

UNA ESTIRPE DE *EUROTIVM ECHINULATUM* DELACR. AISLADA DE UN VERTISUELO

por

C. SAIZ-JIMENEZ

INTRODUCCION

Durante un estudio micológico de vertisuelos (tierras negras andaluzas) se aisló, entre otras, una especie de *Eurotium*, identificada en el C. B. S., Baarn (Ho'anda), como *Eurotium umbrosum* (Bain. y Sart.) Malloch y Cain. Posteriormente, dado que los tamaños de las ascosporas no coincidían plenamente con los de nuestra especie, se reconsideró tal identificac.ón, incluyéndose dentro de *E. echinulatum* Delacr.

Eurotium echinulatum fue descrito por Delacroix en 1893, y en 1926 este nombre fue considerado como sinónimo por Thom y Church, quienes propusieron el de *Aspergillus echinulatus* (Delacr.) Thom y Chuch. En los manuales del género *Aspergillus* (16 y 27) se conserva este último. Sin embargo, en 1972 ya se recoge, en la clave para estados perfectos de *Aspergillus*, la especie *E. echinulatum* (26).

Aspergillus echinulatus (*) estado conidial, es un hongo perteneciente al grupo *A. glaucus*, caracterizado por sus propiedades osmófilas. Muy pocos trabajos se han efectuado sobre los metabolitos de esta especie, poniéndose de manifiesto la existencia de diversos pigmentos en los micelios, tales como flavoglaucina, fisción y eritroglaucina (1 y 6). Posteriormente se encontró, también, equinulina y auroglaucina (15).

(*) En el presente trabajo nos referimos a *A. echinulatus* cuando se cita algún texto de la bibliografía en que los autores lo utilizan.

Los metabolitos producidos por *Eurotium echinulatum* se han estudiado recientemente, identificándose 13 antraquinonas, 20 derivados fenólicos, además de flavoglaucina y equinulina (21-23), así como un pigmento de tipo húmico, que se ha caracterizado físico-químicamente (17-20 y 24).

Dado el evidente interés de esta especie, en función de la elevada cantidad de metabolitos que sintetiza, y lo raramente que ha sido aislada del suelo, se describen a continuación sus características morfológicas y parte de las fisiológicas, no publicadas anteriormente.

MATERIAL Y METODOS

La especie se aisló en 1970 de una tierra negra de El Sorbito, Utrera (Sevilla), soportando una vegetación natural de gramíneas. Para ello se utilizó el método de las suspensiones-diluciones (14), sembrado en placas de Czapek-agar. Las características morfológicas y culturales se examinaron en los medios de Czapek-agar, Czapek-sacarosa 20 %-agar, Czapek-sacarosa 70 %-agar, malta-agar y malta-sacarosa 40 %-agar.

Las características fisiológicas se estudiaron en los medios líquidos de Czapek-glucosa, Czapek-glucosa 20 %, glucosa-asparagina, además de uno empleado por nosotros, que proporcionó buenos resultados, consistente en glucosa, 30 g; NO_3Na , 2 g; asparagina, 1,7 g; PO_4HK_2 , 1 g; ClK , 0,5 g; SO_4Mg , 0,5 g; CO_3Ca , 1 g; extracto de suelo (preparado utilizando 1 kg del mismo suelo donde se aisló la especie, del que se obtuvieron 500 cm^3 , siguiendo el método de Pochon y Tardieux (14)), 250 cm^3 y agua destilada c. s. p. 1.000 cm^3 . El pH se ajustó a 6, lo mismo que los anteriores.

La determinación del peso de micelios se efectuó secando a peso constante a 105 °C durante 24 h. Para la obtención del pigmento de tipo húmico, el medio de cultivo filtrado se acidificó con ClH hasta pH 1. El precipitado se trató como los ácidos húmicos de suelos, para su purificación (18).

RESULTADOS

La descripción de la especie es la siguiente:

«Las colonias crecen en medio de Czapek-agar muy restringidamente y alcanzan un diámetro de 1,5 cm en dos semanas, a 25 °C, en relieve, algo flocosas, amarillo-naranjas a pardas, producen ascomas abortivos en número limitado y con abundantes estructuras conidiales, especialmente en los márgenes de la colonia. Reverso naranja-pardo.

Las colonias, en ma'ta-agar, alcanzan un diámetro de 1,5 cm en 2 semanas, a 25 °C, flocosas, rojo-marrón, producen pocos ascomas abortivos y estructuras conidiales. Reverso rojo oscuro a marrón.

Las colonias alcanzan un diámetro de 3 cm en 2 semanas, a 25 °C, en un medio Czapek-sacarosa 20 %-agar, consistentes en un micelio basal amarillo a naranja, algo flocoso, en el cual están incluidos numerosos ascomas amarillos. Las estructuras conidiales se producen abundantemente, proyectando hacia arriba la capa ascomática y dando al cultivo una apariencia verdosa. Reverso, amarillo a rojizo marrón. Las hifas vegetativas son hialinas, profusamente incrustadas de gránulos amarillos y rojo-naranja, de 2-4 μ de diámetro. Los ascomas son amarillos, globosos a subglobosos, de 100-160 μ de diámetro, madurando a las 3-4 semanas. El peridio consiste en una capa de células poligonales, amarillas, de paredes relativamente finas. Asco globoso a subgloboso, octoesporado, de 16-18 por 15-17 μ (*figura 1c*). Las ascosporas varían de hialinas a verdosas, lenticulares, cuyo tamaño global es de 7,5-9,2 por 5-7 μ de diámetro, provistas de 2 surcos ecuatoriales, bien separados, irregulares, de cerca de 0,5-1 μ de ancho, rugoso en el área ecuatorial, surcos poco profundos a pronunciados, con las partes convexas lisas o casi lisas (*figura 1d*). Las cabezas conidiales son radiadas, de cerca de 200-300 μ de diámetro; los conidióforos, lisos, incoloros al principio, después pardos, especialmente en las partes apicales, de 300-600 μ de longitud, por 8-10 μ de diámetro, con el ápice ensanchándose gradualmente hacia las vesículas, vesículas apicales de 20-55 μ de diámetro (*figura 1a*). Las fiálides, en una serie simple, de 10-12,5 por 4,5-6 μ . Los conidios, verdosos, equinulados, elipsoides a subglobosos, a menudo muestran una pequeña base truncada,

a causa del conectivo adherido, variable en tamaño, usualmente de 7-8 μ de diámetro, a veces mayor o menor (figura 1b).

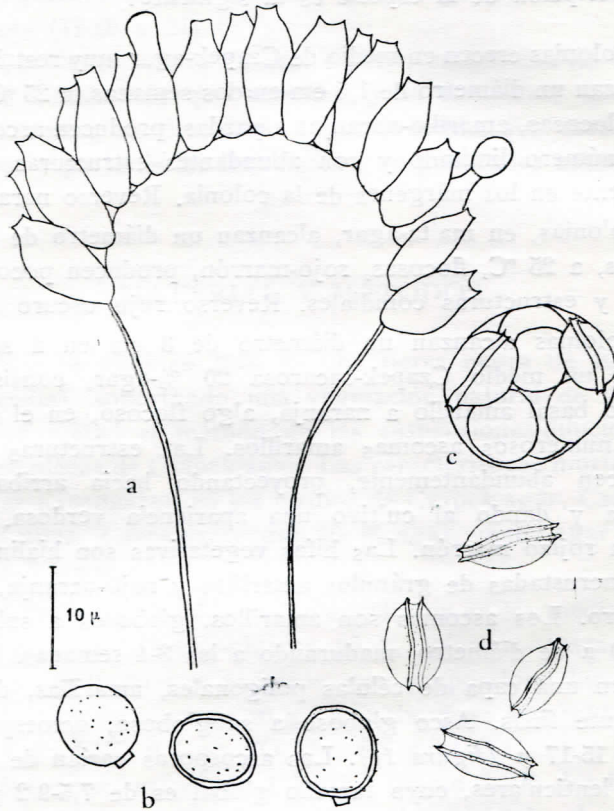


Figura 1. *E. echinulatum* Delacr. a) cabeza conidial; b) conidios; c) asco; d) ascosporas

Las colonias se difunden ampliamente en malta-sacarosa 40 %-agar, alcanzando un diámetro de 8 cm en 8 días; consisten en un micelio basal flocoso, rojizo-marrón, que sostiene pocas estructuras conidiales y ascomas esparcidos, cubiertos por una trama hifal de textura muy suelta, produciendo, a menudo, hifas aéreas muy largas y radiadas, con numerosas estructuras conidiales y de color verdoso. Reverso amarillo-naranja a pardo

Las colonias alcanzan un diámetro de 5,5 cm en 2 semanas, a 25 °C, en Czapek-sacarosa 70 %-agar, y consisten en un micelio muy suelto, flooso, que produce muchas estructuras conidiales verdes. Los ascomas son escasos o faltan. Reverso incoloro, verdoso o amarillento 25)».

Un cultivo de la especie descrita se depositó en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (Holanda), con el número 886.71.

Los medios de cultivo elegidos para la producción del pigmento de tipo húmico se distribuyeron, según la fuente de nitrógeno, en dos grupos: uno formado por el medio de Czapek-glucosa y Czapek-glucosa 20 %, cuya fuente de nitrógeno es inorgánica (NO_3Na), y otro formado por el medio glucosa-asparagina y glucosa-nitrógeno mixto, cuyo nitrógeno es orgánico (asparagina). Este último medio está justificablemente incluido en el segundo grupo, puesto que el pigmento de tipo húmico aislado de él posee las mismas características que el obtenido del medio glucosa-asparagina, estimándose que esta última influye más en las condiciones del medio que el NO_3Na .

En el cuadro 1 se muestra el pH final de los medios de Czapek-glucosa 20 %-asparagina, el peso seco de micelios, el peso de pigmento de tipo húmico y la razón E_4/E_6 de cada medio, elegidos ambos como representativos de cada grupo, ya que no se encontraron diferencias entre los componentes de cada uno, respecto al pigmento. Los pesos se expresan en g/l.

Cuadro 1. Características de dos medios de cultivo de *E. echinulatum*

	pH	Peso del micelio	Peso del pigmento	E_4/E_6
Czapek-glucosa 20 %	4,2	9,1	3,0	2,9
Glucosa-asparagina	7,8	5,4	3,0	2,3

Se ha controlado a lo largo del período de incubación la evolución del pH y la producción del pigmento de tipo húmico. En la figura 2 se muestra la referente al medio glucosa-asparagina, en la que se observa cómo poco después del comienzo de la incubación,

a los 7 días, el pH baja desde su valor inicial hasta 5,5 y luego a 5,4, acidez que permanece constante hasta las 70 días, en que se produce una subida a valores cercanos a la neutralidad y, posteriormente, hasta valores débilmente alcalinos.

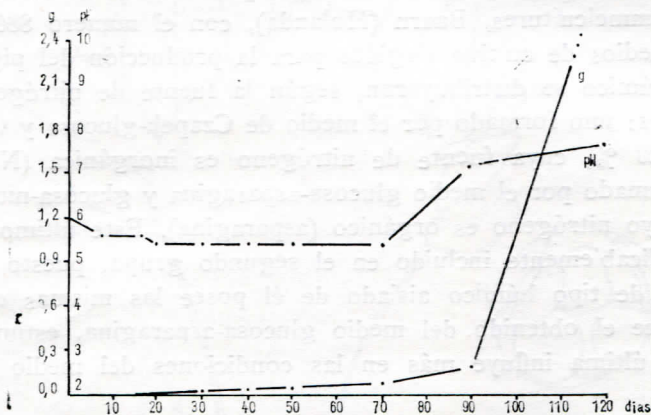


Figura 2. Evolución del pH y de la producción de pigmento de tipo húmico en un cultivo de *E. echinulatum*

Respecto a la síntesis del pigmento, durante los primeros 17 días no existe producción, apareciendo trazas a los 18 días, a partir de los cuales va aumentando la cantidad progresivamente hasta los 90 días, en que se aprecia una brusca subida, coincidente con la del pH.

El pigmento de tipo húmico presenta las siguientes características (media de los valores de los cuatro medios de cultivo): composición elemental, 61,5 % de C, 4,2 % de H, 31,8 % de O, y 2,5 % de N. Grupos funcionales, expresados en meq/g: 8,6 de acidez total; 2,0 de carboxilos; 6,5 de hidroxilos fenólicos; 0,7 de hidroxilos alcohólicos; 3,5 de carbonilos; 0,4 de metoxilos. Los espectros visible y ultravioleta muestran inflexiones a 500, 380, 300, 275, 255 y 230 nm, en medio alcalino. El espectro infrarrojo muestra bandas a 3.390 (hidroxilos), 2.900 (C-H alifáticos), 2.600 (OH de carboxilos), 1.700 (C = O carboxílico), 1.600 (C = C aromático), 1.450 (CH₂), 1.380 (C-CH₃), 1.210 y 1.160 (C-O y OH de

fenoles), 1.050 (C-O y OH de alcoholes), 1.005 y 850 cm^{-1} (C-H y núcleos bencénicos sustituidos). El espectro del pigmento acetinado presenta, además, bandas a 1.770 y 1.190 (acetatos fenólicos) y a 1.670 cm^{-1} (C = O quinónicos). El peso molecular medio, determinado por sephadex, fue de 33.600.

La degradación química del pigmento liberó entre un 45 y 60 % de sustancias solubles en éter, de las cuales un 20 a 30 % pertenecían a compuestos fenólicos, y el resto a antraquinonas, antronas, derivados antracénicos y otros compuestos no identificados. Estos fenoles y antraquinonas fueron los mismos que se identificaron en el medio de cultivo durante las primeras etapas del período de incubación (17, 21 y 23).

Entre un 5 y 10 % en peso del polímero corresponde a antraquinonas adsorbidas, pudiendo ser liberadas mediante filtración por sephadex, tratamiento con hidróxido bórico o ditionito sódico. Además, entre un 8 y 20 % de la molécula está formada por proteínas o péptidos, que se liberan como aminoácidos por hidrólisis ácida con ClH 6 H (8 y 13). También un pequeño porcentaje, no determinado, de polisacáridos está presente en el pigmento, como muestran los estudios de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (5).

En el medio de cultivo tienen lugar reacciones de oxidación enzimática y no enzimática, que originan el polímero a partir de los fenoles y proteínas existentes. El tipo de uniones entre las distintas unidades aromáticas del pigmento sería por adiciones nucleofílicas y establecimiento de enlaces C-C y C-O-C. Es posible que parte de las antraquinonas se encuentren unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, aunque se ha demostrado la posibilidad de enlaces C-C entre las posiciones C-4 y C-5 de antraquinonas con el resto de las unidades aromáticas (17).

Las proteínas se unen al pigmento mediante adición nucleofílica del aminoácido N-terminal a fenoles, durante la oxidación de estos últimos y por desaminación oxidante (7 y 17). Los polisacáridos parecen estar adsorbidos o co-precipitan durante la extracción y acidificación del pigmento. La existencia de éstos es común a todos los pigmentos fúngicos, de tipo húmico, estudiados (5).

DISCUSION

Los tamaños de las ascosporas de la especie aislada concuerdan bien con los de la C. B. S. 117.46, considerada por Thom y Raper (27) como representativa de *Aspergillus umbrosus*, aunque son ligeramente mayores que los tamaños dados por Raper y Fennell (16) para esta última. Sin embargo, los prominentes e irregulares surcos ecuatoriales de las ascosporas son típicos de *A. echinulatus*.

Según Fennell (2), que examinó la estirpe, ésta podía incluirse dentro de *Eurotium echinulatum*, siendo de la misma opinión Stolk (25), quien la considera como *E. echinulatum*, a causa de los surcos ecuatoriales que ornamentan las ascosporas. Los tamaños de éstas están en el límite inferior de la especie, pero concuerdan razonablemente con la descripción de Raper y Fennell (16).

La elevada producción de compuestos aromáticos por hongos está, sin duda, relacionada con su crecimiento en medios ricos en glucosa o, al menos, en condiciones ambientales anormales.

Según Packter (12), la excesiva producción de fenoles por hongos pudiera reflejar una falta de control de la entrada de glucosa en el micelio, incrementándose la formación de acetyl- y malonyl-CoA, que aumenta la síntesis de lípidos y fenoles.

Packter y Collins (13) observaron que *Aspergillus fumigatus*, que produce derivados fenólicos, consume todo el nitrógeno del medio en 24 h, período durante el cual no existe producción apreciable de fenoles. A partir de entonces disminuye el contenido en proteínas del micelio y se incrementa la producción de fenoles. Es muy posible que algo similar suceda en *Eurotium echinulatum*, donde la producción de elevadas cantidades de fenoles y antraquinonas es un hecho constante. Gatenbeck y Sjolund (4) relacionaron, también, la síntesis de antraquinonas por *Penicillium islandicum* con el agotamiento del nitrógeno del medio.

El cuadro 1 muestra el bajo pH final del medio de Czapek, mientras que el de glucosa-asparagina presenta un pH débilmente alcalino. Según Lilly (10), el descenso de pH en el medio puede deberse a dos tipos de metabolismo: producción de ácidos orgánicos y desigual utilización o excreción de cationes y aniones.

El pH ácido del medio de Czapek puede atribuirse a una serie de

factores, tales como la elevada concentración de glucosa, bajo contenido en nitrógeno, medio mineral, los cuales favorecen la producción de acetil-CoA y producción de compuestos aromáticos de carácter ácido (fenoles y antraquinonas), y/o también a la casi completa utilización de elementos minerales con el consiguiente anulamiento del efecto tampón en el medio. No se ha demostrado en este caso la producción de ácidos orgánicos.

El pH débilmente alcalino del medio glucosa-asparagina se debe a la autólisis de los micelios. Aquélla se caracteriza por una pérdida de peso y solubilización del nitrógeno celular, además de, entre otros factores, pérdida elevada del porcentaje inicial de grasas, manitol, xilosa (8), compuestos fosforados (9), elementos minerales (3), etc. Durante la autólisis de *Aspergillus sydowi*, más del 60 % del nitrógeno orgánico soluble liberado parece estar constituido por peptonas y polipéptidos, mientras que el 30 % del nitrógeno micelial se convirtió en amoníaco (3). Este contribuye a la alcalinización del medio.

Parte importante en la autólisis es la presencia de enzimas proteolíticas, las cuales, con excepción de la pepsina, tienen un pH óptimo en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, por lo cual los procesos autolíticos se acentúan grandemente en estos pH. Esto explicaría la diferencia de peso de micelio obtenido en cada medio, puesto que, mientras en uno predominan las condiciones ácidas y, por tanto, hay inhibición de las enzimas proteolíticas, en el otro progresa la autólisis a medida que se neutraliza el medio. A esta diferencia también puede contribuir el que el medio de Czapek es más adecuado, por su elevada presión osmótica, para el crecimiento del hongo.

El incremento del pH observado en la *figura 2* se debe, por tanto, a la autólisis.

La producción del pigmento ocurre tanto en condiciones ácidas (como se deduce del porcentaje obtenido, *cuadro 1*), hecho que concuerda con la existencia de una fenolasa (prueba de Bavendam, positiva) con un óptimo de actividad a pH inferiores a 5, como en condiciones neutras o ligeramente alcalinas, ya que si a estos pH se inactiva la fenolasa, se encuentra el rango más idóneo para la autooxidación de los fenoles, parte de los cuales son altamente reactivos en estas condiciones (7), y ambos procesos, autooxidación y oxida-

ción enzimática, conducen a la formación de idénticos radicales fenólicos (17).

La razón E_4/E_6 , o cociente de las densidades ópticas a 465 y 665 nm, ha sido utilizada para determinar la formación de compuestos húmicos y su aromaticidad en medios de cultivo de *Aspergillus flavus* (29). Una razón baja, como en este caso, indica un elevado contenido en compuestos aromáticos o de tipo húmico, mientras que valores altos (superiores a 5) señalan la poca aromaticidad de los compuestos existentes o presencia de compuestos de tipo fúlvico. Otros datos analíticos (18-19) confirman tal afirmación y el carácter aromático del pigmento.

Respecto a las especies de *Eurotium* y *Aspergillus* citadas en España, sólo se han encontrado en la bibliografía *Eurotium herbariorum* (28), mientras que en los ficheros de micología del herbario del Jardín Botánico aparecen *E. herbariorum*, *Aspergillus candidus* y *A. glaucus*, por lo que *E. echinulatum* es una nueva cita para España.

CONCLUSIONES

El aislamiento de un hongo del suelo, *Eurotium echinulatum* Delacr., que presenta algunas diferencias respecto a la especie tipo y sintetiza una gran diversidad de compuestos en los medios de cultivo, pone de manifiesto dos importantes cuestiones. Por una parte, el interés y la necesidad de efectuar un más profundo estudio micológico de los suelos españoles, sobre todo en lo que respecta a Hyphomycetes y Ascomycetes. Por otra, la importancia de la microflora fúngica en los procesos de biosíntesis y biodegradación en el suelo, produciendo en el primer caso, entre otros, compuestos de tipo húmico, de gran importancia para la fertilidad y estabilidad de los suelos, así como para el control de los procesos geoquímicos.

El examen de la bibliografía a nuestro alcance nos lleva a la conclusión de que la especie de *Eurotium echinulatum* es una nueva cita para España.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a las Dras. A. C. Stoik y D. I. Fennell el examen y comentarios sobre la especie estudiada, y al Dr. F. D. Calonge su colaboración al examinar la bibliografía existente en el Jardín Botánico.

RESUMEN

Se ha aislado de un vertisuelo una estirpe de *Eurotium echinulatum* Delacr., cuyas características morfológicas son algo atípicas. Es una nueva cita para España. Se estudian también algunas de sus características fisiológicas en distintos medios de cultivo y su influencia en la formación de un pigmento de tipo húmico.

SUMMARY

A strain of Eurotium echinulatum Delacr. isolated from a vertisol

A strain of *Eurotium echinulatum* Delacr. has been isolated from a vertisol. It is a new record for Spain. Its morphological characteristics, as well as its physiology in several culture media with regard to the humic acid-like pigment formation are discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. ASHLEY, J. N.; RAISTRICK, H., and RICHARDS, I. 1939. The crystalline colouring matters of species in the *Aspergillus glaucus* series. II. Biochem. J., 33, 1291-303.
2. FENNELL, D. I. 1974. Comunicación personal.
3. FOSTER, J. W. 1949. Chemical Activities of Fungi. Academic Press, New York.
4. GATENBECK, S., and SJOLAND, S. 1964. Biochim. Biophys. Acta, 93, 246, citado en (12).
5. GONZÁLEZ-VILA, F.; SAIZ-JIMÉNEZ, C.; LENTZ, H., and LUDEMANN, H. D. C-13 Nuclear magnetic resonance spectra of fungal melanins, en preparación.

6. GOULD, B. S., and RAISTRICK, H. 1934. The crystalline pigments of species in the *Aspergillus glaucus* series. *Biochem. J.*, **28**, 1640-56.
7. HAIDER, K., and MARTIN, J. P. 1967. Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation. *Soil Sci. Amer. Proc.*, **31**, 766-72.
8. LAHOZ, R. 1967. Quantitative changes in the content of non nitrogenous compounds during autolysis of *Aspergillus terreus*. *J. Gen. Microbiol.*, **46**, 451-56.
9. LAHOZ, R.; REYES, F., and BALLESTEROS, A. M. 1969. Chemical and physiological changes in fungi during autolysis. V. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **38**, 367-72.
10. LILLY, V. G. 1965. The chemical environment for fungal growth. Media macro and micronutrients. En G. C. AINSWORTH, and A. S. SUSSMAN (eds.). *The Fungi*, **1**, 465-78. Academic Press, New York.
11. MALLOCH, D., and CAIN, R. F. 1972. New species and combinations of cleistothecial ascomycetes. *Can. J. Bot.*, **50**, 61-72.
12. PACKTER, N. M. 1973. Biosynthesis of Acetate-derived Compounds. John Wiley & Sons Ltd., London.
13. PACKTER, N. M., and COLLINS, J. S. 1974. Effect of inhibitors of protein synthesis on the formation of phenols derived from acetate and shikimic acid in *Aspergillus fumigatus*. *Eur. J. Biochem.*, **42**, 291-302.
14. POCHON, J., et TARDIEUX, P. 1962. *Técnicas d'Analyse en Microbiologie du Sol*. Ed. de la Tourelle., St. Mandé.
15. QUILICO, A., and PANIZZI, L. 1943. Chemische Untersuchungen über *Aspergillus echinulatus*. I. Mitteilung. *Chem. Ber.*, **6**, 348-58.
16. RAPER, K. B., and FENNEL, D. I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
17. SAIZ-JIMÉNEZ, C. 1974. Síntesis de compuestos aromáticos por *Eurotium echinulatum* Delacr. en relación con la formación de un pigmento de tipo húmico. Tesis doctoral. Universidad de Madrid.
18. SAIZ-JIMÉNEZ, C. 1975. Caracterización del pigmento de *Eurotium echinulatum* Delacr. I. Datos analíticos. *An. Edafol. Agrobiol.*, **34**, 829-39.
19. SAIZ-JIMÉNEZ, C. 1975. Caracterización del pigmento de *Eurotium echinulatum* Delacr. II. Métodos físicos. *An. Edafol. Agrobiol.*, **34**, 943-57.
20. SAIZ-JIMÉNEZ, C., y HAIDER, K. 1975. Caracterización del pigmento de *Eurotium echinulatum* Delacr. III. Métodos degradativos. *An. Edafol. Agrobiol.*, **34**, 959-69.
21. SAIZ-JIMÉNEZ, C., y HAIDER, K. 1975. Síntesis de compuestos aromáticos por *Eurotium echinulatum* Delacr. *An. Edafol. Agrobiol.*, **34**, 931-41.
22. SAIZ-JIMÉNEZ, C.; HAIDER, K.; MARTÍN, F., y MARTÍN, J. P. 1975. Biosíntesis de antraquinonas por un hongo del suelo. Programa Resúmenes VI Congr. Soc. Españ. Bioquím.
23. SAIZ-JIMÉNEZ, C.; HAIDER, K., and MARTÍN, J. P. 1975. Anthraquinones and phenols as intermediates in the formation of dark colored, humic acid-like pigments by *Eurotium echinulatum*. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **39**, 649-53.

24. SAIZ-JIMÉNEZ, C., and MARTÍN, F. 1975. Pyrolysis-gas-chromatography of the pigment of *Eurotium echinulatum* Delacr. Trans. VI Symp. Humus-Planta, 11-16.
25. STOLK, A. C. 1974. Comunicación personal.
26. SUBRAMANIAN, C. V. 1972. The perfect states of *Aspergillus*. Curr. Sci., 21, 755-61.
27. THOM, C., and RAPER, K. B. 1945. A Manual of the Aspergilli. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
28. UNAMUNO, L. M. 1941. Enumeración y distribución geográfica de los ascomicetos de la Península Ibérica y de las Islas Baleares. Mem. Real Soc. Españ. Cienc. Exactas Fis. Natur., VIII, 1-403.
29. VISSER, S. A. 1970. Investigations into the optimum conditions for the formation of humic compounds in *Aspergillus flavus* cultures and some properties of the products formed. West Afr. J. Biol. Appl. Chem., 13, 3-13.