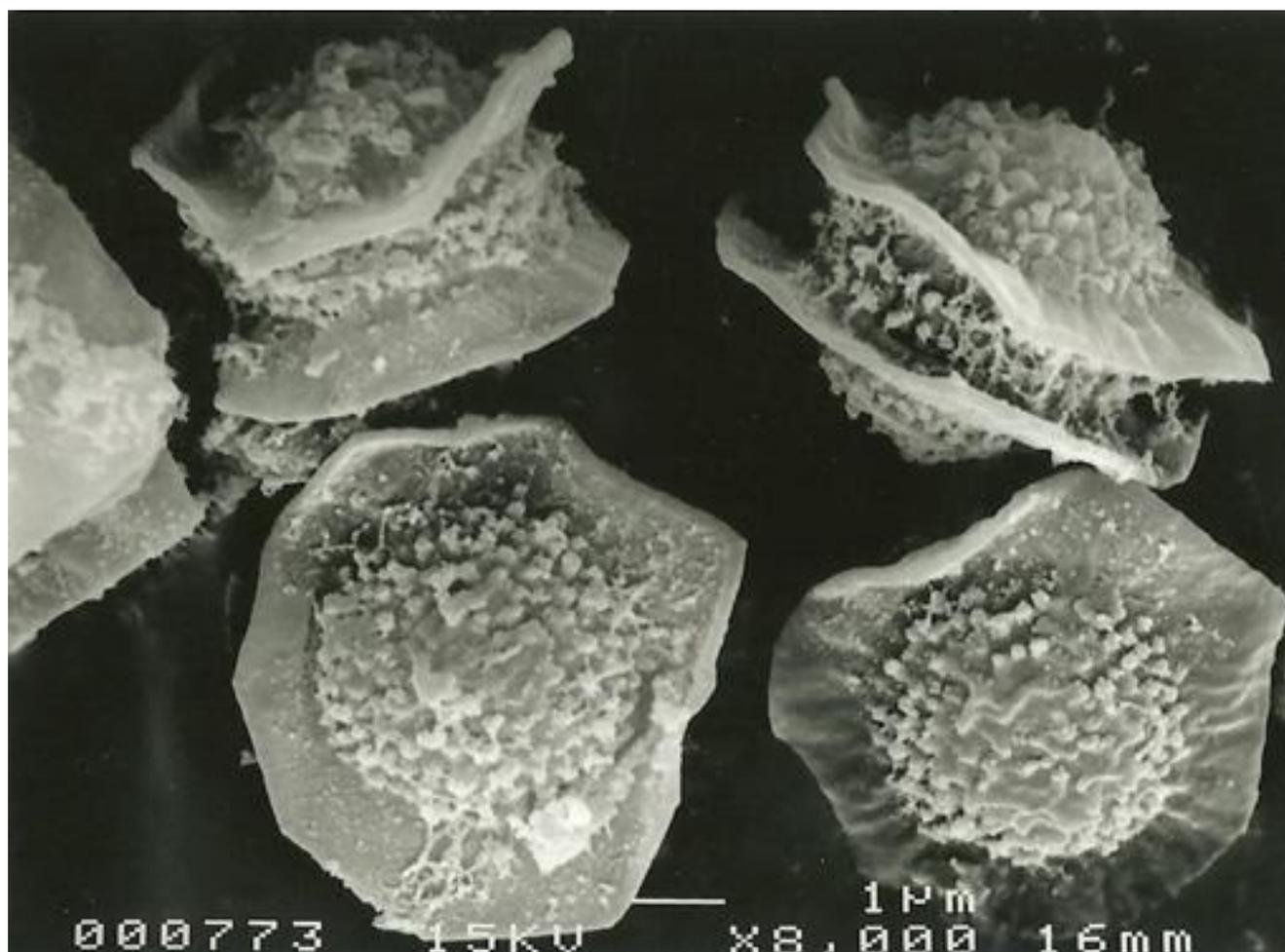


Figura 1.- Microfotografía Electrónica de ascosporas de *Neosartorya spinosa* aisladas de frutillas.

Cuadro 1.- Parámetros de resistencia térmica de ascosporas de *Neosartorya spinosa* aisladas de frutillas.*

Aislado	D ₈₀ °C	D ₈₅ °C	D ₉₀ °C	z
Nº 2	164	18	3	6
Nº 7	154	94	8	6
Nº 11	120	14	6	8
Nº 13	130	11	3	7
Nº 16	176	61	15	9

D: tiempo de reducción decimal, en minutos. z: constante de resistencia térmica, en °C.

* Los valores son promedios de 5 repeticiones.

spinosa. Otros autores realizaron ensayos de muerte térmica en jugos de frutos como manzana, ananá o piña, papaya o lechosa, (Salomão *et al.*, 2007), pulpa de tomate (Baglioni *et al.*, 1999), jugos cítricos de naranja, limón, pomelo, mandarina (Sobrero *et al.*, 2002; Amaeze, 2012), encontrando también valores elevados de termorresistencia que ocasionarían un problema en la industria.

El aislado N° 16 presentó un $D_{90}^{\circ C}$: 15 minutos, que coincide con el 'holding' del proceso utilizado en las plantas procesadoras de la región. Por esto, es necesario que cada empresa identifique los mohos termorresistentes presentes en su materia prima para definir el proceso de calentamiento adecuado ya que si estas ascosporas están presentes, el calentamiento actuaría como choque térmico activándolas (Slongo y de Aragão, 2006; Amaeze y Ugwuanyi, 2011).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se demostró la presencia de *N. fischeri* y *N. spinosa* en frutillas frescas cosechadas a granel en la zona de Coronda, Argentina.
- En las frutillas comerciales tratadas térmicamente no se aislaron mohos termorresistentes.
- *N. fischeri* posee la capacidad para producir FTA, FTB y VC en condiciones de laboratorio, sembrada en arroz integral estéril con 25 % de humedad. No se detectó la producción de estas toxinas cuando los aislados toxicogénicos se sembraron en frutillas estériles.
- Un aislado de *N. spinosa* presentó tiempo de reducción decimal $D_{90}^{\circ C}$: 15 minutos, coincidente con el 'holding' del proceso utilizado en las plantas procesadoras de la región. Por esto, es necesario que cada empresa identifique los mohos termorresistentes presentes

en su materia prima para definir el proceso de calentamiento adecuado ya que si estas ascosporas están presentes, el calentamiento actuaría como choque térmico activándolas.

- La incorporación de frutillas contaminadas a productos lácteos y de pastelería podría dar lugar en estas nuevas condiciones de sustrato, a que este moho pueda crecer con el consecuente riesgo toxicológico; por lo que se deberían continuar los estudios en estos alimentos.
- Es indispensable aplicar buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufacturas ya que una vez que las frutillas se contaminan es muy difícil su eliminación o control.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. J. Guarro y al Servicio de Microscopía Electrónica de la Unidad de Microbiología de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universitat Rovira i Virgili, Reus, España por haber permitido que la Dra. María Z. de Basílico, en colaboración con su personal, tomara las microfotografías electrónicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaeze, N.J. 2012. Heat resistance and inactivation of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in water, phosphate buffers, fruit juices and fruit juices fortified with sugars and preservatives. Report and Opinion. 4(2):18-25.
- Amaeze, N.J. and Ugwuanyi, J.O. 2011. Patterns of activation of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* ascospores in phosphate buffers (pH 6 and 7) and in distilled water at temperatures 70°, 75° and 80 °C. Academia Arena. 3(2):14-26.

- Baglioni, Flávio; Gumerato, Homero Ferracini e Massaguer, Pilar Rodriguez. 1999. Ocorrência de fungos filamentosos termo-resistentes em polpa de tomate envasada assepticamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brasil)*. 19(2):258-263.
- Balajee, S. Arunmozhi; Gribskov, Jennifer L.; Hanley, Edward; Nickle, David and Marr, Kieren A. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell*. 4(3):625-632.
- Balajee, S. Arunmozhi; Nickle, David; Varga, János and Marr, Kieren A. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell*. 5(10):1705-1712.
- Beuchat, L.R. 1986. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* ascospores in fruit products. *Journal of Food Science*. 51(6):1506-1510.
- Beuchat, L.R. and Pitt, J.I. 2001. Detection and enumeration of heat-resistant molds. In *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (pp. 217-222). (4th. ed.). Washington, D. C., USA: American Public Health Association.
- Brakhage, Axel A. and Langfelder, Kim. 2002. Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annual Review of Microbiology*. 56: 433-455.
- Carvajal de Pabón, Luz Marina; Yahia, El Hadi; Cartagena, Regulo; Peláez, Carlos; Gaviria, Carlos A. y Rojano, Benjamín Alberto. 2012. Capacidad antioxidante de dos variedades de *Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne (fresa) sometidas a variaciones en la nutrición vegetal. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(1):37-53.
- Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Moore, J.H.; Blankenship, B.R.; Diener, U.L. and Davis, N.D. 1972. Tremorgenic toxin from *Penicillium verruculosum*. *Applied Microbiology*. 24(2):248-256.
- Cole, Richard J. and Cox, Richard H. 1981. *Handbook of toxic fungal metabolites*. New York: Academic Press.
- Hocking, A.D. and Pitt, J.I. 1992. Introduction and summary of the First International Workshop on Standardisation of Methods for the Mycological Examination of Foods. In *Modern methods in food mycology*. (pp. 3-8). *Developments in Food Science*. Vol. 31. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V.
- Hong, Seung Beom; Cho, Hye Sun; Shin, Hyeon Dong; Frisvad, Jens C. and Samson, Robert A. 2006. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(2):477-486.
- Hong, Seung Beom.; Go, Seung Jo.; Shin, Hyeon Dong; Frisvad, Jens C. and Samson, Robert A. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*. 97(6):1316-1329.
- Hong, Seung Beom; Kim, Dae Ho; Park, In Cheol; Samson, Robert A. and Shin, Hyeon Dong. 2010. Isolation and identification of *Aspergillus* section *Fumigati* strains from arable soil in Korea. *Mycobiology*. 38(1):1-6.
- Hong, Seung Beom; Shin, Hyeon Dong; Hong, Joonbae; Frisvad, Jens C.; Nielsen, Per V.; Varga, János; Samson, Robert A. 2008. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93(1-2):87-98.
- Horie, Yoshikazu; Abliz, Paride; Fukushima, Kazutaka; Okada, Kaoru and Takaki, G.M. Campos. 2003. Two new species of *Neosartorya* from Amazonian soil, Brazil. *Mycoscience*. 44(5):397-402.

- Järv, H.; Lehtmaa, J.; Summerbell, R.C.; Hoekstra, E.S.; Samson, R.A. and Naaber, P. 2004. Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(2):925-928.
- Javoreková, Soňa; Labuda, Roman; Kupcová, Michaela; Selešiová, Zuzana and Maková Jana. 2009. Occurrence and importance of heat-resistant fungi of the strawberries. *Potravinárstvo*. 3(2):27-30.
- Khoufache, Khaled; Puel, Olivier; Loiseau, Nicolas; Delaforge, Marcel; Rivollet, Danièle; Coste, André; Cordonnier, Catherine; Escudier, Estelle; Botterel, Françoise and Bretagne, Stéphane. 2007. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysiological properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*. 7:5(23 January).
- Koyunku, Mehmet y Dilmaçınal, Tuba. 2010. Determination of vitamin C and organic acid changes in strawberry by HPLC during cold storage. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 38(3):95-98.
- Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. *Mycological Papers* N° 161. Wallingford, UK: CAB International. pp. 48-59.
- Larsen, Thomas O.; Smedsgaard, Jørn; Nielsen, Kristian F.; Hansen, Michael A.E.; Samson, Robert A. and Frisvad, Jens C. 2007. Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Medical Mycology*. 45(3):225-232.
- Lavín-A., Arturo y Maureira-C. Marta. La frutilla nativa y su cultivo. *Revista Tierra Adentro*. 47:16-19.
- Liu, J; Yang, Z.J. and Meng, Z.H. 1996. The isolation, purification and identification of fumitremorgin B produced by *Aspergillus fumigatus*. *Biomedical and Environmental Sciences*. 9(1):1-11.
- Murcia, M.A.; Jiménez, A.M. and Martínez-Tomé, M. 2001. Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *Journal of Food Protection*. 64(12):2037-2046.
- Navarro-Aranda, Carmen y Muñoz-Garmendia, Félix. 1998. *Fragaria* L. En *Flora ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. (pp. 88-93). Vol. 6. Rosaceae. Madrid, España: Real Jardín Botánico, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).
- Nielsen, P.V. 1991. Preservative and temperature effect on growth of three varieties of the heat-resistant mold, *Neosartorya fischeri*, as measured by an impedimetric method. *Journal of Food Science*. 56(6):1735-1740.
- Nielsen, P.V. and Samson, R.A. 1992. Differentiation of food-borne taxa of *Neosartorya*. In *Modern methods in food mycology*. (pp. 159-168). *Developments in Food Science*. Vol. 31. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V.
- Pitt, J.I.; Samson, R.A. and Frisvad, J.C. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In *Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification*. (pp. 9-49). Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers.
- Pitt, John I. and Hocking, Alisa D. 2009. *Fungi and food spoilage*. (3th. ed.). New York, USA: Springer Science + Business Media, LLC.
- Rajashekhara, E.; Suresh E.R. and Ethiraj, S. 1998. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in the presence of organic acids and preservatives in fruit juices. *Journal of Food Protection*. 61(10):1358-1362.

- Salomão, B.C.M.; Slongo, A.P. and Aragão, G.M.F. 2007. Heat resistance of *Neosartorya fischeri* in various juices. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology*. 40(4):676-680.
- Salomão, Beatriz de Cássia Martins; Massaguer, Pilar Rodriguez e Aragão, Gláucia Maria Falcão. 2008. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termorresistentes em etapas do processo produtivo de néctar de maçã. *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Brasil)*. 28(1):116-121.
- Samson, R.A. 2000. List of names of *Trichocomaceae* published between 1992 and 1999. In *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. (pp. 73-79). Amsterdam, The Netherlands: Harwood Academic Publishers.
- Samson, R.A.; Hong, S.; Peterson, S.W.; Frisvad, J.C. and Varga, J. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology*. 59:147-203.
- Samson, R.A.; van Reenen-Hoekstra, E.S. and Hartog, B.J. 1992. Influence of pretreatment of raspberry pulp on the detection of heat resistant moulds. In *Modern methods in food mycology*. (pp. 155-158). *Developments in Food Science*. Vol. 31. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V.
- Samson, Robert A.; Nielsen, P.V. and Frisvad, J.C. 1990. The genus *Neosartorya*: differentiation by scanning electron microscopy and mycotoxin profiles. In *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*. (pp. 455-467). New York: Plenum Press.
- Serrano, Rita; Gusmão, Leonor; Amorim, António and Araujo, Ricardo. 2011. Rapid identification of *Aspergillus fumigatus* within the section *Fumigati*. *BMC Microbiology*. 11:82(21 April).
- Slongo, Adriana Paula and de Aragão, Gláucia Maria Falcão. 2006. Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(3):312-316.
- Sobrero, María S.; Basílico, María de la Luz; Sanchis, Juan C. y Basílico, Juan C. 2002. Identificación de variedades de *Neosartorya fischeri* aisladas de jugos cítricos concentrados. *Revista FABICIB*. 6:183-187.
- Sordo, María del Huerto. 2012. Frutilla: con buen manejo, los productores líderes logran rindes de 70 tn/ha. *Producción Agroindustrial del NOA*. 24(196):58-59.
- Splittstoesser, D.F. 1991. Fungi of importance in processed fruits (Chapter 7). In: *Handbook of Applied Mycology. Foods and Feeds*. Volume 3. (pp. 201-219). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sun, Jie; Chu, Yi Fang; Wu, Xianzhong and Liu, Rui Hai. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(25):7449-7454.
- Tournas, Valerie. 1994. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. *Critical Reviews in Microbiology*. 20(4):243-263.
- Varga, János; Vida, Zoltán; Tóth, Beáta; Debets, Fons and Horie, Yoshikazu. 2000. Phylogenetic analysis of newly described *Neosartorya* species. *Antonie van Leeuwenhoek*. 77(3):235-239.
- Vinh, Donald C.; Shea, Yvonne R.; Sugui, Janyce A.; Parrilla-Castellar, Edgardo R.; Freeman, Alexandra F.; Campbell, J. William; Pittaluga, Stefania; Jones, Pamela A.; Zelazny, Adrian; Kleiner, David; Kwon-Chung, Kyung J. and Holland, Steven M. 2009. Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clinical Infectious Diseases*. 49(1):102-111.
- Yaguchi, T.; Imanishi, Y.; Matsuzawa, T.; Hosoya, K.; Hitomi, J. and Nakayama, M. 2012. Method for identifying heat-resistant fungi of the genus *Neosartorya*. *Journal of Food Protection*. 75(10):1806-1813.
- Yaguchi, Takashi; Someya, Ayako and Udagawa, Shun-ichi. 1994. A new species of *Neosartorya* from Taiwan soil. *Mycoscience*. 35(4):309-313.