

## **AISLAMIENTO, REVITALIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ESPECIES FUNGICAS CELULOLÍTICAS PARA SU EMPLEO EN LA BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA.**

Liuba Plana Pérez, Rafael F. Castañeda Ruíz, Beatríz Ramos García, Mirta Caraballo Fernández, Aliana Sosa León, Nirva González López, Danay Guerra González, Irma Marrero Granados y Doris García Vázquez.

### **RESUMEN**

En este trabajo se lograron aislar, revitalizar y evaluar especies de hongos con elevada actividad celulolítica, conformando un banco de trabajo para su potencial de uso en la biotecnología agrícola y la producción de compost. Se aislaron 25 cepas de hongos, recolectadas a partir de restos celulósicos (tela, cartón y papel) y de suelo en diferentes áreas del INIFAT (Área de compostaje, Bosque y Cuartón de Roig). De estas cepas, 18 fueron identificadas en especie: *Ascotricha bosei*, *Ascotricha xyliina*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Curvularia lunata*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium indicum*, *Dycima vesiculifera*, *Memnoniella echinata* (2), *Memnoniella levispora*, *Stachylidium bicolor*, *Stachybotrys niragirica*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y siete en género: *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Stachybotrys* sp. y *Trichoderma* sp.; según la descripción morfológica de sus colonias. Además se revitalizaron y reidentificaron 12 cepas reportadas como celulolíticas, conservadas en la Colección 853 de la Federación Mundial de Cultivos Microbianos (WFCC) del INIFAT, durante más de 15 años; así como cinco pertenecientes al grupo de la Colección de Cepas Comestibles y Medicinales. La actividad celulolítica se evaluó mediante las técnicas cualitativas de carboximetilcelulosa (CMC) y papel de filtro (ensayo de exoglucanasas y pérdida de peso) para seleccionar las cepas de mayor potencialidad: *Ascotricha bosei*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys* sp., *Stachybotrys niragirica*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Pleurotus ostreatus*. Finalmente se conservaron todas en tubos con medio Malta-Agar (MA) inmersos en 15 mL de petrolato líquido ligero, una vez replicadas en número de 10 diez.

**Palabras clave:** hongos, actividad celulolítica.

**Isolate, revitalize and evaluate species of cellulolytic fungus for their use in the agricultural biotechnology.**

---

MSc. Liuba Plana Perez, Investigador Agregado del Grupo de Agrobiotecnología del Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Calle 379 esq. 188 Santiago de las Vegas, La Habana. Cuba. [labhongo@inifat.co.cu](mailto:labhongo@inifat.co.cu)

## ABSTRACT

In this work were possible to isolate, revitalize and evaluate species of fungus with high cellulolytic activity, conforming a work bank for their potential use in the agricultural biotechnology and the compost production. 25 strains of fungus were isolated, gathered starting from cellulosic remains (cloth, cardboard and paper) and from soil in different INIFAT's area (compost area, forest and Cuartón of Roig). Of these strains, 18 were identified in species: *Ascotricha bosei*, *Ascotricha xyliina*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Curvularia lunata*, *Chaetomium globosum*, *Chaetomium indicum*, *Dycima vesiculifera*, *Memnoniella echinata* (2), *Memnoniella levispora*, *bicolor Stachyldium*, *Stachybotrys niragirica*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* and seven in genus: *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Stachybotrys* sp. and *Trichoderma* sp.; according to the morphologic description of their colonies. Also 12 strains conserved in the Collection 853 of the World Federation of Microbial Cultivations (WFCC) of the INIFAT, during more than 15 years; reported as cellulolytic, were revitalized and reidentified, as well as five belonging to the group of the Collection of Edible and Medicinal Strains. The cellulolytic activity was evaluated by the qualitative techniques of carboximetilcelulosa (CMC) and filter paper (exoglucanasas assay and loss weight) to select the strains with more potenciality: *Ascotricha bosei*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys* sp., *Stachybotrys niragirica*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* and *Pleurotus ostreatus*. Finally all were conserved in tubes with a half of Malt-Agar (MA) medium immersed in 15 mL of Slight Liquid Petrolatum, replied in number of ten.

**Key Words:** fungus, cellulolytic activity.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos han sido los microorganismos más utilizados en la obtención de enzimas hidrolíticas, tales como las celulasas; por ser capaces de producir niveles superiores que bacterias y levaduras. Son los responsables mayoritarios de celulólisis en la naturaleza y esto se debe a su eficiente sistema catalítico (remoción de los productos de hidrólisis), ventajas adaptativas como la alta especificidad con el substrato y su rápida colonización (Gote, 2004).

Las especies de hongos celulolíticos más

frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo, otros géneros de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Neurospora*, incluyendo especies de comestibles como: *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes* y *Volvariella volvacea*; también producen celulasas (Cai *et al.*, 1999).

El proceso de obtención de celulasas a partir de estos, es económicamente viable, pues en sistemas de fermentación sumergida se logran obtener altas concentraciones de

enzimas, que son purificadas a partir del sobrenadante de la fermentación, ya que son excretadas al medio durante el metabolismo (Heredia *et al.*, 2008).

El estudio de la potencialidad celulolítica de la biodiversidad fúngica, juega un rol importante en la obtención de celulasas de origen biológico para la biotecnología agrícola, específicamente en la obtención de protoplastos (Agamez *et al.*, 2008) y producción de compost, por lo que se hace necesario el aislamiento, identificación y selección de cepas de hongos con elevada actividad celulolítica para el establecimiento de los bancos de trabajo destinados a este estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Recolección, Aislamiento e Identificación de cepas

Para el aislamiento de cepas, se recolectaron muestras a partir de restos celulósicos (hojarasca) y de suelo, en diferentes áreas del INIFAT (Área de compostaje, Bosque y Cuartón de Roig); así como en la Unidad Central de Materias Primas de la comunidad de Santiago de las Vegas (cartón, papel y textil).

Las mismas fueron tratadas de acuerdo a su origen: natural (hojarasca y suelo) e industrial (cartón, papel y textil).

Las muestras de suelo se agitaron a 425 r.p.m en agua estéril durante cinco minutos y de la suspensión obtenida se aplicaron 10 mL a 15 tubos con tiras de papel de filtro de 2 x 5 cm embebidas en 5 mL de medio líquido X y se incubaron a 30°C durante 15 días. Las tiras de

papel colonizadas se colocaron en posición adyacente al medio PDA contenido en placas de Petri de 9 cm, durante 72 horas, para la posterior caracterización de las cepas presentes.

#### Medio X

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-----5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-----1 g  
MgSO<sub>4</sub> -----0,5 g  
Cloranfenicol----- 0.02 g  
H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>-----1000 mL

Las muestras de hojarasca se colocaron en placas de Petri, sobre papel de filtro y se incubaron a 27 °C durante 24 horas en cámara húmeda, con el objetivo de acelerar y favorecer la producción de conidios. Y las muestras de origen industrial recibieron igual tratamiento, pero se mantuvieron incubando durante un período mayor (24-72 horas).

Se realizaron los cultivos de las cepas aisladas de tela y cartón y de aquellas capaces de colonizar el papel de filtro. Mediante el uso de una aguja estéril y el auxilio del microscopio- estereoscopio con lente 10x (MBC-9, Rusia), se tomaron varios conidios y se inocularon en placas de Petri estéril con medio Malta-Agar (MA). Para facilitar la captura de los conidios con la aguja se empleó glicerina estéril.

La descripción morfológica de las colonias y su identificación, se realizó según Manual de Identificación de Ellis (1976), a partir de los cultivos crecidos. Mediante el empleo del microscopio óptico de contraste de fase y efecto Barel (Zeiss Axioskop 40, Alemania),

con lente 40 x y preparaciones microscópicas montadas con polivinilalcohol.

### **Revitalización de cepas celulolíticas de la Colección INIFAT y reidentificación de especies**

La revitalización se realizó vertiendo el medio conservante de cada una de las cepas durante 12 horas, transfiriendo un pequeño fragmento del borde del cultivo a placas de Petri con medio celulosa, para su posterior reidentificación mediante el uso del microscopio óptico de contraste de fase y efecto Barel (Zeiss Axioskop 40, Alemania), con lente 40x. Se incubaron a 30°C durante 48-72 horas.

### **Conservación de cepas**

Para su conservación se transfirieron a tubo con medio MA inclinado y se les añadió 5 mL de Petrolato Líquido Ligeró (PLL) estéril, incorporando 10 réplicas por tubo a la Colección registrando cada cepa con código consecutivo.

## **2. Determinación de la actividad carboximetilcelulasa (CMC) a partir de los aislados obtenidos**

### **Ensayo de actividad enzimática**

Se evaluó la actividad celulolítica de las cepas aisladas mediante el test de CMC según Stamford *et al.* (1998).

Se prepararon placas de 15 cm de diámetro con medio CMC-Agar y se sembró un disco de cada cepa con un número de réplicas por cepa de tres. Luego se incubaron a 50°C en la oscuridad para facilitar la formación del halo de degradación de la celulosa, durante 5 días,

tomando mediciones a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

### Medio CMC-Agar

Carboximetilcelulosa (CMC) ----- 10 g  
NaNO<sub>3</sub>----- 3 g  
KCl ----- 0,5 g  
MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O -----  
0,5 g  
FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O -----0,01 g  
Extracto de levadura-----0,5 g  
Enrasar conH<sub>2</sub>O<sub>d</sub>-----1000 mL  
Agar ----- 12 g  
pH -----6,5

### **Selección de las cepas más efectivas**

Se evaluó cualitativamente la actividad de exoglucanasas de las cepas celulolíticas mediante la degradación del papel filtro (Borrego *et al.*, 2005), y la pérdida de peso (adaptación del método de Saddler, 1982), como criterio adicional de selección de las cepas escogidas en el acápite anterior por su potencialidad frente a CMC.

### **Degradación del papel filtro**

Se tomaron inóculos de las cepas y se sembraron en tubos conteniendo medio Papa Dextrosa, pH 5,5 (15 mL) con una tira de papel filtro Whatman. Los cultivos se incubaron durante 21 días a una temperatura entre 28-30°C, con agitación periódica durante siete horas diarias. Durante este tiempo se observaron y registraron diariamente el crecimiento micelial y la degradación del papel filtro. Una vez terminado el período de incubación se clasificaron cada una de las cepas de acuerdo a la degradación del papel filtro y de su crecimiento micelial sobre el

papel de filtro, según los criterios: abundante (+++), moderado (++) , muy pobre (+).

#### **Evaluación de la pérdida de peso**

Los cultivos obtenidos de la degradación del papel filtro se filtraron y centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos. Cada sobrenadante (2 mL) se incubó con papel de filtro Whatman (50 mg de peso aproximadamente) y buffer acetato 0,05 M pH 4,5 (2 mL), durante cinco días a 50 °C en baño de María. Al término de la incubación el papel de filtro se lavó con agua destilada y se procedió a secar en estufa a 60°C entre 24-48 horas hasta lograr peso constante.

El peso perdido se determinó por diferencia con el peso inicial. Se realizaron tres ensayos por cultivo.

#### **Determinación de la producción de ácidos por las cepas fúngicas**

Se inoculó cada cepa en medio similar a exoglucanasas, pero se empleó Glucosa al 1% como fuente de carbono y se ajustó a pH 7,0. Se incubaron las muestras a 28 °C por tres días y se realizaron las mediciones de pH para evaluar la variación del mismo, lo que de forma indirecta permite evaluar la producción total de ácidos orgánicos en el caldo fermentado.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **1. Aislamiento, identificación y conservación de cepas celulolíticas.**

##### **Aislamiento e identificación de especies**

Durante la recolección de cepas, se lograron muestrear áreas de una biodiversidad rica de especies fúngicas, por su entorno medioambiental y abundancia de sustratos

de celulosa; favorable para el desarrollo de estos microorganismos degradadores. Así, se lograron aislar 31 cepas, de las cuales 25 se identificaron como hongos pertenecientes a las divisiones Deuteromicotina (20) y Ascomicotina (5), representados en 12 géneros diferentes (Figura 1). Además de otras cuatro cepas clasificadas como mucorales (*Mucor hiemalis* y otras tres no identificadas) y dos como cromistas (*Phytophthora* sp. y otra sin identificar).

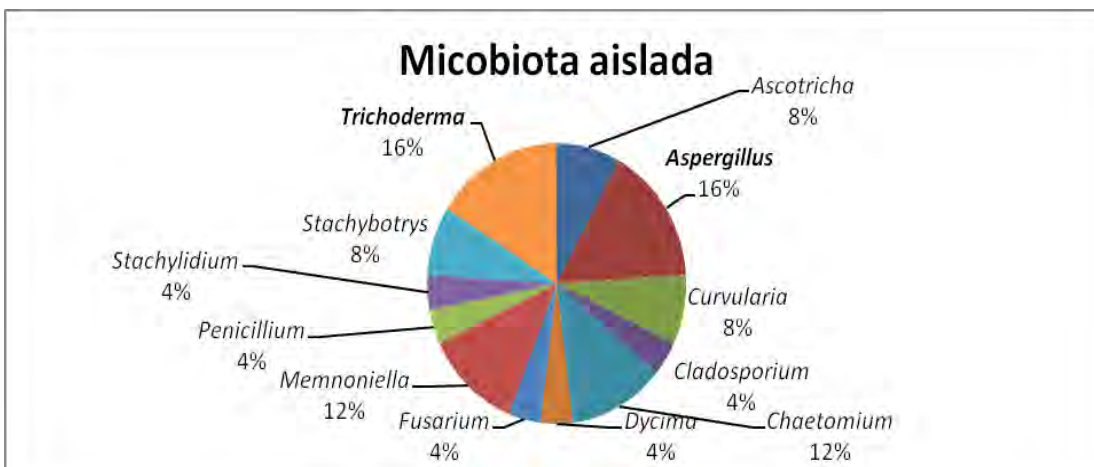
De las 25 especies aisladas de deuteromicetes y ascomicetes, 18 se ubicaron a nivel de especie. Las siete cepas restantes no lograron esporular durante la etapa evaluada, por lo que no se pudo observar el proceso de ontogenia conidial y se clasificaron como: *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Stachybotrys* sp. y *Trichoderma* sp. (Tabla 1). Como se puede observar en la tabla anterior, los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* fueron los más representados, debido probablemente a que en el caso de *Aspergillus* además de poseer un fuerte sistema enzimático, es capaz de excretar un alto nivel de micotoxinas (Khalid *et al.*, 2006) y sustancias antibióticas que lo hacen prevalecer sobre los demás microorganismos existentes en el medio circundante. Para *Trichoderma*, se reporta su rápida velocidad de colonización, ya que puede crecer en una amplia gama de sustratos y produce un grupo importante de enzimas hidrolíticas (Asero *et al.*, 2007). Su gran tolerancia a condiciones ambientales

extremas y hábitats de pH ácidos, donde los hongos son causantes de diversas enfermedades, le permiten ser eficientes agentes de control, de ahí que pueda inhibir el crecimiento de otros hongos mediante la producción de metabolitos antagonistas. Son los mejores productores de celulasas extracelulasas; dentro de las especies de hongos celulolíticos más reportadas se encuentra *Trichoderma viride*, por lo que la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos en general de éstas enzimas han sido realizados usando este microorganismo (Maheshwari *et al.*, 2000). En los aislados de suelo, prevalecieron *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Azaz y Pikel (2002), encontraron en muestras aisladas de bosques de *Pinus brutia* Ten. y *Quercus* sp. L., en Turquía, que la micobiota predominante correspondía a cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*; las que se caracterizan por ser de distribución cosmopolita.

Sharma (1981) señaló, el predominio de las especies de *Cladosporium*, *Penicillium* y *Trichoderma* en suelo de coníferas (*Pinus kesiya*) después de un incendio, mientras que en suelos no afectados, identificó especies de los géneros *Fusarium*, *Trichoderma* y *Penicillium*. Estudios realizados por Martínez y colaboradores en el 2005 y 2008, sobre 1200 cepas de hongos aislados de entre 0-20 cm de suelo, en bosques de *Araucaria-Nothofagus*, en el Parque Nacional de Tolhuaca, Chile; reportaron un dominio de

especies pertenecientes a los géneros *Penicillium* y *Trichoderma* en un 79 y 68,6 %, respectivamente. En cuanto a las cepas aisladas en papel y cartón, se evidenció la presencia de especies representantes degradadores de celulosa, pertenecientes a los géneros *Ascotracha*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Memnoniella* y *Stachybotrys*; como son *Ascotracha bosei*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Memnoniella echinata* y *Stachybotrys niragrica*. Cappitelli y Sorlini (2010), reportaron la susceptibilidad al ataque de hongos celulolíticos del papel manufacturado, por ser este previamente deslignificado durante el proceso industrial. Investigadores de archivos (Yang *et al.*, 2007; Borrego *et al.*, 2008) observaron la prevalencia de colonias de *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Alternaria* y *Geotrichum* sobre documentos dañados. Kolwzan *et al.*, 2006, encontraron una clara correlación entre la micobiota del aire y el biodeterioro de materiales celulósicos, considerando de acuerdo a la concentración de conidios en el aire, como local o ambiente contaminado a aquellos que excedan las 300 UFC/m<sup>3</sup>, mientras Bogomolova *et al.* (2009) y Borrego *et al.* (2010), estiman que no debe exceder las 1000 UFC/m<sup>3</sup>.

Si tenemos en cuenta las condiciones del local donde se recolectaron las muestras, con valores de humedad relativa de 64 % y 32 °C de temperatura; pues no es casual el poder encontrar las especies antes mencionadas colonizando estos materiales.



**Figura 1.** Micobiota aislada en el Área de compostaje, Bosque y Cuartón de Roig del INIFAT y en la Unidad Central de Materias Primas de Santiago de las Vegas. Distribución de géneros representados.

**Tabla 1.** Cepas de hongos celulolíticos aisladas. Substratos de origen.

Cepas	Género y especie	Substrato
1	<i>Ascotricha bosei</i>	papel
2	<i>Ascotricha xyli</i>	papel
3	<b><i>Aspergillus niger</i></b>	papel
4	<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b>	hojarasca
5	<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	suelo
6	<b><i>Aspergillus terreus</i></b>	suelo
7	<i>Curvularia lunata</i>	hojarasca
8	<i>Curvularia</i> sp.	papel
9	<i>Cladosporium</i> sp.	cartón
10	<i>Chaetomium</i> sp.	papel
11	<i>Chaetomium globosum</i>	papel
12	<i>Chaetomium indicum</i>	hojarasca
13	<i>Dycima vesiculifera</i>	hojarasca
14	<i>Fusarium</i> sp.	suelo
15	<i>Memnoniella echinata</i>	tela
16	<i>Memnoniella echinata</i>	cartón
17	<i>Memnoniella levispora</i>	papel
18	<i>Penicillium</i> sp.	suelo
19	<i>Stachylidium bicolor</i>	hojarasca
20	<i>Stachybotrys niragirica</i>	papel
21	<i>Stachybotrys</i> sp.	papel
22	<b><i>Trichoderma hamatum</i></b>	suelo
23	<b><i>Trichoderma viride</i></b>	hojarasca
24	<b><i>Trichoderma harzianum</i></b>	hojarasca
25	<b><i>Trichoderma</i> sp.</b>	hojarasca

Revitalización de cepas celulolíticas de la  
Colección INIFAT

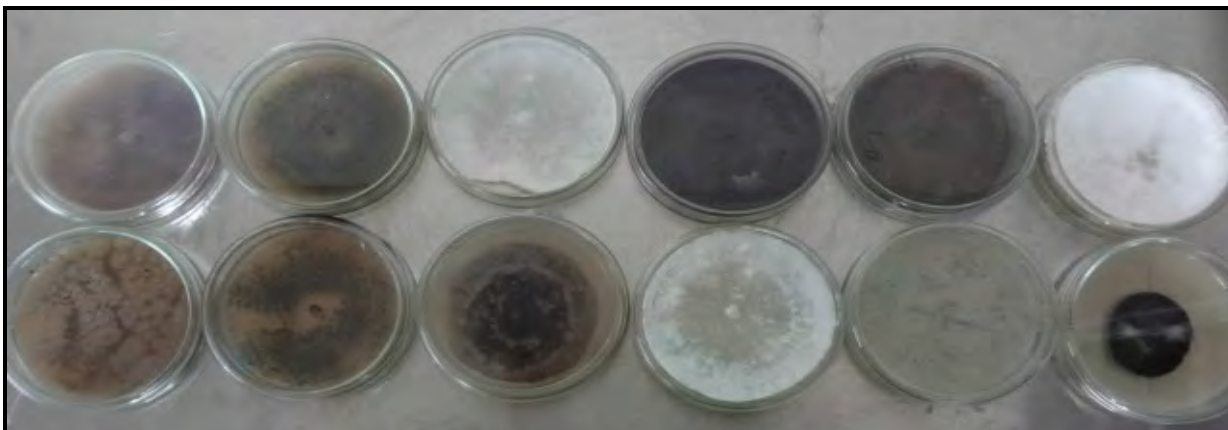
Se realizó un programa de revitalización de 15 cepas, que se encontraban conservadas desde la década anterior en la Colección de Hongos del INIFAT, por su alto potencial celulolítico en el momento que se aislaron. Algunas de importancia Institucional como la 2684 de *Trichoderma viride*, cuya formulación como TRIFESOL constituye un bioproducto de interés en la Agricultura para el control de hongos fitopatógenos.

A pesar de permanecer en estado de latencia, por más de 10 años, se lograron replicar un total de 12: *Ascotricha* sp., *Ascotricha bosei*, *Chaetomium* sp., *Chaetomium globosum*, *Chaetomium indicum*, *Dycima vesiculifera*, *Memnoniella levispora*, *Stachyllidium bicolor*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma virens* y *Trichoderma* sp.

Como se observa en la Figura 2, cada una de ellas mostró su típico comportamiento morfológico cultural al ser transferidas en

placas con MA, luego de ser expuestas para su reactivación en medio de celulosa como única fuente de carbono.

En el caso de los tres cultivos restantes (*Sclerotium* sp., *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp.), no se lograron depurar, pues se encontraban contaminadas con colonias de bacterias del género *Bacillus*. La presencia de éste género bacteriano en el aire de interiores es generalmente indicativo de daños provocados por el agua o por la necesidad de realizar un mantenimiento constructivo en el edificio donde se encuentra ubicado (Borrego et al., 2011); lo cual se corresponde en nuestro caso, con las condiciones del local del Cepario, enclavado en una edificación de más de 105 años, cuyas paredes resguardan un nivel de humedad considerable.



**Figura 2.** Cultivo de cepas celulolíticas revitalizadas de la Colección.

#### **Conservación de cepas**

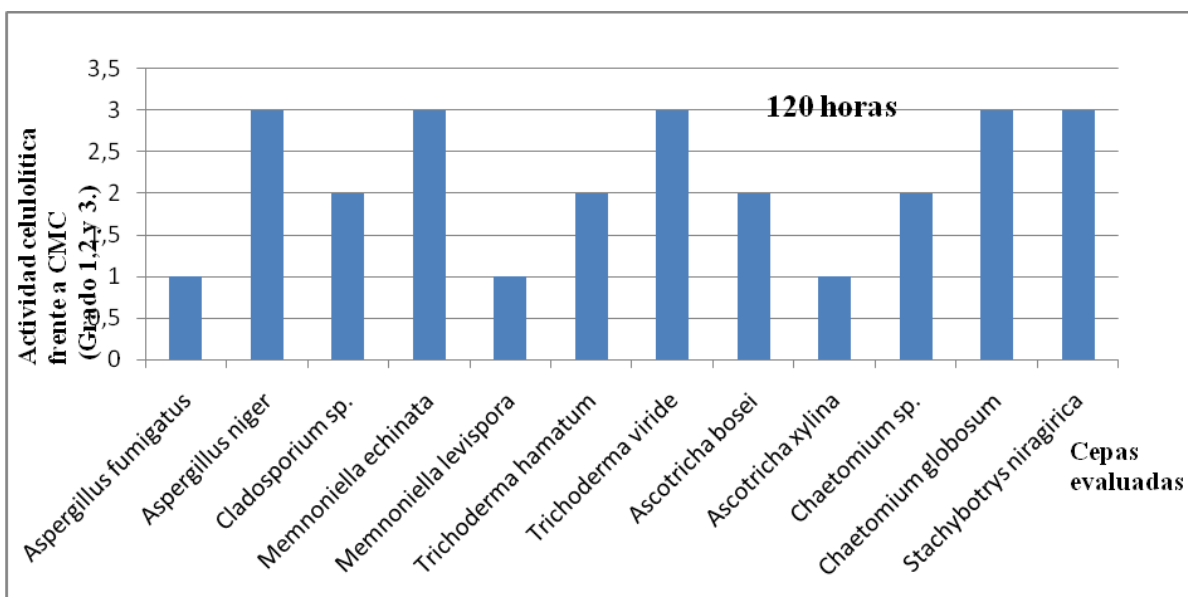
Todas las cepas se replicaron, conservaron

en petrolato líquido ligero (Godinez et al., 2010), e incorporaron a la Colección INIFAT;

lo cual permitió establecer un banco de trabajo de 10 tubos por cada una de las 25 cepas aisladas y 17 revitalizadas. En las colecciones de cultivos microbianos, los bancos de cepas, constituyen una herramienta clave en la preservación de las características genéticas de los microorganismos empleados como inoculantes y en procesos de fermentación para purificación de proteínas (enzimas) extracelulares. Se evita así que los caracteres de estos hongos se degeneren o muten con la transferencia indiscriminada de su micelio en el tiempo (Sardiñas *et al.*, 2008).

## 2. Determinación de la actividad celulolítica mediante ensayo carboximetilcelulasa (CMC) a partir de los aislados obtenidos.

Se evaluó la actividad celulolítica mediante el test de carboximetilcelulosa (CMC) de un primer grupo de 12 cepas de hongos anamórficos identificados como *Ascotricha xyli*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *Cladosporium sp.*, *Chaetomium globosum*, *Memnoniella echinata*, *M. levispora*, *Trichoderma viride* y *Stachybotrys niragirica*; aisladas a partir del material celulósico recolectado y adicionalmente se utilizaron tres cepas de la Colección INIFAT: *Ascotricha bosei*, *Chaetomium sp.* y *Trichoderma hamatum*; revitalizadas en medio Agar-celulosa.



**Figura 3.** Comportamiento de la actividad celulolítica de las especies evaluadas durante el primer ensayo, a las 120 horas. Cepas que clasifican como grado 1 (+), 2 (++) y 3 (+++).

Las que exhibieron zonas claras alrededor de sus colonias en medio Agar-CMC, a las 120 horas (Figura 3), observándose mayor actividad en el caso de las cepas correspondientes a: *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Memnoniella echinata*, *Stachybotrys niragirica* y *Trichoderma viride* (mayor diámetro del halo de degradación de CMC), durante el análisis cualitativo (Tabla 2).

En estos ensayos se siguió el sistema de clasificación de Borregos (2010); donde de acuerdo a la evidencia de actividad enzimática en el tiempo, en este caso 120 horas (cinco días), se clasifican como grado 1 (+), las cepas cuyo halo de crecimiento es pobre, como grado 2 (++) aquellas que el grosor del halo no sobrepasa los 10mm (moderado) y

grado 3 (+++) las que sobrepasa los 10 mm (crecimiento abundante).

Durante el segundo ensayo, se evaluaron las especies aisladas: *Ascotricha bosei*, *Aspergillus flavus*, *A. terreus*, *Chaetomium indicum*, *Dycima vesiculifera*, *Stachylidium bicolor*, *Memnoniella echinata*, *Trichoderma harzianum* y *Curvularia* sp. y las provenientes de la Colección: *Chaetomium globosum*, *Trichoderma viride* y *Trichoderma* sp. Todas exhibieron zonas claras alrededor de sus colonias en medio Agar-CMC, a las 120 horas (figura 4), observando una mayor actividad en las cepas *Ascotricha bosei* y *Trichoderma harzianum* (mayor diámetro del halo de degradación de CMC), durante el análisis cualitativo. (Tabla 3).

**Tabla 2.** Cepas de hongos celulolíticos evaluadas durante el primer ensayo de actividad con CMC. Origen (CA: Cepa Aislada y CC: Cepa de la Colección). Cepas que exhibieron un diámetro de crecimiento mayor (+++).

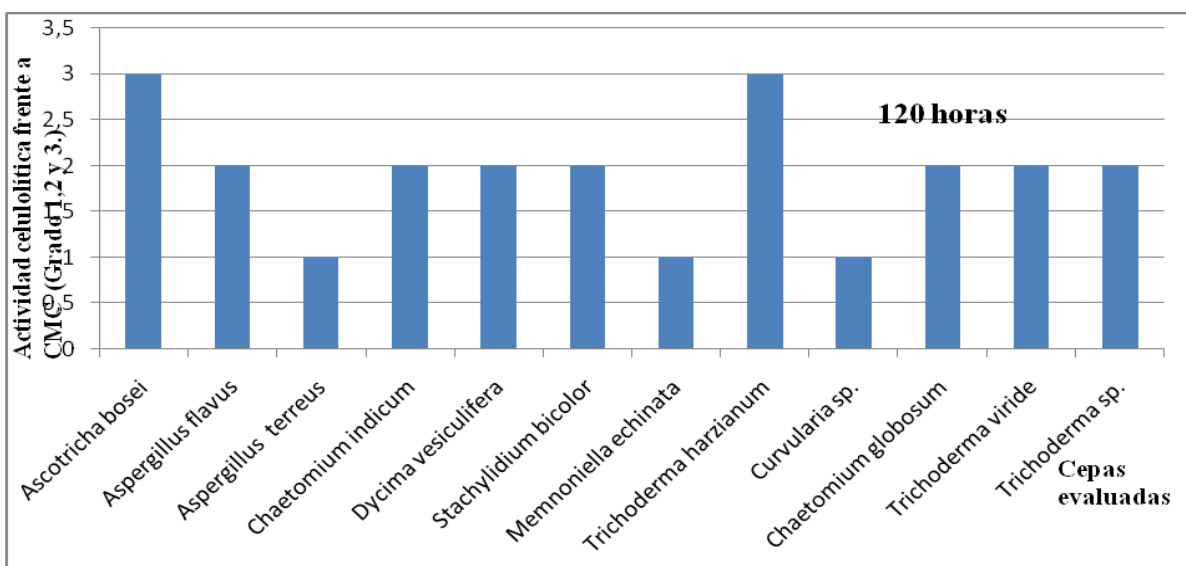
Cepas	Origen	Género y especie	Ensayo CMC
1	CA	<i>Ascotricha xyliina</i>	+
2	CA	<i>Aspergillus fumigatus</i>	+
3	CA	<b><i>Aspergillus niger</i></b>	+++
4	CA	<i>Cladosporium</i> sp.	++
5	CA	<b><i>Chaetomium globosum</i></b>	+++
6	CA	<b><i>Memnoniella echinata</i></b> (cartón)	+++
7	CA	<i>Memnoniella levispora</i>	++
8	CA	<b><i>Trichoderma viride</i></b>	+++
9	CA	<b><i>Stachybotrys niragirica</i></b>	+++
10	CC	<i>Ascotricha bosei</i>	++
11	CC	<i>Chaetomium</i> sp.	++
12	CC	<i>Trichoderma hamatum</i>	++

**Tabla 3.** Cepas de hongos celulolíticos evaluadas durante el segundo ensayo de actividad con CMC. (CA: Cepa Aislada y CC: Cepa de la Colección). Cepas que exhibieron un diámetro de crecimiento mayor (+++).

Cepas	Origen	Género y especie	Ensayo CMC
1	CA	<i>Ascotricha bosei</i>	+++
2	CA	<i>Aspergillus flavus</i>	++
3	CA	<i>Aspergillus terreus</i>	+
4	CA	<i>Chaetomium indicum</i>	++
5	CA	<i>Dycima vesiculifera</i>	++
6	CA	<i>Stachylidium bicolor</i>	++
7	CA	<i>Memnoniella echinata</i> (tela)	+
8	CA	<i>Trichoderma harzianum</i>	+++
9	CA	<i>Curvularia</i> sp.	+
10	CC	<i>Chaetomium globosum</i>	++
11	CC	<i>Trichoderma viride</i>	++
12	CC	<i>Trichoderma</i> sp.	++

Las últimas cepas a evaluar de los aislados, fueron: *Curvularia lunata*, *Trichoderma hamatum*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Stachybotrys* sp., *Trichoderma* sp. y *Chaetomium* sp. y de las revitalizadas de la colección: *Ascotricha* sp., *Chaetomium indicum*, *Dycima vesiculifera*, *Memnoniella*

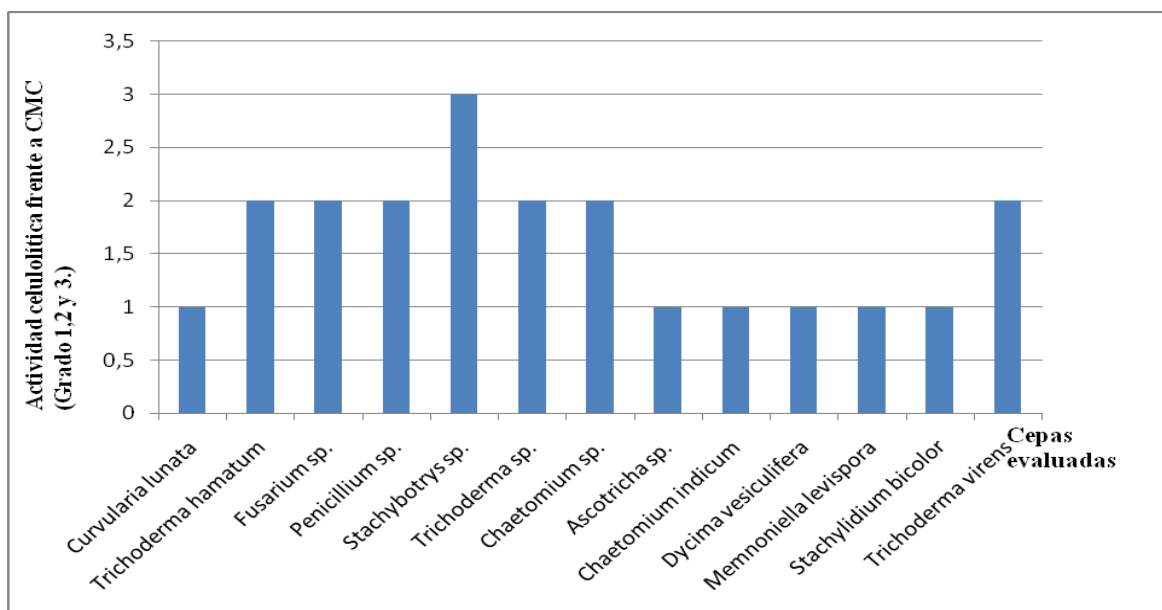
*levispora*, *Stachylidium bicolor* y *Trichoderma virens* (Figura 5); sin incluir las comestibles que se trataron por separado (Figura 6), observando una mayor actividad en la cepa de *Stachybotrys* sp. (Tabla 4), a las 120 horas.



**Figura 4.** Comportamiento de la actividad celulolítica de las especies evaluadas durante el segundo ensayo, a las 120 horas. Cepas que clasifican como grado 1(+), 2(++) y 3 (+++).

**Tabla 4.** Cepas de hongos celulolíticos evaluadas durante el tercer ensayo de actividad con CMC (CA: Cepa Aislada y CC: Cepa de la Colección). Cepas que exhibieron un diámetro de crecimiento mayor (+++).

Cepas	Origen	Género y especie	Ensayo CMC
1	CA	<i>Curvularia lunata</i>	+
2	CA	<i>Trichoderma hamatum</i>	++
3	CA	<i>Fusarium sp.</i>	++
4	CA	<i>Penicillium sp.</i>	++
5	CA	<b><i>Stachybotrys sp.</i></b>	+++
6	CA	<i>Trichoderma sp.</i>	++
7	CA	<i>Chaetomium sp.</i>	++
8	CC	<i>Ascotracha sp.</i>	++
9	CC	<i>Chaetomium indicum</i>	+
10	CC	<i>Dycima vesiculifera</i>	++
11	CC	<i>Memmoniella levispora</i>	++
12	CC	<i>Stachylidium bicolor</i>	+
13	CC	<i>Trichoderma virens</i>	++



**Figura 5.** Comportamiento de la actividad celulolítica de las especies evaluadas durante el tercer ensayo, a las 120 horas. Cepas que clasifican como grado 1 (+), 2 (++) y 3 (+++).

Como se puede apreciar las cepas evaluadas como categoría 3 (+++), pertenecen al grupo de cepas aisladas durante el desarrollo del proyecto: *Ascotracha bosei*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Memmoniella*

*echinata*, *Stachybotrys sp.*, *Stachybotrys niragirica* *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride*. Al establecer un estudio comparativo entre las especies *Ascotracha bosei*, *Chaetomium globosum*, *Stachybotrys*

*niragirica* y *Trichoderma viride* (+++) y sus homólogas de la Colección (CC), aquellas en estado de hibernación; hay una diferencia real en cuanto a su producción enzimática a iguales intervalos de tiempo frente al substrato a degradar y se quedan éstas últimas rezagadas mostrando actividad grado 2 (++) (Tabla 5), en estos casos. Sin embargo no ocurrió lo mismo para las cepas CA grado (++) , y sus correspondientes cepas CC, las que con excepción de *Chaetomium indicum* y *Stachylidium bicolor* que presentaron un menor crecimiento, el resto se mantuvo al mismo nivel que sus similares frescas, manifestando un comportamiento de grado 2 (++) .

La disminución de las actividades celulolíticas, en alguna de estas especies puede explicarse por una inactivación de las enzimas en períodos largos de tiempo, así como de la composición del medio de cultivo en que se encontraban crecidas antes de ser conservadas; pero sobre todo según Aranda y colaboradores en el 2008, depende de la heterogeneidad de las especies. La baja o nula actividad enzimática detectada en las cepas *Chaetomium indicum* y *Stachylidium bicolor* podría explicarse si se asume que las moléculas enzimáticas activas están incorporadas en nuevos productos formados, probablemente de naturaleza soluble polimérica con la consiguiente inmovilización (Heredia *et al.*, 2008).

**Tabla 5.** Comportamiento de las cepas homólogas evaluadas durante el proyecto.

Cepas aisladas durante el proyecto (CA)      Cepas conservadas en la Colección (CC)

<i>Ascotricha bosei</i> (+++)	—————>	<i>Ascotricha bosei</i> (++)
<i>Chaetomium</i> sp. (++)	—————>	<i>Chaetomium</i> sp. (++)
<i>Chaetomium globosum</i> (+++)	—————>	<i>Chaetomium globosum</i> (++)
<i>Chaetomium indicum</i> (++)	—————>	<i>Chaetomium indicum</i> (+)
<i>Dycima vesiculifera</i> (++)	—————>	<i>Dycima vesiculifera</i> (++)
<i>Memnoniella levispora</i> (++)	—————>	<i>Memnoniella levispora</i> (++)
<i>Stachylidium bicolor</i> (++)	—————>	<i>Stachylidium bicolor</i> (+)
<i>Trichoderma hamatum</i> (++)	—————>	<i>Trichoderma hamatum</i> (++)
<i>Trichoderma viride</i> (+++)	—————>	<i>Trichoderma viride</i> (++)
<i>Trichoderma</i> sp. (++)	—————>	<i>Trichoderma</i> sp. (++)

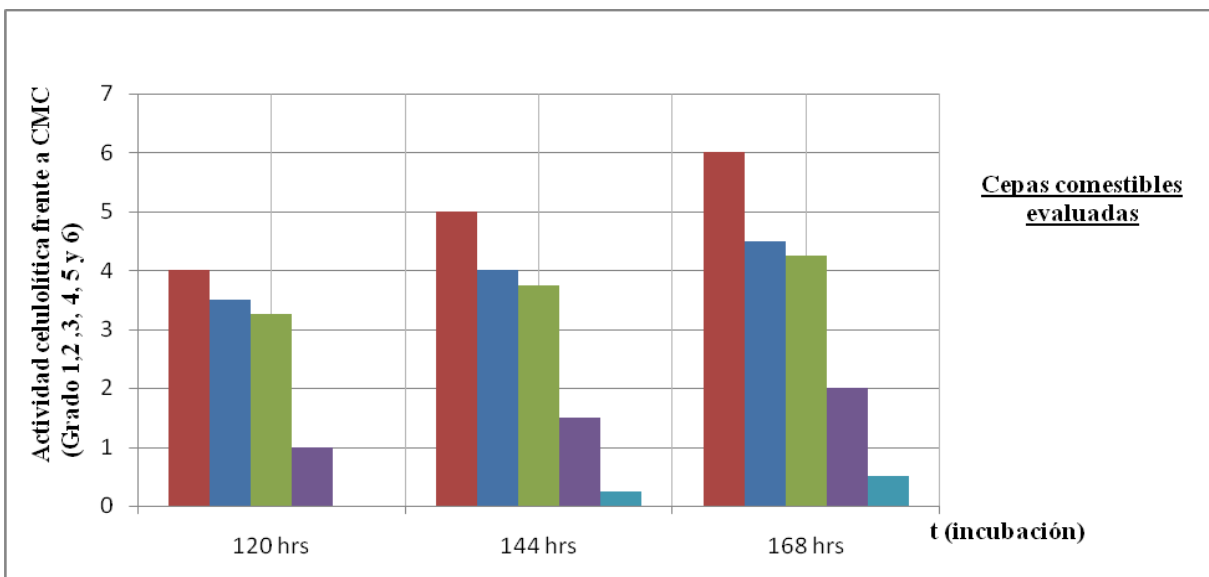
En el caso de las cinco cepas comestibles, éstas se evaluaron por separado pues presentan su peculiaridad con respecto al resto, ya que durante su ciclo de vida presentan una fase micelial (fase vegetativa) y otra en forma de basidioma ó cuerpo fructífero (fase reproductiva sexual) (Lin Shuqian,

2011), por lo que la cinética de producción de enzimas pudiera diferir del resto a las 120 horas, a pesar de su comprobada actividad celulolítica.

Teniendo en cuenta esto, el ensayo se extendió hasta los siete días como se muestra en la Figura 6.

Como se pudo observar, las especies de *Pleurotus*, mostraron una alta actividad degradadora con respecto al resto, prevaleciendo la cepa de *Pleurotus ostreatus*; sin embargo, no sucedió así con

*Volvariella volvacea* y *Clitocybe maxima*, las cuales a las 120 horas se encontraban minimizadas respecto a su reportada actividad, sin diferencias significativas respecto a la 168 horas.



**Figura 6.** Resultados de la actividad celulolítica frente a CMC de las cepas comestibles a los cinco, seis y siete días respectivamente. Cepas que clasifican como grado 1 (+), 2 (++), 3 (+++), 4-6 (crecimiento abundante cercano al límite de la placa).

Este comportamiento fue inesperado pues en el período en el que se realizó el estudio, eran cepas frescas provenientes de cultivos madres. Sin embargo pudiera estar relacionado con los rangos de temperatura y pH óptimos del crecimiento de las mismas ya que en el caso de la *Volvariella volvacea* según Lin Zhanxi y colaboradores en el 2012, necesita rangos de pH cercanos a 8 y una temperatura superior a los 35 °C. En cuanto a *Clitocybe maxima* la aparente inhibición de su metabolismo enzimático se revierte en la no activación del sistema enzimático del hongo pues el valor de temperatura ideal, para el

crecimiento micelial de esta especie oscila alrededor de los 15 °C (Lin Dongmei *et al.*, 2012).

### 3. Selección de las cepas más efectivas

Se evaluó cualitativamente la actividad de exoglucanasas producidas por estos microorganismos, mediante la degradación y la pérdida de peso del papel de filtro, como criterio adicional del ensayo anterior, para la selección de cepas. Además se les realizó el ensayo de producción de ácidos; para poder estimar el comportamiento del pH durante el estudio de fermentación.

La caracterización fisiológica de las cepas fúngicas evidenció que la mayoría de los hongos fueron capaces de crecer a expensas del papel de filtro como única fuente de carbono. Además se pudo comprobar en la Tabla 7, que con excepción de las cepas

comestibles *Volvariella volvacea* y *Clitocybe maxima*, el resto produjeron ácidos, pues mostraron una marcada disminución del pH del medio, durante el ensayo de producción de ácidos (pH= 7,0).

**Tabla 7.** Actividad celulolítica cualitativa, producción de pigmentos y ácidos por parte de los hongos aislados y revitalizados.

Cepa	Crecimiento sobre papel de filtro	Crecimiento sobre CMC cristalina	Producción de pigmentos	Producción de ácidos (pH)
<i>Ascotricha xyлина</i> (CA)	++	+	+	6.1
<b><i>Ascotricha bosei</i> (CA)</b>	+++	+++	+	5.4
<i>Ascotricha bosei</i> (CC)	+++	++	+	5.5
<i>Ascotricha</i> sp. (CC)	+++	++	+	5.7
<b><i>Aspergillus niger</i> (CA)</b>	+++	+++	+	4,5
<i>Aspergillus flavus</i> (CA)	++	++	+	5,0
<i>Aspergillus fumigatus</i> (CA)	++	+	-	6,1
<i>Aspergillus terreus</i> (CA)	++	+	+	6,2
<b><i>Chaetomium globosum</i> (CA)</b>	+++	+++	+	5,5
<i>Chaetomium globosum</i> (CC)	+++	++	+	5,7
<i>Chaetomium indicum</i> (CA)	++	++	+	5,6
<i>Chaetomium indicum</i> (CC)	++	+	+	5,5
<i>Chaetomium</i> sp. (CA)	+++	++	-	5,8
<i>Chaetomium</i> sp. (CC)	++	++	+	5,2
<b><i>Memnoniella echinata</i> (CA)</b> (cartón)	+++	+++	+	4,9
<i>Memnoniella echinata</i> (CA) (tela)	++	+	+	4,7
<i>Memnoniella levispora</i> (CA)	+++	++	+	4,6
<i>Memnoniella levispora</i> (CC)	+++	++	+	4,5
<b><i>Stachybotrys</i> sp. (CA)</b>	+++	+++	+	5,3
<b><i>Stachybotrys niragirica</i> (CA)</b>	+++	+++	+	5,2
<i>Trichoderma viride</i> (CA)	+++	+++	+	5,5
<i>Trichoderma viride</i> (CC)	+++	++	+	5,6

<i>Trichoderma harzianum</i> (CA)	+++	+++	+	5,7
<i>Trichoderma hamatum</i> (CA)	++	++	+	5,8
<i>Trichoderma hamatum</i> (CC)	++	++	+	5,3
<i>Trichoderma</i> sp. (CA)	++	++	-	5,2
<i>Trichoderma</i> sp. (CC)	++	++	+	4,9
<i>Trichoderma virens</i> (CC)	++	++	+	4,8
<i>Cladosporium</i> sp. (CA)	++	++	+	3,6
<i>Dycima vesiculifera</i> (CA)	++	++	+	5,2
<i>Dycima vesiculifera</i> (CC)	++	++	+	5,4
<i>Stachylidium bicolor</i> (CA)	++	++	+	4,7
<i>Stachylidium bicolor</i> (CC)	++	+	+	4,8
<i>Curvularia</i> sp. (CA)	+	+	+	6,5
<i>Curvularia lunata</i> (CA)	+	+	+	6,7
<i>Fusarium</i> sp.(CA)	++	++	+	5,7
<b><i>Penicillium</i> sp. (CA)</b>	+++	++	+	<b>6,0</b>
<b><i>Pleurotus ostreatus</i> (CC)</b>	+++	+++	-	6,8
<i>Pleurotus columbinus</i> (CC)	++	+++	-	6,9
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (CC)	++	+++	+	6,7
<i>Volvariella volvacea</i> (CC)	++	+	-	7,5
<i>Clitocybe maxima</i> (CC)	++	±	-	7,0

(+++): Indica crecimiento abundante, (++): Indica crecimiento moderado, (+): Indica crecimiento pobre también es indicativo de la presencia de pigmentos, ±: Indica crecimiento o producción de pigmento muy pobre, -: Indica NO crecimiento y NO producción de pigmentos.

La mayoría excretaron diferentes pigmentos sobre el papel, abarcando una amplia gama de colores desde el amarillo hasta el carmelita intenso pasando por el naranja, tonos rojizos y negros, no observándose así para *Aspergillus fumigatus*, *Chaetomium* sp., *Trichoderma* sp., *Pleurotus ostreatus*, *P. columbinus*, *Volvariella volvacea* y *Clitocybe maxima*.

En el ensayo de pérdida peso (Tabla 8 y Figura 7), se observó que las 10 cepas de

mayor actividad fueron ***Memnoniella echinata* (CA) (cartón)**, *Penicillium* sp. (CA), ***Aspergillus niger* (CA)**, ***Stachybotrys niragirica* (CA)**, ***Trichoderma viride* (CA)**, ***Pleurotus ostreatus* (CC)**, *Trichoderma viride* (CC), ***Stachybotrys* sp. (CA)**, *Pleurotus sajor-caju* (CC) y *Pleurotus columbinus* (CC), con un 30,4; 30,4; 29,0; 28,2; 28,0; 27,6; 27,4; 26,4; 26,4 y 26,0 % de degradación del papel respectivamente, con respecto al peso total inicial de la tira (50 mg).

**Tabla 8.** Valores obtenidos durante el ensayo de pérdida de peso de Papel de filtro para cada una de las 42 cepas estudiadas, a las 120 horas (cinco días), de incubación. Tiempo de Incubación (0 horas)- Peso inicial del Papel de filtro (50,0 mg).

No.	Cepas evaluadas	Peso final (mg)
1	<i>Ascotricha xyлина</i> (CA)	45.8
2	<i>Ascotricha bosei</i> (CA)	40.0
3	<i>Ascotricha bosei</i> (CC)	44.0
4	<i>Ascotricha</i> sp. (CC)	46.5
<b>5</b>	<b><i>Aspergillus niger</i> (CA)</b>	<b>35.5</b>
6	<i>Aspergillus flavus</i> (CA)	39.8
7	<i>Aspergillus fumigatus</i> (CA)	40.0
8	<i>Aspergillus terreus</i> (CA)	42.0
9	<i>Chaetomium globosum</i> (CA)	39.7
10	<i>Chaetomium globosum</i> (CC)	42.0
11	<i>Chaetomium indicum</i> (CA)	38.0
12	<i>Chaetomium indicum</i> (CC)	39.5
13	<i>Chaetomium</i> sp. (CA)	42.0
14	<i>Chaetomium</i> sp. (CC)	40.6
<b>15</b>	<b><i>Memnoniella echinata</i> (CA) (cartón)</b>	<b>34.8</b>
16	<i>Memnoniella echinata</i> (CA) (tela)	38.5
17	<i>Memnoniella levispora</i> (CA)	39.0
18	<i>Memnoniella levispora</i> (CC)	39.0
<b>19</b>	<b><i>Stachybotrys</i> sp. (CA)</b>	<b>36.8</b>
<b>20</b>	<b><i>Stachybotrys niragirica</i> (CA)</b>	<b>35.9</b>
<b>21</b>	<b><i>Trichoderma viride</i> (CA)</b>	<b>36.0</b>
<b>22</b>	<b><i>Trichoderma viride</i> (CC)</b>	<b>36.3</b>
23	<i>Trichoderma harzianum</i> (CA)	39.8
24	<i>Trichoderma hamatum</i> (CA)	42.0
25	<i>Trichoderma hamatum</i> (CC)	44.4
26	<i>Trichoderma</i> sp. (CA)	41.1
27	<i>Trichoderma</i> sp. (CC)	42.5
28	<i>Trichoderma virens</i> (CC)	45.3
29	<i>Cladosporium</i> sp. (CA)	44.0
30	<i>Dycima vesiculifera</i> (CA)	45.5
31	<i>Dycima vesiculifera</i> (CC)	45.0

32	<i>Stachylidium bicolor</i> (CA)	44.8
33	<i>Stachylidium bicolor</i> (CC)	45.3
34	<i>Curvularia</i> sp. (CA)	46.5
35	<i>Curvularia lunata</i> (CA)	45.8
36	<i>Fusarium</i> sp. (CA)	44.0
<b>37</b>	<b><i>Penicillium</i> sp. (CA)</b>	<b>34.8</b>
<b>38</b>	<b><i>Pleurotus ostreatus</i> (CC)</b>	<b>36.2</b>
<b>39</b>	<b><i>Pleurotus columbinus</i> (CC)</b>	<b>37.0</b>
<b>40</b>	<b><i>Pleurotus sajor-caju</i> (CC)</b>	<b>36.8</b>
41	<i>Volvariellavolvacea</i> (CC)	39.5
42	<i>Clitocybe maxima</i> (CC)	40.2

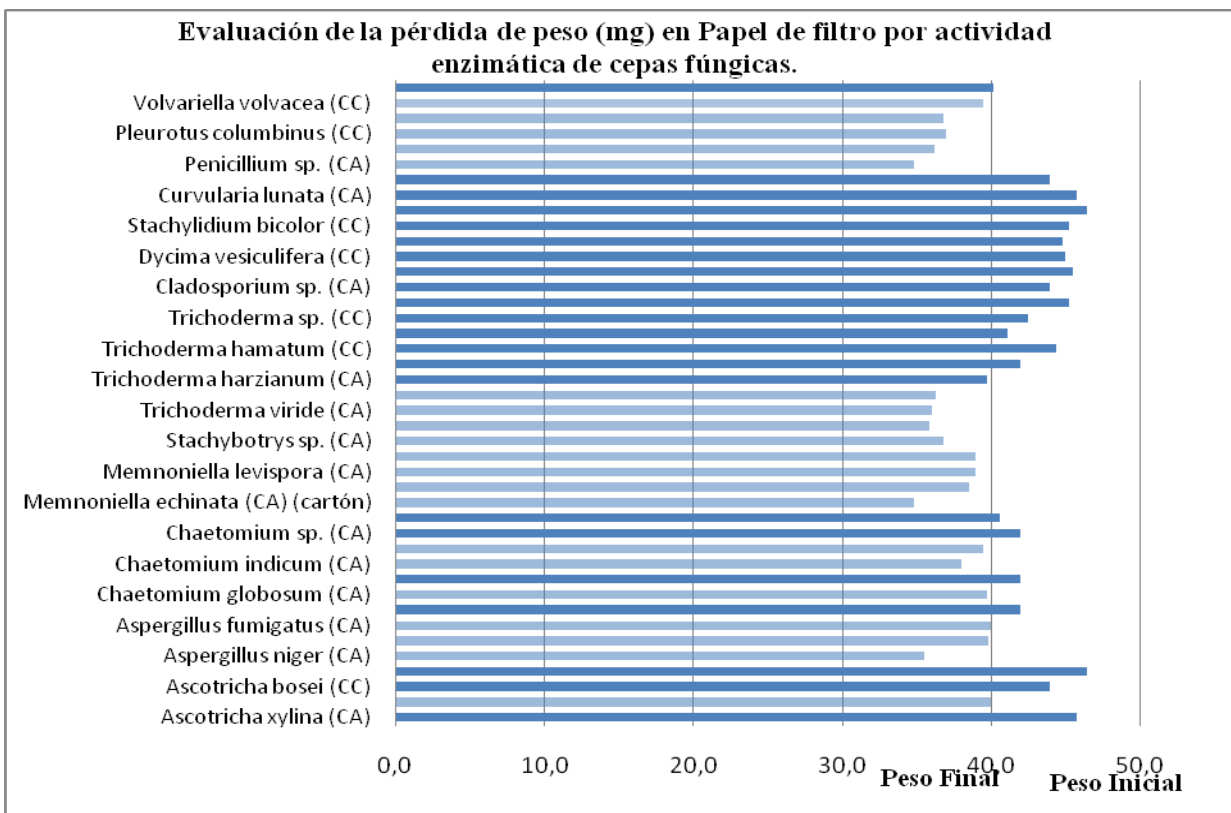
Las especies que fueron capaces de crecer aceleradamente en CMC: *Ascotricha bousei* (CA), *Aspergillus niger* (CA), *Chaetomium globosum* (CA), *Memnoniella echinata* (CA), *Stachybotrys* sp. (CA), *Stachybotrys niragirica* (CA), *Trichoderma harzianum* (CA), *Trichoderma viride* (CA) y *Pleurotus ostreatus* (CC), mostraron elevada actividad celulolítica sobre el papel de filtro, al disminuir en un 20,0; 29,0; 20,6; 30,4; 26,4; 28,2; 20,4; 28,0 y 27,6 % respectivamente, el peso inicial de la tira de papel; logrando degradar cantidades suficientes de celulosa, presentes en el mismo.

Este resultado se corresponde con lo esperado, ya que el papel de filtro es una fuente de celulosa de más fácil asimilación que la cristalina presente en la carboximetilcelulosa (CMC), pues las moléculas de celulosa presentes en la naturaleza no son puramente cristalinas, no poseen igual grado de polimerización ya que muestran sitios amorfos, los cuales se

incrementan a lo largo de las cadenas durante el proceso de manufactura del papel, con los cambios físico-químicos a los que queda expuesta la estructura de la celulosa que lo compone (Cappitelli y Sorlini, 2010); quedando de ésta forma más expuesto al ataque enzimático de cepas potencialmente activas.

### CONCLUSIONES

- Se lograron aislar e identificar 25 cepas de hongos celulolíticos.
- Se revitalizaron 17 cepas de la Colección de Hongos del INIFAT (853 de la Federación Mundial de Cultivos Microbianos (WFCC)).
- Se enriqueció la Colección de Hongos del INIFAT, con la incorporación de 25 nuevas cepas de hongos celulolíticos.
- Se estableció un banco de 42 cepas celulolíticas para las futuras investigaciones y SCT del INIFAT.



**Figura 7.** Evaluación del ensayo de pérdida de peso para las 42 cepas fúngicas estudiadas.

- Se contribuyó a la conservación de 42 especies, pertenecientes a las divisiones Deuteromicotina, Ascomicotina y Basidiomicotina del reino Fungi.
- Se seleccionaron nueve cepas de alto potencial degradativo en el ensayo de CMC y exoglucanasas: *Ascotricha bosei*, *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Memmoniella echinata*, *Stachybotrys sp.*,
- *Stachybotrys niragirica*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* y *Pleurotus ostreatus*.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agamez, E. Y.; Ramos, R.; Zapata, I.; Oviedo, L.E. y Barrera, J.L. (2008): Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma sp.* Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. X, No. 2, 23-34.
- Aranda, E.; Sampedro, I.; Arriada, C.; Díaz, R.; García, M; Ocampo, J.A. y García-Romera, I. (2008): Transformación de los residuos procedentes del olivo mediante cepas fúngicas. Cap.15.pp.293-312. Tópicos sobre diversidad ecológica y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica. ISBN. 970-709-104-5.

- Asero J. y M. Suquilanda (2007): Evaluación de *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp. en el control de "oidio" (*Sphaeroteca pannosa*) en rosas (*Rosa* sp.) variedad AALSMER GOLD. ASCÁZUBI, PICHINCHA, ECUADOR.
- Azaz, A. y O. Pekel (2002): Comparison of soil Fungi Flora in Burnt and Unburnt Forest Soils in the Vicinity of Kargıcak (Alanya, Turkey). *Turk. J. Bot.* 26: 409-416.
- Bogomolova, E.V.; Kirtsideli, I. (2009): Airborne fungi in four stations of the St. Petersburg underground railway system. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 63: 156-160.
- Borrego, S. (2005): El edificio del Archivo: su influencia en la contaminación microbiana ambiental, en el biodeterioro y la salud del personal. IV Coloquio Iberoamericano del Papiro a la Realidad Virtual, Casa de las Américas. La Habana, Cuba.
- Borrego, S.; Pons, V. y Perdomo, I. (2008): La contaminación microbiana del aire en dos depósitos del Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 39, 63-69.
- Borrego, S.F.; Perdomo, I.; de la Paz, J.; Gómez de Saravia, S.G. y Guiamet, P.S. (2011): Relevamiento microbiológico del aire y de materiales almacenados en el Archivo Histórico del Museo de La Plata, Argentina y en el Archivo Nacional de la República de Cuba. *Revista del Museo de La Plata.* ISSN: 0372-4611. Sección Botánica, 18 (119): 1-18.
- Cai, J.; Chapman, S. J.; Buswell, J. A. & Chang, S.H. (1999): Production and Distribution of Endoglucanase, Cellobiohydrolase and  $\beta$ -Glucosidase Components of the Cellulolytic System of *Volvariella volvacea*, the Edible Straw Mushroom. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.* Vol. 65, No. 2, p. 553-559.
- Cappitelli, F. and Sorlini, C. (2010): Paper and Manuscripts. Cultural Heritage Microbiology. *Fundamental Studies in Conservation Science.* ISBN 978-1-55581-476-2. Section II. Chapter 2: 45-59.
- Ellis, M. (1976): *More Dematiaceous Hyphomycetes*, 507 pg. Kew, Ferry Lane, England.
- Godinez, S. y Pérez, M. (2010): Métodos alternativos para la preservación de hongos filamentosos. I Taller Científico de Laboratorios LIORAD. IV Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y Otros Materiales Biológicos.
- Gote, M. (2004): Isolation, purification and characterization of thermostable  $\alpha$ -galactosidase from *Bacillus stearothersophilus* (NCIM-5146). PHD Thesis, University of Pune Deptt of Microbiology, Division of Biochemical Science, NPL, Pune, India.
- Heredia, G.; Arias, R.M.; Becerra, C.I.(2008): Análisis del conocimiento de los hongos anamórfos saprobios de México. Cap. 4, pp. 83-101. Tópicos sobre diversidad ecológica y uso de hongos microscópicos en Iberoamérica. ISBN. 970-709-104-5.

- Khalid, M.; Yang, W.; Kishwar, N.; Kajput, Z. and Arijo, A. (2006): Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 7(6); 459-466.
- Kolwzan, B.; Adamiak, W.; Graba, K. & Pawelczyk, A. (2006): *Introduction to Environmental Microbiology*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wroclawskiej Wroclaw.
- Lin Dongmei (2012): The Current Status of Mushrooms Industry Development in teh world. Reference Material for China-Aid Training Programs. pp. 9-21.
- Lin Shuqian (2011): *Fermentation Engineering and Products of Medicinal Fungi*. Teaching Material for International Training Course on Edible Mushroom Technology. Chapter 2. Section1, pp.138-142.
- Lin Zhanxi (2012): *Volvariella volvacea* Cultivation with JUNCAO. Reference Material for China-Aid Training Programs. Chapter 8, pp. 154-168.
- Maheshwari, R.; Bharadwaj, G. & Bhat, M.K. (2000): Termophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 461-488.
- Martínez, O.; Valenzuela, E. y Godoy, R. (2005): Hongos aislados desde suelos de bosques de *Araucaria-Nothofagus* después de un incendio en el Parque Nacional Tolhuaca. *Bol. Micol.* 20 35-39.
- Martínez, O. y Valenzuela, E. (2008): Poblaciones Fúngicas del suelo de un bosque de *Araucaria –Nothofagus* del Parque de Tolhuaca después de 2 años de un incendio. Tópicos sobre diversidad, ecología y usos de los hongos microscópicos en Iberoamérica, Cap. 9, 175-193 pp.
- Sardiñas, C.A.; Iglesias, E.; Morales, T. y León, G. (2008): Colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. I Taller Científico de Laboratorios LIORAD. IV Taller de Colecciones de Cultivos Microbianos y Otros Materiales Biológicos.
- Sharma, G. (1981): Effect of fire on soil microorganisms in a Meghalaya Pine Forest. *Folia Microbiol. (Praha)* 26: 321-327.
- Yang, C.S. and Heinsohn, P.A. (2007): *Sampling and Analysis of Indoor microorganisms*, 1st ed. Wiley-Interscience, New York, NY.

Fecha recibido: 18 de diciembre de 2013.

Fecha aceptado: 27 de abril de 2014.