

DETECCIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS LIGNOCELULOLÍTICAS DE *Chaetomium* spp.

T. TROYA ¹, D. MUÑOZ-MINGARRO ², F. LLINARES ²,
C. RODRÍGUEZ-BORRAJO ², M. YUSTE ², F. RUBIO ²

¹ Área de Industrias Forestales, CIFOR-INIA
Ctra. Coruña km 7,5, 28040-Madrid. España
secifp@inia.es

² Dpto. de Biología, Universidad San Pablo C.E.U.
Ctra. Boadilla del Monte km 5,3 28040-Madrid. España

RESUMEN

La pudrición blanda de la madera en contacto con el suelo suele estar producida por diferentes especies de *Chaetomium*. Por ello, se han estudiado las capacidades lignocelulolíticas de *Chaetomium globosum* y *Chaetomium erraticum*, microflora habitual de la tierra agrícola, mediante los siguientes estudios: formación de biomasa, asimilación de hidratos de carbono, producción de enzimas extracelulares y determinación de actividades lignocelulolíticas (celulasa, xilanasa, lacasa y manganeso peroxidasa). Los sustratos utilizados fueron: glucosa, galactosa, manosa, xilano y celulosa. Se estudió asimismo el efecto del alcohol veratrílico como posible inductor de la actividad ligninolítica.

El conjunto de los resultados muestra que ambas especies poseen una dotación enzimática que permite la degradación de los componentes principales de la madera, sobre todo celulosa y hemicelulosa, si bien esta capacidad es superior en *Chaetomium globosum*.

PALABRAS CLAVE: Pudrición blanda
Actividades celulolíticas
Actividades ligninolíticas
Chaetomium globosum
Chaetomium erraticum

INTRODUCCIÓN

Los principales organismos causantes de la degradación de la madera en contacto con el suelo son los hongos e insectos (categoría de riesgo 4). Entre los microorganismos pro-

Recibido: 1-10-97
Aceptado para su publicación: 8-9-99

ductores de dicha degradación se encuentran los hongos de pudrición blanda. Son muchas las especies que componen esta microflora degradadora, pero se ha observado que *Chaetomium globosum* es el que posee mayor actividad enzimática sobre las paredes de las células leñosas, a la vez que tiene una distribución geográfica muy amplia. Esta es la razón por la que esta especie es de obligada aplicación en la normativa europea correspondiente, para determinar la eficacia preventiva de los productos protectores de la madera contra los organismos causantes de la pudrición blanda (ENV-807). Esta normativa contempla además, la posibilidad de incluir las especies autóctonas de cada país con el fin de que ésta pueda adaptarse a cada una de las condiciones y exigencias regionales particulares. Por ello, el objetivo de este trabajo ha sido comparar la actividad lignocelulolítica de *Chaetomium erraticum*, hongo aislado en España a partir de madera degradada, con la de *Chaetomium globosum*, ya que si su capacidad degradativa fuera relevante, cabría la posibilidad de su inclusión en la norma europea.

Las capacidades degradativas de estos hongos se han estudiado a través de diversos ensayos: formación de biomasa, asimilación de hidratos de carbono, producción de proteínas extracelulares y determinación de las actividades lignocelulolíticas. Se utilizaron como fuentes de carbono algunas de las que se encuentran con mayor frecuencia en las células leñosas (glucosa, galactosa, manosa, xilano y celulosa), con el fin de detectar la influencia de las mismas en estas actividades. Asimismo, se estudió el efecto del alcohol veratrílico como posible inductor de la actividad ligninolítica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas utilizadas

Las especies utilizadas fueron *Chaetomium globosum* cepa 1A CTFT y *Chaetomium erraticum* cepa 18A INIA.

Medios de cultivo

El medio de cultivo usado fue un medio basal salino (Eggins y Plugh, 1962) de la siguiente composición: sulfato amónico, 0,05 %; L-asparagina, 0,05 %; fosfato monopotásico, 0,10 %; cloruro potásico, 0,05 %; sulfato magnésico, 0,02 %; cloruro cálcico, 0,01 % y extracto de levadura, 0,05 %, adicionado con las diferentes fuentes de carbono al 1,00 %. La concentración del alcohol veratrílico, en presencia de glucosa, fue 1 mM.

El medio se ajustó a un pH de 5,2.

Parámetros de desarrollo

Los hongos se inocularon en el medio basal adicionado con las diversas fuentes de carbono en matraces de 250 ml, y se incubaron a 28 ± 2 °C y 80 ± 5 % de humedad relativa, durante cuatro semanas, con una velocidad de agitación constante de 80 r.p.m.

El número de repeticiones fue de tres por hongo y fuente de carbono. Como controles se utilizaron, por una parte, el medio basal con cada uno de los azúcares sin inocular, y por otra, el medio basal inoculado con cada uno de los hongos, pero sin el azúcar.

Transcurrido este tiempo, se realizaron los ensayos que se detallan a continuación.

Determinación de biomasa

La biomasa se determinó por gravimetría. Después del período de incubación, el micelio se recogió en papel Whatman n.º 1, y se determinó el peso seco anhidro.

Determinación de proteínas extracelulares

Las proteínas extracelulares presentes en el filtrado fueron determinadas siguiendo el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para la curva patrón se utilizó seroalbúmina bovina.

Asimilación de hidratos de carbono

La asimilación de hidratos de carbono por los hongos de ensayo se determinó en los filtrados por el método de Miller (Miller *et al.*, 1959).

En los cultivos con monosacáridos como fuente de carbono se analizaron los porcentajes de azúcar residual, y en los cultivos con polisacáridos, se determinó la presencia de grupos reductores.

Determinaciones enzimáticas

Las actividades enzimáticas determinadas han sido: celulasa (CMC endo- β ,1-4 glucanasa) y xilanasas, como celulolíticas y hemicelulolíticas, respectivamente, y lacasa y manganeso peroxidasa, como ligninolíticas.

La actividad se expresó en Unidades Internacionales (UI) de actividad enzimática ($\mu\text{M min}^{-1}$) por mililitro.

Determinación de actividades celulolíticas

Después del período de incubación, el medio fue filtrado a través de papel Whatman n.º 1, y posteriormente a través de un filtro Millipore de 0,22 μm de diámetro. A diferentes tiempos de incubación a 28 °C (1, 2, 4 y 8 h), alícuotas de 1 ml de cada extracto se mezclaron con el mismo volumen de solución de celulosa o xilano, al 0,10 %, disueltos en el medio basal.

Se analizaron las concentraciones de azúcares liberados mediante el método de Miller (1959). Los controles efectuados para cada determinación fueron:

- Un tubo con 1 ml de filtrado al que se añadió 1 ml del reactivo de Miller y 1 ml de la solución del hidrato de carbono correspondiente a tiempo cero (control 1).

- Otro tubo con 1 ml del filtrado al que tras el tiempo de incubación se le añadió 1 ml del reactivo de Miller y 1 ml de la solución del hidrato de carbono correspondiente (control 2).

Ambos controles se realizaron para conocer los grupos reductores presentes en el filtrado y los producidos en el mismo durante el tiempo de incubación, no atribuibles a la hidrólisis de los polisacáridos utilizados como sustrato.

- Un tercer tubo con 1 ml de filtrado al que se añadió, a tiempo cero, 1 ml de la solución del hidrato de carbono correspondiente. Tras la incubación, la reacción se paró añadiendo 1 ml del reactivo de Miller.

Para la curva de calibrado de la celulosa, se utilizó glucosa, y para las de xilano, xilosa, a concentraciones comprendidas entre 0,005 y 0,200 % (p/v).

Determinación de actividades ligninolíticas

La actividad lacasa se determinó a partir de los filtrados obtenidos, aplicando el método colorimétrico con el reactivo 2-2' azinobis-3 etilbenzotiazolin-6-sulfonato de diamonio (ABTS) (Bourbonnais y Paice, 1990). La manganeso peroxidasa fue determinada por el método del Rojo de fenol (Paszczynski *et al.*, 1988).

Estudio estadístico

Los datos obtenidos de cada una de las réplicas, con las diferentes fuentes de carbono para los hongos de ensayo, se contrastaron entre sí mediante un análisis de la varianza, seguido de una prueba de la t de Student en los casos en que se obtuvieron diferencias significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se reflejan las diferencias significativas para $p < 0,05$ y $p < 0,01$ encontradas al aplicar el análisis de la varianza (ANOVA) con dos factores de variación (la especie fúngica y el sustrato utilizado para su crecimiento). Todas las variables estudiadas mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los sustratos utilizados y en interacción especie fúngica \times sustrato.

La producción de biomasa expresada en miligramos de micelio seco, se muestra en la Tabla 2, donde puede observarse que ambas especies son capaces de desarrollarse en una amplia variedad de sustratos carbonados, especialmente polisacáridos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores, como Kanotra y Mathur (1955), que observaron que *Chaetomium globosum* era capaz de producir gran cantidad de micelio en cultivos con celulosa como única fuente de carbono, en sólo tres días de incubación.

TABLA 1

VALORES DE F DEL ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) REALIZADO PARA CADA VARIABLE CON LOS DATOS CORRESPONDIENTES A *Chaetomium globosum* Y *Ch. erraticum* DESARROLLADOS SOBRE SEIS SUSTRATOS

*F values of ANOVA realized for each variable with the corresponding data to *Chaetomium globosum* and *Ch. erraticum* developed on six substrates*

VARIABLE	F hongos (df = 1)	F sustratos (df = 5)	F interacción (df = 5)
Biomasa	9,04 (ns)	16,23 **	40,79 **
Prot. extracelular	41,99 (ns)	541,65 **	35,34 **
Azúcar residual	3,45 (ns)	25,23 **	15,95 *
Xilanasas	1008,58 **	192,00 **	94,58 **
Celulasa	79,39 (ns)	34,64 **	39,30 **
Lacasa	95,91 (ns)	15,15 *	13,92 *
Mn-peroxidasa	1288,22 **	345,70 **	378,33 **

(ns) diferencias no significativas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

TABLA 2

MEDIA DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA (mg) Y DESVIACIÓN TÍPICA DE LOS HONGOS ENSAYADOS SOBRE LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO ¹

Average of the production of biomass (mg) and standard deviation of the fungi tested using different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	BIOMASA (mg)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	82 ± 10 ^{b,c,d}	147 ± 30 ^{c,d,e}
Galactosa	97 ± 30 ^{c,d}	62 ± 10 ^{b,c}
Manosa	55 ± 19 ^b	152 ± 29 ^{c,d}
Glu + A. veratrílico	106 ± 30 ^{c,d}	29 ± 10 ^a
Xilano	290 ± 10 ^g	163 ± 50 ^{c,d,e}
Celulosa	251 ± 20 ^f	184 ± 39 ^{b,e}

¹ En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para $p < 0,05$, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

La producción de proteínas extracelulares en el filtrado se expresa en mg/ml, y los resultados se muestran en la Tabla 3. Las concentraciones encontradas fueron similares para ambos hongos cuando las fuentes de carbono utilizadas fueron monosacáridos, mientras que en presencia de alcohol veratrílico y de xilano se obtuvieron valores superiores. Estas

TABLA 3
MEDIA DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES (mg/ml)
Y DESVIACIÓN TÍPICA DE LOS HONGOS ENSAYADOS SOBRE LAS
DIFERENTES FUENTES DE CARBONO *

Average of the production of extracellular proteins (mg/ml) and standard desviation of the tested fungi in different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	PROTEÍNAS EXTRACELULARES (mg/ml)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	0,045 ± 0,01 ^a	0,043 ± 0,03 ^a
Galactosa	0,100 ± 0,03 ^d	0,100 ± 0,02 ^d
Manosa	0,055 ± 0,02 ^b	0,075 ± 0,01 ^c
Glu + A. veratrílico	0,357 ± 0,03 ^g	0,243 ± 0,02 ^f
Xilano	0,687 ± 0,06 ^h	0,426 ± 0,15 ^g
Celulosa	0,105 ± 0,04 ^d	0,156 ± 0,02 ^e

* En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para p < 0,05, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

concentraciones mayores podrían estar relacionadas con la regulación de la síntesis de enzimas extracelulares, al igual que ocurre en Basidiomicetos. En estos hongos, la producción de celulasas y de enzimas hemicelulolíticas y ligninolíticas, se encuentra reprimida por monosacáridos y favorecida por oligosacáridos y disacáridos. Estos últimos se producirían como consecuencia de la acción de enzimas constitutivas (celulasas, xilanasas, mananasas), sobre el material lignocelulósico (Broda, 1992). El efecto del alcohol veratrílico podría tener una doble interpretación. En el caso de *Chaetomium globosum*, el alcohol podría actuar como un inductor de la síntesis de enzimas extracelulares, al igual que sucede en algunos hongos Basidiomicetos incubados en presencia de compuestos fenólicos (Freitag y Morrell, 1991; Johansson y Nyman, 1992). Las mayores actividades manganeso peroxidasa xilanasas y celulasas obtenidas en este trabajo, confirman estos resultados. En *Chaetomium erraticum*, sin embargo, no se encuentra paralelismo entre el aumento de la concentración de proteínas y las actividades enzimáticas estudiadas. Estos resultados podrían deberse, entre otras causas, a una posible lisis celular por el efecto tóxico de los fenoles, con la consiguiente salida de proteínas intracelulares al medio, o bien, a otro tipo de actividades enzimáticas no analizadas en este trabajo. En lo que se refiere a la posible autólisis fúngica, habría que señalar que, en general, las actividades enzimáticas estudiadas no parecen atribuibles, en principio, a procesos de ruptura celular. Los porcentajes de azúcares residuales encontrados tras el período de incubación indican que la fuente de carbono presente en el medio no ha sido agotada, por lo que las actividades detectadas corresponderían a la acción de enzimas extracelulares.

En la Tabla 4 se reflejan las concentraciones (en porcentaje) de azúcares residuales, para el caso de los monosacáridos y de azúcares reductores que aparecen como consecuencia de la actividad enzimática. El consumo de la fuente de carbono no parece estar relacionado ni con la producción de exoenzimas, ni con la biomasa obtenida, ya que, como apuntan Freitag y Morrell (1991), el mayor crecimiento que se observa en presencia

TABLA 4
MEDIA DE LAS CONCENTRACIONES (%) Y DESVIACIÓN TÍPICA DE AZÚCARES RESIDUALES O REDUCTORES OBTENIDOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS HONGOS ENSAYADOS SOBRE LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO *

Average of the concentrations (%) and standard deviation of residual or reductor sugars obtained as a consequence of enzymatic activity of the tested fungi in different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	AZÚCARES RESIDUALES O REDUCTORES (%)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	0,170 ± 0,10 ^h	0,155 ± 0,01 ^g
Galactosa	0,295 ± 0,10 ^j	0,060 ± 0,00 ^e
Manosa	0,175 ± 0,07 ^h	0,215 ± 0,03 ⁱ
Glu + A. veratrílico	0,054 ± 0,02 ^{c,d}	0,101 ± 0,01 ^f
Xilano	0,057 ± 0,02 ^d	0,052 ± 0,01 ^c
Celulosa	0,005 ± 0,00 ^a	0,042 ± 0,04 ^b

* En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para $p < 0,05$, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

de polisacáridos no está en consonancia con el bajo nivel de azúcares reductores. Esto podría ser debido a una rápida asimilación de los fragmentos reductores que aparecen como consecuencia de la acción endohidrolítica de estas enzimas.

Los bajos porcentajes de azúcares reductores detectados en los medios con xilano y celulosa pueden ser atribuidos a la dificultad de las cepas ensayadas para metabolizar estos sustratos. Por tanto, hasta que la hidrólisis de estas macromoléculas no se encuentre avanzada, la detección de grupos reductores apreciables es escasa.

Los resultados correspondientes a la actividad xilanasa se recogen en la Tabla 5, en mUI/ml. Esta actividad es significativamente menor en *Chaetomium erraticum*, y en ambas especies sólo aparece en presencia de polisacáridos, lo que podría estar relacionado con la inhibición que provocan los monosacáridos sobre la síntesis enzimática. Diversos investigadores han puesto de manifiesto que la producción de xilanasas está fuertemente influenciada por la naturaleza de la fuente de carbono. En este sentido, Kubackova (Kubackova *et al.*, 1975), demostraron que en algunos Basidiomicetos, la síntesis de estas enzimas está totalmente inhibida en presencia de monosacáridos. Wiacek *et al.* (1994) mostraron, asimismo, que en *Chaetomium globosum* y *Ch. cellulolicum* sólo aparecen elevadas concentraciones de xilanasas en presencia de hemicelulosas y celulosa.

Las actividades celulásicas se exponen en la Tabla 6 (en mUI/ml). Cuando se detecta esta actividad, es mayor en *Chaetomium globosum* que en *Ch. erraticum*, y se incrementa en el primero en presencia de alcohol veratrílico. La inducción de actividades celulolíticas por fenoles es un hecho que ya ha sido demostrado en *Phanerochaete chrysosporium* por Ericksson y Hamp (1978). En esta especie la degradación de la madera se produce como consecuencia de la acción sinérgica de un complejo enzimático que incluye la manganeso peroxidasa y la celulasa. Finalmente, cabe destacar que esta actividad en *Chaetomium globosum* sólo es atribuible a la endo- β -1,4 glucanasa (Keilich *et al.*, 1970; Bailey *et al.*, 1972).

TABLA 5
MEDIA DE LA ACTIVIDAD XILANASA DETECTADA (mUI/ml) Y
DESVIACIÓN TÍPICA EN LOS HONGOS ENSAYADOS SOBRE LAS
DIFERENTES FUENTES DE CARBONO *

Average of xylanase activity (mUI/ml) and standard deviation detected in the tested fungi in different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	ACTIVIDAD XILANASA (mUI/ml)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	0,00	0,00
Galactosa	0,00	0,00
Manosa	0,00	0,00
Glu + <i>A. veratrífico</i>	0,00	0,00
Xilano	1,32 ± 0,09 ^c	0,15 ± 0,09 ^a
Celulosa	0,62 ± 0,07 ^b	0,00

* En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para p < 0,05, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

TABLA 6
MEDIA DE LA ACTIVIDAD CELULASA DETECTADA (mUI/ml) Y
DESVIACIÓN TÍPICA EN LOS HONGOS ENSAYADOS SOBRE LAS
DIFERENTES FUENTES DE CARBONO *

Average of cellulase activity (mUI/ml) and standard deviation detected in the tested fungi in different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	ACTIVIDAD CELULASA (mUI/ml)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	0,00	0,00
Galactosa	0,00	0,00
Manosa	0,00	0,00
Glu + <i>A. veratrífico</i>	0,30 ± 0,10 ^d	0,00
Xilano	0,06 ± 0,02 ^c	0,03 ± 0,01 ^b
Celulosa	0,08 ± 0,02 ^c	0,01 ± 0,00 ^a

* En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para p < 0,05, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

Sería conveniente señalar que la ausencia de actividad xilanasa y celulasa en presencia de monosacáridos podría atribuirse a una represión por producto final, tal como indica Varadi (1972) para otros hongos.

Los resultados correspondientes a las actividades ligninolíticas, lacasa y manganeso peroxidasa, expresados en mUI/ml para la primera y μ UI/ml para la segunda, se muestran en las Tablas 7 y 8, respectivamente. La actividad lacasa se detecta únicamente en presen-

TABLA 7
MEDIA DE LA ACTIVIDAD LACASA DETECTADA (mUI/ml)
Y DESVIACIÓN TÍPICA EN LOS HONGOS ENSAYADOS
SOBRE LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO *

Average of laccase activity (mUI/ml) and standard deviation detected in the tested fungi in different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	ACTIVIDAD LACASA (mUI/ml)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	0,00	0,00
Galactosa	0,00	0,00
Manosa	0,00	0,00
Glu + A. veratrílico	0,00	0,00
Xilano	0,54 ± 0,17 ^{a,b}	2,50 ± 0,92 ^c
Celulosa	0,27 ± 0,12 ^a	1,11 ± 0,41 ^{b,c}

* En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para p < 0,05, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

TABLA 8
MEDIA DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDASA DETECTADA
(μUI/ml) Y DESVIACIÓN TÍPICA EN LOS HONGOS ENSAYADOS SOBRE
LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO *

Average of manganese peroxidase activity (μUI/ml) and standard deviation detected in the tested fungi in different carbon sources

HIDRATOS DE CARBONO	ACTIVIDAD Mn PEROXIDASA (μUI/ml)	
	<i>Ch. globosum</i>	<i>Ch. erraticum</i>
Glucosa	3,82 ± 0,94 ^e	0,67 ± 0,27 ^{b,c}
Galactosa	1,69 ± 0,72 ^d	1,12 ± 0,42 ^{c,d}
Manosa	0,42 ± 0,18 ^b	0,00
Glu + A. veratrílico	8,91 ± 2,67 ^f	0,67 ± 0,32 ^{b,c}
Xilano	6,72 ± 1,49 ^f	1,47 ± 0,87 ^{b,c,d}
Celulosa	24,50 ± 5,64 ^g	0,10 ± 0,02 ^a

* En los superíndices, la(s) misma(s) letra(s) indican diferencias no significativas en la t de Student para p < 0,05, tanto entre los datos correspondientes a la misma columna como entre ambas columnas.

cia de polisacáridos, y es significativamente más elevada en *Chaetomium erraticum*. En algunos hongos se ha demostrado que la degradación de polisacáridos se debe a la acción de enzimas hidrolíticas y oxidativas, que darían lugar a quinonas o radicales fenólicos (Westermarck y Ericksson, 1974). Este hecho pone nuevamente de manifiesto la interrelación existente entre los sistemas enzimáticos que intervienen en la degradación de la madera. En cuanto a la actividad manganeso peroxidasa, en general, es mucho menor que las

celulásicas y hemicelulásicas, como cabe esperar en los hongos causantes de la pudrición blanda. En esta línea, Levi y Preston (1965) comprobaron que madera de *Fagus sylvatica* atacada por *Chaetomium globosum* sufría una pérdida de peso del 12 % en la lignina y del 80 % en hemicelulosas y celulosas. Por otra parte, la actividad manganeso peroxidasa parece ser constitutiva en *Chaetomium globosum* y no en *Ch. erraticum*, ya que aparece en el primero en presencia de todos los sustratos ensayados.

CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, puede afirmarse que en los medios con polisacáridos (celulosa y xilano), *Chaetomium globosum* presenta actividad celulasa, xilanasa y manganeso peroxidasa significativamente mayor a las de *Ch. erraticum*, mientras que éste manifiesta mayor actividad lacasa. Por todo ello, cabría deducir que *Chaetomium globosum* posee una dotación enzimática más completa y eficaz que *Ch. erraticum*, capaz de degradar los componentes lignocelulósicos de la madera. Estas actividades serían, por tanto, hemicelulolíticas y celulolíticas, y en menor medida ligninolíticas dependientes de manganeso.

Los ensayos realizados *in vitro* con las dos especies de *Chaetomium* muestran una menor capacidad degradativa en *Chaetomium erraticum* con respecto a *Ch. globosum*. Por tanto, manifestaría una menor agresividad en la descomposición de la madera en contacto con el suelo expuestas a fuentes de humedad constantes. Por ello, en un principio, *Chaetomium erraticum* no sería adecuado para ser utilizado como cepa complementaria, en los ensayos de la normativa correspondiente para determinar la eficacia de los productos protectores de la madera, expuesta a categorías de riesgo 4 (maderas en contacto con el suelo).

No obstante, con el fin de poder esclarecer ciertos aspectos, sería conveniente llevar a cabo otros estudios, como son: determinar la posible inducción de las actividades celulasa, xilanasa y manganeso peroxidasa por el alcohol veratrílico y otros fenoles; detectar la posible existencia de exoglucanasas en *Chaetomium erraticum* y estudiar si la actividad lacasa se induce por productos procedentes de la degradación de polisacáridos, tal y como ocurre en Basidiomicetos.

SUMMARY

Detection of lignocellulolytic enzymatic activities of *Chaetomium* spp.

Soft rot in wood in contact with soil is usually produced by different species of *Chaetomium*. For this reason, the lignocellulolytic capacities of *Chaetomium globosum* and *Chaetomium erraticum*, microflora habitually found in farmland, have been studied considering the following tests: formation of biomass, assimilation of carbohydrates, production of extracellular enzymes, and determination of lignocellulolytic activities (cellulase, xylanase, laccase and manganese peroxidase). The substrates used were: glucose, galactose, mannose, xylan and cellulose. The effect of veratryl alcohol as a possible inductor of lignocellulolytic activity was analysed as well. The combined results prove that both species exert show enzymatic capacity which allows the degradation of the principal components of wood, above all, cellulose and hemicellulose. This capacity is seen to be significantly higher in *Chaetomium globosum*.

KEY WORDS: Soft rot fungi
Cellulolytic activities
Ligninolytic activities
Chaetomium globosum
Chaetomium erraticum

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANONIMOUS, 1993. ENV-807. Wood preservatives. Determination of the toxic effectiveness against soft-rotting micro-fungi and other soil inhabiting micro-organisms. European Committee for Standardization, Bruxelles.
- BAILEY P.J., KEILICH G., HAUSEMAN E., 1972. Isolation and characterization of cellulase (β -1,4-glucan 4-glucanohydrolase) from *Chaetomium globosum* Kunze. *Material und Organismen* 7, 27-43.
- BOURBONNAIS R., PAICE M. G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters* 267, 99-102.
- BRODA P., 1992. Biotechnology in the degradation and utilization of lignocellulose. *Biodegradation* 3, 219-238.
- EGGINS H.O.W., PLUGH G.J.F., 1962. Isolation of cellulose the comparing fungi from soil. *Nature* 193 (581), 94-95.
- ERIKSSON K.E., HAMP, S.G., 1978. Regulation of endo-1,4- β -glucanase production in *Sporotridium pulverulentum*. *European Journal of Biochemistry* 90, 183-190.
- FREITAG M., MORRELL J.J., 1991. Changes in selected enzyme activities during growth of pure and mixed cultures of the white rot decay fungus *Trametes versicolor* and the potential biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 38, 317-323.
- JOHANSSON T., NYMAN P. O., 1993. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from white rot Basidiomycete *Trametes versicolor*. Isolation of enzyme forms and characterization of physical and catalytic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 300 (1), 49-56.
- KANOTRA S., MATHUR R. S., 1995. Simple cultural test for relative cellulolytic activity of fungi. *Indian Phytopathology* 48, 483-488.
- KEILICH G., BAILEY P., LIESE W., 1970. Enzymatic degradation of cellulose, cellulose derivatives and hemicelluloses in relation to the fungal decay of wood. *Wood Science and Technology* 4, 273-283.
- KUBACKOVA M., KARACSONYI S., VARADI J., 1975. Studies on xylanase from Basidiomycetes. Selection of strains for the production of xylanase. *Folia Microbiol.* 20, 29-37.
- LEVI M.P., PRESTON R.D., 1965. A chemical and microscopic examination of the action of the soft rot fungus (*Chaetomium globosum*) on beech wood (*Fagus sylvatica*). *Holzforschung* 19, 183-190.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal Biol. Chem.* 193, 265-275.
- MILLER G.L., BLUM R., GLENNON W.E., BURTONA L., 1959. Measurement of carboxymethyl cellulose activity. *Analytical Biochemistry* 2, 127-132.
- PASZCYNYSKI A., CRAWFORD R.L., HUYNH V.N., 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods in Enzymology* 161, 264-270.
- VARADI J., 1972. The effect of aromatic compounds on cellulase and xylanase production of fungi *Schizophyllum commune* and *Chaetomium globosum*. In: *Biodeterioration of Materials*, Vol. 2, eds. A. H. Walters & E. H. Hueck-van der Plas, Applied Science, London, pp. 129-135.
- WESTERMARK U., ERICKSSON K.E., 1974. Carbohydrate-dependent enzyme quinone reduction during lignin degradation. *Acta Chem. Scand.* 28, 204-208.
- WIACEK-ZYCHLINSKA A., CZAKAJ J., SAWICKA-ZUKOWSKA R., 1994. Xylanase production by fungal strains in solid-state fermentations. *Bioresources Technology* 49, 13-16.