

# Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*

## Effect of different the culture media in the production of biomass and ergosterol in *Rhizopus stolonifer*

**Mónica Hernández-López\***, **Silvia Bautista-Baños**, Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México; **Rosa Isela Ventura-Aguilar**, CONACYT-Instituto Politécnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carretera Yautepec-Jojutla, Km 6, calle CEPROBI, No. 8, San Isidro, Yautepec, Morelos, CP 62731, México; **Ana Guadalupe Abarca-Franco**, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CP 62209, México. \*Autor para correspondencia: mohernandezl@ipn.mx.

Recibido: 22 de Marzo, 2019.

Aceptado: 02 de Agosto, 2019.

Hernández-López M, Bautista-Baños S, Ventura-Aguilar RI y Abarca-Franco AG. 2019. Efecto de los diferentes medios de cultivo en la producción de biomasa y ergosterol en *Rhizopus stolonifer*. Revista Mexicana de Fitopatología 37 (No. Esp. 1) 22-28.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1903-4

**Resumen.** La utilidad de medios de cultivos sintéticos, es proporcionar una mezcla de nutrientes requeridos por los microorganismos que optimicen su crecimiento. *Rhizopus stolonifer*, es causante de la enfermedad llamada pudrición blanda. Se evaluó *in vitro* la producción de biomasa (mg) y ergosterol (%) de dos aislados de *R. stolonifer* de fresa (*Fragaria x ananassa*) y jitomate (*Solanum lycopersicum*) incubados en seis medios de cultivos con diferente composición de C/N, durante 25 días a 28 °C. Previamente, se caracterizaron (contenido de carbohidratos, proteínas y C/N) los medios evaluados. Los datos se analizaron a través de un diseño experimental completamente al azar

y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los resultados mostraron que los extractos de Malta y Sabouraud (SAB), presentaron de 3 a 50% más carbohidratos que los demás medios de cultivo. El medio SAB presentó de 50 a 100% mayor cantidad de proteínas, mientras que, en la relación C/N el medio mineralizado (MN) fue en el que se cuantificó el mayor valor (100.5). Respecto a la producción de biomasa, con el extracto de jugo V8, ambos aislados de *R. stolonifer* tuvieron la mayor producción (c.a 40 mg). La mayor cuantificación de ergosterol (0.00012%) fue en el medio MN.

**Palabras clave:** carbono, nitrógeno, C/N, peso seco, *in vitro*

**Abstract.** The utility of synthetic culture media is to provide a blend of nutrients required by microorganisms to optimize their growth. The disease called soft rot is caused by *Rhizopus stolonifer*. The biomass (mg) and ergosterol (%) production

of two isolates of *R. stolonifer* of strawberry (*Fragaria x ananassa*) and tomato (*Solanum lycopersicum*) incubated in six culture media with different C/N composition was evaluated *in vitro* for 25 days at 28 °C. Previously, the culture media evaluated were characterized (carbohydrate, protein and C / N content). The data were analyzed through a completely randomized experimental design and a Tukey means comparison test ( $p \leq 0.05$ ). The results showed that the extracts of Malta and Sabouraud (SAB) had 3 to 50% more carbohydrates than the other culture media. The SAB medium showed 50 to 100% more proteins, while in the C/N ratio of the mineralized medium (MN) had the highest value (100.5). Regarding biomass production, with the V8 juice extract, both of *R. stolonifer* isolates had the highest production (c.a 40 mg). The highest quantification of ergosterol (0.00012%) was with the MN medium.

**Key words:** carbon, nitrogen, C/N, dry weight, *in vitro*

Para el crecimiento *in vitro* de los hongos se utilizan diferentes medios de cultivo, los cuales sustituyen parcialmente las propiedades nutricionales del hospedante o sustrato natural del hongo por cultivar. La finalidad del medio es proporcionar energía al microorganismo, para que se desarrolle de manera normal. Además, en la preparación y diseño de un medio de cultivo, se busca proporcionar una mezcla adecuada de nutrientes requeridos por los microorganismos a una concentración que optimice su crecimiento (Merck, 2004). No obstante, el crecimiento y composición de los microorganismos se puede modificar por efecto del medio de cultivo. Para el crecimiento *in vitro* de *Rhizopus stolonifer* se han reportado medios de cultivo sólidos como papa dextrosa agar, agar extracto de levadura,

peptona dextrosa, agar dextrosa Sabouraud y medio mínimo (Lennartsson y Taherzadeh, 2014). También, se reporta el uso de medios líquidos como el caldo papa dextrosa. La composición del medio de cultivo puede influir sobre diferentes aspectos en la fisiología del microorganismo, tales como, nutrición, multiplicación y producción de metabolitos primarios y secundarios (Bernal *et al.*, 2002). Dentro de los indicadores del crecimiento fúngico se considera la biomasa y producción de ergosterol. Este último es el componente mayoritario del hongo y se localiza en la membrana plasmática de la célula (Frey *et al.*, 1994).

*Rhizopus stolonifer* se considera como uno de los principales hongos fitopatógenos que provoca la enfermedad llamada ‘pudrición blanda’ (Bautista-Baños *et al.*, 2016). Este hongo crece en diversos hospedantes como el jitomate y la fresa, los cuales son productos agrícolas de importancia económica en México. Por ejemplo, se ha reportado que *R. stolonifer* causa pérdidas en poscosecha que ascienden hasta un 80%, las cuales se manifiestan principalmente durante el transporte y la comercialización de los productos agrícolas (Bautista-Baños *et al.*, 2008).

El objetivo de esta investigación fue caracterizar los medios nutritivos y evaluar el contenido de biomasa y ergosterol en dos aislados de *R. stolonifer* durante 25 días de incubación a 28 °C.

**Obtención de *Rhizopus stolonifer*.** El hongo utilizado fue proporcionado por el cepario del Laboratorio de Tecnología Poscosecha de Productos Agrícolas del CEPROBI y para su reactivación se re-inoculó en frutos de jitomate y fresa (pruebas de patogenicidad), de acuerdo con los postulados de Koch. Posteriormente, el hongo se aisló de cada fruto y se incubó en medio papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon<sup>®</sup>, Becton Dickinson de México) en cajas Petri

de 10 cm a  $20 \pm 2$  °C durante 5 días. La caracterización molecular indicó que ambas cepas corresponden a *R. stolonifer*. Este análisis molecular se llevó a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario del Colegio de Postgraduados (LADIFIT). Se utilizaron primers universales ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Para la amplificación de los genes se empleó un ciclo de 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 57 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C por 5 minutos (White *et al.*, 1990). Las secuencias de los nucleótidos obtenidos se analizaron con el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y se compararon con las secuencias reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center of Biotechnology Information) obteniéndose una homología del 96% y una similitud del 90.1%.

**Preparación de la suspensión de esporas.** Después del periodo de incubación, se adicionaron 20 mL de agua destilada estéril a la caja Petri, y con una aguja de disección se raspo el micelio con la finalidad de desprender las esporas (globosas, ovales y lisas), mismas que se recuperaron en un matraz Erlenmeyer. La cuantificación de esporas se llevó a cabo en una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ .

**Preparación de los medios de cultivo.** Se utilizaron seis diferentes medios de cultivo líquidos: caldo extracto de malta (EM) (Bioxon®, México), caldo dextrosa Sabouraud (EDS) (BD Difco™, USA), medio mineralizado (MN), jugo comercial V8 Splash (JV8) (Campbell's), jugo de jitomate (JJ) y jugo de fresa (JF). Los medios de cultivo se prepararon de manera distinta, de acuerdo con

las especificaciones del proveedor. El medio MN consistió en 10 g de glucosa, 2.5 g de  $\text{NH}_4$ -tartrato, 0.015 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.06636 g de  $\text{CaCl}_2$ , 16.78 g de  $\text{FeCl}_3$ , 100 mL de tiamina, 0.25 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.025 g de NaCl en 1000 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en agitación en una parrilla de calentamiento Cimarrec (Thermo Scientific, China), hasta ebullición, y después se esterilizó. Los jugos de fresa y jitomate se obtuvieron a partir de frutos sanos, los cuales se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, durante 1 min y posteriormente con agua destilada. Con un extractor de jugos (EURO LINE modelo-ETW-9800) se obtuvo el producto a utilizar.

**Siembra del hongo en los medios nutritivos** Se colocaron 4 mL del medio de cultivo y/o jugo, en viales de vidrio de 20 mL, previamente esterilizados. Posteriormente, los viales se inocularon con 80 mL de la solución de esporas ( $10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ) y no se utilizó un control negativo (medios sin inocular). Se emplearon tres repeticiones por cada medio de cultivo. Los viales se colocaron en una incubadora modelo Innova 40 (New Brunswick, USA) con agitación constante a 150 rpm y  $28 \pm 2$  °C. Las evaluaciones se realizaron a los 5, 10, 15, 20 y 25 días, excepto el análisis de composición del medio de cultivo que se determinó al inicio del experimento.

### Caracterización de los medios de cultivo

**Cuantificación de carbohidratos por DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico).** La metodología que se utilizó para la cuantificación de los carbohidratos fue la de Miller (1959). Se pesó 0.1 g de muestra

del medio de cultivo y se depositaron en tubos de ensayo a los cuales se les agregó 10 mL de agua destilada y 1 mL de DNS y la mezcla se homogenizó perfectamente con el uso de un vortex Genie 2 (Scientific Industries, USA). Todos los tubos se sometieron a ebullición durante 5 min, al término de este tiempo se enfriaron en baño de hielo y se les adicionaron 8 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Genesis 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de  $\lambda=575\text{nm}$ . La cuantificación de los carbohidratos se reportó en gramos.

**Contenido de proteínas.** La determinación de proteína se realizó mediante el método de kjedhal (AOAC, 1990). Consistió en pesar 0.5 g de la muestra en un matraz kjeldhal, a la cual se agregó 1 g de mezcla digestora y 5 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado. Los matraces se colocaron en un digestor hasta la obtención de una coloración verde cristalina, el material digerido se transfirió a un matraz de destilación y se le agregaron 20 mL de agua y 20 mL de hidróxido de sodio; en el extremo del condensador se colocó un matraz Erlenmeyer de 125 mL el cual contenía 15 mL de ácido bórico al 4% y dos gotas de indicador. El extremo del condensador quedó sumergido dentro de la solución valorada de HCL 0.1 N. se siguió el mismo procedimiento para el blanco sin agregar la muestra. Se calculó primeramente el porcentaje (%) de nitrógeno total, y una vez obtenido se procedió a calcular el porcentaje (%) de proteína contenida en la muestra.

**Relación carbono/nitrógeno.** Se obtuvo la relación carbono/nitrógeno (C/N) mediante la división de estos valores.

**Cuantificación de la biomasa.** La biomasa fúngica se determinó por diferencia de peso seco, para ello se vertió el contenido total de cada vial de cristal a través de un papel filtro Whatman No.1. Posteriormente, el papel filtro y la muestra se secaron en un horno Binder No. 10-21821 (Alemania) a una temperatura de 90-100 °C, hasta obtener un peso constante. La biomasa fúngica se expresó en gramos de peso seco (Oshoma y Ikenebomeh, 2005).

**Contenido de ergosterol.** El contenido de ergosterol se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Tian *et al.* (2012). Este método consistió en adicionar 5 mL de una solución alcohólica de hidróxido de potasio al 25% (Sigma-Aldrich, USA) a 1 g de biomasa húmeda. La mezcla se homogenizó durante 5 min y después se incubó en baño maría a 85 °C durante 4 h. Posteriormente, se extrajeron los esteroides de cada muestra adicionando 2 mL de agua destilada y 5 mL de n-heptano (Fermont, México). La mezcla obtenida se agitó por 2 min en un vórtex y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se recuperó la fase cristalina o sin color y se midió su absorbancia a 320 nm en un espectrofotómetro Genesis 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA). La cantidad de ergosterol se calculó como un porcentaje del peso húmedo de las células y se basó en la absorbancia y el peso húmedo del sedimento inicial. Los datos se reportaron como porcentaje de ergosterol.

**Análisis estadístico.** Los datos se analizaron mediante un ANOVA con un diseño experimental completamente al azar y una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p\leq 0.05$ ).

### Caracterización de los medios de cultivo.

**Contenido de carbohidratos y proteínas.** Los medios de cultivo EM y EDS presentaron de 3 a 50% más cantidad de carbohidratos que el resto de los medios de cultivo. Por otra parte, el medio de cultivo EDS presentó de 50 a 100% mayor cantidad de proteínas con respecto al resto de los medios de cultivo, mientras que, en la relación C/N el medio de cultivo MN fue en el que se cuantificó el valor mayor (100.5) (Cuadro 1).

**Contenido de biomasa.** El contenido de biomasa de *R. stolonifer* se modificó significativamente ( $p < 0.05$ ) por efecto del medio de cultivo con respecto al tiempo (Figura 1 A y B). En general, la biomasa en ambos aislados, se incrementó durante el tiempo de incubación e independientemente del medio de cultivo. Cuando el medio de incubación fue JV8, hubo una mayor producción de biomasa en comparación con el resto de los medios utilizados, obteniéndose de 4 a 5 veces mayor producción en comparación con los medios EM y MN. Los valores al término de la incubación con el JV8 fueron de  $28.6 \pm 0.4$  mg y  $36.2 \pm 8.40$  mg (fresa y jitomate, respectivamente).

**Contenido de ergosterol.** Los resultados mostraron un contenido sobresaliente de ergosterol de *R. stolonifer* incubado en el medio adicionado con minerales (EM), independientemente si el hongo se aisló del fruto de fresa o jitomate, mientras que, al utilizar los medios nutritivos restantes, se observó en su mayoría un comportamiento opuesto en ambos aislados (Figura 2 A, B).

En relación al contenido de biomasa, Taherzadeh *et al.* (2003) indicaron que la composición del medio de cultivo tuvo un efecto notable en el rendimiento de la biomasa producida por *R. oryzae*. Ellos reportaron valores de 0.18 y 0.43 g de biomasa  $g^{-1}$  después de 14 días a 30 °C, teniendo la glucosa como fuente de carbono. Adicionalmente, Millati *et al.* (2005) reportaron que el contenido de biomasa de 3 aislados de *R. oryzae* a partir de glucosa fue diferente, a pesar de haber sido incubadas en el mismo medio de cultivo. Los resultados de biomasa pudieran estar más bien relacionados por la diferencia de la composición nutricional en la que cada hongo se incubó. Al respecto, Cortés *et al.* (2002) indicaron que la relación C/N afectó el crecimiento de *R. nigricans* ya que en ese estudio se obtuvo la mayor producción de biomasa (3.8 mg  $mL^{-1}$ ) en el medio de cultivo Melin-Norkrans con una relación C/N de 18.9, en comparación con 2.8 mg  $mL^{-1}$  de biomasa cuando la relación C/N

**Cuadro 1.** Contenido inicial de proteínas, carbohidratos y relación C/N de los medios de cultivo y jugos de frutas.

Medios de cultivo	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)	C/N
Caldo extracto de malta	85.8	10.9	8.5
Caldo dextrosa Sabouraud	80	20.0	4.0
Medio mineralizado	33.1	0.33	100.5
Jugo comercial V8 Splash	32.0	0.0	-
Jugo de jitomate	3.5	0.8	4.3
Jugo de fresa	7.6	0.6	11.4

C/N= Relación carbono/nitrógeno.

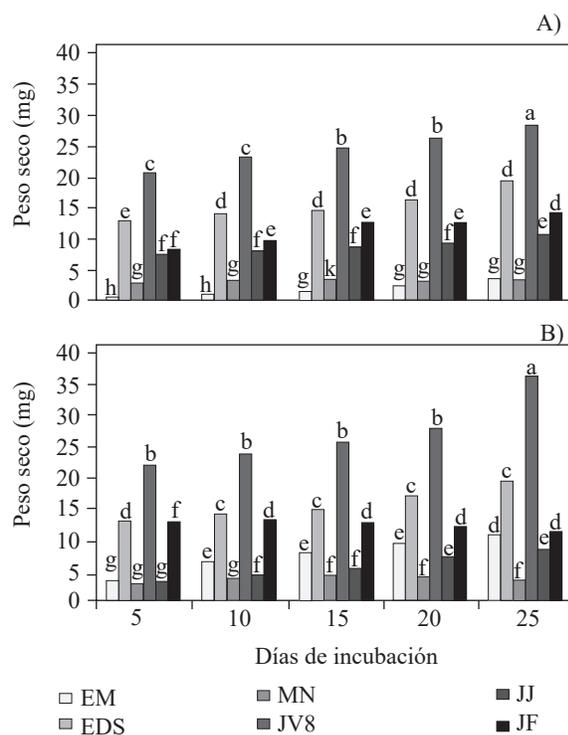


Figura 1. Contenido de biomasa en *R. stolonifer* aislado de fresa (A) y jitomate (B), incubado en diferentes medios nutritivos a temperatura ambiente de 5 a 25 días. EM = caldo extracto de malta, EDS = caldo dextrosa Sabouraud, MN = medio mineralizado, JV8 = jugo comercial V8 Splash, JJ = jugo de jitomate, JF = jugo de fresa. Medias marcadas con letras diferentes en cada medio de cultivo indican que son estadísticamente diferentes, usando la comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ).

fue de 38.4. En esta investigación no hubo una relación directa entre la composición C/N y la producción de biomasa, ya que se observó que en el medio nutritivo MN donde se obtuvo el máximo valor de C/N (100.5) hubo una menor producción de biomasa (15 mg).

En relación al porcentaje de ergosterol, los resultados obtenidos en esta investigación difieren de lo reportado por Nout *et al.* (1987) quienes obtuvieron una mayor cantidad de este compuesto en *R. oligosporus* en un sustrato natural (habas de soja), en comparación con el crecimiento de *R. stolonifer*

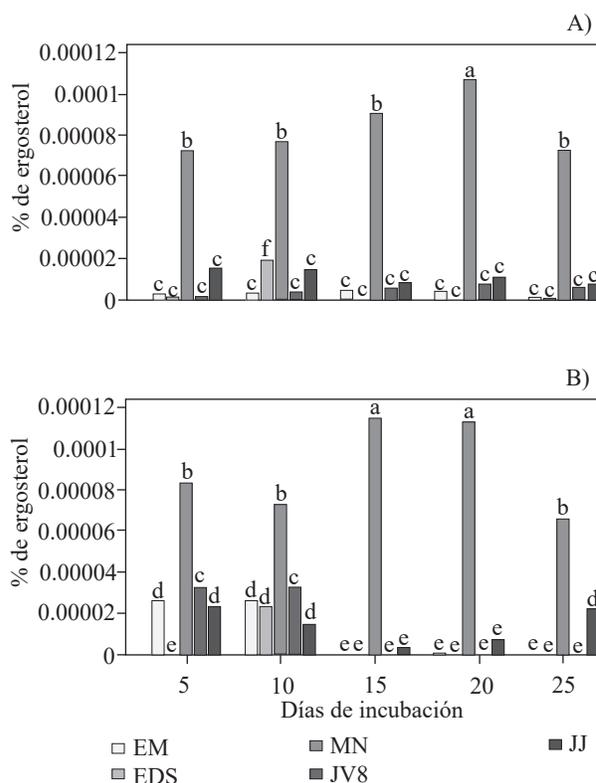


Figura 2. Contenido de ergosterol en *R. stolonifer* aislado de fresa (A) y jitomate (B), incubado en diferentes medios nutritivos a temperatura ambiente de 5 a 25 días. EM = caldo extracto de malta, EDS = caldo dextrosa Sabouraud, MN = medio mineralizado, JV8 = jugo comercial V8 Splash, JJ = jugo de jitomate, JF = jugo de fresa. Medias marcadas con letras diferentes en cada medio de cultivo indican que son estadísticamente diferentes, usando la comparación de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ).

cuando se incubó en los medios de cultivo sintéticos. Por otro lado, el contenido de ergosterol, además de estar influenciado por la especie fúngica, considera otras variables, como la edad del hongo, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el método de análisis para su obtención (Trigos y Ortega, 2002; Valdés-Duque, 2008). Al parecer el contenido de carbohidratos de los sustratos evaluados no fue el componente que indujo la producción de este compuesto lipídico. Además, es importante

señalar que no hubo un patrón notorio en la síntesis del ergosterol durante el periodo de incubación de 25 días al que se sometió *R. stolonifer* de ambos aislados.

En conclusión, la distinta composición en carbohidratos y proteínas de los medios nutritivos que se evaluaron, influyó en el rendimiento de la biomasa y la concentración de ergosterol en ambos aislados de *R. stolonifer*. Por otro lado, el tiempo de incubación de 25 días en los medios nutritivos, no influyó en las variables de biomasa.

## LITERATURA CITADA

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis: Changes in official Methods of Analysis Made at the Annual Meeting. Supplement 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Hernández-López M, and Rodríguez-González F. 2016. Morphological and ultrastructural modifications of chitosan-treated fungal phytopathogens. Pp. 251-275. In: Bautista-Baños S, Gianfranco Romanazi and Jiménez-Aparicio A (eds). Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities. Academic Press. USA. 352p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00009-4>
- Bautista-Baños S, Velázquez-del Valle MG, Hernández-Lauzardo AN and Barka EA. 2008. The *Rhizopus stolonifer*-tomato interaction. Pp. 269-289. In: Barka EA and Clement C (eds.). Plant Microbe Interaction. Research Signpost. Kerala, India. 406p. [https://www.researchgate.net/profile/Silvia\\_Bautista-Banos/publication/234102268\\_The\\_rhizopus\\_stolonifer-tomato\\_interaction/links/00463535394fb7d5a5000000/The-rhizopus-stolonifer-tomato-interaction.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Silvia_Bautista-Banos/publication/234102268_The_rhizopus_stolonifer-tomato_interaction/links/00463535394fb7d5a5000000/The-rhizopus-stolonifer-tomato-interaction.pdf)
- Bernal G, Illanes A, and Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. with antibiotic activity against plant pathogenic agents. Electronic Journal of Biotechnology 5:7-8. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582002000100008>
- Cortés D, Barrios-González J and Tomasini A. 2002. Pentachlorophenol tolerance and removal by *Rhizopus nigricans* in solid-state culture. Process Biochemistry 37: 881-884. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00295-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00295-3)
- Frey B, Vilariño A, SchUepp H, and Arines J. 1994. Chitin and ergosterol content of extraradical and intraradical mycelium of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Soil Biology and Biochemistry 26:711-717. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90263-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)90263-1)
- Lennartsson PR, Erlandsson P and Taherzadeh MJ. 2014. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. Bioresource Technology 165:3-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>
- Millati R, Edebo L and Taherzadeh MJ. 2005. Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates. Enzyme and Microbial Technology 36:294-300. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.007>
- Miller GL. 1959. Modified DNS method for reducing sugars. Analytical Chemistry. 31:426-428.
- Nout MJR, Bonants-van Laarhoven TMG, De Jongh P and De Koster PG. 1987. Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates. Applied Microbiology and Biotechnology 26:456-461. <https://doi.org/10.1007/BF00253532>
- Oshoma CE, and Ikenebomeh MJ. 2005. Production of *Aspergillus niger* biomass from rice bran. Pakistan Journal of Nutrition 4:32-36. <http://dx.doi.org/10.3923/pjn.2005.32.36>
- Taherzadeh MJ, Fox M, Hjorth H and Edebo L. 2003. Production of mycelium biomass and ethanol from paper pulp sulfite liquor by *Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology 88:167-177. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00010-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00010-5)
- Tian J, Huang B, Luo X, Zeng H, Ban X, He J and Wang Y. 2012. The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand. -Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. Food Chemistry 130:520-527. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.061>
- Trigos A and Ortega-Regules A. 2002. Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. Mycologia 94:563-568. <https://doi.org/10.1080/15572536.2003.11833184>
- Valdés-Duque BE. 2008. Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, Barcelona. 161p. <https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2007/tdx-0229108-165736/bevd1de1.pdf>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp:315-322. In: PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). Academic Press, San Diego, USA. 482p. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>