

AISLAMIENTO DE *ASPERGILLUS NIGER* CON ACTIVIDAD LIGNOCELULOLÍTICA A PARTIR DE *BRACHIARIA SPP*

(Isolation of *Aspergillus niger* with lignocellulolytic activity from *Brachiaria spp*)

Nirza C. Noguera-Machado^{1,2}, Viviana V. Sánchez G^{1,2}, José M. Soto O^{1,2}, Luis E. Ojeda^{1,2},
Carlos Rodríguez-Leo²

¹ Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo Sede Aragua. Sector Santa Rita
Apartado Postal 2106, Municipio Linares Alcántara, Estado Aragua.

²Sección de Biotecnología Agroindustrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana Alonso” (BIOMED-UC). Sector Las Delicias, Apartado postal 2351 Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Emails: nnoquera1@uc.edu.ve, nirza.noguera@gmail.com Tlf: 0412-1312245, vivisg93@gmail.com. Tlf: 0414-9439738, soto_14_jose@hotmail.com. Tlf: 0424-4581067, lojeda2@uc.edu.ve, luis.edgardo.ojeda@gmail.com, Tlf: 0412-0424558. leogod1985@gmail.com Tlf: 0051963816963.

Autor de correspondencia: nnoquera1@uc.edu.ve, nirza.noguera@gmail.com

Recibido: 05-03-2020

Aceptado: 30-03-2020

RESUMEN

El volumen de desechos orgánicos generados por la agroindustria ha superado su capacidad de biodegradación natural, generando problemas de acumulación y contaminación en diversos ecosistemas. Por lo que diseñar estrategias que permitan la bioconversión de estos residuos, para disminuir su impacto ecológico constituye un reto desde el punto de vista biotecnológico. En este sentido, la búsqueda de microorganismos capaces de utilizar estos residuos como nutrientes, para la producción de metabolitos con valor agregado resulta de interés. En la presente investigación, se planteó como objetivo aislar uno o más microorganismos ambientales, a partir de una muestra de pasto *Brachiaria spp.*, identificarlos y determinar su capacidad lignocelulolítica. Para ello, se realizó una caracterización cultural macro y microscópica en medios Czapeck y papa dextrosa agar (PDA); así como pruebas de crecimiento en presencia de papel de filtro, celulosa microcristalina y licor de lignina, utilizando el medio Czapeck. Se logró aislar una cepa, la cual fue identificada como *Aspergillus niger* y las pruebas de crecimiento confirmaron su capacidad de utilizar la celulosa y la lignina como fuente de carbono, demostrando su actividad lignocelulolítica. Esta especie, *A. niger*, es de gran importancia desde el punto de vista industrial, debido a la gran cantidad de metabolitos que es capaz de producir, entre los que destacan el ácido cítrico y una amplia gama de enzimas, entre ellas la glucosa oxidasa. En consecuencia, los hallazgos obtenidos abren un abanico de posibilidades sobre los usos de esta cepa en la bioconversión y aprovechamiento de residuos vegetales, los cuales deben ser explorados en futuras investigaciones.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, *Brachiaria spp.*, celulasas, lignilasas.

SUMMARY

The volume of organic waste generated by agribusiness has exceeded its natural biodegradation capacity, generating accumulation and contamination problems in various ecosystems. Therefore, designing strategies that allow the bioconversion of these wastes to reduce their ecological impact constitutes a challenge from a

biotechnological point of view. In this sense, the search for microorganisms capable of using these residues as nutrients for the production of metabolites with added value is of interest. In the present investigation, the objective was to isolate one or more environmental microorganisms, from a *Brachiaria spp.* Grass sample, identify them and determine their lignocellulolytic capacity. For this, a macro and microscopic cultural characterization was performed in Czapeck and potato dextrose agar (PDA) media; as well as growth tests in the presence of filter paper, microcrystalline cellulose and lignin liquor, using Czapeck medium. It was possible to isolate a strain, which was identified as *Aspergillus niger*, and growth tests confirmed its ability to use cellulose and lignin as a carbon source, demonstrating its lignocellulolytic activity. This species, *A. niger* is of great importance from an industrial point of view, due to the large number of metabolites it is capable of producing, among which citric acid and a wide range of enzymes, including glucose oxidase, stand out. Consequently, the findings obtained open up a range of possibilities on the uses of this strain in bioconversion and use of plant residues, which should be explored in future research.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Brachiaria spp.*, cellulases, lignylases.

INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal componente de la estructura vegetal y está constituida por tres tipos de polímeros celulosa, hemicelulosa y lignina, que están fuertemente unidos por enlaces químicos no covalentes y covalentes entrecruzados (Pérez et al., 2002). La descomposición de la biomasa lignocelulósica en los ecosistemas, es llevada a cabo por microorganismos saprófitos, a fin de mantener el equilibrio de los mismos, y cumplir con los ciclos del carbono y de otros nutrientes (Martínez et al., 2005). Éstos son capaces de hidrolizar dichos polímeros y transformarlos en azúcares de 5 y 6 carbonos, gracias a procesos bioquímicos catalizados por el conjunto de enzimas denominadas lignocelulolíticas (Grijalva, 2013). Entre los microorganismos capaces de realizar esta bioconversión en la naturaleza, destacan los géneros bacterianos *Streptomyces*, *Thermomonospora* y *Thermobifida* (Ramírez & Cocha, 2003) y, entre los fúngicos *Chaetomium*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Sánchez, 2009; Grijalva, 2013).

La actividad agrícola, agroindustrial y forestal, generan grandes volúmenes de residuos orgánicos, los cuales superan la capacidad de biodegradación natural y su acumulación ocasiona problemas de contaminación ambiental (Grijalva, 2013; Llenque-Díaz et al., 2015; Piña-Guzmán et al., 2016). Adicionalmente, muchos de estos residuos suelen ser eliminados por medio de la quema, lo que impacta negativamente el ambiente (Grijalva, 2013) y genera serios problemas de salud pública por enfermedades de índole respiratorio.

Por ello, surge la necesidad de implementar estrategias que permitan el aprovechamiento de este tipo de material, con los consecuentes beneficios económicos y ambientales (Piña-Guzmán et al., 2016). Existen trabajos que demuestran la factibilidad de producir celulasas utilizando el bagazo de caña de azúcar, a partir de hongos del género *Aspergillus* (Escudero et al. 2013, Llenque-Díaz et al. 2015), así como el cultivo del hongo comestible *Pleurotus spp.*, sobre rastrojos de arroz y de trigo (Kumari & Achal 2008, Piña-Guzmán et al. 2016); con resultados exitosos logrando altos rendimientos a bajos costos.

En este sentido, la búsqueda de especies capaces de utilizar estos residuos, constituye una herramienta fundamental para garantizar el éxito de los procesos de bioconversión. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar un microorganismo ambiental con capacidad lignocelulolítica a partir de una muestra de pasto *Bracharia spp.*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo: Se colectó material vegetal de la especie *Bracharia spp.*, cultivado en los campos del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicado en el sector El Limón del Municipio Mario Briceño Iragorry del Estado Aragua (N10°17.226'; W 067°37.457' a una elevación de 478m). Se tomaron muestras de hojas secas a nivel del suelo y se colocaron en bolsas estériles herméticas para ser trasladadas al laboratorio, de acuerdo con lo establecido por Laura & Castellanos (2009) para la toma de muestras vegetales en descomposición.

2. Aislamiento del microorganismo: El material vegetal fue cultivado en un medio para *Streptomyces* propuesto Kluepfel et al. (1986), constituido por K₂HPO₄ (1,4 g/L), KH₂PO₄ (2,5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (10 g/L), CaCl₂ (0,3 g/L), MgSO₄ (1 g/L), extracto de levadura (1 g/L) y peptona (2 g/L). El tiempo de incubación fue de 7 días a 30 ± 1°C, bajo agitación continua a 150 rpm. A partir de esta suspensión se procedió a tomar volúmenes para hacer diluciones seriadas hasta 10⁻⁸ y cultivarlas en placas (Ramírez & Cocha, 2003). Para este fin se usó el medio Czapeck, constituido por sacarosa (30g/L), NaNO₃ (3g/L), K₂HPO₄ (1g/L), MgSO₄ (0,5g/L), KCl (0,5g/L), FeSO₄ (0,01g/L), con la adición de agar 2,5% y celulosa microcristalina 1,0%. Las placas fueron incubadas a 30°C hasta observar crecimiento de colonias entre 2 a 7 días.

3. Identificación Morfológica: Las colonias aisladas fueron sembradas en placas con medio Czapeck y Papa Dextrosa Agar (PDA), para proceder con la identificación mediante las técnicas de identificación morfológica tradicional. Se emplearon claves taxonómicas para el género *Aspergillus* según Raper & Fennell (1965) y Gams et al. (1985), junto a las técnicas micrométricas para la medición de estructuras típicas diferenciales en el género. También se hicieron observaciones de las estructuras a nivel de microscopio electrónico (marca JEOL modelo JSM-6390) en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Simón Bolívar (Miranda-Venezuela). Se evaluaron características del crecimiento tales como el color de la colonia en el anverso y el reverso, la textura, el crecimiento lineal (cm/día), el crecimiento aéreo y la pigmentación del sustrato.

4. Confirmación de la actividad lignocelulolítica:

4.1. Actividad celulolítica: Se realizó la prueba de crecimiento sobre papel de filtro, siguiendo la metodología planteada por Ramírez & Cocha (2003). Se preparó un medio con las sales del medio Czapeck y se sustituyó la celulosa por una tira de papel de filtro estéril (Whatman nro. 1), como única fuente de carbono. Se prepararon dos tubos, uno de los cuales fue inoculado con el microorganismo y el otro no, a fin de usarlo como control negativo. Se incubaron bajo agitación continua (150 rpm) a 30°C durante 10 días, con observación diaria. La formación de estructuras celulares visibles, fueron el indicativo

de la capacidad de producir celulasas. El ensayo se realizó por duplicado.

4.2. Actividad lignolítica: Se realizó una determinación cuantitativa fundamentada en los procedimientos descritos por Lara et al. (2003), González et al. (2007) y Laura & Castellanos (2009). Se preparó el medio Czapeck con adición de 1% de glucosa y 1% de licor de lignina y fue incorporado en dos tubos de los cuales, uno fue inoculado con el microorganismo y el otro no (control negativo). Se incubaron a 30°C bajo agitación continua (150 rpm) durante 15 días. Posteriormente, el caldo de cultivo fue separado del micelio por filtración y centrifugación (5300 rpm / 30 minutos). Al sobrenadante se le determinó el espectro de absorción en un rango entre 200 y 300 nm. El experimento se realizó por duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislamiento e Identificación

A partir de los cultivos en medios selectivos se logró aislar una colonia que presentó un rápido desarrollo en los medios Czapeck y PDA, ya a los 7 días había cubierto la zona de la placa donde fue inoculado. Entre las características macroscópicas observadas se puede mencionar que el color inicial era blanco y al transcurrir los días se oscurecieron hasta teñirse totalmente de negro; la textura fue de aspecto polvoriento-granular y al reverso se observó de color crema (Figura 1). En relación a las características microscópicas, se observó la cabeza conidial radiada y de forma globosa, de color pardo a negro, conidióforos lisos, hialinos o ligeramente pardos cerca del ápice, de 2,00 x 16 µm. La célula metula de forma conidial filídica biseriada, con una longitud 8,00 x 3,0 µm. Los conidios de forma globosa, de color marrón a negro y rugosos, de 4,0-5,0 µm de diámetro (Figura 2). Dichas características son típicas a las reportadas para hongos del género *Aspergillus*, específicamente para *Aspergillus niger* (Raper & Fennell 1965, Gams et al. 1985), concluyendo que esta fue la especie aislada.

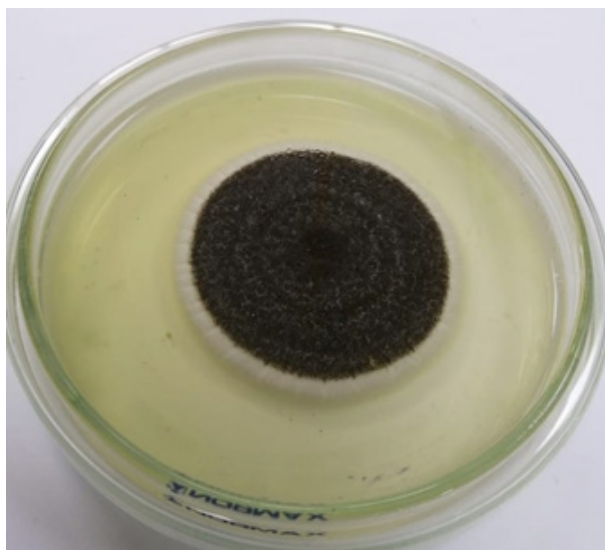


Figura 1. Colonia aislada cultivada en medio Czapeck.

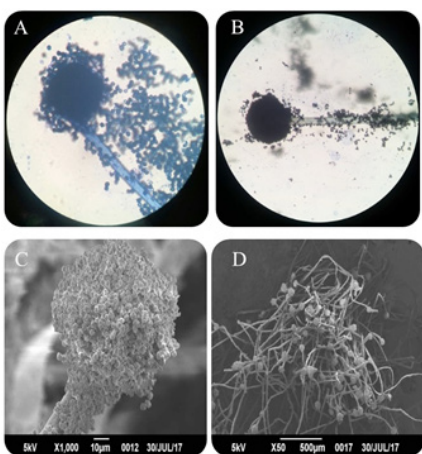


Figura 2. Características microscópicas del microorganismo aislado. Imágenes (A) y (B) captadas con microscopio óptico a 100X. Imágenes (C) y (D) captadas con microscopio electrónico de transmisión 1000X.

De acuerdo con Schuster et al. (2002), esta especie pertenece a un género de hongos filamentosos, capaces de crecer sobre la materia orgánica, que comúnmente habitan en el suelo, material vegetal en descomposición y en el compost. Sin embargo, las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo periodo de tiempo, pudiéndose aislar de una gran variedad de sustratos y ambientes (Abarca, 2000).

Otros trabajos como el de Laura & Castellanos (2009), reportaron un aislamiento de cepas de este género *Aspergillus*, a partir de la planta forrajera *Calamagrostis nitidula* Pilg. La cual, al igual que *Bracharia*, es utilizada para la alimentación animal en Perú. Los investigadores tomaron muestras tanto material vegetal erguido como en descomposición.

A nivel biotecnológico e industrial, *A. niger* es una especie de gran importancia, debido a la gran cantidad de metabolitos que se producen a partir de él. Entre los que se pueden mencionar el ácido cítrico, el ácido glucónico, así como una gran cantidad de enzimas como pectinasas, proteasas, catalasa y glucosa oxidasa (Schuster et al., 2002; Zoghbi et al., 2008; Ojeda et al., 2011). Además, su biomasa ha sido probada como fuente de proteína para animales de laboratorio y sus resultados han sido similares a otras fuentes proteicas usadas en piensos para roedores (Méndez et al., 2004).

2. Actividad celulolítica

Se observó crecimiento en la parte superior del tubo, alrededor del papel de filtro. Por lo que se confirmó que el hongo aislado fue capaz de producir las enzimas para degradar la celulosa del papel para su crecimiento.

Las enzimas celulasas son producidas por una variedad de bacterias y hongos aeróbicos o anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Sin embargo, sólo algunos de ellos producen enzima celulosa extracelular capaz de hidrolizar la celulosa (Llanque-Díaz et al., 2015). En general, los hongos filamentosos han sido catalogados como los responsables de la mayor celulosis en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, y sus ventajas adaptativas. El género más estudiado para la producción de estas enzimas es el *Trichoderma*, seguido por *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora*, los cuales también son buenos productores de estas enzimas (Ferrer-Marcelo et al., 2011).

Se ha descrito el uso de cepas de *Aspergillus* para producción de celulasas y hemicelulasas en procesos sumergidos de tanque agitado, debido a su capacidad de excretar estas enzimas en altas concentraciones, al medio de cultivo (Schuster et al. 2002). De igual manera, en fermentaciones sólidas ha demostrado un alto rendimiento de excreción de éstas enzimas, tal como lo lograron Escudero et al. (2013) y Llanque-Díaz et al. (2015) usando el bagazo de caña de azúcar.

3. Actividad Lignolítica

Se observó una disminución del pico de absorción entre las longitudes 215 y 225 nm, equivalente al 12,6% con respecto al control, asociado con un proceso oxidativo de la lignina por acción de las enzimas producidas por la cepa aislada (Figura 3). Se ha descrito que en presencia de oxígeno y peróxido de hidrogeno, los microorganismos por medio de enzimas lignolíticas pueden ocasionar la ruptura de los enlaces insaturados carbono-carbono de las cadenas propanoides, destruyendo algunos grupos cromóforos, lo que reduce la absorción a determinadas longitudes de onda y por ende la coloración del licor de lignina (Lara et al. 2003, Laura & Castellanos 2009).

Este resultado, fue inferior al hallazgo de Laura & Castellanos (2009) con una cepa de *Aspergillus melleus*. A partir de este microorganismo los investigadores obtuvieron una disminución de un 80% en la absorción del sobrenadante, durante 15 días de incubación.

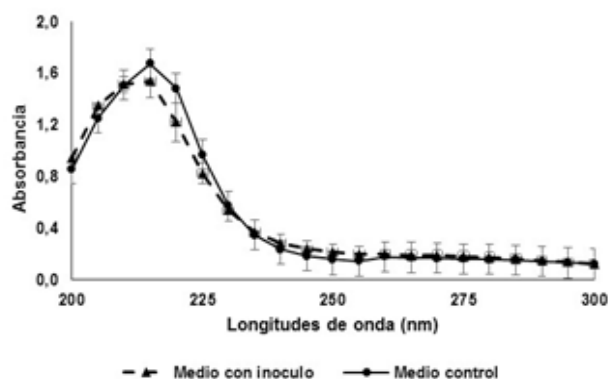


Figura 3. Curvas de absorbancia del medio Czapeck con licor de lignina incubadas durante 15 días: (▲) Inoculado con *A. niger*; (●) Sin inoculo (control).

Las enzimas lignocelulolíticas son un grupo grande de proteínas extracelulares en las que se incluyen las enzimas ligninolíticas (peroxidasas y oxidasas) y enzimas hidrolíticas (pectinasas, hemicelulasas, quitinasas, celulasas, amilasas, esterases, proteasas y manasas). Estas enzimas son producidas principalmente por especies fúngicas, dentro de los que destacan los hongos de la podredumbre blanca (ejemplo: *Phanerochaete chrysosporium*), por ser los más eficientes en la degradación de la celulosa, lignina y un amplio número de contaminantes como compuestos aromáticos clorados, hidrocarburos

heterocíclicos aromáticos, algunos colorantes y polímeros sintéticos (Sánchez 2008, Godliving 2012). Estos hongos tienen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: el sistema hidrolítico, responsable de la degradación de polisacáridos, y el sistema lignolítico oxidativo y extracelular que degrada la lignina y abre los grupos fenilo (Sánchez 2008).

Por lo que la lignólisis ocurre como parte del metabolismo secundario, es decir, los hongos no utilizan directamente lignina como fuente de carbono y energía (Laura & Castellanos, 2009). Inicialmente dependen del sistema hidrolítico para obtener azúcares más digeribles y al limitarse las fuentes de carbono, se activa el sistema oxidativo para fragmentar los monómeros de fenilpropano. Sin embargo, no todos los hongos producen suficiente cantidad de una o varias de estas enzimas, por lo que no todos los hongos ambientales son lignolíticos (Sánchez 2008).

CONCLUSIONES

A partir de las hojas de pasto en descomposición se logró aislar e identificar una cepa silvestre de *A. niger* con actividad lignocelulolítica. La cepa fue capaz de crecer en papel de filtro y ocasionar la ruptura de grupos fenilo presentes en el licor de lignina, usados como sustratos para confirmar dicha actividad. La importancia biotecnológica de este hongo y su capacidad de aprovechar material vegetal para su crecimiento, lo convierte en una alternativa de interés económico y ambiental, a fin de promover la recirculación de material orgánico dentro de los sistemas productivos, favoreciendo el desarrollo sostenible con miras hacia una agricultura sustentable.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarca, L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S79-S84.
- Escudero, J.; Daza, Z.T.; Gil, N.J.; Mora O.Y. (2013). Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 108-117. <http://doi.org//10.15446/rev.colomb.biote>
- Ferrer-Marcelo, Y.; León-Rodríguez, M.; Michelena-Álvarez, G.; Dustet-Mendoza, J.C.; Duque-Ortiz,

- A.; Ibañez-Fuentes, M.L.; Tórtolo-Cabañas, K. (2011). Selección de Hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *ICIDCA*, 45(1), 3-12.
- Gams, W.; Chistensen, M.; Onion, A.H.; Pitt, J.I.; Samson, R.A. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*. Plenum Press, Nueva York, EEUU. p. 55-64.
- Godliving, Y. (2012). Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and assays*, 7(15), 1544 - 1555. <http://doi.org//10.5897/SRE11.1812>.
- González, A.M.; Herrera, J.P.; Rodríguez, A. (2007). Caracterización de fracciones de lignina extraídas del licor negro con solventes orgánicos. *Revista Forestal Latinoamericana*, 42,51-64.
- Grijalva, N. (2013). Degradación de residuos vegetales mediante inoculación con cepas microbianas. *Enfoque UTE*, 4(1), 1-13.
- Kluepfel, D.; Mondou, S.; Morosoli, R. (1986). Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 230-234.
- Kumari, D. & Achal, V. (2008). Effect of different substrates on the production and non-enzymatic antioxidant activity of *Pleurotus ostreatus* (Oyster mushroom). *Life Science Journal*, 5, 73 -76.
- Lara, M.A.; Rodríguez-Malaver, A.J.; Rojas, O.J.; Holmquist, O.; González, A.; Bullón, J.; Peñaloza, N.; Araujo, E. (2003). Blackliquor lignin biodegradation by *Trametes elegans*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 167-173. [http://doi.org//10.1016/S0964-8305\(03\)00055-6](http://doi.org//10.1016/S0964-8305(03)00055-6)
- Laura, J. & Castellanos, P. 2009. Hongos filamentosos con actividades ligninolíticas aislados de *Calamagrostis nitidula* Pilg. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 125-128.
- Llenque-Díaz, L.; Muñoz, M.; Espejo, E.; Moreno, A. (2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. *Ciencia y Tecnología*, 11(4), 39-49.
- Martínez A., Speranza M., Ruiz F., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M., Gutierrez A., Del Río J. 2005. Research Review: Biodegradation of lignocellulosic: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204.
- Méndez, R.; Guerrero, B.; De Jesús, R.; O'Callaghan, J. (2004). Estudio preliminar del *Aspergillus niger* como componente del pienso para ratas de laboratorio. *Agroalimentación & Desarrollo Sustentable*, 5(1), 1-6.
- Ojeda, L.; Noguera, N.; Triana, J.L.; Triana-Alonso, F. (2011). Obtención de un extracto enzimático de glucosa oxidasa y catalasa con potencial antioxidante en alimentos, en un medio de cultivo no convencional. *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, 15(2), 48 – 58.
- Pérez, J.; Muñoz-Dorado, J.; De la Rubia, T.; Martínez J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5:53-63.
- Piña-Guzmán, A.; Nieto-Monteros, N.A.; Robles-Martínez, F. (2016). Utilización de Residuos Agrícolas y Agroindustriales en el Cultivo y Producción del Hongo Comestible Seta (*Pleurotus spp.*). *Rev. Int. Contam. Ambie.* 32 (Especial Residuos Sólidos):141-151. <http://doi.org//10.20937/RICA.2016.32.05.10>
- Ramírez, P. & Cocha, J.M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: Aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celololítica. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 67-77.
- Raper, K.B. & Fennell, D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore. 686 pp.
- Sánchez, C. (2008). Review Lignocellulosic residues: Biodegradation an bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27,185-194. <http://doi.org//10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Schuster, E.; Dunn-Coleman, N.; Frisvad, J.C.; van Dijck P.W.M. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 426–435. <http://doi.org//10.1007/s00253-002-1032-6>.
- Zoghbi, N.; Ojeda, L.; Noguera, N.; Yépez, A.; Camargo, H.; Triana-Alonso, F. (2008). Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 28(1), 31-37.