

Estudio preliminar de la microflora bacteriana termotolerante de la pulpa de café y la paja de trigo con potencial de inhibición contra *Trichoderma viride* en el cultivo de *Pleurotus* spp.

¹Marnyye Velázquez-Cedeño, ²Gerardo Mata

³Anne-Marie Farnet, ¹Jean-Michel Savoie

¹UPR Mycologie et Sécurité des Aliments, INRA, B.P. 81, 33883 Villenave d'Ornon, France. ²Instituto de Ecología, Apartado postal 63, Xalapa, Veracruz 91000, México. ³Laboratoire de Microbiologie, Service 452, UMR CNRS 6116, Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie, Faculté des Sciences et Techniques de Saint Jérôme, F-13397, Marseille Cedex 20, France

Preliminary study of the termotolerant bacterial microflora of the coffee pulp and wheat straw with potential of inhibition against *Trichoderma viride* in the culture of *Pleurotus* spp.

Abstract. A preliminary study of the bacterial community implied in the selectivity of the substrate for the culture of *Pleurotus ostreatus* is presented. The analyzed substrates were coffee pulp and wheat straw, both pasteurized with steam. From these substrates bacterial colonies were isolated and cultivated on solid media. The studied bacterial groups were: *Bacillus*, *Pseudomonas* and Actinomycetes. The results showed a modification of the structure of the bacterial community based on the pasteurización. It was observed that some of the microorganisms that inhibit the growth of *Trichoderma viride* were those of *Bacillus*' group. The persistence of these microorganisms after the pasteurization could guarantee the obtaining of a selective substrate. The importance of the substrate treatment with the purpose of improving its the selectivity for the *Pleurotus* growth is discussed.

Key Words: Inhibition, culture, bacterial microflora, wheat straw, pasteurization, coffee pulp, selectivity.

Resumen. Se presenta un estudio preliminar de la microflora bacteriana implicada en la selectividad del sustrato para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. Los sustratos analizados fueron pulpa de café y paja de trigo, ambos pasteurizados con vapor. A partir de estos sustratos se aislaron y se contaron colonias bacterianas cultivadas en diferentes medios sólidos. Los grupos bacterianos estudiados fueron: *Bacillus*, *Pseudomonas* y Actinomycetes. Los resultados mostraron una modificación de la estructura de la comunidad bacteriana en función de la pasteurización. Se observó que algunos de los microorganismos que inhiben el crecimiento de *Trichoderma viride* fueron aquellos pertenecientes al grupo de *Bacillus*. La persistencia de estos microorganismos después de la pasteurización podría garantizar la obtención de un sustrato selectivo. Se discute la importancia del tratamiento del sustrato con la finalidad de mejorar la selectividad del mismo para el crecimiento de *Pleurotus*.

Palabras clave: Inhibición, medios de cultivo, microflora bacteriana, paja de trigo, pasteurización, pulpa de café, selectividad.

Received 9 december 2005; accepted 15 may 2006.

Recibido 9 de diciembre 2005; aceptado 15 de mayo 2006.

Introducción

En México se generan anualmente alrededor de 100 mil toneladas de pulpa de café [16], las cuáles representan un

*Autor para correspondencia: Gerardo Mata
mata@ecologia.edu.mx*

buen sustrato para el cultivo de *Pleurotus* [8]. Sin embargo, la proliferación de mohos contaminantes del género *Trichoderma* constituye una de las causas principales por las que este sustrato no es empleado a nivel industrial [12]. Para resolver este problema, es necesario producir un sustrato selectivo, el cual permita el crecimiento del hongo comestible

y limite el desarrollo de sus antagonistas [20, 23]. La selectividad del sustrato, en el caso de *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach, se logra a través del compostaje del mismo. En cambio, en el cultivo de *Pleurotus* spp. la selectividad es obtenida a partir de tratamientos térmicos del sustrato, como la pasteurización [17]. Un estudio previo sobre el cultivo de *P. ostreatus* en paja de trigo, mostró que la microflora termotolerante presente en el sustrato, es capaz de limitar la colonización de *Trichoderma* [24]. Así, el tratamiento del sustrato a 65 °C, da como resultado la obtención de un sustrato selectivo para el crecimiento de *Pleurotus* [20]. Por otro lado, se ha observado que tanto la pulpa de café como la paja de trigo poseen una microflora bacteriana, la cual está presente antes y después de la inoculación del sustrato con el hongo comestible [7, 11], pero no se ha analizado si esta microflora participa en la selectividad del sustrato. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la microflora bacteriana presente en la pulpa de café y la paja de trigo antes y después de la pasteurización, con la finalidad de aislar y caracterizar cepas bacterianas inhibidoras de *Trichoderma viride*. Se discuten los efectos de la pasteurización sobre las comunidades bacterianas y sus posibles consecuencias sobre la selectividad del sustrato. Este estudio forma parte de una serie de investigaciones en las que se pretende optimizar el uso de la pulpa de café como sustrato para el cultivo de *Pleurotus* spp.

Materiales y métodos

Cepa de *Trichoderma*

Se estudió una cepa de *Trichoderma viride* (IE-637) que se aisló de un cultivo de *Lentinula edodes* en pulpa de café. Esta cepa se mantiene en medio de cultivo de agar con dextrosa y papa (PDA) a 4 °C en el Cepario de Hongos Comestibles del Instituto de Ecología, A.C. (Xalapa, México).

Preparación de sustratos

La pulpa de café fue colectada en un beneficio de café (localizado en Coatepec, Veracruz, México), la cual recibió un proceso de secado al sol, hasta obtener un porcentaje de humedad entre 18-20% y posteriormente fué almacenada a temperatura ambiente. La paja de trigo fué cortada en trozos de 1 cm de longitud y se mantuvo bajo las mismas condiciones que la pulpa de café. Se colocaron 100 g de cada sustrato en bolsas de polipropileno, parte de las cuáles se pasteurizaron con vapor en una autoclave parcialmente cerrada (manteniendo la temperatura a 75 °C durante 1 h), y otra parte por inmersión en agua caliente a 75 °C durante 1 h. Como controles, ambos sustratos fueron utilizados sin ningún tratamiento térmico.

Extracción de microorganismos

Para la extracción y estimación de la microflora bacteriana, se suspendieron 20 g de sustrato pasteurizado (o no pasteurizado) en 180 ml de tampón fosfato 0.1 M, pH 7, adicionado con Tween 80 al 0.5% estéril, los cuales fueron agitados durante 30 min a 150 rpm [23]. Estas suspensiones fueron llamadas suspensiones madre y se utilizaron para el conteo de microorganismos en medios selectivos de cultivo sólido.

Conteo y aislamiento de bacterias

A partir de cada suspensión madre se prepararon diez diluciones seriadas en una solución de NaCl al 8.5%. 100 µl de cada dilución se inocularon en los siguientes medios de cultivo: 1) Triptona-Agar (triptona 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5%) para el conteo de la microflora total (MT), 2) agar para el aislamiento de *Pseudomonas* de Difco (triptona 2%, MgCl₂ 0.14%, K₂SO₄ 1%, Irgasan 25 mg, agar 1.36%), para el conteo de bacterias del género *Pseudomonas* (P), y 3) los Actinomycetes (A) fueron contados en el medio descrito por Pochon y Tardieux (1962) [15] (glicerol 0.1%, L-asparagina

0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, solución de oligo-elementos 0.1%, agar 1.5%, bicromato de potasio 0.1%). Para la búsqueda de bacterias esporulantes representadas principalmente en las condiciones de cultivo utilizadas por el género *Bacillus* (B), una alícuota de 10 ml de la suspensión madre fue tratada a 80 °C durante 10 min., a partir de esta alícuota se realizaron diez nuevas diluciones para ser inoculadas en medio Triptona-Agar. En total se realizaron tres repeticiones por cada dilución las cuales se incubaron a 28 °C. Los resultados fueron expresados como número de unidades formadoras de colonia por gramo de sustrato seco (UFC/g MS). Una vez realizado el conteo de colonias en los diferentes medios de cultivo, se procedió a evaluar la abundancia de microorganismos inhibidores de *Trichoderma viride*. Primeramente fueron aisladas diez colonias bacterianas por cada medio de cultivo, con base tomando en cuenta si dichas colonias presentaban características morfológicas distintas. Posteriormente las colonias aisladas fueron purificadas y mantenidas en medio Triptona-Agar.

Prueba de KOH

Para saber si las colonias bacterianas aisladas correspondían a bacterias Gram⁺ o Gram⁻ se realizó una prueba con KOH al 3% [3]. Esta prueba consistió en tomar una porción de la colonia bacteriana de un día de cultivo con un asa estéril y mezclarla con 10µl de KOH en un portaobjetos. Cuando la mezcla se volvía viscosa en un lapso de 5 a 60 s, la colonia bacteriana era considerada como Gram⁻. Por el contrario, dicha viscosidad no fue observada para las colonias Gram⁺.

Evaluación del efecto inhibitorio de las colonias bacterianas sobre *T. viride*

Los aislados bacterianos obtenidos de cada medio de cultivo fueron confrontados con *T. viride* en cajas de Petri conteniendo medio de PDA. Por cada condición se inocularon tres cajas, las cuáles se incubaron a 25 °C. Después de dos días de crecimiento, con una aguja estéril, se colocó un implante

de un precultivo de *T. viride* frente a la colonia bacteriana, anotándose la presencia o ausencia de inhibición. Un aislado inhibitorio fue definido como aquel que impidió el crecimiento de *T. viride*, formando un halo de inhibición de 0.5 cm o más. Un aislado resistente fue considerado como aquel que inhibió parcialmente el desarrollo de *T. viride* y el crecimiento micelial del moho es observado alrededor de la colonia bacteriana. Un aislado sin efecto es aquel que no inhibió el crecimiento de *T. viride*.

Resultados y discusión

En la paja de trigo, la pasteurización por vapor produjo una disminución del número de microorganismos, mientras que la pasteurización por inmersión en agua tuvo el efecto contrario (Tabla 1). Esto puede ser debido a que la humidificación de la paja durante la inmersión y el tiempo necesario para alcanzar los 75 °C (40 min aproximadamente), favorecieron el desarrollo de una microflora termotolerante.

En el caso de la pulpa de café y a comparación de la paja de trigo, se observó un mayor número de microorganismos en el sustrato no pasteurizado, lo que indica que ambos tratamientos térmicos lograron reducir el número de microorganismos presentes.

Estos resultados muestran que la estructura de la comunidad bacteriana de ambos sustratos es modificada por efecto directo de la pasteurización. Así la pasteurización puede seleccionar la microflora bacteriana, reduciendo la diversidad de la misma [13]. En general, con la finalidad de disminuir la presencia de mohos antagonistas de *Pleurotus*, el sustrato de cultivo es frecuentemente pasteurizado a 70-80 °C. Sin embargo, se observó que la pasteurización elimina un buen número de microorganismos y entre ellos aquellos que eventualmente podrían contribuir a la selectividad como los Actinomycetes (Tabla 1). Los Actinomycetes son microorganismos conocidos por sus potencialidades

Tabla 1. Número de microorganismos obtenidos de la paja de trigo y la pulpa de café.

Sustrato	Tratamiento	Medios de cultivo			
		MT	P	A	B
Paja de trigo	Control	6,24 (6,13)	5,99 (5,93)	3,84 (3,34)	3,55 (2,78)
	1	3,93 (2,81)	4,04 (3,92)	0	2,45 (2,08)
	2	>6	>6	0	>6
Pulpa de café	Control	7,17 (6,83)	7,12 (6,79)	4,48 (4,22)	3,84 (3,74)
	1	3,67 (2,81)	3,65 (2,72)	0	3,32 (2,88)
	2	3,36 (2,56)	3,02 (3,11)	0	3,05 (2,87)

Los resultados son expresados en Log de UFC/g de MS. Los valores representan las medias y las desviaciones estándar de tres repeticiones. Tratamientos: 1= pasteurización por vapor, 2= pasteurización por inmersión en agua. Control= sustrato no pasteurizado. Medios de cultivo: MT= Microflora Total, P= *Pseudomonas*, A= Actinomycetes, B= *Bacillus*.

antibióticas y lignocelulósicas [1, 5], lo cual puede explicar su intervención en la inhibición de *Trichoderma* spp. [23], así como su participación en la degradación de la lignocelulosa en las etapas mesófilas del composteo [21]. Estos microorganismos no resisten temperaturas mayores a 60 °C por lo que son siempre encontrados en la última etapa del composteo, es decir cuando la temperatura ha disminuido [10]. Por otro lado, la pasteurización a temperaturas elevadas puede provocar cambios bioquímicos del sustrato (ruptura del complejo celulosa-lignina) lo cual facilita la disponibilidad de azúcares solubles y como consecuencia condiciones favorables para la implantación de antagonistas fúngicos [8, 20]. Trabajos previos han demostrado que los principales agentes de contaminación de la paja de trigo después de la pasteurización son los hongos, entre los que destacan *Rhizopus stolonifer*, *Trichoderma viride*, *Fusarium* spp., *Alternaria tenuis*, *Peziza* spp. y *Coprinus* spp. [2]; y cuando la paja es inoculada con *P. ostreatus* también se observa la presencia de algunos de ellos [11]. Estas observaciones indican que mohos del género *Trichoderma* y de otros géneros pueden invadir el sustrato después de la pasteurización y la inoculación de *Pleurotus*. Por otro lado, las etapas de preparación del sustrato antes de la pasteurización pueden igualmente influir en la estructura de las comunidades

bacterianas. La deshidratación de la pulpa de café por su exposición al sol durante un periodo de tres a cuatro días, puede provocar una primera selección de dichas comunidades [7].

Trabajos previos han demostrado la implicación de ciertos grupos bacterianos en la inhibición del crecimiento del género *Trichoderma* [6, 19]. Así, este trabajo también se enfocó al aislamiento de organismos inhibidores de *T. viride* presentes en los sustratos de cultivo de *Pleurotus*. Tres grupos antagonistas fueron estudiados: *Pseudomonas*, *Bacillus* y Actinomycetes. En lo que respecta al género *Pseudomonas*, se ha observado que algunas especies pueden inhibir el crecimiento de *T. viride* [22] y otras inducir la fructificación de *Pleurotus* [4]. Por otro lado, dentro del género *Bacillus* y el grupo de Actinomycetes se encuentran especies con capacidad de degradación de sustratos lignocelulósicos y de producción de antibióticos [9, 14, 20]. Sin embargo, no se cuenta con información sobre su participación en la inhibición del desarrollo de *Trichoderma* spp.

De los aislamientos obtenidos en la paja de trigo, cuatro presentaron inhibición del crecimiento de *T. viride*, siete fueron resistentes y nueve no tuvieron ningún efecto sobre el crecimiento de este mohó (Tabla 2, Figura 1). Tres de los aislamientos con capacidad inhibitoria procedían de la

Tabla 2. Porcentaje de aislamientos bacterianos antagonistas de *T. viride*.

Sustrato	Tratamiento	Medio de aislamiento	Inhibición de <i>Trichoderma</i>	
			No.	%
Paja de trigo	Control	MT	1	10
		B	2	20
		MT	1	10
Pulpa de café	Control	MT	1	10
		MT	3	30
		MT	1	10

Tratamientos: 1=pasteurización por vapor, 2= pasteurización por inmersión en agua. Control= sustrato no pasteurizado. Medios de aislamientos: MT= Microflora Total, B= *Bacillus*.

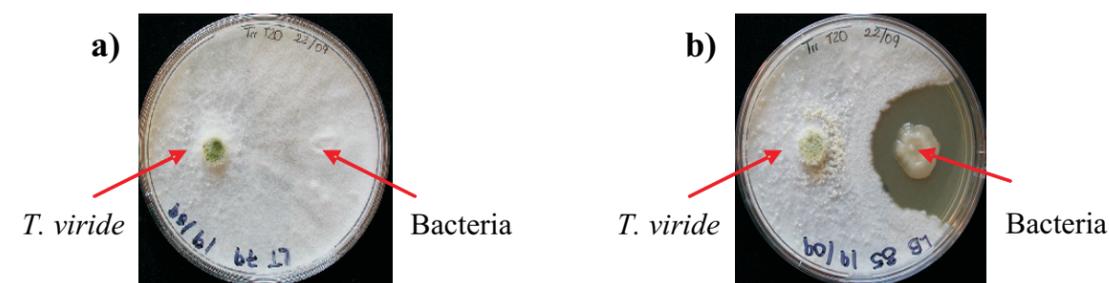


Figura 1. Confrontación de *Trichoderma viride* (IE 637) y algunos aislamientos bacterianos. a) crecimiento de *T. viride* sobre la colonia bacteriana (aislada del medio *Pseudomonas*), b) inhibición del crecimiento de *T. viride* (bacteria aislada del medio *Bacillus*).

paja pasteurizada con vapor y fueron obtenidos de los cultivos en medios tripton agar y *Bacillus*. De los cultivos aislados en la pulpa de café, cinco lograron inhibir el crecimiento de *T. viride*, ocho presentaron resistencia al mohó y nueve no tuvieron ningún efecto antagonista. Cuatro de los cinco aislamientos inhibidores provienen de un tratamiento térmico distinto. Por otro lado, en lo que respecta las especies de *Pseudomonas*, en ambos sustratos no se encontraron bacterias eficaces contra *T. viride*.

En general, estas observaciones muestran que los sustratos de cultivo empleados en el cultivo de *Pleurotus* poseen microorganismos inhibidores de *T. viride*, los cuales podrían garantizar la obtención de un sustrato selectivo (Fig. 1). La persistencia de estas bacterias inhibidoras después del tratamiento térmico podría ser favorecida durante el

desarrollo del cultivo de *Pleurotus*.

La importancia del cultivo de *Pleurotus* esta ligada al hecho de que puede ser realizada sobre diversos sustratos lignocelulósicos, lo cual permite el tratamiento de desechos provenientes de actividades agrícolas y agro-industriales. Sin embargo, la composición de la microflora de un sustrato determinado antes de su tratamiento para el cultivo de *Pleurotus*, podría estar en déficit de bacterias que contribuyan a su selectividad.

En este estudio se comparó la paja de trigo (sustrato frecuentemente utilizado en el cultivo de hongos comestibles) y la pulpa de café (objeto de estudios particulares como sustrato de cultivo) y se observó la presencia de bacterias inhibidoras o resistentes a *Trichoderma* después de la pasteurización (Tabla 2), indicando así, la presencia de

bacterias útiles a la selectividad del sustrato. Esto podría representar una alternativa de control contra *Trichoderma*. Sin embargo, la caracterización taxonómica de estos microorganismos ya sea por métodos clásicos (API, Gram, etc.) o moleculares (amplificación y secuenciación del ADNr 16S) es importante antes de proponerlas como agentes de control en el cultivo de *Pleurotus*. Por otra parte, la utilización de una pasteurización a 75 °C, propuesta generalmente como un tratamiento térmico para eliminar los microorganismos antagonistas de *Pleurotus*, no garantiza obtener un sustrato selectivo, debido a que muchos microorganismos son eliminados, algunos de los cuáles podrían inhibir el crecimiento de *Trichoderma*. Por lo tanto y, con la finalidad de limitar la reducción de la microflora bacteriana durante la pasteurización del sustrato, se podría utilizar otro modo de preparación del mismo que incluye las siguientes etapas: hidratación, pre-compostaje (para permitir el desarrollo de microorganismos gracias a la asimilación de azúcares y reservas nutritivas solubles), tratamiento térmico a temperaturas alrededor de 60-65 °C (para eliminar los mohos antagonistas potenciales), un condicionamiento a temperaturas alrededor de 40-45 °C y un enfriamiento progresivo (para permitir la colonización del sustrato por Actinomycetes y *Bacillus*) [23].

Por otro lado, el manejo de comunidades bacterianas con la finalidad de garantizar el desarrollo de bacterias inhibidoras de *Trichoderma* y mejorar la selectividad, debe tener en cuenta todas las etapas de preparación del sustrato y sobre todo la etapa de crecimiento vegetativo de *Pleurotus*. En efecto, es importante que la selectividad del sustrato sea mantenida durante los primeros días de cultivo debido a que existe un mayor riesgo de contaminación del sustrato por *Trichoderma* durante la etapa de incubación [18]. Esta cuestión es abordada en otro trabajo [23].

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de ECOS/ANUIES (proyecto M00-A01) para el intercambio académico entre el Institut National de la Recherche Agronomique y el Instituto de Ecología. Velázquez-Cedeño agradece el financiamiento brindado por el CONACYT durante su formación doctoral en Francia. Se agradece la colaboración del Biol. Carlos Ortega y del Dr. Rigoberto Gaitán del Instituto de Ecología, así como el apoyo técnico de Marie-Hélène Nguyen et Jean Le Petit de la Universidad Paul Cezanne (Francia).

Literatura citada

- Alderson, G., D.A. Ritchie, C. Cappellano, R.H. Cool, N.M. Ivanova, A.S. Huddleston, C.S. Flaxman, V. Kristufek, A. Lounes, 1993. Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. *Research in Microbiology* 144: 665-670.
- Benavides, C., D. Rodríguez, M. Ulloa, 1992. Algunos hongos contaminantes de la paja de trigo sobre la que se cultiva industrialmente *Pleurotus ostreatus*. IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala, México.
- Buck, J.D., 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 992-993.
- Cho, Y.S., J.S. Kim, D.E. Crowley, B.G. Cho, 2003. Growth promotion of edible fungus *Pleurotus ostreatus* by fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Letters* 218: 271-276.
- De Boer, W., L.B. Folman, R.C. Summerbell, L. Boddy, 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 795-811.
- De Boer, W., P.J.A. Klein-Gunnewiek, P. Lafeber, J.D. Janse, B.E. Spit, J.W. Woldendorp, 1998. Antifungal properties of chitinolytic dune soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 193-203.
- Gaime-Perraud, I., S. Roussos, D. Martínez-Carrera, 1993. Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micología Neotropical Aplicada* 6: 95-103.
- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto-Velazco, L. Guzmán-Dávalos, 1993. El cultivo de los hongos comestibles, con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Knox, O.G.G., K. Killham, C. Leifert, 2000. Effect of increased nitrate availability of the control of plant pathogenic fungi by the soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Applied Soil Ecology* 15: 227-231.
- Lacey, J., 1973. Actinomycetes in soils, compost and fodders. In: Sykes, G., F.A. Skinner (eds.), *Actinomycetales. Characteristics and Practical Importance*. Academic Press, Nueva York. Pp. 231-251.
- López-Nolasco, J.E., L. Fucikovsky-Zack, S. Osada-Kawasoe, L.I. De Bauer, 1995. Microorganismos causantes de problemas de producción durante el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Micología Neotropical Aplicada* 8: 39-46.
- Murrieta-Hernández, D.M., 2002. Cambios en la actividad enzimática de *Pleurotus* spp. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma* spp. Tesis de Maestría. Instituto de Genética Forestal. Universidad Veracruzana. Veracruz, México.
- Ntougias, S., G.I. Zervakis, N. Kavroulakis, C. Ehaliotis, K.K. Papadopoulou, 2004. Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 746-754.
- Phae, C.G., M. Sasaki, M. Shoda, H. Kubota, 1999. Characteristic of *Bacillus subtilis* isolated from compost suppressing phytopathogenic microorganisms. *Soil Science Plant and Nutrition* 36: 568-575.
- Pochon, J., P. Tardieux, 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle. Saint-Mandé.
- Roussos, S., M. Aquíahuatl, M. Trejo-Hernández, I. Gaime-Perraud, E. Favela, M. Ramakrishna, M. Raimbult, G. Viniegra-González, 1995. Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp husk. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 756-762.
- Sanchez, J.E., D. Royses, 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. ECOSUR. México, D.F.
- Savoie, J.M., P. Delpech, C. Billeto, G. Mata, 2000. Inoculum adaptation changes the outcome of the competition between *Lentinula edodes* and *Trichoderma* spp. during shiitake cultivation on pasteurized wheat straw. In: Van Griensven L.J.L.D. (ed). *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Balkema, Rotterdam. Pp. 667-674.
- Savoie, J.M., R. Iapicco, M.L. Largeteau-Mamoun, 2001. Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycological Research* 105: 1348-1356.
- Stölzer, S., K. Grabbe, 1991. Mechanisms of substrate selectivity in the cultivation of edible fungi. In: Maher M.J. (ed). *Science and Cultivation of Edible and Medicinal Fungi*. Balkema, Rotterdam. Pp. 141-146.
- Toumela, M., M. Vikman, A. Hatakka, M. Itävaara, 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* 72: 169-183.
- Upadhyay, R., L. Visintin, R. Jayaswal, 1991. Environmental factors affecting the antagonism of *Pseudomonas cepacia* against *Trichoderma viride*. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 880-884.
- Velázquez-Cedeño, M.A. 2005. Compétition entre *Pleurotus ostreatus* et *Trichoderma* sp. en culture sur paille de blé : rôle des communautés bactériennes du substrat et des laccases de *Pleurotus*. Thèse doctorale. Université Paul Cezanne (Aix-Marseille III). France.
- Velázquez-Cedeño, M.A., A.M. Farnet, E. Ferré, J.M. Savoie, 2004. Variations of lignocellulosic activities in dual cultures of *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma longibrachiatum* on unsterilized wheat straw. *Mycologia* 96: 712-719.