



Cinética de crecimiento de aislamientos autóctonos de *Aspergillus* sección *Fumigati*

Hilda Romero ¹ .
Ana María Capote ² .
Stephany Contreras ³ .
Angélica Castro ⁴ .

¹Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela hildarom4@hotmail.com

²Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela

³Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela

⁴Cátedra de Micología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina
Universidad Central de Venezuela

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina -
Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 29 de Marzo del 2018 a la Revista Vitae Academia
Biomédica Digital.

RESUMEN

Debido al desconocimiento de parámetros fisiológicos aportados por la cinética de crecimiento de aislamientos de *Aspergillus* sección *Fumigati* en Venezuela y la importancia que ello involucra, este trabajo tuvo como objetivo determinar la cinética de crecimiento de cinco aislamientos autóctonos (dos de libros, uno ambiental, dos clínicos) y una cepa de

referencia (ambiental) de *Aspergillus* sección *Fumigati* en Sabouraud líquido (SL) por espectrofotometría. Para ello, se realizaron siembras sucesivas, cada tres días, en agar Sabouraud y SL. El inóculo fúngico se preparó de la tercera resiembra en SL, homogenizando hasta obtener una DO de 0,024 (540 nm) y se incubó en agitación a 28 °C, leyendo a diferentes tiempos. Se calcularon los parámetros tiempo de generación (Tg) y velocidad de crecimiento (k) y cada fase se observó microscópicamente con azul de lactofenol. Las curvas de crecimiento tuvieron una duración de 39 y 60 h. La fase de latencia se observó durante las primeras 24 h, la exponencial fue de 21-42 h y la estacionaria comenzó a las 39 y 60 h. El Tg fluctuó entre 9,4- 26,5 h (media:17,3 h) y la k fue de 0,026 a 0,074 h⁻¹ (media:0.047 h⁻¹). Se notó un comportamiento similar entre los aislamientos provenientes de libros y ambientales y hubo disimilitud entre los clínicos, resultando más rápidos en completar el ciclo los procedentes de libros. Las características micromorfológicas de cada fase fueron semejantes para los hongos analizados. La importancia de conocer la cinética de crecimiento de *Aspergillus* sección *Fumigati* queda de manifiesto con los resultados aquí obtenidos, al evidenciarse la variabilidad cinética que existe dentro de una misma especie fúngica.

PALABRAS CLAVE: Cinética de crecimiento, *Aspergillus* sección *Fumigati*, Sabouraud, espectrofotometría, micromorfología

SUMMARY

Due to the unawareness of physiological parameters in Venezuela, such as the growth kinetic and the importance that such parameter involves, the main purpose of this work was to determine the growth kinetic of five autochthonous isolates (two from books, one from the environment, two clinical) and one reference strain of the *Aspergillus* section *Fumigati* in liquid Sabouraud (LS) by spectrophotometry. For this, each three days cultures were seeded in agar Sabouraud and LS. The inoculum was prepared from the third subculture in LS, then homogenized to obtain an O.D. of 0.024 (540nm), incubated under mechanical agitation at 28 °C and reading at different times. The parameters of generation time (GT) and growth velocity (k) were calculated and each phase was microscopically observed using lactophenol cotton blue. The growth curves lasted for 39 and 60 h, where the latency phase was observed during the first 24 h of growth, the exponential phase was of 21-42 h and the stationary phase started at 39 and 60 h. The GT fluctuated between 9.4- 26.5 h (half: 17.3 h) and k was from 0.026 to 0.074 h⁻¹ (half: 0.047 h⁻¹). A similar behaviour was noted between the books and environmental isolates whereas the clinical isolates showed some differences. The isolates coming from books were more rapid in all aspects. The micromorphological characteristics of each growth phase were similar for the studied fungi. The results here obtained show the importance of knowing the growth kinetic of *Aspergillus* section *Fumigati*, since evidenced the kinetic variability in a fungal species.

KEY WORDS: Growth kinetic, *Aspergillus* section *Fumigati*, Sabouraud, spectrophotometry, micromorphology.

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS DE *ASPERGILLUS* SECCIÓN *FUMIGATI*

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de un microorganismo se refiere al incremento de su biomasa. Los hongos, en un sistema cerrado, presentan una cinética de crecimiento comprendida en cuatro fases: latencia, exponencial, estacionaria y muerte. Uno de los métodos utilizados para el monitoreo del crecimiento de hongos filamentosos *in vitro* es el espectrofotométrico, el cual tiene la ventaja de ser un método rápido, útil y seguro (1, 2, 3, 4).

La cinética de crecimiento se ha estudiado en hongos como *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cladophialophora carrionii*, *Microsporum canis* y *Cryptococcus neoformans* con la finalidad de evaluar el efecto inhibitorio de antifúngicos sobre estos hongos y también en la extracción de antígenos para el desarrollo de técnicas inmunológicas (2, 3, 4, 5, 6, 7).

Con respecto a los estudios de la cinética de crecimiento de *A. fumigatus*, la fase estacionaria se ha empleado para la preparación de antígenos utilizados en el inmunodiagnóstico de aspergiloma y la velocidad de crecimiento específico se ha relacionado con la presencia de determinados genes así como también con la virulencia de *A. fumigatus* (8, 9, 10).

Los hongos del género *Aspergillus* son omnipresentes y gracias a la facilidad de dispersión de sus conidias y a su pequeño tamaño, pueden permanecer en suspensión durante largo tiempo, por lo que el hombre se encuentra constantemente expuesto a su inhalación (11,12, 13, 14). De las más de 250 especies de este género, 20 son consideradas patógenas siendo *A. fumigatus* la especie más patógena para el hombre y los animales ocasionando aspergilosis y reacciones de hipersensibilidad (11, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20) debido a sus numerosos factores de virulencia (8,11,13, 21, 22, 23).

El conocimiento de la cinética de crecimiento de aislamientos autóctonos de *Aspergillus* sección *Fumigati* conjuntamente con el seguimiento micromorfológico, permitirá disponer de datos propios para ser utilizados en pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, así como para la obtención de antígenos extraídos de un mesoclima compartido por las personas cuya sensibilidad estaría siendo valorada, e implementarlos en el diagnóstico de la aspergilosis en nuestro país; también sería útil para correlacionar la virulencia de los aislamientos ambientales o clínicos. A nivel industrial y médico podría tener aplicaciones conforme a la extracción de enzimas, toxinas o productos de su metabolismo.

Por lo antes expuesto y debido a la inexistencia de trabajos venezolanos que muestren el comportamiento de las diferentes fases del crecimiento de estos hongos, el objetivo del presente estudio fue determinar la cinética de crecimiento y la paridad micromorfológica de aislamientos autóctonos de *Aspergillus* sección *Fumigati* en Sabouraud líquido por espectrofotometría y micromorfología.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamientos fúngicos

Se analizaron cinco aislamientos fúngicos autóctonos y una cepa de referencia. A cada uno de

ellos se les verificó la identificación fenotípica realizando estudios micológicos (cultivos en agar Sabouraud a 25 y 37°C) y usando claves taxonómicas (24) (Tabla I).

Tabla I. Aislamientos y cepa de *Aspergillus* sección *Fumigati*.

Nº	Datos Disponibles
1	Aislamiento de libros. Biblioteca de EB-UCV
2	Aislamiento de libros enfermos. Biblioteca de EB-UCV
3	Aislamiento ambiental. UIDJA del CENDES-UCV
4	Aislamiento clínico. Onicomycosis. INHRR. N° F412000-87
5	Aislamiento clínico. Aspergilosis invasora. INHRR. N° F412000-144
6	Cepa ambiental. NCPF-2140. MRL- Londres. Aislado en 1965

EB-UCV: Escuela de Bioanálisis-UCV, UIDJA: Unidad de Información y Documentación Jorge Ahumada CENDES-UCV. INHRR: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". NCPF-MRL: National Collection of Pathogenic Fungi, Mycological reference laboratory.

Cinética de crecimiento

Preparación del inóculo fúngico

Se siguió la metodología reportada previamente (7), con algunas modificaciones. Se hicieron tres resiembras cada tres días en agar Sabouraud (AS) a temperatura ambiente (TA) seguidos de tres subcultivos en 30 mL de Sabouraud líquido (SL) con intervalos de tres días cada uno, en agitación mecánica constante (80 rpm) a 28 °C. Luego, el cultivo fúngico se homogeneizó (homogeneizador IKA-WERK®) y diluyó lo suficiente con SL para obtener una DO de 0,024 a 540 nm.

Estandarización de los tiempos de lectura

Para ello se escogió, al azar, el aislamiento N° 1 y con él se realizaron tres protocolos para curvas de crecimiento utilizando diferentes tiempos de lectura y el inóculo estandarizado.

Curvas de crecimiento

Se escogió el protocolo N° 3 por ser el que permitió la mejor definición de las fases de crecimiento; en este se efectuaron 11 lecturas, las dos primeras cada 12 h, las tres lecturas siguientes se hicieron con intervalos de tres h, la sexta se efectuó 12 h después, las cuatro siguientes con intervalos de tres h y la última se ejecutó 12 h más tarde, a las 60 h.

Se inocularon fiolas de 50 mL con 10 mL del inóculo estandarizado y se incubó bajo las condiciones ya descritas. Se midió la turbidez fúngica generada a 540 nm a los diferentes tiempos (previa homogenización de los 10mL del inóculo). Cada determinación se hizo por duplicado.

Los datos obtenidos fueron graficados (tiempo vs. DO) usando Microsoft Excel 2010. Se realizó un control de pureza en AS a TA antes de la lectura de DO.

Parámetros de la cinética de crecimiento

Tiempo de generación (Tg)

Es el tiempo requerido para que la biomasa se duplique. Se obtuvo de la fase de crecimiento exponencial, a partir de la ecuación de la recta cuya expresión matemática es $Tg = \ln 2/m$,

donde \ln = logaritmo neperiano; m = pendiente (1, 3, 25).

Constante de velocidad de crecimiento (k)

Es una medida del número de generaciones que ocurre por unidad de tiempo (una hora) en un cultivo con crecimiento exponencial y se expresa con la ecuación $k = \ln 2 / T_g$ (1, 25).

Estudio microscópico

Para ello, simultáneamente con cada lectura espectrofotométrica, se colocó una gota del cultivo fúngico y una gota de azul de lactofenol, entre lámina y laminilla; se realizó la descripción morfológica y se registró fotográficamente.

Los resultados se presentaron en valores absolutos, en porcentajes, promedios, tablas y gráficos.

RESULTADOS

Curvas de crecimiento fúngico

Estas tuvieron una duración de 39 a 60 h hasta la fase estacionaria. En todos los hongos estudiados, la fase de latencia se observó durante las primeras 24h de cultivo, la exponencial fue entre 21- 42 h y la fase estacionaria comenzó a las 39 y 60 h, como se aprecia en el gráfico 1 y la tabla II.

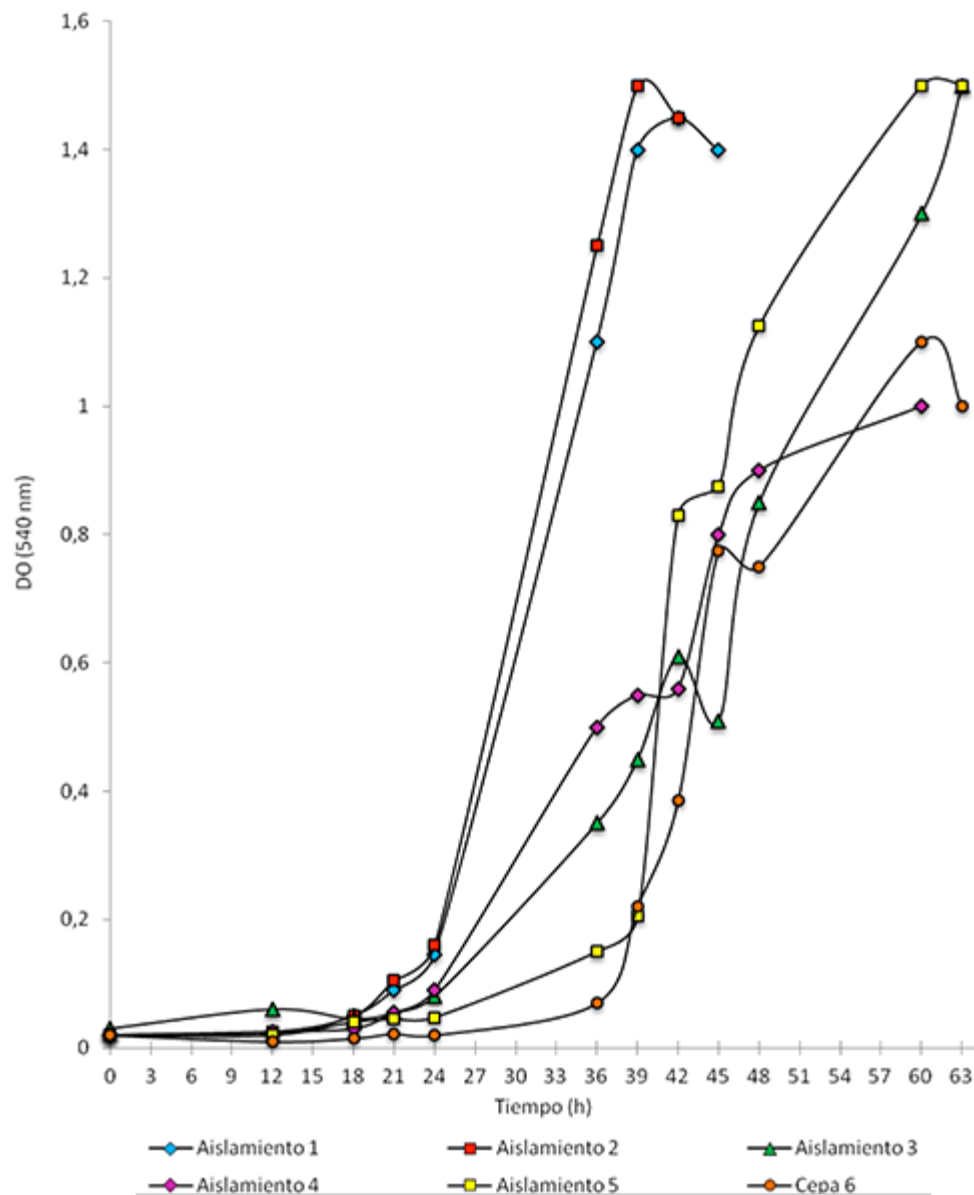


Gráfico1. Curvas de crecimiento de *Aspergillus* sección *Fumigati*. Aislamiento 1: libros. Aislamiento 2: libros. Aislamiento 3: ambiental. Aislamiento 4: clínico. Aislamiento 5: clínico. Cepa 6: ambiental.

Parámetros de la cinética de crecimiento

Tiempos de generación (Tg)

Este parámetro fluctuó entre 9,4 a 26,5 h (media: 17,9 h), donde el promedio de los aislamientos procedentes de libros fue 9,8 h, el de los ambientales fue 21,3 h y el de los clínicos fue de 20,8 h (Tabla II).

Tabla II. Parámetros de la cinética de crecimiento de *Aspergillus* sección *Fumigati*

N° Aislamiento/cepa	Duración fase lag (h)	Duración fase log (h)	Inicio fase estacionaria (h)	Tg (h)	k (h ⁻¹)
1 (Libros)	18	21	39	10,2	0,0676
2 (Libros <u>enf.</u>)	18	21	39	9,4	0,0740
3(Ambiental)	21	39	60	22,2	0,0312
4 (Clínico)	18	42	60	26,5	0,0262
5 (Clínico)	24	36	60	15,0	0,0461
6 (Ambiental)	24	36	60	20,3	0,0341

Tg: tiempo de generación, h: hora, k: constante de velocidad de crecimiento, h⁻¹: inverso de hora.

Constante de velocidad de crecimiento (k)

Para este parámetro hubo una oscilación de 0,026 a 0,074h⁻¹ (media: 0.047 h⁻¹), en el cual la media de los aislamientos provenientes de libros fue de 0,071h⁻¹, la de los ambientales de 0,033 h⁻¹ y la de los clínicos fue de 0,036 h⁻¹, como se observa en la tabla II.

Estudio microscópico

Este mostró características similares para todos los microorganismos analizados. En la fase de latencia se observó hifas hialinas, gruesas, septadas y algunos entramados de hifas con ramificaciones escasas que se hicieron más frecuentes con el tiempo de incubación; en la fase exponencial se evidenció un entramado denso de hifas ramificadas, en ángulos de 45 y 90° y algunos aparatos conidiales indiferenciados; la estacionaria reveló numerosos aparatos conidiales totalmente diferenciados y típicos de *Aspergillus* sección *Fumigati* (Gráfico 2).

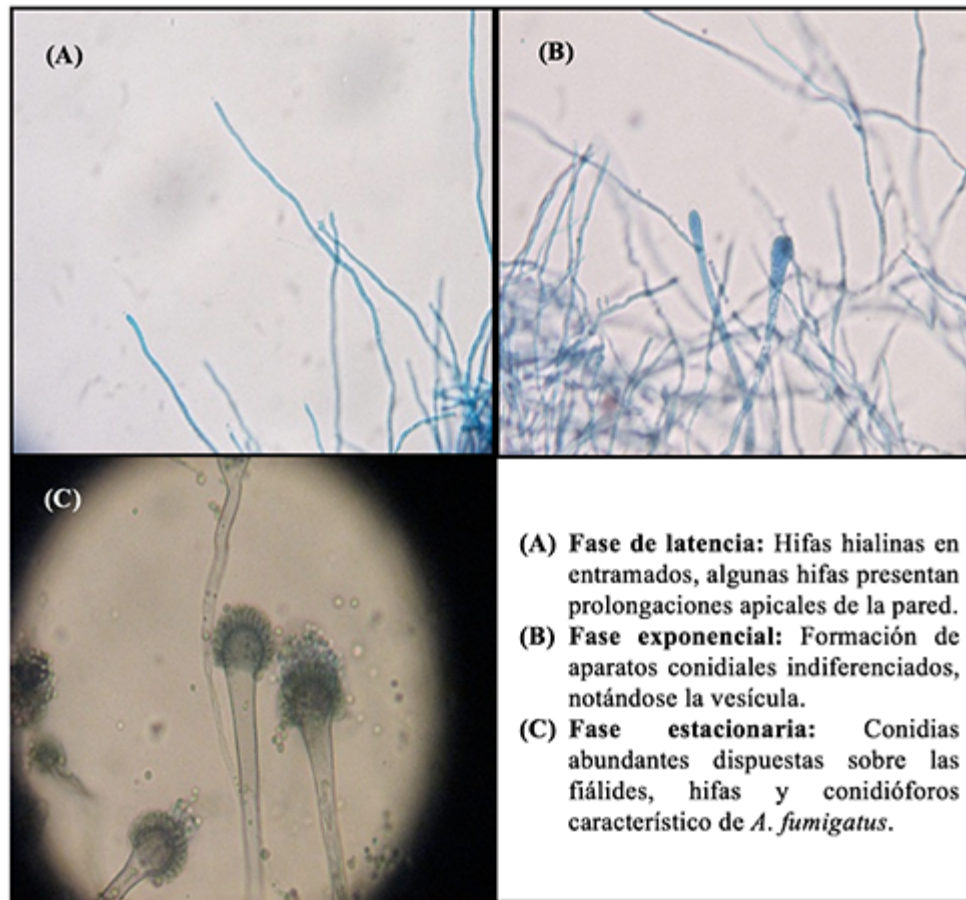


Gráfico 2. Hallazgos microscópicos de *Aspergillus* sección *Fumigati* en cada fase de crecimiento (400 X). Azul de lactofenol.

DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la cinética de crecimiento de aislamientos autóctonos de *Aspergillus* sección *Fumigati* en medio líquido por espectrofotometría y micromorfología con la finalidad de aportar información fenotípica propia de aislamientos circunscritos a nuestro mesoclima.

Se utilizó el medio de cultivo Sabouraud líquido, puesto que es el medio de referencia en micología y también porque se han reportado resultados muy satisfactorios con respecto al desarrollo y velocidades de crecimiento de *A. fumigatus* usando este medio (3, 4, 8, 7, 10, 26, 27, 28, 29, 30).

Por otra parte, en esta investigación se implementó el método espectrofotométrico por ser más seguro para el experimentador ya que con éste se evita la dispersión de conidias en el aire, los resultados se obtienen de manera directa y rápida, es el método más preciso para el hallazgo de la fase log y además permite observar microscópicamente las diferentes características morfológicas del hongo durante su desarrollo (7, 9, 10, 28, 31).

La temperatura seleccionada fue 28 °C debido a que esta es la temperatura promedio del

hábitat de *Aspergillus* sección *Fumigati* en Venezuela (32).

Se obtuvieron curvas de crecimiento típicas, mostrando que los dos aislamientos procedentes de libros fueron más rápidos en completar este proceso, quizás debido a su aislamiento a partir de materia orgánica que le aporta los nutrientes necesarios para su reproducción, encontrándose así en condiciones óptimas para su desarrollo.

Al analizar cada fase de crecimiento fúngico, se observó que la fase de latencia permaneció por un tiempo similar en todos los hongos estudiados (18 a 24 h), valores superiores a los informados en trabajos internacionales, donde se trabajó con este hongo por espectrofotometría a 37°C, ésta diferencia presumiblemente sea debida a las distintas temperaturas usadas en esas investigaciones (9,10, 28).

Aunque la duración de la fase de latencia fue similar en los hongos estudiados, se notaron diferencias en este aspecto en las otras fases de crecimiento, puesto que la fase exponencial de los aislamientos procedentes de libros fue más corta que la del resto de los hongos analizados y la fase estacionaria comenzó entre las 39 y 60 h, tiempos más cortos que los reportados en uno de los trabajos mencionados anteriormente (>92,4 h) (28). Es de señalar que hasta la lectura efectuada no se alcanzó la fase de muerte del hongo.

Al establecer el T_g , se observó que este parámetro fue similar entre los aislamientos de igual procedencia, con excepción de los clínicos, evidenciándose que los aislamientos de libros duplicaron su biomasa más rápidamente que los otros hongos, lo que se presume se deba a su reciente extracción de un sustrato orgánico rico en nutrientes.

Con respecto a la k , se observó que este parámetro fue similar entre los aislamientos de igual procedencia, evidenciándose que la k de los aislamientos de libros fue más elevada. Los valores de la k aquí obtenidos (0,026-0,074 h⁻¹) fueron menores a los reportados en un estudio previo realizado a 37 °C donde el promedio de las k fue de 0,295 h⁻¹ (10), disimilitud seguramente debida a las diferentes temperaturas empleadas. Es de hacer notar la importancia que pudiera revestir la determinación de este parámetro ya que en estudios recientes se ha relacionado la k con la virulencia de *A. fumigatus*, donde la velocidad de crecimiento y la virulencia del hongo son directamente proporcionales (9,10).

Con relación a las características micromorfológicas, estas fueron semejantes para todos los hongos en cada una de las fases del desarrollo fúngico.

Además del incremento de la biomasa revelado espectrofotométricamente, el estudio microscópico reveló que hubo correspondencia entre la cinética del crecimiento fúngico y la diferenciación de las estructuras del micelio del hongo, partiendo de la observación de solo hifas en la fase de latencia, seguida de la formación de micelio especializado en la fase log y finalmente de la morfología típica de *A. fumigatus* en la fase estacionaria, lo cual concuerda con el hecho de que en esta fase se produce el agotamiento de nutrientes del medio y la acumulación de productos del metabolismo fúngico conduciendo así a la esporulación (1).

La importancia de conocer la cinética de crecimiento de *Aspergillus* sección *Fumigati* queda de manifiesto con los resultados aquí obtenidos, al evidenciarse la variabilidad cinética que existe dentro de la sección *Fumigati*, aún más en el caso de *A. fumigatus*, ya reconocido como parte de una sección donde algunas especies son fenotípicamente similares pero genéticamente diferentes, esto conlleva a desestimar la generalización en todos los procesos que impliquen la obtención de alguna información o producto de las diferentes fases del desarrollo de este hongo; además, la carencia de información sobre el comportamiento cinético de aislamientos autóctonos de estos hongos, hecho constatado después de una revisión exhaustiva de la bibliografía venezolana disponible, incrementan la importancia del presente trabajo. Asimismo, en estos casos es de mucha utilidad el método espectrofotométrico aquí empleado, que estuvo ceñido de sistematicidad y rigurosidad garantes de los resultados obtenidos (14, 16, 33,34).

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al personal docente y obrero de la Cátedra de Micología de la Escuela de Bioanálisis de la UCV por la colaboración brindada, en especial a la Profa. Edith Ortega; a la M.Sc. Mercedes Panizo, del Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, a la Dra. Mireya Mendoza, del Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina por la donación de los hongos usados en este estudio y a Dra. Myrtha Arango, del laboratorio de micología de la Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Prescott L, Harley J, Klein D. Nutrición, crecimiento y control microbiano. En: Microbiología. 5ta ed. España: Mc Graw-Hill/Interamericana de España S.A; 2004. P 99-145.
2. Vivas J, Romero H, Herrmann G, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* antiproliferative effect of ajoene on *Cryptococcus neoformans*. J Mycol Med 2002; 12:149-151.
3. Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R. *In vitro* antiproliferative effect of ajoene on *Microsporum canis*. J Mycol Med 2000; 10:152-5.
4. Romero H, Viscaya L, Ferrara G. *Bacillus subtilis* inhibits growth of *Cladophialophora carrionii* *in vitro*. J Mycol Med 2006; 16:92-94.
5. San-Blas G, San-Blas F, Gil F, Mariño L, Apitz-Castro R. Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. Antimicrob Agents Chemother 1989; 33(9):1641-1644.
6. San-Blas G, Mariño L, San-Blas F, Apitz-Castro R. Effect of ajoene on dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol 1993; 31:133-144.
7. Romero H, Torres J, Apitz-Castro R. *In vitro* inhibitory effect of ajoene on *Histoplasma capsulatum*. J Mycol Med 2004; 14:181-184.
8. Casquero J, Urcia F, Sánchez E. Antígenos nativos de *Aspergillus fumigatus* con utilidad para el inmunodiagnóstico de aspergiloma. Rev Perú Med Exp Sal Púb 2009; 26(2):182-186.
9. Amarsaikahan N, O'Dea E, Tsoggerel A, Owegi H, Gillenwater J, Templeton S. Isolate-

- Dependent growth, virulence, and cell wall composition in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Plos One 2014; 9(6):1-9.
10. Paisley D, Robson G, Denning D. Correlation between in vitro growth rate and in vivo virulence in *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol 2005; 43:397-401.
 11. Bonifaz A. Aspergilosis. En: Micología Médica Básica. 4ta Ed. Mc Graw-Hill. Mexico DF; 2012. P 381 - 398.
 12. Kwon K. Aspergillus: Diagnosis and description of the genus. En: *Aspergillus* and Aspergillosis. Vanden H, Mackenzie D, Cauwenbergh G. Nueva York: Plenum Publishing Corporation; 1988. P 11-22.
 13. Garcia-Vidal C, Carratalà J. Patogenia de la Infección fúngica invasora. Enf Inf Microbiol Clin 2012; 30(3):151-158.
 14. Abarca M. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol 2000; 17:S79-S84.
 15. Casas G. Contribución al estudio de *Aspergillus* y Aspergilosis. KASMER 1972; 4(2):107-183.
 16. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Enf Inf Microbiol Clin 2012; 30(1):33-39.
 17. Sanabria S. Aspergilosis pulmonar (Revisión bibliográfica). Rev Med Costa Rica y Centroam 2009; LXVI (587):67-71.
 18. Maggiolo J, Rubilar L, Kogan R, Girardi G. Aspergilosis broncopulmonar alérgica en pediatría. Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile. [Internet] Disponible en: <http://www.neumologia-pediatrica.cl>. Consultado en Abril de 2014.
 19. Ballesteros A, Morales O, Royo C. Aspergilosis broncopulmonar alérgica, una complicación del paciente con fibrosis quística: reporte de dos casos y revisión de la literatura. Iatreia 2012; 25(1):65-74.
 20. Máiz L, Cuevas M, Lamas A, Sousa A, Quirce S, Suárez L. *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans* en la fibrosis quística: significado de inmunoglobulinas G, A y M. Arch Bronconeumol 2008; 44(3):146-51.
 21. Mackenzie D. *Aspergillus* in man. En: *Aspergillus* and Aspergillosis. Vanden H, Mackenzie D, Cauwenbergh G. Nueva York: Plenum Publishing Corporation; 1988. P 1-8.
 22. Borges M, Fiederling A. Presentaciones clínicas de la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol 2000; 17:S85-S89.
 23. Blanco J, Guedeja-Marrón J, Caballero J, García M. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. Rev Iberoam Micol 1998; 15:10-15.
 24. Hoog G, Guarro J, Gené J, Figueras M. Atlas of Clinical Fungi. 2ª ed. Universitat Rovira i Virgili. Reus, España. 2000. P 473-475.
 25. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Pearson Prentice Hall; 2003. P 136 - 166.
 26. Romero H, Ortega E, Castro A, Torres J. Métodos de estudio de los hongos de importancia médica. En: Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Micología. Venezuela: Ed de la Cátedra de Micología; 2012. P Mét10.
 27. Arenas R. Medio de cultivo. En: Micología Médica Ilustrada. 4ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2011. P 293.
 28. Meletiadiis J, Meis J, Mouton J, Verweij P. Analysis of growth characteristics of filamentous

- fungi in different nutrient media. J Clin Microbiol 2001; 39(2):478-484.
29. Mendoza M, Diaz A, Hung M, Zambrano E, Diaz E, Albornoz M. Production of culture filtrates of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. Med Mycol 2002; 40:447-454.
 30. Mendoza M, Hung M, Diaz A, Zambrano E, Diaz E, Albornoz M. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. J Mycol Med 2005; 15:127-135.
 31. Melgar G, Souza F, Coutinho L, Fanti S, Duraes L, Meleiro A. Growth curves of filamentous fungi for utilization in biocatalytic reduction of Cyclohexanones. Glob J Sci Front Res Chem 2013; 13(5):13-19.
 32. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMEH). Boletín Climatológico Mensual Julio 2014. Venezuela: INAMEH; 2014.
 33. Samson R, Hong S, Peterson S, Frisvad J, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph Neosartorya. Studies in Mycol 2007; 59:147-203.
 34. Serrano R, Gusmão L, Amorim A, Araujo R. Rapid identification of *Aspergillus* within the section *Fumigati*. BMC Microbiology 2011;11:82.