

# OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCION DE CELULASA DE TRICHODERMA VIRIDE

B. Hung, L. Lara, M. Patrón, R. Sánchez e I. Berdan

Departamentos de Genética y de Química Inorgánica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 23 de octubre de 1987

Recibido: 27 de octubre de 1988

**ABSTRACT.** Culture medium optimization for cellulase production by a *Trichoderma viride* wild type strain was made by means of the modified Rosenbrock's mathematic method of experimental design, because of the high number of variables to be optimized, among which the carbon source used was also included (alkali treated sugar cane bagasse). The enzyme activity obtained was 35 % higher than that reached with the medium before optimization. The addition of trace elements must be kept unlike the ammonium sulphate that was omitted from the culture medium composition.

**RESUMEN.** Se realizó la optimización del medio de cultivo para la producción de celulasa por una cepa salvaje de *Trichoderma viride*, aplicando el método matemático de diseño experimental de Rosenbrock modificado debido al elevado número de variables a optimizar, entre las que se incluyó además la fuente de carbono añadida (bagazo de caña de azúcar tratado alcalinamente). Se logró aumentar la actividad enzimática en un 35 % con respecto al medio sin optimizar. Se hace necesario mantener la adición de elementos traza, a diferencia del sulfato de amonio, el cual fue eliminado del medio de cultivo.

## INTRODUCCION

En los procesos microbiológicos, cuando se realiza la optimización de las condiciones de cultivo para un microorganismo, aún es frecuente el empleo de métodos empíricos en los que se cambia cada variable independientemente de manera que resulta un trabajo excesivamente largo y laborioso, sobre todo cuando se abarca un gran número de variables.

El desarrollo de la estadística impone cada vez más la aplicación de métodos matemáticos con estos fines, entre los que se encuentran el de Box y Wilson<sup>1</sup> y el de Rosenbrock.<sup>1</sup> Una amplia revisión de éstos y otros diseños experimentales estadísticos se describen en la literatura.<sup>2</sup>

El objetivo de este trabajo consiste en la optimización del medio de cultivo para la producción de celulasa por una cepa salvaje de *Trichoderma viride* aislada en los laboratorios.<sup>3</sup>

## MATERIALES Y METODOS

**Microorganismo.** Se utilizó una cepa salvaje de *Trichoderma viride* T3 aislada en los laboratorios por métodos convencionales a partir de muestras extraídas de campos de caña.<sup>3</sup>

**Medio de cultivo.** Se utilizó el medio de Mandels y Reese<sup>4</sup> cuya composición original es la siguiente: (g/L) -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,4; urea 0,3; proteosa peptona 0,75;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0;  $\text{CaCl}_2$  0,3;  $\text{MgSO}_4$  0,3; Tween 80 2 mL/L; trazas (mg/mL) -  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,0;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,6;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,4;  $\text{CoCl}_2$  2,0. Como fuente de carbono y energía se añadió bagazo de caña tratado alcalinamente con NaOH al 10 % a 180 °C durante 1 h según el procedimiento de Dunlap.<sup>5</sup>

**Condiciones de cultivo.** El cultivo se realizó a nivel de zaranda en erlenmeyers de 300 mL que contenían 50 mL del medio de cultivo a 100 r/min durante 8 d. Como inóculo se utilizó una caña para cada erlenmeyer, partiendo de una suspensión micelial única ob-

tenida a partir de cuñas de agar extracto de malta mantenidas a 30 °C durante 7 d. Las muestras se extrajeron al octavo día después de inoculados los erlenmeyers, se separó la fracción sólida (células y bagazo residual) por centrifugación a 5 000 r/min durante 30 min. La temperatura de incubación del cultivo fue de 30 °C.

**Determinación de la actividad enzimática.** Se determinó la actividad celololítica libre en el sobrenadante según la técnica de papel de filtro descrita por Mandels y colaboradores.<sup>6</sup>

**Método matemático de optimización de Rosenbrock modificado.** Como criterio de optimización se utilizó la actividad enzimática libre en el sobrenadante obtenida en el cultivo al octavo día de inoculados los erlenmeyers.

El diseño estadístico se basa en la evaluación del criterio de optimización en corridas experimentales sucesivas en las cuales cada variable toma el valor:

$$x = x_0 + k_1 \bar{v}_1 (t)$$

donde:

x valor experimental de la variable

$x_0$  punto inicial de la variable

$k_1$  factor de variación

$\bar{v}_1$  vector ortogonal unitario

El resultado de cada experimento se analizó de la forma siguiente:

Variable	Resultado	
	Positivo	Negativo
$x > x_0$	$F(x) > F(x_0)$	$F(x) \leq F(x_0)$
$x < x_0$	$F(x) \geq F(x_0)$	$F(x) < F(x_0)$

F actividad enzimática (resultado experimental obtenido)

Los experimentos posteriores se diseñaron teniendo en cuenta las consideraciones siguientes:

Si el resultado es:

**Positivo**

$$\bar{K} = 3k$$

$$\bar{x}_0 = x_1$$

$$\bar{x}_1 = \bar{x}_0 + 3k$$

**Negativo**

$$\bar{K} = -1/2k$$

$$\bar{x}_0 = x_0$$

$$\bar{x}_1 = \bar{x}_0 - 1/2k$$

De esta forma una secuencia de pruebas experimentales negativas conduce a una reducción del factor de variación unida a una oscilación del signo donde, al igual que en una secuencia de pruebas positivas, se produce un rápido progreso en dirección al óptimo. Una variable se considera optimizada cuando se produce una oscilación del signo y el factor de variación es pequeño, siempre que los resultados alcancen los límites de exactitud deseados.

Los análisis estadísticos comparativos se efectuaron mediante el test de Student partiendo de seis réplicas de cada experimento.

Las variables a optimizar se muestran en la Tabla I. Para la preparación del medio se partió de soluciones concentradas de cada nutriente.

**TABLA I**

Componentes del medio de cultivo (variables a optimizar)

Variable	Nutriente	Concentración
1	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L
2	urea	g/L
3	proteosa peptona	g/L
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L
5	CaCl <sub>2</sub>	g/L
6	MgSO <sub>4</sub>	g/L
7	Tween 80	mL/L
8	soln. trazas	l(x)
9	bagazo tratado	g/L
	soln. elementos trazas:	g/L
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,32
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,4
	CoCl <sub>2</sub>	2,0

\*1(x) = 0,5 mL de soln. por cada 100 mL de medio

## RESULTADOS Y DISCUSION

Mediante la aplicación del método de Rosenbrock modificado para la optimización de la composición del medio, se obtuvieron los rendimientos en la producción de celulasa que se detallan en las Tablas de la II a la VII, las cuales corresponden a los experimentos consecutivos realizados siguiendo el diseño experimental.

Los factores de variación k para cada variable fueron seleccionados teniendo en cuenta la concentración original que cada una de ellas presente en el medio de cultivo original de Mandels y Reese.

Los valores de cada variable y los resultados obtenidos para cada experimento planificado de acuerdo al diseño estadístico se resumen a continuación:

### Experimento 1 (Tabla II)

Variables 2; 3; 4; 7; 8 y 9: resultados positivos, se mantiene la dirección.

Variables 5 y 6: resultados negativos, cambia la dirección, correspondiendo disminuir la concentración en los dos nutrientes.

Variable 1: resultado negativo, cambia la dirección, pero como el valor de k correspondiente hace la variable negativa, se consideró como cero, por tanto, se omitió en el segundo experimento.

**TABLA II**

Experimento 1. Optimización del medio de cultivo

No.	x <sub>0</sub>	k <sub>1</sub>	x <sub>1</sub>	Actividad enzimática F (UI/mL)	Comparación con variante 0	Evaluación del resultado
-	-	-	-	0,19	-	-
1	0	1,40	1,40	0,21	NS	N
2	0,30	0,20	0,50	0,31	S+	P
3	0,75	0,25	1,00	0,31	S+	P
4	2,00	0,50	2,50	0,28	S+	P
5	0,30	0,10	0,40	0,14	S-	N
6	0,30	0,10	0,40	0,19	NS	N
7	0,00	1,00	1,00	0,25	S+	P
8	0,00	1(x)	1(x)	0,25	S+	P
9	20,00	20,00	40,00	0,23	S+	P

S significativo; NS no significativo; P positivo; N negativo + aumenta- disminuye

### Experimento 2 (Tabla III)

Variables 2; 3; 7; 8 y 9: resultados negativos, se invierte la dirección. Las variables 7 y 8 toman valores negativos con la k nueva y se consideran iguales a cero en el próximo experimento.

Variable 4: resultado positivo, se mantiene la dirección.

Variable 5: resultado negativo, se cambia nuevamente la dirección.

Variable 6: resultado positivo, se mantiene la dirección.

Variable 1: se cambió a un nuevo valor de k = 0,35 con el fin de disminuir la concentración, para descartar la posibilidad de que la concentración inicial probada haya sido tal que su interrelación con otras variables afecte los rendimientos.

### Experimento 3 (Tabla IV)

Variables 2; 3 y 9: resultados negativos, se invierte la dirección (oscilación).

Variables 5 y 6: resultados negativos, corresponde cambiar la dirección, pero como ambas variables ya han oscilado con valores de k pequeños, se consideran optimizadas.

Variables 7 y 8: resultados negativos, cambia la dirección, pero se decidió continuar la optimización para disminuir el rango de variación pues el valor de k anterior fue muy elevado (no adecuado).

Variable 1: resultado negativo, como ya se había probado un valor de k mayor para esta variable, se demostró que su presencia en el medio no influye en los resultados obtenidos.

Variable 4: resultado negativo, cambia la dirección.

### Experimento 4 (Tabla V)

Variables 2; 3; 4; 8 y 9: resultados negativos, nueva oscilación de la dirección, pero se decidió seguir el experimento con esas variables para estrechar el rango alrededor del óptimo.

Variable 7: resultado positivo, se mantiene la dirección.

**TABLA III**

Experimento 2. Optimización del medio de cultivo

No.	Variable			Actividad enzimática F (UI/mL)	Comparación con variante 0	Evaluación del resultado
	$x_0$	$k_1$	$x_1$			
0	-	-	-	0,49	-	-
1	0,0	-0,70	0,00	-	-	-
2	0,5	0,60	1,10	0,31	S-	N
3	1,0	0,75	1,75	0,46	NS	N
4	2,5	1,50	4,00	0,61	S+	P
5	0,3	-0,05	0,25	0,34	S-	N
6	0,3	-0,05	0,25	0,57	S+	P
7	1,0	3,00	4,00	0,43	S-	N
8	1(x)	3(x)	4(x)	0,43	S-	N
9	40,00	60,00	100,00	0,31	S-	N

S significativo; NS no significativo; P positivo; N negativo + aumenta - disminuye

**TABLA IV**

Experimento 3. Optimización del medio de cultivo

No.	Variable			Actividad enzimática F (UI/mL)	Comparación con variante 0	Evaluación del resultado
	$x_0$	$k_1$	$x_1$			
0	-	-	-	0,59	-	-
1	0,00	0,35	0,35	0,36	S-	N
2	0,50	-0,30	0,20	0,33	S-	N
3	1,00	-0,375	0,625	0,36	S-	N
4	4,00	4,50	8,50	0,35	S-	N
5	0,30	0,025	0,325	0,55	NS	N
6	0,25	-0,15	0,10	0,30	S-	N
7	1,00	-1,50	0,00	0,36	S-	N
8	1(x)	-1,5(x)	0,00	0,31	S-	N
9	40,00	-30,00	10,00	0,36	S-	N

S significativo; NS no significativo; P positivo; N negativo + aumenta - disminuye

Experimento 4 (Tabla V)

Variables 2; 3; 4; 8 y 9: resultados negativos, nueva oscilación de la dirección, pero se decidió seguir el experimento con esas variables para estrechar el rango alrededor del óptimo.

Variable 7: resultado positivo, se mantiene la dirección.

Experimento 5 (Tabla VI)

Variables 2 y 9: resultados positivos, se mantiene la dirección, como ya se probaron concentraciones menores y éstas disminuyen los rendimientos, se consideró optimizada la variable.

Variables 3 y 8: como los resultados anteriores indican que no es conveniente probar concentraciones menores, se tomaron los valores del experimento 4 como óptimos.

Variables 4 y 7: resultados negativos, cambio de dirección.

**TABLA V**

Experimento 4. Optimización del medio de cultivo

No.	Variable			Actividad enzimática F (UI/mL)	Comparación con variante 0	Evaluación del resultado
	$x_0$	$k_1$	$x_1$			
0	-	-	-	0,61	-	-
1	0,00	-0,175	0,00	-	optimizada	-
2	0,50	0,15	0,65	0,60	NS	N
3	1,00	0,187	1,187	0,62	NS	N
4	4,00	-2,25	1,75	0,52	S-	N
5	0,30	optimizada	-	-	optimizada	-
6	0,25	optimizada	-	-	optimizada	-
7	1,00	0,75	1,75	0,73	S+	P
8	1(x)	0,75(x)	1,75(x)	0,64	NS	N
9	40,00	15,00	55,00	0,59	NS	N

S significativo; NS no significativo; P positivo; N negativo + aumenta - disminuye

**TABLA VI**

Experimento 5. Optimización del medio de cultivo

No.	Variable			Actividad enzimática F (UI/mL)	Comparación con variante 0	Evaluación del resultado
	$x_0$	$k_1$	$x_1$			
0	-	-	-	0,80	-	-
2	0,50	-0,075	0,425	0,81	NS	P
3	1,00	-0,094	0,906	0,70	S-	N
4	4,00	1,125	5,125	0,69	S-	N
7	1,75	2,25	4,00	0,64	S-	N
8	1(x)	-0,37(x)	0,62(x)	0,67	S-	N
9	40,00	-7,50	32,50	0,83	NS	P

S significativo; NS no significativo; P positivo; N negativo + aumenta - disminuye

Experimento 6 (Tabla VII)

Variables 4 y 7: como ya se ha probado la oscilación en la dirección de las variables con valores de k respectivamente pequeños se toman los resultados del experimento 5 como los mejores.

En la Tabla VIII se muestra la composición final del medio optimizado y se compara con la del medio original. Para la mayor parte de los nutrientes los valores optimizados se encuentran próximos a la concentración establecida en el medio de Mandels, con la excepción del sulfato de amonio, el fosfato monobásico de potasio y el bagazo.

En el caso del sulfato de amonio pudo determinarse que no es indispensable su adición en el medio de cultivo, lo que aparentemente pudo estar motivado porque el aumento que se produjo en el resto de las fuentes nitrogenadas presentes compensó el requerimiento nutricional del microorganismo. Por otra parte, si se realiza el balance del contenido total de nitrógeno en el medio original y optimizado se encuentra que es de 0,54 y 0,34 g/L respectivamente, es decir, que hay un exceso de nitrógeno en el medio inicial, lo que permite eliminar el sulfato de amonio solamente con un ligero aumento de la urea y la proteosa peptona.

**TABLA VII**

Experimento 6. Optimización del medio de cultivo

No.	$x_0$	Variable $k_1$	$x_1$	Actividad enzimática F (UI/mL)	Comparación con variante 0	Evaluación del resultado
0	-	-	-	0,85	-	-
2	0,425	-	-	-	optimizada	-
3	1,00	-	-	-	optimizada	-
4	4,00	-0,562	3,438	0,83	NS	P
7	1,75	-1,125	0,625	0,50	S-	N
8	1(x)	-	-	-	optimizada	-
9	32,5	-	-	-	optimizada	-

S significativa; NS no significativa; P positivo; N negativo  
+ aumenta - disminuye

**TABLA VIII**

Comparación del medio original y el optimizado para la producción de celulasa por la cepa de *T. viride*

Variable	Medio	
	original	optimizado (g/L)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4	0,00
urea	0,3	0,425
proteosa peptona	0,75	1,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0	3,438
CaCl <sub>2</sub>	0,3	0,3
MgSO <sub>4</sub>	0,3	0,25
Tween80	2,0 mL/L	1,75
elementos trazas	1,0(x)	1(x)
bagazo	20,0	32,5

Garg y Neelakantan<sup>7</sup> y Coutts y Smith<sup>8</sup> encontraron que el sulfato de amonio disminuye el rendimiento en la producción de celulasa y el crecimiento de una cepa de *A. niger* y de *Sporotrichum thermofilia* sobre bagazo tratado alcalinamente.

El efecto positivo de la urea y la proteosa peptona encontrado en el presente trabajo corrobora lo planteado para diversos géneros microbianos. En primer lugar, la proteosa peptona, a pesar de que incrementa los costos en la producción de enzima, se incluye en la composición de los medios de cultivo por los excelentes rendimientos obtenidos.<sup>9-11</sup> En cuanto a la adición de urea, la mayoría de los autores reconocen sus efectos estimulantes sobre el crecimiento de los hongos y la producción de celulasa como por ejemplo en *Myrothecium*,<sup>12</sup> *Trichoderma*,<sup>13</sup> *Aspergillus*,<sup>7</sup> *Phanerochete*<sup>14</sup> y otros, aunque en *Trichoderma* los mejores resultados se obtienen combinando varias fuentes nitrogenadas.<sup>10,13</sup>

La concentración de fosfato de amonio en el medio de cultivo optimizado fue duplicada con respecto al medio inicial (Tabla III). No existe ningún efecto metabólico especial de los iones fosfato en la producción de celulasa, pero éstos sí influyen en el control del pH del medio de cultivo, los que contribuyen de esta forma a mejorar las condiciones para la estabilidad de las celulastas.

El nivel óptimo en la concentración de la fuente de carbono (bagazo tratado alcalinamente) fue de 32,5 g/L, se produjo una disminución de la actividad cuando se utilizaron concentraciones de 100 g/L. A concentraciones por encima de ese valor, se ha demostrado que se produce inhibición por sustrato en la hidrólisis enzimática del bagazo,<sup>15</sup> lo cual influye en que la celulasa producida inicialmente por el microorganismo no degrade eficientemente el sustrato, lo que hace que disminuya de esta forma el crecimiento, y por tanto, la producción de enzima.

Un resultado importante en la optimización es que debe mantenerse la adición de los elementos traza a pesar de utilizarse una fuente de carbono natural rica en iones metálicos. Si se observa el contenido de Zn, Mn, Fe y Co en el bagazo (Tabla IX)<sup>3</sup> se evidencia la ausencia de cobalto al nivel detectable por el método empleado en la determinación. El Co fundamentalmente, tiene una marcada influencia sobre la producción de celulasa y no sobre el crecimiento, como se ha señalado frecuentemente, al mismo tiempo que posee una acción estabilizadora sobre la celulasa.<sup>16</sup> Esto justifica que la necesidad de la adición de los iones metálicos se mantenga, sin embargo, sería conveniente determinar lo que ocurriría cuando se eliminara cada uno de ellos por separado del medio de cultivo pues probablemente sea realmente indispensable incluir sólo el Co ya que el resto de los microelementos se encuentra presente en el bagazo en cantidades relativamente considerables.

**TABLA IX**

Análisis espectrográfico de iones metálicos del bagazo tratado alcalinamente

iones	cenizas (%)
Mn	0,120 ± 0,006
Fe	3,600 ± 0,200
Zn	0,370 ± 0,040
Co	< L.D.

L.D. límite de detección 0,035 % (NaOH 10 %, 180 °C, 1 h)

## CONCLUSIONES

La optimización del medio de cultivo aplicando el método de diseño experimental de Rosenbrock modificado permitió aumentar la actividad enzimática hasta un valor de 0,90 UI/mL, con un aumento del 35 % aproximadamente con respecto al medio sin optimizar (0,65 UI/mL). Se determinó además que:

Es necesario mantener la adición de elementos traza.

Se logró eliminar el sulfato de amonio de la composición del medio de cultivo con un ligero aumento del resto de las fuentes nitrogenadas presentes.

## BIBLIOGRAFIA

- Pilát I.P., Votruba J., Prokop A., Ksandrova O., Rychtera M. and Gregř V. Scientific Papers of the Prague Institute of Chem. Food Technol., E 46, 117, 1976.
- Pilát I.P., Votruba J., Dobeřky P. and Prokop A. Folia Microbiologica, 21, 391, 1976.
- Hung B. Tesis para optar por el grado de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba, 1987.
- Sternberg D. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 53, 1976.
- Dunlap C.E. Ph.D. Thesis, Louisiana State University, USA, 1969.
- Mandels M., Andreotti R. and Roche C. Biotechnol. Bioeng. Symp. 6, 21, 1976.

7. Garg S.K. and Neelakantan S. *Biotechn. Bioeng.*, 24, 109, 1982.
8. Coutts A.D. and Smith R.E. *Appl. Environm. Microb.* 31, 819, 1976.
9. Mandels M. and Sternberg D. *J. Ferm. Technol.* 54, 267, 1976.
10. Nystron J. and Diluca P.H. *Intern. Symp. on Bioconv. of Cellulosic into Chem., Energy and Microb. Protein, New Delhi, India, 1 - 13 Feb., 1977.*
11. Eriksson K.E. and Johnsrud S.C. *Enz. Microbiol. Technol.*, 5, 425, 1983.
12. Updegraff D. *Biotechn. Bioeng.*, 13, 77, 1971.
13. Gupta J.K. *Agric. Biol. Chem.*, 36, 1961, 1972.
14. Zetelaki-Horváth K. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 389, 1984.
15. Lara L. Tesis para optar por el grado de Candidato a Doctor en Ciencias Biológicas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.
16. Ferchak J.D. and Pye E.K. *Biotechn. Bioeng.*, 25, 865, 1983.

## NOTA A LOS AUTORES

La Revista CENIC Ciencias Biológicas acepta trabajos originales, comunicaciones breves y reseñas bibliográficas y analíticas escritos en idioma español o inglés.

La redacción de trabajos se hará de forma impersonal.

La extensión de los trabajos, incluyendo las tablas no excederá de 7 cuartillas. En el caso de las reseñas se aceptarán 10 cuartillas.

Los originales deberán remitirse mecanografiados en original y una copia, en papel (216 x 332) mm, con márgenes de 2 cm, a doble espacio. En la primera página deberá consignarse el título del trabajo (en español e inglés), los nombres de los autores y de las instituciones donde fuera realizado el trabajo, así como la dirección postal del autor.

Los trabajos deberán constar de los acápites siguientes: **RESUMENES** en inglés y español (extensión máxima 150 palabras). El resumen en inglés, deberá enviarse debidamente revisado, a fin de garantizar la correcta sintaxis y ortografía inglesa. **INTRODUCCION, MATERIALES Y METODOS, PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS, DISCUSION DE METODOS Y RESULTADOS.** (Estos dos acápites anteriores podrán reunirse en uno sólo). **CONCLUSIONES, RECONOCIMIENTOS, BIBLIOGRAFIA.**

Las referencias dentro del texto se harán por orden numérico ascendente, consignándose así en el acápite de Bibliografía y a medio espacio por encima de la palabra en el lugar del texto donde corresponda. En la relación final se declararán todos los autores (se escribirá primer apellido e inicial del nombre), nombre de la publicación, volumen, página inicial y año de cada referencia. En caso de tratarse de referencias de publicaciones no periódicas, deberá consignarse además, la página final, la editora, el país de procedencia y la fecha de edición.

Las notas breves como su nombre lo indica, serán trabajos cortos y atendiendo a su importancia habrán de publicarse tan rápido como sea posible. Su extensión no excederá las 3 cuartillas, incluyendo las tablas. Las figuras no serán más de 2 en total.

Las figuras en general, se enviarán por duplicado y serán confeccionadas en papel alba y tinta china. Al dorso llevarán escrito a lápiz, el nombre del autor, el número de la figura y una indicación de su parte superior. Se ajustarán a los tamaños siguientes: (230 x 180) mm; (180 x 110) mm.

Las fotos deberán ser de buena calidad y en papel brillo, debiendo ajustarse a los tamaños anteriores.

Las tablas llevarán numeración romana y las figuras numeración arábiga.

Los pies de las figuras deberán enviarse mecanografiados en el orden correspondiente en una hoja aparte. No se dejará espacio alguno dentro del texto para las figuras.

Las fórmulas químicas y matemáticas en general, se escribirán con cuidado y claridad, asegurando colocar los subíndices, coeficientes, exponentes, letras, símbolos, etc., que sean empleados, en el nivel correspondiente. Si es preciso, se harán con lápiz y mediante trazos ligeros todas las aclaraciones o señalamientos que resulten necesarios.

Se empleará el Sistema Internacional de Unidades en todos los casos.

Las letras griegas que se utilicen serán escritas con suficiente claridad y su identificación se hará con lápiz en los márgenes.

Sólo se recepcionarán y publicarán aquellos trabajos que se acompañen de la debida autorización expedida por la Institución donde hayan sido realizados.

Los trabajos deben ser remitidos a:

**Revista CENIC Ciencias Biológicas**  
**Centro Nacional de Investigaciones Científicas**  
**Ave. 25 y calle 158, Cubanacán, Playa 16**  
**Apartados Postales 6880 ó 6990**  
**Ciudad de La Habana**  
**Cuba**