

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE ACTINOMICETO CELULOLÍTICO, TERMÓFILO MODERADO Y ACIDÓFILO

Isolation and Characterization of a Moderate Thermophilic and Acidophilic Cellulolytic Actinomycete Strain

Judith Piñero Bonilla¹ y Nilo Rivas²

¹Ingeniería de Alimentos, Núcleo Canoabo, Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez", Edo. Carabobo, Venezuela. E-mail: unescanoabo@hotmail.com. Fax: (0249)-7934795-7971184. ²Postgrado en Biotecnología Alimentaria, Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez", Valencia, Edo. Carabobo, Venezuela. E-mail: nrivar@cantv.net

RESUMEN

Se aisló un actinomiceto celulolítico, Gram positivo, aeróbico, termófilo moderado y acidófilo a partir de estiércol de pollo. En agar celulosa, las colonias alcanzaron un diámetro de 4,0-4,5 mm con micelio aéreo de color crema y de textura cremosa. El microorganismo creció óptimamente a 45°C y pH 5,0, con mayor producción de azúcares reductores a 45°C y pH entre 5,0 y 7,0. La cepa era ácido-resistente, hidrolizó caseína, hipoxantina, xantina, urea y tirosina, licuó gelatina, redujo los nitratos y fue sensible a la lisozima. Este organismo creció en sustratos celulósicos como la carboximetilcelulosa, avicel y polvo de celulosa. El actinomiceto fue identificado como *Nocardia* spp; la cepa tipo se depositó como EP3-MC3 en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM1314) del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, Caracas. La capacidad de esta cepa para utilizar sustratos celulósicos bajo condiciones térmicas moderadas y aeróbicas, sugiere la existencia de propiedades anabólicas potenciales para el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos en los procesos biotecnológicos.

Palabras clave: Actinomiceto celulolítico, *Nocardia*, aislamiento, estiércol de pollo.

ABSTRACT

A Gram positive, aerobic, moderate thermophilic, acidophilic, cellulolytic actinomycete was isolated from poultry manure. The colonies produced on cellulose agar were 4.0-4.5 mm in

diameter, with yellowish-white colored aerial mycelia and a creamy texture. The microorganism grew optimally at 45°C and pH 5.0; with optimal production of reductive sugars at 45°C and pH 5.0-7.0. The strain was acid-resistant, it hydrolyzed casein, hypoxanthine, xanthine, urea and tyrosine, and liquefied gelatin, reduced nitrates and was not lysozyme-resistant. This organism grew on cellulosic substrates like carboxymethyl cellulose, avicel and cellulose powder. The actinomycete was identified as *Nocardia* spp., the strain type has been deposited in the "Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos" (CVCM1314) at the "Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, as strain EP3-MC3. The ability of this strain to utilize cellulosic substrates under moderate thermic and aerobic conditions suggests the existence of potential anabolic features that can be used in lignocellulosic wastes in biotechnological processes.

Key words: Cellulolytic actinomycete, *Nocardia*, isolation, poultry manure.

INTRODUCCIÓN

La celulosa es un polisacárido muy abundante en la naturaleza que en combinación con la hemicelulosa y la lignina constituye la fracción lignocelulósica la cual se genera en grandes cantidades durante las actividades agrícolas, madereras y del procesamiento industrial y artesanal de los alimentos. Estos residuos han sido objeto de muchas investigaciones conducentes a su utilización como sustratos en los procesos fermentativos, principalmente para la producción de combustibles y alimentos alternativos que aminoren los problemas deri-

vados de la crisis energética [1, 6, 10, 36], la escasez de proteínas [16, 17, 26] y la contaminación ambiental [2].

Los procesos fermentativos a que son sometidos estos residuos, requieren algunas veces de condiciones térmicas y pH ácidos como en la producción etanólica [23]. Además, el empleo de microorganismos celulolíticos termófilos tiene varias ventajas sobre los mesófilos destacándose el hecho de tener tasas más altas de digestión de la celulosa y la lignina [3] y producir usualmente enzimas más activas y termoestables [34]. La mayor parte de los microorganismos celulolíticos aislados pertenecen al género *Clostridium* [4, 15, 16, 18, 19, 25], y a los actinomicetos como *Thermomonospora curvata* [33] y *Microbispora bispora* [38] pero ninguno de éstos son acidófilos, teniendo un pH óptimo para el crecimiento y producción de celulasas igual o mayor a 7,0, por lo que no pueden crecer bajo condiciones ácidas (pH 3,0-5,0), prevalecientes en determinadas fermentaciones [23]. Entre los hongos se han encontrado especies acidófilas pero no termófilas [41], sin embargo, *Aspergillus fumigatus* puede crecer y producir considerables cantidades de celulasas en cultivos sumergidos a 45°C y pH 4,6 [31], *Sporotrichum thermophile* crece en condiciones óptimas de 50°C y pH 5,6 5. Mohagheghi y col. [23] aislaron una bacteria termófila y acidófila, designada como *Acidothermus cellulolyticus*, a partir de aguas termales, la cual alcanza el crecimiento óptimo a 55°C y pH 5,0.

Entre los actinomicetos celulolíticos, las especies termófilas del género *Thermomonospora* han recibido mucha atención, sin embargo, las especies mesófilas del género *Streptomyces* también han sido muy estudiadas debido a su mayor abundancia en el suelo y a la importancia que tienen por ser las principales productoras de antibióticos [29, 35]. La mayor parte de las investigaciones en estos géneros a partir de los años ochenta, se ha basado en el estudio de las enzimas celulolíticas y sus mecanismos de acción, además, han sido objeto de manipulación genética [29, 40]. El género *No-cardia* no es muy abundante en la naturaleza (42); se han aislado y estudiado pocas especies lignocelulolíticas siendo todas mesófilas y neutrófilas, sin embargo, algunas de las especies estudiadas tienen la propiedad de degradar la lignina, compuesto altamente resistente a la descomposición microbiana [9, 37]. Algunas especies de este género son productoras de ciertos antibióticos importantes [35] por lo que la búsqueda y estudio de nuevos organismos puede ampliar el espectro de fuentes de estos y otros compuestos bioactivos.

Dada las ventajas de los organismos termófilos y acidófilos, la importancia de los residuos celulósicos y la disponibilidad de un potencial microbiano inagotable en el ambiente, el objetivo de esta investigación estuvo dirigido a la búsqueda de nuevos microorganismos celulolíticos especialmente aquellos que puedan ser activos a temperaturas superiores a los 40°C y a pH inferiores a 7,0, empleando métodos convencionales de aislamiento y caracterización microbiológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

El medio basal salino (MBS) utilizado en todos los medios de cultivo fue el mismo empleado por Mohagheghi y col. [23] el cual contenía por litro de agua destilada: 0,5 g extracto de levadura, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g NH_4Cl , 0,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. En los medios líquidos de enriquecimiento y crecimiento la fuente de carbono consistía en una tira de papel de filtro CFS no. 2 de 1,0x7,0 cm mientras que en los medios sólidos para el aislamiento y conservación se empleó 10 g/L de polvo de celulosa Whatman CF1 (W. & Balston Ltd.) y 25 g/L de agar extra puro (Himedia Laboratories Ltd.). El medio de enriquecimiento se suplementó además con 0,5 g D-celobiosa (Sigma Chemicals, S. A.) y el pH se ajustó a 5,2.

Los medios de fermentación utilizados para determinar las condiciones óptimas de pH y temperatura para el crecimiento microbiano y producción de azúcares reductores de la cepa aislada tenían la misma composición que el medio de enriquecimiento eliminando la D-celobiosa. Se preparó un medio precultivo (MPC) con igual composición a pH 6,0 con la finalidad de propagar la cepa y obtener la biomasa suficiente para inocular los medios destinados a los ensayos de pH y temperatura. Para la determinación del aprovechamiento de otras fuentes de celulosa, se utilizó el MBS sustituyendo el papel de filtro por carboximetilcelulosa (CMC) microgranular hinchada CM-52 Whatman (Whatman Internacional Ltd.) y avicel una forma de celulosa microcristalina (Marcherey Nagel).

Todos los medios de cultivo se esterilizaron a 120°C, 15 lbf/pulg² durante 15 minutos. Las sales para la preparación de los medios eran de grado analítico y procedían de Riedel-de Hæn, el extracto de levadura de Himedia Laboratories Ltd., la D-Celobiosa de Sigma Chemical, S.A y el papel de filtro CFS no. 2 de Advantec MFS, Inc.

Aislamiento de cepas celulolíticas

Los cultivos de enriquecimiento se iniciaron inoculando 10 mL de MBS y la tira de papel de filtro, contenidos en tubos de ensayo de 20x150 mm, con una pequeña cantidad de estiércol de pollo. Estos medios de enriquecimiento se incubaron a temperatura ambiente (26-30°C) hasta observar degradación del papel de filtro. Los medios donde se observó la degradación fueron pasteurizados a 90°C durante 10 minutos. Alícuotas de los medios pasteurizados fueron transferidos a medios de enriquecimiento fresco incubando bajo las mismas condiciones hasta observar nuevamente degradación del papel de filtro. Aquellos cultivos que produjeron degradación se seleccionaron para el aislamiento en medios sólidos, mediante estría, las colonias que produjeron halos claros a su alrededor producto de la degradación de la celulosa, fueron aisladas y transferidas con el asa a un medio de enriquecimiento. Esta técnica de enriqueci-

miento y aislamiento se repitió hasta obtener cepas celulolíticas puras que degradaran el sustrato en el menor tiempo posible y mantuvieran su viabilidad durante los ensayos.

Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas fueron realizadas mediante procedimientos estándar descritos en el Manual de Laboratorio para el Estudio de los Actinomicetales Patógenos 30 en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) del Instituto de Biología Experimental en la Universidad Central de Venezuela y en el laboratorio de Investigación de Actinomicetos Patógenos Humanos y del Suelo que dirige el Dr. José Antonio Serrano, del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Estas pruebas consistieron en las tinciones de Gram y Kinjoun, hidrólisis de la tirosina, hipoxantina, xantina, caseína, urea y esculina, resistencia a la lisozima, licuefacción de la gelatina y reducción de nitratos.

Condiciones de crecimiento

Los MPC se inocularon con la cepa aislada, conservada en placas de agar-celulosa a 4°C, incubando a 30°C durante 72 h para el ensayo de temperatura y a la temperatura óptima previamente obtenida para el ensayo de pH. Tanto para el ensayo de temperatura como para el de pH, los MPC se ajustaron a pH 6,0.

Determinación de la temperatura óptima: SE prepararon varios medios de fermentación a los cuales se les ajustó el pH a 6,0, se inoculó cada uno con 0,1 mL de las células fragmentadas suspendidas en el MPC y se incubaron a 30, 35, 40, 45, 50 y 60°C.

Determinación del pH óptimo: A otra serie de medios de fermentación se les ajustó el pH a 3,42; 4,15; 5,06; 6,07; 7,06 y 8,06, inoculándolos también cada uno con 0,1 mL de MPC e incubándolos a la temperatura óptima de crecimiento obtenida en el ensayo anterior.

Después de siete días de incubación, los caldos de fermentación de los medios sometidos a las diferentes condiciones de temperatura y pH, se centrifugaron a 1500 rpm durante 20 minutos cuantificando la biomasa con base a peso seco total siguiendo la metodología descrita por Ison y Matthew 14 y almacenando el sobrenadante a -10°C para su análisis posterior.

En todos los ensayos realizados para el enriquecimiento y crecimiento de la cepa aislada, se incubaron simultáneamente controles no inoculados pero sometidos a las mismas condiciones con la finalidad de descartar la degradación de la fuente de celulosa por el efecto combinado de la temperatura, pH y/o nutrientes del medio.

Determinaciones analíticas

Los azúcares reductores en el sobrenadante se determinaron empleando el método del ácido dinitrosalicílico 22 utilizando la glucosa como estándar.

Análisis estadísticos

Los valores de biomasa y azúcares reductores se presentan como promedios de tres repeticiones por tratamiento de temperatura y pH, respectivamente. Se hizo un análisis de varianza de dos colas, aleatorio, cuando se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, se empleó la prueba de comparación de medias de Tuckey con una probabilidad mayor o igual al 95% ($\alpha=0,05$) [24].

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de los microorganismos celulolíticos

En el análisis macroscópico de los medios de aislamiento se observó el desarrollo de colonias que alcanzaron entre 4,0 a 4,5 mm de diámetro, presentando un micelio aéreo de coloración marrón claro, de textura cremosa. El análisis de microscopía óptica mostró organismos Gram positivos que presentaban hifas delgadas con ramificaciones fragmentables en cocos y bacilos. El perfil bioquímico de la cepa aislada indicó que era ácido-resistente, capaz de hidrolizar la hipoxantina, tirosina, caseína, xantina y urea, licuó la gelatina y redujo los nitratos. No hidrolizó la esculina y fue sensible a la lisozima. Estas características permitieron concluir que se trataba de un actinomiceto del género *Nocardia*. La cepa tipo fue depositada como EP3-MC3 en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM1314) del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela.

La ausencia de degradación de la fuente de celulosa en los controles en comparación con los medios inoculados sugirió que la descomposición de la misma fue producto de la actividad microbiana de esta cepa. El crecimiento en los medios de enriquecimiento con un micelio aéreo pigmentado sobre la superficie de los mismos sugiere que requiere oxígeno para crecer pero también se observó el desarrollo de biomasa con coloración blanca en el fondo de los tubos sobre la tira de papel de filtro. Los análisis mediante microscopía óptica mostraron la adsorción y envolvimiento del micelio sobre las fibras de celulosa de la tira de papel de filtro.

Condiciones óptimas de crecimiento

Se obtuvo la mayor cantidad de biomasa de la cepa EP3-MC3 a las temperaturas de incubación de 40 y 45°C, no existiendo diferencias significativas entre ellas, mientras que la mayor producción de azúcares reductores se alcanzó a 45°C. La biomasa fue significativamente mayor en el medio de cultivo ajustado a pH 5,06 mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de azúcares reductores a los pH 5,06; 6,07 y 7,06 (FIG. 1).

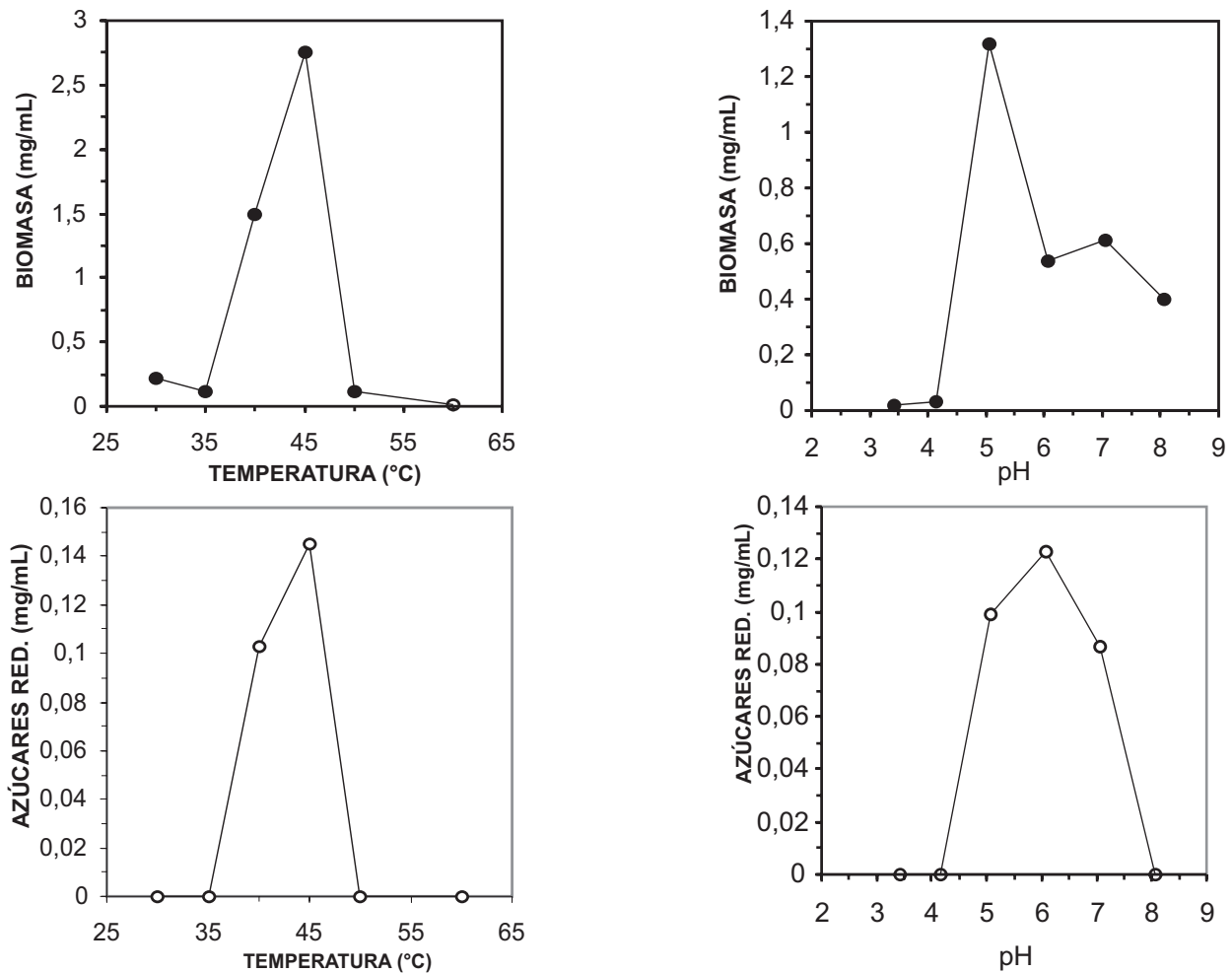


FIGURA 1. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA (●) Y AZÚCARES REDUCTORES (○) DELA CEPA EP3-MC3 CRECIDA EN MBS CON CELULOSA.

DISCUSIÓN

Algunos autores consideran que los actinomicetos aislados entre 40 y 60°C de varios sustratos que incluyen estiércoles, abonos compuestos, henos y forrajes son más termotolerantes que termófilos [35]. Sin embargo, los actinomicetos celulolíticos pertenecientes a los géneros *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces* y *Microbispora*, cuyas temperaturas óptimas de crecimiento se alcanzan a los 55°C, son clasificados como termófilos [3, 8, 21, 40].

La disertación sobre los criterios a tomar en cuenta para clasificar a los microorganismos como termófilos ha conducido a considerar también la temperatura óptima a la cual se producen ciertos metabolitos entre ellos las enzimas u otros productos de la fermentación [32]. Usando estos criterios, la cepa EP3-MC3 ha sido clasificada como termófilo moderado, debido a que el máximo crecimiento y producción de azúcares reductores se obtuvo a 45°C. A diferencia de otros actinomicetos termófilos, la cepa EP3-MC3 también es capaz de crecer óptimamente y producir azúcares reductores a pH 5,0.

Estas dos características permiten hacer una evaluación de la cepa EP3-MC3 para determinar su potencial como alternativa para el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos en los procesos biotecnológicos. Dada su naturaleza aeróbica como en la mayoría de los actinomicetos [12] son explotables las propiedades anabólicas tales como la producción de proteína unicelular [3, 8, 13], de antibióticos 35 y otros compuestos bioactivos [29]. El empleo de microorganismos termófilos aerobios para la producción de PUC ofrece algunas ventajas en comparación con los mesófilos aeróbicos o anaeróbicos y los termófilos anaerobios: los aerobios pueden utilizar la lignina o los complejos lignocelulósicos; los termófilos tienen tasas más altas de degradación de la celulosa y la lignina, es menor el riesgo junto con un pH ácido de contaminación o proliferación de organismos patógenos del hombre, animales y plantas durante los procesos de fermentación y el control de la temperatura de los fermentadores puede llevarse a cabo con agua freática [3].

Usualmente los termófilos también producen enzimas más activas y termoestables que las producidas por los mesófilos [34]. En este sentido, los actinomicetos aerobios termófilos pueden ser utilizados para la producción de celulasas utilizables en la sacari-

ficación de los residuos lignocelulósicos cuyo principal producto es la glucosa, metabolito de interés económico [23].

Esta cepa no es apropiada para llevar a cabo procesos de fermentación anaeróbica que forman la base de la producción microbiana de compuestos químicos como ciertos ácidos y combustibles tales como el metano y el etanol [43]. A menos que se emplee en procesos acoplados de sacarificación de la celulosa con los de fermentación de la glucosa producida utilizando microorganismos solventógenos [10]. Aunque puede ser potencialmente útil en la degradación de la lignina, debe evaluarse el efecto de la temperatura ya que los actinomicetos lignolíticos estudiados son mesófilos, entre ellos algunas cepas de *Nocardia* [7, 9, 11, 20, 27, 37].

El empleo de microorganismos celulolíticos filamentosos como los actinomicetos y los hongos tiene varias ventajas, entre ellas, la buena adaptación a la penetración y degradación de los sustratos insolubles como la lignocelulosa debido a la formación de hifas ramificadas que le permiten aprovechar mejor el sustrato y los productos derivados de su degradación [21] mediante la concentración de las enzimas en sitios específicos de las fibras [28]. Este pudiera ser también el caso de la cepa EP3-MC3 ya que mediante microscopía óptica se pudo observar la adsorción de los filamentos a las fibras de celulosa. Este tipo de microorganismo se puede recuperar por filtración, sin embargo, la forma de crecimiento produce caldos de fermentación difíciles de airear [39].

CONCLUSIONES

La cepa identificada como *Nocardia* spp. y designada como EP3-MC3, aislada de estiércol de pollo es capaz de degradar sustratos celulósicos clasificándose como termófila moderada y acidófila en función de la mayor producción de biomasa y azúcares reductores entre 40-45°C y pH 5,0. Dadas sus características aerobias y termófilas posee potencial para la producción de proteína unicelular y compuestos bioactivos empleando sustratos celulósicos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado mediante fondos del Proyecto S1-99-007 otorgados por el CDCHT de la Universidad Nacional Experimental "Simón Rodríguez" utilizando equipos disponibles en el laboratorio de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, laboratorio de Biomoléculas, laboratorios Básicos y Planta Piloto de Ingeniería de Alimentos del Núcleo Canoabo de la misma Universidad. Los estudios bioquímicos y fisiológicos para la caracterización e identificación de la cepa se realizaron en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela y el laboratorio de Actinomicetos Patógenos Humanos y del Suelo en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina en la Universidad de Los Andes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADNEY, W.S.; RIVARD, C.J.; MING, S.; HIMMEL, M.E. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes: cellulases and related enzymes. **Appl. Biochem. and Biotechnol.** 30(2):165-183. 1991.
- [2] AITKEN, M.D. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles. **Chem. Eng. J.** 52, B49-B58. 1993.
- [3] BELLAMY, D. Single cells proteins from cellulosic wastes. **Biotechnol. Bioeng.** 16:869-880. 1974.
- [4] BENDER, J.; VATCHARAPIJARM, Y.; JEFFRIES, T.W. Characteristics and adaptability of some new isolates of *Clostridium thermocellum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 49(3):475-477. 1985.
- [5] BHAT, K.M.; MAHESHWARI, R. *Sporotrichum thermophile* growth, cellulose degradation, and cellulase activity. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(9):2175-2182. 1987.
- [6] CHRISTAKOPOULUS, P.; MACRIS, B.J.; KEKOS, D. On the mechanism of direct conversion of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*: effect of cellulase and -glucosidase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33(1):18-20. 1990.
- [7] CRAWFORD, D.L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 35(6):1041-1045. 1978.
- [8] CRAWFORD, D.L.; MCCOY, E. Production of microbial protein from waste cellulose by *Thermomonospora fusca*, a thermophilic actinomycete. **Biotechnol. Bioeng.** 15: 833-843. 1973.
- [9] CRAWFORD, R.L.; MCCOY, E.; HARKIN, J.M.; KIRK, T.K.; OBST, J.R. Degradation of methoxylated benzoic acids by a *Nocardia* from lignin-rich environment: significance to lignin degradation and effect of chloro substituents. **Appl. Microbiol.** 26(2):176-184. 1973.
- [10] DESPHANDE, M.V. Ethanol production from cellulose by coupled saccharification/fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* and cellulase complex from *Sclerotium rolfsii* UV-8 mutant. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 36(3):227-234. 1992.
- [11] GODDEN, B.; BALL, A.S.; HELVENSTEIN, P.; MCCARTHY, A.J.; PENNINGCKX, M.J. Towards elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. **J. Gen. Microbiol.** 138:2441-2448. 1992.
- [12] GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Ann. Rev. Microbiol.** 37:189-216. 1983.

- [13] HUMPHREY, A.E.; MOREIRA, A.; ARMIGER, W., ZAB-RISKIE, D. Production of single cell protein from cellulose wastes. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** (7):45-64. 1977.
- [14] ISON, A.P.; MATHEW, G.B. Measurement of biomass. In: Rhodes, P.M. And Stanbury, P.F. (Eds.). **Appl. Microb. Physiol.** The Practical Approach Series IRL Press. Oxford University Press. 103-109 pp. 1997.
- [15] JIN, F.; YAMASATO, K.; TODA, K. *Clostridium thermocopriæ* sp. Nov., a cellulolytic thermophile from animal feces, compost, soil a hot spring in Japan. **Inter. J. System. Bacteriol.** 38(3):279-281. 1988.
- [16] KALRA, K.L.; KAHN, S.S. Acidic and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **J. of Res. Punjab Agricult. Univ.** 27(1):97-107. 1990.
- [17] KVARATSKHELIYA, M.S.; ZVEJAGILSKAYA, R.A.; RAININA, E.I.; RABINOVICH, M.L. Enzymatic hydrolysis of cellulosic wastes of tea concentrate production and use of hydrolysates to produce microbial protein. **Appl. Biochem. Microbiol.** 27(5):518-523. 1991.
- [18] MADDEN, R.H. Isolation and characterization of *Clostridium stercorarium* sp. Nov., cellulolytic thermophile. **Inter. J. System. Bacteriol.** 33(4):837-840. 1983.
- [19] MADDEN, R.H.; BRYDER, M.J.; POOLE, N.J. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium papyrosolvens* sp. Nov. **Inter. J. System. Bacteriol.** 32(1):87-91. 1982.
- [20] MCCARTHY, A.J.; BRODA, P. Screening for lignin-degrading actinomycetes and characterization of their activity against ¹⁴C lignin-labeled wheat lignocellulose. **J. Gen. Microbiol.** 130: 2905-2913. 1984.
- [21] MCCARTHY, A.J. Lignocellulose-degrading actinomycetes. **FEMS Microbiol. Rev.** 46:145-163. 1987.
- [22] MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31(3):426-428. 1959.
- [23] MOHAGHEGHI, A.; GROHMANN, K.; HIMMEL, M.; LEIGHTON, L.; UPDEGRAFF, D. M. Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. Nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. **Inter. J. System. Bacteriol.** 36(3): 435-443. 1986.
- [24] MONTGOMERY, D.C. Experimentos con un solo factor. Análisis de varianza. Capítulo III. En: **Diseño y Análisis de Experimentos.** Grupo Editorial Iberoamérica, S.A. de C.V. México, D.F. 45-84 pp. 1991.
- [25] PALOP, M.L.; VALLES, S.; PIÑANGA, F.; FLORS, A. Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium celerecrescens* sp. Nov. **Inter. J. System. Bacteriol.** 39(1): 68-71. 1989.
- [26] PARRADO, J.; BAUTISTA, J. Protein enrichment of sunflower lignocellulosic fraction by *Trichoderma harzianum* S/G2431 in low moisture content media. **Biosci., Biotechnol. Biochem.** 57(12): 317-318. 1993.
- [27] PHELAN, M.B.; CRAWFORD, D.L.; POMETTO, A.L. Isolation of lignocellulose-decomposing actinomycetes and degradation of specifically ¹⁴C-labelled lignocelluloses by six selected *Streptomyces* strains. **Can. J. Microbiol.** 25: 1270-1276. 1979.
- [28] PIÑERO B.J.; VIDAL, L.; COELLO, N. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus* spp. Degradadora de plumas de aves de corral. **Rev. Científ., FCV-LUZ.** X(2): 124-129. 2000.
- [29] SANGLIER, J.J.; WELLINGTON, E.M.H.; BEHAL, V.; FIEDLER, H.P.; GHORBEL, R. E.; FINANCE, C., HACENE, M.; KAMOUN, A.; KELLY, C.; MERCER, D.K.; PRINZIS, S.; TRIGO, C. Novel bioactive compounds from actinomycetes. **Res. Microbiol.** 144: 661-663. 1993.
- [30] SERRANO, J.A.; SANDOVAL, A.H. Manual de laboratorio para el estudio de los actinomicetales patógenos. Universidad de Los Andes. Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico. Consejo de Publicaciones. Mérida, Venezuela. 358 pp. 1992.
- [31] SHAKER, H.M.; FARID, M.A.; EL-DIWANG, A.I. Optimization of the composition of the nutrient medium for cellulase and protein biosynthesis by thermophile *Aspergillus fumigatus*, NRC. **Enz. Microb. Technol.** 6: 612-621. 1984.
- [32] SONNLEITNER, B.; FIECHTER, A. Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. **Trends Biotechnol.** 1(3):74-80. 1983.
- [33] STUTZENBERGER, F.J. Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. **Appl. Microbiol.** 22:147-152. 1971.
- [34] SUKHUMAVISI, J.; OHMIYA, K.; SHIMIZU, S.; UENO, K. *Clostridium josui* sp. Nov., a cellulolytic moderate thermophilic species from Thai compost. **Inter. J. System. Bacteriol.** 38(2):179-182. 1988.
- [35] THEILLEUX, J. Los actinomicetos. En: Leveau, J.Y. y Bouix, M. (eds.). **Microbiología Industrial.** Editorial Aciribia, S.A. Zaragoza, España. 416-478 pp. 2000.

- [36] TISCHLER, M.; HIRTE, W.F.; SCHULZ, G. Development of a cellulase complex for distillery purposes by optimization of cultivation conditions for selected *Penicillium* strains. **Zentralbl. Mikrobiol.** 145(6):411-426. 1990.
- [37] TROJANOWSKI, J.; HAIDER, K.; SUNDMAN, V. Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocardia* sp. **Arch. Microbiol.** 114:149-153. 1977.
- [38] WALDRON, C.R.; BECKER, J.R.; VALLONE, C.A.; EVELEIGH, D.E. Isolation and characterization of a cellulolytic actinomycete *Microbispora bispora*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24:477. 1986.
- [39] WARD, O.P. Producción de Biomasa. Capítulo 6. En: **Biología de la fermentación**. Editorial Acirbia, S.A. Zaragoza, España. 111-132 pp. 1991.
- [40] WILSON, D.B. Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. **Crit. Rev. Biotechnol.** 12(1-2):45-63. 1992.
- [41] YAMANOBÉ, T.; MITSUISHI, Y.; TAKASAKI, Y. Isolation of a cellulolytic enzyme producing microorganism, culture conditions and some properties of the enzymes. **Agric. Biol. Chem.** 51(1):65-74. 1987.
- [42] ZENOVA, G.M.; MIKHAILOVA, N.V.; ZVYAGINTSEV, D.G. Ecology of soil oligosporous actinomycetes. **Eurasian Soil Sci.** 34(7):765-773. 2001.
- [43] ZEYKUS, J.G. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.** 34: 423-464. 1980.