



Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata

TESIS DOCTORAL

“Estudio de la micobiota alcalofílica y alcalino- tolerante del
suelo de los bosques de *Celtis tala* Gill (ex Planch) y *Scutia
buxifolia* Reiss en el Partido de Magdalena, Provincia de
Buenos Aires”

Lic. Lorena Alejandra Elíades

Directora: Dra. Marta Cabello

Co-Director: Dr. Claudio Voget

2008

A mis amores Lauti y Walter

A Mamá, Mara, Ari

A la memoria de Papá

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Dra Marta Cabello por haberme guiado en momentos duros, por transmitirme sus conocimientos, por su apoyo constante y fundamentalmente por su cariño.

A mi co-director Dr. Claudio Voget por sus valiosas enseñanzas en el campo de las enzimas y su dedicación.

A la Dra. Angélica Arambarri por haberme alentado siempre, por sus invalorable consejos.

A mi esposo Walter por su paciencia y contención y mi hijo Lauti por sus besos “para quitarme las tristezas”, los quiero.

A mamá Kikí porque siempre confió en mí, por su incansable ayuda y aliento, por apoyarme en todo y por saber que siempre cuento con ella, a Mara y Leo por su alegría y cariño a Ari por ser un solcito en mi vida.

A mis amigas desde el jardín, Liliana Lopardo y Evangelina Maffei por su amistad, por escucharme y comprenderme.

A mis queridas enanas Jazmín y Rocío por hacerme ver cuando las miro cuáles son las cosas importantes de la vida.

A mis queridos compañeros del Instituto Spegazzini, Alicia Bargas, Jorge Chayle, Daniel Melendi, Hugo Perla, Dra. Vilma Rosato, Dra. Mónica Steciow, por todos estos años de compartir el día a día.

A las chicas por su ayuda y su linda amistad, Luz Arellano, Eugenia Gonzalez Ibáñez, Agostina Marano y Suani Pacheco.

A mis amigas María Silvana Velázquez, Gabriela Irrazábal y Natalia Allegrucci por su ayuda en el laboratorio, por su cariño y aliento, por las risas y las lágrimas, por tantos momentos juntas, porque no podría haber concretado esta etapa sin ellas y por supuesto porque esta tesis es de todas.

Al Dr. Mario Saparrat (Marito) por su amistad y su ayuda intelectual, por estar al pie del cañón siempre, por ser tan buena persona, gracias.

A Ana María Bucsinszky por su cariño de madre y su esfuerzo para que sigamos.

A la gente del CINDEFI por su cálido trato, en especial a Lorena Rojas por todo lo que hizo por mi, a Betina Galarza, María Cecilia Gortari, Carolina Vita y María Dolores Blanco Fernandez por su ayuda desinteresada en mi trabajo.

A mis compañeros de la cátedra de Botánica Sistemática I, Dra. Maria Adela Casco, Dra. Silvia Sala, Dra. Inés Sunensen, Maria Gabriela Cano, Analía Dos Santos, Romina Gómez, Adrián Cefarelli, por su aliento y sus consejos.

A mi gran familia tíos y primos, en especial a la memoria de mi tío Titín Ingeniero Pedro Zucalli, por entusiasmarme en mi carrera, por confiar en mí y por su cariño.

A la memoria de papá Miguel porque me enseñó el valor de la humildad, el respeto y el sacrificio.

Al CONICET por haberme otorgado la beca con la cual pude realizar este trabajo.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	8
Marco general.....	9
Introducción y antecedentes.....	10
Los hongos del suelo.....	14
<i>Biodiversidad.....</i>	<i>15</i>
<i>Hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes.....</i>	<i>17</i>
<i>Metodología en el estudio de los hongos de suelo. Técnicas de aislamiento.....</i>	<i>19</i>
<i>Nutrición y función.....</i>	<i>21</i>
<i>Sistema enzimático.....</i>	<i>22</i>
Enzimas.....	24
<i>Producción fúngica de enzimas alcalinas.....</i>	<i>25</i>
<i>Queratinasas.....</i>	<i>27</i>
<i>Quitinasas.....</i>	<i>29</i>
<i>α-ramnosidasas y β-glucosidasas.....</i>	<i>31</i>
Flavonoides.....	31
Naringina.....	33
Acción enzimática.....	34
<i>Importancia biotecnológica.....</i>	<i>36</i>
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	37
OBJETIVO GENERAL.....	38
OBJETIVOS PARTICULARES.....	38
HIPÓTESIS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
Área de muestreo.....	44
<i>Clima.....</i>	<i>47</i>
<i>Suelos y vegetación.....</i>	<i>48</i>
<i>Fauna.....</i>	<i>58</i>
<i>Conservación.....</i>	<i>58</i>

I Parte

DIVERSIDAD DE HONGOS DE SUELO. METODOLOGÍA

<i>Muestreo</i>	60
<i>Análisis de los datos</i>	61
<i>Análisis de componentes principales</i>	62
Diversidad de hongos aislados de <i>Distichlis</i>	63
<i>Análisis de los datos</i>	65
Métodos de conservación de cepas	65
<i>Liofilización y deshidratación en papel de filtro</i>	65
<i>Mantenimiento en medios agarizados</i>	66

II Parte

CULTIVO DE HONGOS EN DIFERENTES MEDIOS Y ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

Preparación de inóculos	68
Crecimiento en medio agarizado para los test enzimáticos	68
Medio de cultivo líquido HS (harina de soja)	70
Cultivos en sustrato sólido. <i>Distichlis</i>	71
Cultivos en sustrato sólido. Pelo vacuno	74
Caracterización de los sustratos sólidos	76
Obtención de extractos enzimáticos	77
Determinación de actividades enzimáticas en extractos de cultivo ..	78
<i>Actividad queratinolítica</i>	78
<i>Actividad α-ramnosidasa y β-glucosidasa</i>	79
Hidrólisis de naringina	81
Purificación de la ramnosidasa alcalina de <i>Acremonium murorum</i> .	82
Electroforesis: Caracterización por SDS-PAGE	83
RESULTADOS	85

I Parte

DIVERSIDAD DE HONGOS DE SUELO.....	86
Efecto del pH del medio de aislamiento y de la profundidad de las muestras sobre la frecuencia y diversidad de especies	93
<i>Análisis de Componentes principales</i>	106
Diversidad de hongos aislados de <i>Distichlis</i>	119

II Parte	
FUNCIONES: CULTIVO DE HONGOS EN DIFERENTES MEDIOS Y ANÁLISIS ENZIMÁTICOS.....	122
Crecimiento fúngico en medios sólidos y líquidos.....	123
<i>Caracterización de los medios sólidos: Propiedades de hidratación de los sustratos.....</i>	<i>123</i>
<i>Crecimiento fúngico en diferentes medios.....</i>	<i>125</i>
Determinación de actividades enzimáticas.....	129
<i>Test en medios agarizados: actividades proteolítica, amilolítica y celulolítica.....</i>	<i>130</i>
<i>Actividad quitinolítica.....</i>	<i>132</i>
<i>En de extractos de cultivo: actividad queratinolítica.....</i>	<i>132</i>
<i>Actividades α-ramnosidasa y β-glucosidasa.....</i>	<i>135</i>
Determinación de la capacidad de hidrólisis de naringina.....	143
Purificación parcial de la ramnosidasa de <i>Acremonium murorum</i>..	145
Análisis por SDS –PAGE.....	146
DISCUSIÓN.....	147
Diversidad de hongos de suelo.....	148
Diversidad de hongos aislados de <i>Distichlis</i>.....	154
Enzimas de interés biotecnológico... ..	155
CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES.....	167
BIBLIOGRAFÍA.....	170
ANEXOS.....	192

RESUMEN

Esta tesis se enmarca en la necesidad de establecer un nexo entre los estudios ecológicos relacionados con la biodiversidad y el desarrollo de procesos biotecnológicos. El principal objetivo fue analizar la diversidad fúngica de suelos alcalinos de los bosques de *Celtis tala* Gill ex Planch (Fam. Ulmaceae) (tala) y *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) (coronillo) en el Partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires y determinar el potencial de estos hongos como fuente de enzimas alcalinas con aplicaciones biotecnológicas. En este sentido el aislamiento de especies fúngicas alcalino-tolerantes y alcalofílicas de estos suelos es no sólo una contribución al conocimiento de nuestra biodiversidad microbiana, sino también una búsqueda de microorganismos productores de enzimas alcalino-tolerantes y alcalino activas. Hasta el momento no se registran estudios que integren el conocimiento de la micobiota asociada a suelos alcalinos de Argentina y las capacidades enzimáticas de interés biotecnológico que estos hongos producen.

La mayoría de los hongos crecen en ambientes ácidos, sin embargo algunos de ellos son capaces de crecer en condiciones de alcalinidad. En el caso de los suelos estudiados en esta tesis, en los suelos calcáreos (pH entre 7,5 y 8,5) la alcalinidad se origina por la presencia de CaCO_3 y en los suelos sódicos (pH>8) la alcalinidad se debe a la presencia dominante del ion Na^+ en el complejo de intercambio. Los suelos alcalinos, sin sodio, pueden producir en las plantas problemas de deficiencia de hierro, zinc, manganeso y boro; mientras que la presencia de sodio produce problemas de aireación del suelo debido al deterioro de la estructura física, que a su vez puede inducir cambios en la disponibilidad de nutrientes. La micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante de la Argentina es aún poco conocida. Sin embargo existen estudios referidos a las comunidades fúngicas del suelo rizosférico de zonas disturbadas y no disturbadas de los talares de Magdalena. Los hongos saprótrofos tienen un enorme potencial de dispersión y un sistema enzimático eficiente que les garantiza su modo de vida. Pueden degradar una gran variedad de fuentes carbonadas, el 95% de los tejidos de las

plantas están compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. La actividad descomponedora de los hongos es realmente importante en relación a la redistribución de estos elementos entre los organismos y el ambiente. Actualmente existe una tendencia creciente a reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos que impliquen el uso de microorganismos y/o enzimas, ya que no sólo constituyen una alternativa menos agresiva para el medio ambiente, sino que también son económicamente más viables. El desarrollo de productos enzimáticos de origen microbiano usualmente recae en un screening inicial de un gran número de microorganismos adaptados a distintas condiciones ambientales, a los efectos de conseguir enzimas con características físicas y bioquímicas aptas para la aplicación particular que se desea realizar. Las enzimas que son objeto de análisis de esta tesis, a saber: queratinasas, quitinasas, α -ramnosidasas y β -glucosidasas, actualmente revisten interés en la industria del cuero, farmacéutica y alimenticia entre otras.

El área muestreada está ubicada en el partido de Magdalena a 20 Km. al SE de la localidad homónima (35° 11' S, 57° 17' O) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. En esta zona se analizaron tres tipos de suelo: Rendol, que presenta alcalinidad por presencia de CO_3Ca correspondiente a cordones de conchilla paralelos a la costa, Natracualf, suelo alcalino por presencia de sodio correspondiente a las zonas planas de la albufera y Argialbol, correspondiente a las zonas bajas e inundables de la antigua albufera platense. Se tomaron muestras estacionales de los tres tipos de suelo a dos profundidades: otoño (Mayo-2004), invierno (Agosto-2004), primavera (Octubre-2004) y verano (Febrero-2005). Para el aislamiento de hongos de suelo se utilizó el método de lavado de suelo. Para evaluar el efecto de pH de aislamiento sobre la frecuencia y diversidad de especies fúngicas, el pH inicial del medio de cultivo fue ajustado a 6.0, 8.0, 11.0 con soluciones buffer. Se calcularon las frecuencias de aparición de las especies fúngicas aisladas, índice de diversidad (H') Shannon-Weiner; riqueza específica (S) y equitabilidad (J'). Mediante el empleo de análisis de componentes principales (PCA) se evaluaron las diferencias de composición de las comunidades frente al pH utilizado para su aislamiento. Se utilizó el índice de

correlación de Pearson para evaluar las variaciones de diversidad (H') en relación con la riqueza de especies (S) y su distribución en las muestras (J'). Las cepas aisladas se conservan en medios agarizados, liofilizados y deshidratados en papel de filtro en el Cepario del Instituto de Botánica Spegazzini (LPS). Se determinaron actividades enzimáticas: amilolítica, proteolítica, celulolítica y quitinolítica mediante test en placa. Las actividades queratinolítica, α -ramnosidasa y β -glucosidasa se determinaron a partir de extractos de cultivos líquidos y sólidos. Los ensayos se realizaron en condiciones de alcalinidad pH (9.0). Se caracterizaron los medios sólidos de incubación mediante la determinación de sus propiedades de hidratación. Los extractos que presentaron mayores actividades α -ramnosidasa medida con sustrato cromogénico, fueron probados en su capacidad para hidrolizar naringina, flavonoide responsable del sabor amargo en los jugos de cítricos por lo que su hidrólisis es de importancia en biotecnología de alimentos. La cepa probada que presentó mayor liberación de prunina como producto de la hidrólisis de la naringina, fue *Acremonium murorum*. Se purificó parcialmente la enzima α -ramnosidasa alcalina de *A. murorum*, y se caracterizó por SDS page.

Como resultado muchas de estas especies fueron capaces de crecer en medios de aislamiento y de fermentación a pH elevados (9.0, 11.0). La composición de especies en las muestras de los tres tipos de suelo analizadas no presentó variaciones estacionales. Se observaron variaciones en la composición específica y en el número de especies observadas dependiendo del tipo de suelo y de la profundidad de la muestra. En el presente estudio muchas de las cepas fúngicas aisladas a partir de los tres tipos de suelo estudiados presentaron la capacidad de **producir** proteasas, amilasas, celulasas, queratinasas, quitinasas, α -ramnosidasas y β -glucosidasas en medios de cultivo a pH elevados y que también **actúan** en condiciones de elevada alcalinidad. Entre las cepas aisladas de suelos alcalinos se encontraron especies capaces de producir enzimas queratinolíticas y quitinolíticas alcalinas de interés en la industria. En particular la especie *Acremonium murorum* fue la cepa que mostró mayor capacidad para producir una α -ramnosidasa alcalina de interés en biotecnología de alimentos, por lo que

estos suelos alcalinos son fuente de microorganismos con capacidades enzimáticas de potencial utilización en la industria.

SUMMARY

This thesis is based on the need to establish a link between the ecological studies related to biodiversity and the development of biotechnological processes. The main aim was to analyze the fungal diversity of the alkaline soils of the forests of *Celtis tala* Gill ex Planch (Fam. Ulmaceae) (“tala”) and *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) (“coronillo”) in Magdalena, Province of Buenos Aires, Argentina, and determine the potential of these fungi as a source of alkaline enzymes for biotechnological application. In this sense, the isolation of alkaline-tolerant and alkalophilic fungal species from these soils is not only a contribution to the knowledge of the microbial diversity of this area, but also a search for microorganisms producing alkaline-tolerant and alkaline-active enzymes.

So far, there are no studies integrating the knowledge of the microbiota associated to the alkaline soils of Argentina and the enzymes of biotechnological interest that these fungi produce.

Most fungi grow in acid environments; however, some of them are able to grow in alkaline conditions. The alkalinity of the soils studied in this thesis is due to the presence of CaCO_3 (calcareous soils; pH between 7.5 and 8.5) or by the dominant presence of Na^+ in the exchange complex (sodic soils; pH>8).

The lack of sodium in alkaline soils can produce iron, zinc, manganese and boron deficiency in plants, whereas the presence of sodium can produce problems of soil aeration due to the damage of its physical structure, which can in turn induce changes in the availability of nutrients. Little is still known about the alkalophilic and alkaline-tolerant microbiota of Argentina. However, there are studies about the fungal communities of the rhizospheric soil of disturbed and non-disturbed areas of the “talares” of Magdalena. Saprotrophic fungi have an enormous dispersal potential and an efficient enzymatic system that guarantees their life style. They can degrade a great variety of carbon sources (95% of plant tissues are composed of carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, phosphorus and sulphur), and their decomposing activity is essential for the redistribution of these elements between the organisms and the environment. Nowadays, there is a

growing trend to replace some traditional chemical processes by biotechnological processes that imply the use of microorganisms and/or enzymes, since not only do they constitute a less aggressive alternative for the environment, but also are more economically viable. The development of enzymatic products of microbial origin usually starts with the screening of a great number of microorganisms adapted to different environmental conditions with the aim to obtain enzymes with the physical and biochemical features necessary for the specific application that wants to be carried out. The enzymes analyzed in this thesis were: keratinases, chitinases, α -rhamnosidases and β -glucosidases, which are currently of interest in the leather, pharmaceutical and food industries, among others.

The area sampled is located 20 km southeast of the city of Magdalena (35° 11' south, 57° 17' west) in the Province of Buenos Aires, Argentina. Three soil types were analyzed: Rendoll, which is alkaline because of the presence of CO_3Ca due to the shelly ranges parallel to the coast, Natracualf, which is alkaline because of the presence of sodium corresponding to the plain zones of the "albufera", and Argialbol, corresponding to the low, flooding areas of the environment called "Antigua albufera platense". Samples were taken from the three types of soil at two different depths in fall (May 2004), winter (August 2004), spring (October 2004) and summer (February 2005). Soil fungi were isolated by soil washing. In order to evaluate the effect of the pH used for isolation on the frequency and diversity of fungal species, the initial pH of the culture medium was adjusted to 6.0, 8.0 and 11.0 with buffer solution. The frequency of the fungal species isolated, the Shannon-Weiner diversity index (H'), the species richness (S) and the equitability (J') were calculated. By means of principal component analysis (PCA), the differences in the composition of the communities were evaluated in relation with the pH used for their isolation. The Pearson correlation index was used to evaluate the diversity variations (H') in relation with species richness (S) and their distribution in the samples (J'). The strains isolated were conserved in agarized, lyophilized and dehydrated media in filter paper at the Instituto de Botánica Spegazzini, La Plata, Buenos Aires, Argentina. The amylolytic, proteolytic, cellulolytic and chitinolytic activities were determined in plaque. The

keratinolytic, α - rhamnosidase and β -glucosidase activities were determined from extracts of liquid and solid cultures. The assays were carried out in alkaline conditions (pH: 9.0). The solid incubation media were characterized by determining their hydration properties. The extracts that presented highest α -rhamnosidase activity, measured with chromogenic substrate, were tested in their capacity to hydrolyze naringin, a flavonoid responsible for the bitter flavor of citric juices, for which its hydrolysis is important in food biotechnology. *Acremonium murorum* was the strain that presented the highest release of prunin as a product of the hydrolysis of naringin. The alkaline α -rhamnosidase of *A. murorum* was partially purified and characterized by SDS page. As a result, many of these species were able to grow in isolation and fermentation media at high pH levels (9.0, 11.0). The species composition in the samples of the three types of soils analyzed did not present seasonal variations. Variations were observed in the species composition and in the number of species observed depending on the type of soil and the depth of the sample.

In the present study, many of the fungal strains isolated from the three types of soil studied presented the capacity of producing proteases, amylases, cellulases, keratinases, chitinases, α - rhamnosidases and β -glucosidases as well as of acting in culture media at high pH levels. Among the strains isolated from alkaline soils, we found species able to produce keratinolytic and chitinolytic alkaline enzymes, which are of interest in the industry. In particular, *Acremonium murorum* was the strain that showed the greatest capacity of producing an alkaline α - rhamnosidase of interest in food biotechnology, for which these alkaline soils are a source of microorganisms with enzymatic capacities of potential use in the industry.



Introducción

Marco general

Esta tesis se enmarca en la necesidad de establecer un nexo entre los estudios ecológicos relacionados con la biodiversidad y el desarrollo de procesos biotecnológicos. En este sentido el aislamiento de especies fúngicas alcalino-tolerantes y alcalofílicas de los suelos de los bosques de *Celtis tala* Gill ex Planch (tala) y *Scutia buxifolia* Reiss (coronillo) de la zona costera de la provincia de Buenos Aires, es no sólo una contribución al conocimiento de nuestra biodiversidad microbiana, sino también una búsqueda de microorganismos productores de enzimas alcalino-tolerantes y alcalino activas. Estas enzimas son de interés para bioconversiones, procesos industriales relacionados con el tratamiento de fibras textiles, la producción de alimentos y la degradación de residuos industriales. Dichos procesos generalmente se realizan en condiciones de pH alcalinos donde es necesario adoptar técnicas químicas tradicionales agresivas para el medio ambiente y por lo tanto se plantea, como alternativa, la utilización de enzimas provenientes de microorganismos.

Cabe destacar que hasta el momento no se registran estudios que integren el conocimiento de la microbiota asociada a suelos alcalinos de Argentina y las capacidades enzimáticas de interés biotecnológico que estos hongos producen y que pueden ser estudiadas en profundidad para su utilización en la industria.

Introducción y antecedentes

Los hongos son de vital importancia en la descomposición y mineralización de la materia orgánica tanto vegetal como animal y responsables de la fertilidad del suelo. La biomasa microbiana comprende 1%-4% del carbono orgánico total y un 2%-6% de nitrógeno total del suelo. Entre los microorganismos que habitan el suelo, los hongos son los más abundantes en términos de biomasa y actividad fisiológica, comprenden un 75% a 95% de la biomasa microbiana del suelo (Gaspar et al., 2001) y junto con las bacterias son responsables del 90% del flujo total de energía por descomposición de la materia orgánica, (Kjøller & Struwe, 1982; Schürer et al., 1985). Los hongos interactúan directa o indirectamente con otros organismos en el ecosistema, siendo sustento alimenticio de bacterias, otros hongos, nematodos, insectos (Trappe & Luoma, 1992).

Muller & Bills (2004) plantean que los hongos se encuentran entre los organismos de mayor importancia en la tierra, no sólo debido a las funciones vitales que estos organismos cumplen en los ecosistemas, sino también por su influencia sobre los seres humanos y sus actividades.

La estructura somática de los hongos filamentosos, el micelio, es una adaptación efectiva a la vida en un medio como el suelo (**Figura 1**). Las hifas que conforman el micelio se desarrollan a través de las superficies absorbiendo nutrientes del sustrato y son también capaces de crecer por el aire presente en la

red de poros. Una consecuencia de la ramificación de la mayoría de los micelios es que éstos pueden explorar una superficie más amplia en comparación con las bacterias. Otra característica importante del micelio es que funciona como una red interconectada donde los materiales pueden ser transportados dentro de las hifas entre diferentes regiones del micelio. Dicha traslocación hace que los hongos filamentosos tengan la habilidad de crecer a través de zonas del suelo pobres en nutrientes y a través del aire, reciclando internamente los nutrientes y llevándolos a las estructuras reproductivas (Ritz & Young, 2004).

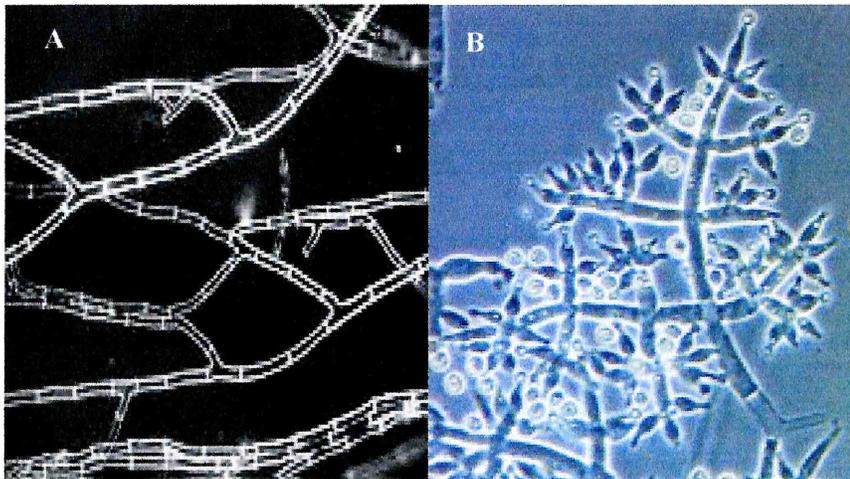


Figura 1. **A.** fotografía de un micelio ramificado. **B.** fotografía de estructuras de reproducción sobre el micelio.

El hábitat físico, en donde todos los organismos del suelo residen, está definido por una red de poros que se forma como consecuencia de la disposición espacial de las fases sólidas del suelo. Esta red tridimensional regula el movimiento de los gases, líquidos, solutos y organismos, y a través de ella ocurren todos los procesos (Bills et al., 2004). Cuanto menor tamaño posean las

partículas minerales del suelo, tendrán una proporción área/volumen mayor y serán más reactivas porque es sobre la superficie donde se adsorben el agua y los nutrientes y donde se llevan a cabo las reacciones químicas. Las interfaces sólido-líquido y líquido-gas son los sitios donde preferentemente viven los microorganismos; se abre la posibilidad de generar gradientes de nutrientes, gases, pH, en apenas volúmenes microscópicos, ya sea al interior de microporos colonizados o entre microporos contiguos; así se forman innumerables microambientes que ofrecen distintos nichos ecológicos (Valencia Cantero & Peña Cabriales, 2001).

Los hongos, producen una gran variedad de exudados al medio. Estos incluyen enzimas responsables de la degradación de los sustratos que utilizan, polisacáridos y glicoproteínas que forman una matriz protectora y lubricante de las hifas. Estos compuestos tienen propiedades adhesivas manteniendo unidas a las partículas del suelo (Ritz & Young, 2004). Esta extensa red de micelio en el suelo promueve, entonces, la agregación de partículas, mejorando la estructura del suelo, lo que favorece su mejor aireación y beneficia el crecimiento vegetal (Lynch & Bragg, 1985). En los lugares donde la disponibilidad de nutrientes es limitante al desenvolvimiento de las plantas, la presencia de los hongos micorrícicos es fundamental para la evolución de una vegetación estable (Janos, 1980). Estos hongos contribuyen para la estabilización del suelo, por medio de los efectos de agregación y estabilización de agregados mediante la excreción de proteínas al suelo, como la glomalina (Wright & Upadhyaya, 1998) y del efecto

físico de malla de contención de las hifas en los agregados. En la **figura 2** se ilustra el hábitat del suelo y sus componentes.

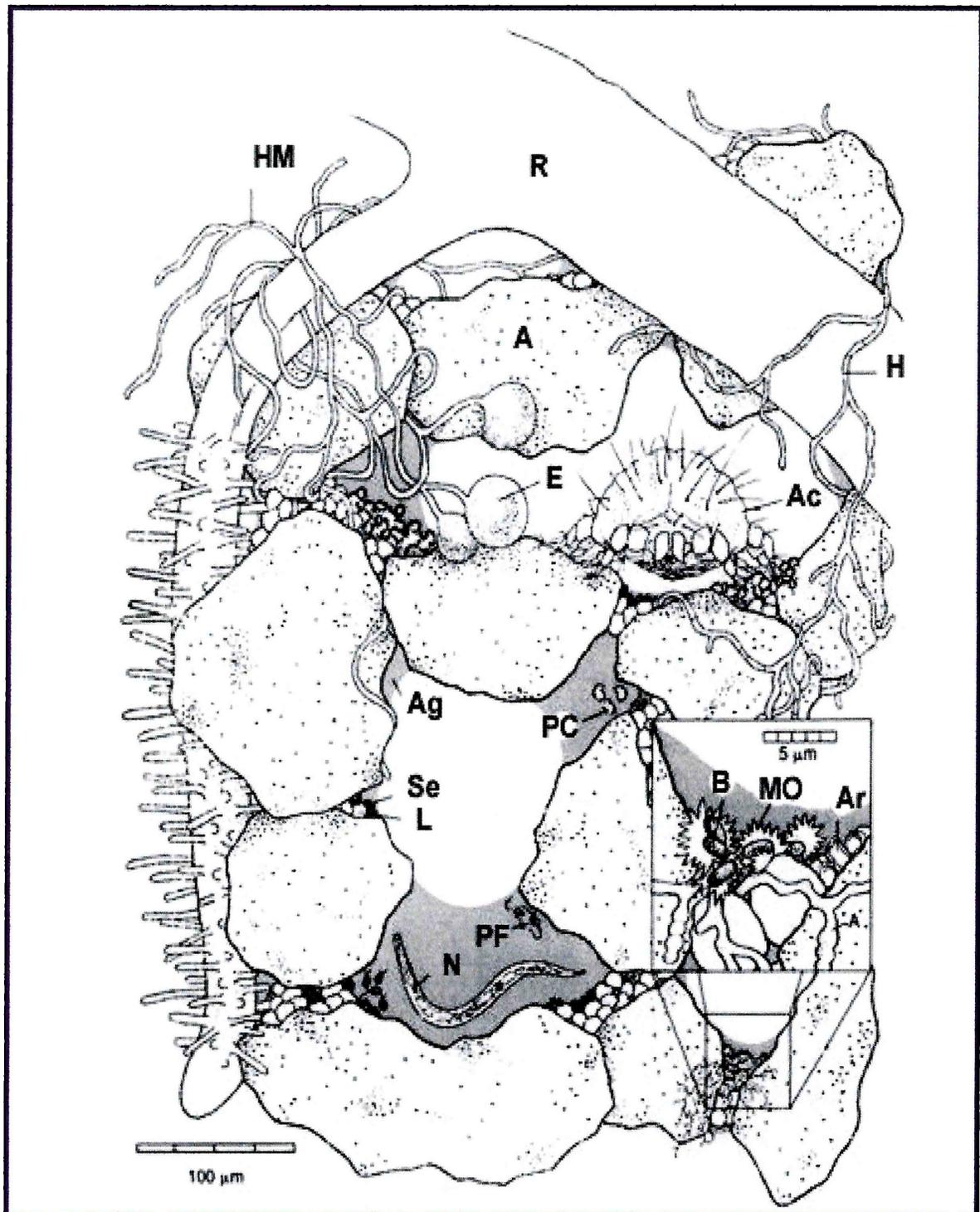


Figura 2. Hábitat del suelo conteniendo partículas minerales, materia orgánica, raíces de plantas con pelos radicales, y microorganismos del suelo. R: raíz y pelos radicales de la planta. HM: hifas micorrícicas. H: hongo saprófito. A: arena. E: esporas micorrícicas. Ac: ácaro. Ag: agua. PC: protozoo ciliado. PF: protozoo flagelado. Se: sedimento. L: limo. N: nematode. B: bacterias. MO: materia orgánica. Ar: arcilla. (Dibujo original Kim Luoma (Sylvia, 1999))

Los hongos del suelo

Técnicamente el sistema suelo está formado por todos los horizontes desde la hojarasca hasta la roca basal. Sin embargo los investigadores de las comunidades de hongos del suelo, han limitado sus estudios al horizonte mineral en los primeros 2-10 cm del perfil (Bills et al., 2004), debido a que la mayor parte de la actividad de los microhongos en relación a la materia orgánica en descomposición ocurre en los horizontes superficiales. Se conoce muy poco acerca de la estructura de las comunidades fúngicas de horizontes profundos. En los estudios de Vardavakis (1990), Pandey et al. (1991), Bogoev et al. (2002) y Fierer et al. (2003), se observó que los horizontes de mayor riqueza en materia orgánica, contenían el mayor número de especies y mayor biomasa fúngica y que la distribución vertical de las comunidades fúngicas puede ser atribuida a la disminución de la disponibilidad de carbono con la profundidad.

Burges (1963) señala que la distribución de los hongos en el suelo no es homogénea; existen numerosos factores que condicionan el crecimiento y establecimiento de las distintas comunidades fúngicas. Las diferencias en las condiciones físico-químicas del suelo a medida que aumenta la profundidad determinan cambios en estas comunidades.

Por otro lado, la diferente cobertura vegetal de cada ecosistema determina también la composición de las comunidades fúngicas del suelo (Bills et al., 2004)

Los suelos minerales son generalmente un medio pobre para el crecimiento fúngico debido a las muy bajas concentraciones de sustratos aprovechables. Las condiciones del medio se tornan más adversas debido al

antagonismo de otros microorganismos del suelo. Muchas especies fúngicas son oligotróficas en estas condiciones y utilizan las distintas fuentes de carbono orgánico de baja concentración, presentes en la solución edáfica (Wainwright, 1993).

Biodiversidad

Hawksworth (1991, 2001) estima que existen 1.5 millones de especies de hongos. Si esta estimación es correcta, sólo se ha descrito el 5% de los hongos existentes. Poseer una estimación de la diversidad taxonómica de los hongos es necesario para permitir la inclusión de estos microorganismos en la conservación de la biodiversidad, manejo y planeamiento del uso de la tierra.

Se han realizado numerosos trabajos acerca de la diversidad de hongos de suelo. Los estudios de Jensen en 1912 permitieron establecer que las especies más comunes en el suelo pertenecen a los géneros: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

Waksman (1917) recopiló datos de aislamientos de distintas partes del mundo, obtenidos por diversos autores. Al observar que las especies de *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Trichoderma* se repetían en todos los suelos, estableció un orden decreciente de importancia de acuerdo a sus frecuencias de aparición y la lista según éste orden quedó conformada de la siguiente manera: *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Rhizopus*, *Zygorrhynchus*, *Acrostalagmus*, *Alternaria*, *Verticillium*. Esta lista concluyó con el agregado de *Scopulariopsis*, micelio

estéril y algunas levaduras. Especies de estos géneros fueron consideradas como la **micobiota típica del suelo**.

Bisby et al. (1933, 1935) estudiaron la micobiota en suelos confirmando la validez de la lista de Waksman y agregaron los géneros *Mortierella*, *Cylindrocarpon* y *Monospora*. Se desarrolló entonces el concepto de que existe una micobiota básica cosmopolita capaz de crecer en el suelo bajo condiciones normales, que es regularmente aislada, y se encuentra acompañada por hongos con características fisiológicas especiales, los cuales tienen una distribución más compleja y no son aislados regularmente.

Tiempo después Alexander en 1977 señaló en su trabajo, que a pesar de las diferencias cualitativas de las poblaciones fúngicas de los suelos, existen géneros cosmopolitas que están presentes en prácticamente todos los suelos y la mayoría de estos géneros tienen la capacidad de producir un gran número de esporas, además de un activo crecimiento miceliar.

El conocimiento acerca de la diversidad fúngica, ecología y producción secundaria es esencial para interpretar como la actividad fúngica y la composición de especies pueden afectar la dinámica de otros microorganismos y de invertebrados detritívoros y su influencia en la pérdida de masa de hojarasca, inmovilización de los nutrientes y mineralización (Webster & Benfield 1986; Findlay *et al.* 2002).

Hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes

Las condiciones abióticas del medio físico donde habitan la mayoría de los organismos varían temporal y espacialmente. Los organismos se ven obligados a sobrevivir a tales variaciones y desarrollan diferentes adaptaciones al medio.

La mayoría de los hongos crecen en ambientes ácidos, sin embargo algunos de ellos son capaces de crecer en condiciones de alcalinidad. La micobiota alcalofílica es aquella cuyo óptimo pH de crecimiento es alcalino (pH 9.0-10.0) y la micobiota alcalino-tolerante es aquella capaz de crecer tanto a pH ácidos como alcalinos (Nagai et al. (1998). Muchos hongos alcalofílicos y alcalino-tolerantes pueden ser aislados de suelos particularmente ricos en materia orgánica así como también de hojarasca en descomposición, ya que esta degradación natural de las proteínas puede producir amonio generando un medio propicio para la multiplicación y supervivencia de estos organismos (Meenakshi, 2004). A causa de su compleja interacción con otros factores, y su variación local, los efectos precisos del pH del suelo sobre los hongos son difíciles de evaluar. Los hongos tienen la capacidad de cambiar el pH del medio que los rodea durante su crecimiento pero en el laboratorio crecen mejor en un rango de pH 5-7. Algunas especies crecen, aunque más lentamente, a pH extremos. Esta capacidad está relacionada con el mantenimiento de un adecuado balance iónico y pH internos (Battley & Barlett, 1966)

En el caso de los suelos estudiados en esta tesis, en los suelos calcáreos (pH entre 7,5 y 8,5) la alcalinidad se suele originar en la presencia de CaCO_3 en los suelos sódicos (pH>8) la alcalinidad se debe a la presencia dominante del ion

Na⁺ en el complejo de intercambio. Los suelos alcalinos, sin sodio, pueden producir en las plantas problemas de deficiencia de hierro, zinc, manganeso y boro; mientras que la presencia de sodio produce problemas de aireación del suelo debido al deterioro de la estructura física, que a su vez puede inducir cambios en la disponibilidad de nutrientes (Marschner, 1995). La acción descomponedora de los hongos de suelo es esencial para el aporte de materia orgánica en los ecosistemas de suelos salinos (Torzilli et al. 2006).

Warcup (1951), Stenton (1953), Mukerji (1965), Pugh & Dickinson (1965), Rai et al. (1971), Nagai et al. (1995, 1998), analizaron la composición fúngica de suelos alcalinos y Vardavakis (1990), Cabello & Arambarri (2002), la micobiota de suelos con alto contenido de carbonato de calcio. En la mayoría de estos estudios los rangos de pH utilizados en los medios de aislamiento variaron de ácidos a neutros. Para el crecimiento de algunos de los hongos alcalofílicos estos medios ácidos no son propicios, por lo tanto es necesario tener en cuenta que el pH de aislamiento afecta la diversidad de las especies observadas.

La micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante de la Argentina es aún poco conocida. Sin embargo Cabello & Arambarri (2002) estudiaron la composición fúngica del suelo rizosférico de zonas disturbadas y no disturbadas de los talares de Magdalena y encontraron que existe un patrón específico de especies fúngicas alcalofílicas y alcalino-tolerantes, asociado a estos suelos calcáreos, independientemente del grado de disturbio. También observaron que la variación en el pH del medio de aislamiento influyó en la frecuencia de aparición de las especies.

Metodología en el estudio de los hongos de suelo. Técnicas de aislamiento

En la investigación de hongos de sustratos específicos como el suelo, hojarasca o en plantas vivas las técnicas para el aislamiento de grupos particulares de microhongos varía considerablemente.

La elección de las técnicas utilizadas para el aislamiento de los hongos del suelo depende en gran medida del objetivo del estudio. Las hifas fúngicas representan la fase activa, mientras que las estructuras de resistencia (conidios, clamidosporas, esclerocios) son prácticamente inactivas. Entonces es importante distinguir de qué manera se encuentran presentes los hongos en el suelo. El mayor problema que se ha encontrado con todas las técnicas es poder discernir si las especies se encuentran como micelio activo o como estructuras de resistencia (Warcup, 1955).

Para el aislamiento de hongos del suelo las muestras deben ser tomadas al azar, y se aconseja tomar submuestras que se mezclan para formar una muestra compuesta. El número de las muestras debe establecerse de acuerdo al tipo de análisis de los datos que se realice. (Johnson & Curl, 1972)

Gams, (1992) señala que las muestras deben ser tomadas a una profundidad en el perfil del suelo, removiendo los restos de suelo de los horizontes superiores. También debe tenerse en cuenta la relación de las muestras tomadas con las raíces de las plantas. El fenómeno “rizósfera”, un incremento en la densidad microbiana alrededor de las raíces vivas, ha sido investigado por Hiltner (1904) creando este término. Dependiendo del propósito del estudio la

muestra puede ser tomada a una distancia de todas las raíces o puede incluir las raíces. En este último caso las raíces se separan de la muestra, con lo que el suelo de la rizósfera que se encuentra adherido es también separado.

La mayoría de los investigadores enfatizan en el hecho de que en un ambiente de aparente homogeneidad florística, la micobiota varía considerablemente en cortas distancias. Sappa (1955), sugiere que los estudios de los hongos de suelo deberían realizarse en un ambiente con la máxima homogeneidad posible.

La técnica más comúnmente utilizada para el aislamiento es la **técnica de dilución** (Johnson & Curl, 1972) la cual presenta la ventaja de ser un método sencillo, que obtiene aislamientos puros en un solo paso y los resultados cuantitativos (número de unidades formadoras de colonias) son aptos para diferentes análisis estadísticos. Sin embargo tiene algunas desventajas, ya que más del 90% de los aislamientos proviene de estructuras de resistencia, los hongos con gran capacidad de esporular son sobreestimados y las especies de crecimiento lento tienden a ser subestimadas (Warcup, 1955).

Otro método utilizado es el de **placas de suelo** propuesto por Warcup (1950) en el cual se dispersa una alícuota de suelo sobre una placa de Petri conteniendo medio de cultivo. Esta técnica tiene las mismas desventajas que el método de dilución.

La alternativa más usada a las técnicas antes mencionadas, es el **método de lavado de suelo**. Esta técnica fue aplicada primero por Parkinson & Williams (1961) en suelo libre de raíces y modificada varias veces por Gams & Domsch

(1967). Una muestra de suelo se lava repetidas veces con agua y se pasa por tamices de tamaño de poro cada vez menor de manera de obtener partículas de suelo de un tamaño definido. Luego las partículas se siembran en placas de Petri conteniendo algún medio agarizado. Las características del medio de aislamiento dependerán de los objetivos de la investigación (Gams, 1992).

Una ventaja de este método es el hecho de que la contaminación aérea de las partículas puede ser estimada y descartada y todos los aislamientos obtenidos provienen indudablemente del suelo.

El período de incubación utilizando esta técnica puede extenderse hasta dos semanas, de esta manera *Trichoderma* y otras especies de rápido crecimiento miceliar están ausentes y pueden evidenciarse ciertos hongos de crecimiento lento. El método de lavado y sembrado de partículas da como resultado un mayor número de especies en comparación con la técnica de dilución (Gams, 1992).

Nutrición y función

Garret en 1951 determinó grupos ecológicos fúngicos, considerando para ello la relación de los grupos fúngicos con el sustrato y el momento de su aparición en la secuencia sucesional sobre diferentes residuos vegetales. Consideró que pertenecen al mismo grupo ecológico las especies que poseen alguna estrategia particular para la colonización de un sustrato determinado, por ejemplo alguna actividad bioquímica o fisiológica común a todos los hongos de ese grupo.

Thornton (1956) propuso el término *patrón de distribución de los hongos de suelo* para las especies aisladas y ordenadas en orden decreciente del porcentaje de la frecuencia de aparición. Este patrón cambiaría de un suelo a otro e inclusive dentro de un mismo suelo bajo diferentes condiciones.

Christensen (1981) encontró que existen diferencias en el patrón de distribución de las especies dependiendo del tipo de suelo. Especies de los géneros *Fusarium*, *Papulospora* y *Humicola* son características en suelos de praderas de climas templados, mientras que especies de los géneros *Paecilomyces* y *Oidiodendron* se encuentran en suelos forestales del mismo clima.

En la década del 80`se agrupó a los hongos por su forma de nutrición y por la función que realizaban en el ecosistema. Así Söderström (1975) aisló 60 especies de hongos de suelo de bosque y los separó por la posibilidad de utilizar diferentes sustratos como proteínas, xilanos, celulosa y quitina. Flanagan (1981) tabuló la capacidad de degradar pectina, almidón, xilanos, celulosa, ácidos húmicos, ácido gálico y madera. Otros autores encontraron que varios aislamientos de la misma especie varían la capacidad de descomponer pectina, xilano, carboximetilcelulosa (Domsch & Gams, 1969).

Sistema enzimático

Los hongos saprótrofos tienen un enorme potencial de dispersión y un sistema enzimático eficiente que les garantiza su modo de vida (Gams, 1992).

Pueden degradar una gran variedad de fuentes carbonadas, desde azúcares simples, como hexosa o pentosa, hasta moléculas más difíciles de utilizar como ácidos orgánicos, disacáridos, almidón, pectina, grasas y poseen un rol esencial en la descomposición de los polímeros estructurales de las plantas, tales como celulosa, hemicelulosa y lignina.

Existe una gran variabilidad en la composición química de los restos animales y vegetales, y no todas las especies fúngicas son capaces de utilizar la totalidad de los materiales que los conforman. Existe una diferencia en la habilidad de las especies para acceder a carbohidratos simples o complejos. La descomposición es producto de la actividad enzimática donde los tipos de enzimas requeridas son dependientes del sustrato disponible (Dighton, 2003).

El análisis de las habilidades enzimáticas indican que, mientras diferentes especies de *Penicillium* tienen amplio espectro de actividades enzimáticas, los hongos típicos del azúcar como los miembros de las Mucorales son más pobres en su posibilidad de degradar hidratos de carbono complejos (Gochenaur, 1984).

Entre los hongos de suelo podemos establecer dos grupos. Uno conformado por hongos con la capacidad de utilizar sólo hidratos de carbono simples como *Mortierella* y *Mucor* y otro caracterizado por especies que pueden usar un amplio rango de carbohidratos, como *Trichoderma* (Martínez, 1999).

El 95% de los tejidos de las plantas están compuestas por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre. La actividad descomponedora de los hongos es realmente importante en relación a la redistribución de estos elementos entre los organismos y el ambiente (Gadd, 2004). La producción de

enzimas está regulada por la disponibilidad de nitrógeno y fósforo. Donde la disponibilidad de nutrientes es baja los hongos gastan mayores cantidades de energía en producir enzimas para obtener los nutrientes de las fuentes orgánicas. Estos resultados sugieren un alto grado de control en la producción de enzimas dada por las condiciones del suelo, lo que está directamente relacionado con la disponibilidad de nitrógeno y fósforo en el agua (Sinsabaugh et al., 1993).

Enzimas

Las enzimas son activadores específicos que se combinan estereoespecíficamente con sus sustratos. Las reacciones catalizadas por enzimas se producen más rápidamente porque requieren una menor energía de activación (Tabatabai & Singh, 1979).

Las enzimas se desnaturalizan a temperatura elevada y pH extremos, su estado fisicoquímico y su influencia en las reacciones que catalizan son dependientes del pH, concentración iónica, temperatura y la presencia o ausencia de inhibidores o activadores (Tabatabai, 1994)

La degradación de la pared celular vegetal es llevada a cabo por una gran variedad de enzimas, cuya acción genera una amplia gama de productos intermedios, oligosacáridos y unidades monoméricas que finalmente sirven de nutrientes o van a intervenir en la regulación de algún proceso fisiológico en particular. La síntesis de estas enzimas está regulada en general por mecanismos de inducción/represión a cargo de sustancias que pueden estar presentes en el suelo (De Vries, 2003).

Actualmente existe una tendencia creciente a reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos que impliquen el uso de microorganismos y/o enzimas, ya que no sólo constituyen una alternativa menos agresiva para el medio ambiente, sino que también son económicamente más viables. El desarrollo de productos enzimáticos de origen microbiano usualmente recae en un screening inicial de un gran número de microorganismos adaptados a distintas condiciones ambientales, a los efectos de conseguir enzimas con características físicas y bioquímicas aptas para la aplicación particular que se desea realizar.

Un ideal industrial de un catalizador enzimático debería poseer propiedades de alta estabilidad y actividad en un amplio rango de condiciones. Cada vez más frecuentemente se están buscando en microorganismos habitantes de ambientes extremos tales enzimas (Kladwang et al., 2003).

Producción fúngica de enzimas alcalinas

Meenakshi (2004) estudió en detalle la producción de diferentes enzimas alcalinas por parte de un grupo de hongos y Actinomicetes aislados de suelo y hojarasca en Tailandia. Este estudio tuvo como objetivo la búsqueda de organismos productores de enzimas alcalinas para aplicación biotecnológica ya que ensayos preliminares detectaron la producción de xilanasas alcalinas producidas por el hongo alcalinotolerante *Cephalosporium* sp.

En Argentina resultados preliminares del screening enzimático mostraron que algunas especies alcalofílicas y alcalino-tolerantes producen enzimas extracelulares que degradan componentes de la pared celular vegetal, como celulosa, hemicelulosa y pectina y también ciertos flavonoides a pH 9.0-9.5 (Rojas, 2004). En estos estudios se observó que la cepa más promisorio en cuanto a su capacidad enzimática fue *Acrocalagmus luteo-albus*. No obstante existen muchas cepas aisladas que aún no fueron probadas y falta completar el screening de otras actividades enzimáticas.

A continuación se sintetizan las particularidades de las enzimas que son objeto de análisis de esta tesis, a saber: queratinasas, quitinasas, α -ramnosidasas y β -glucosidasas.

Queratinasas

Las queratinasas son las enzimas responsables de la degradación de la queratina, una escleroproteína altamente resistente, insoluble y no reactiva químicamente. Lo que la distingue de las otras proteínas es la presencia de la cisteína, un aminoácido que contiene azufre en su estructura que hace que las cadenas de queratina se encuentren unidas por enlaces bisulfuro (Mark et al., 1988) En la degradación de la queratina por acción fúngica actúan un conjunto de procesos enzimáticos. Bioquímicamente implican, en primera instancia la sulfitólisis, que es la reacción clave de la queratinólisis, en donde se produce la reducción de los enlaces bisulfuro; seguido a este proceso, intervienen reacciones de desaminación y proteólisis. Estas actividades las manifiestan parcialmente

algunos hongos no queratinolíticos, casi siempre acompañados por especies queratinofílicas (Kunert, 2000). Las especies queratinolíticas se definen como las que presentan capacidad para destruir y/o descomponer a la queratina, mientras que las queratinofílicas, que aparecen con frecuencia sobre sustratos queratináceos, sólo son capaces de utilizar materiales asociados a la queratina tales como el contenido intercelular, sedimentos protoplasmáticos o algunos derivados de la degradación parcial de queratina (Filipello, 1986; Hubalek, 2000; Mangiaterra et al., 2000; Piontelli et al., 1984).

La queratina integra la mayor parte del material contenido en las células que forman la epidermis de la piel de animales, pelos, uñas, plumas, escamas, espinas cuernos y pezuñas; y es componente importante de la lana y matriz de los dientes (Goddard & Michaelis, 1934; Gutcho, 1974; Ulfig & Korcz, 1995). Los residuos del material queratinizado al acumularse en el suelo, generalmente cerca de zonas pobladas, constituyen un factor de contaminación. Los hongos capaces de ejercer una acción de queratinólisis sobre estos sustratos juegan un rol ecológico importante en la descomposición de estos residuos (Ulfig, 2000).

En particular, las queratinasas son empleadas actualmente en la industria cosmética y en la curtiembre de pieles (Dozie et al., 1994). Son enzimas de interés para la industria del cuero regional, ya que tendrían aplicaciones en el proceso de depilación de los cueros, disminuyendo a niveles mínimos la concentración de sulfuro en el efluente; y por otro lado podrían ayudar a generar un estadio intermedio en la transformación de los residuos de pelo con

potenciales usos, entre los cuales podemos mencionar a distintos tipos de enmienda orgánica, lombricultura y compostage (Galarza et al., 2002, 2004).

Los hongos queratinolíticos más activos son los dermatofitos que también poseen propiedades queratinofílicas por excelencia (Filipello, 2000; Simpanya, 2000). (particularmente especies de *Microsporum* y *Trichophyton*) y los relacionados con estos (*Aphanoascus*, *Chrysosporium*, *Geomyces*, *Malbranchea*, *Gymnoascus*, y *Myceliophthora*) Estos hongos, aislados del suelo, como saprótrofos digieren la queratina. Kunert (2000), sugiere que entre los hongos considerados fuertemente queratinolíticos, débilmente queratinolíticos y aquellos que solo digieren componentes no queratínicos no hay una clara separación de grupos. Se han encontrado cepas fúngicas queratinolíticas entre los Onygenales y también en otros grupos fúngicos, incluidos los Mucorales.

Varsavsky (1962, 1964, 1965) reportó la presencia de hongos queratinofílicos en suelos de nuestro país

Quitinasas

Las quitinasas son un conjunto de enzimas responsables de la depolimerización y degradación de la quitina, la cual es el polímero de mayor abundancia en la naturaleza luego de la celulosa.

La quitina está constituida por unidades de N-acetil-gliucosamina con enlaces β -1,4-glicosídicos. Es uno de los componentes principales de las paredes celulares de los hongos y del exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, crustáceos, insectos).

La degradación de la quitina por acción de las quitinasas produce poca N-acetilglucosamina y más cantidad de los oligómeros quitobiosa y quitotriosa que son convertidos en monómeros por la β -N-acetil-glucosaminidasa. Otra enzima, la quitin desacetilasa transforma la quitina en quitosano y acetato por hidrólisis (Madigan et al. 2003). Seidl (2008), realizó una revisión de la constitución química y variedad de quitinasas producidas por hongos filamentosos, señalando que las mismas cumplen un rol esencial en la degradación y remodelación de la pared fúngica durante el crecimiento hifal.

Muchas bacterias y hongos han desarrollado sistemas para depolimerización, transporte y metabolismo de quitina. En general, la degradación microbiana de la quitina involucra la actividad de diferentes depolimerasas (Keyhani & Roseman, 1996), la cual podría ser explotada para producir compuestos derivados de quitina de interés comercial. Algunos microorganismos, mayormente los hongos, son capaces de deacetilar y metabolizar quitina, por la actividad de deacetilasas. (Howard et al, 2003)

En la actualidad se realizan investigaciones que estudian en detalle los usos industriales y médicos de la quitina, derivados de quitina y quitinasas. Dentro de los usos industriales la quitina y los quitosanos han sido empleados en la biorremediación de la contaminación con metales pesados (Cardenas et al., 2001), en la producción textil y papelera (Shigemasa & Minami, 1996) como aditivo para alimentos de animales (Austin et al., 1981) y como componente de productos cosméticos (Tsigos, 2000). En medicina se utilizan los derivados de la quitina en tratamientos de heridas y quemaduras (Muzzarelli et al., 1999), en

agentes de control de colesterol en sangre (Ylitalo et al., 2002), como agentes anticoagulantes (Drozd et al., 2001) y compuestos antibacterianos (Austin et al., 1981). Por otra parte los hongos capaces de producir enzimas quitinolíticas tendrían potencial aplicación en el control biológico (Lorito et al., 1993; Bonants et al., 1995; Tikhonov et al., 2002) y como antifúngicos (Fung et al., 2002).

α -ramnosidasa y β -glucosidasa

Las enzimas α -ramnosidasa y β -glucosidasa son dos enzimas involucradas en la hidrólisis de los flavonoides, entre ellos la naringina.

Para una mejor comprensión de la acción de estas enzimas en la hidrólisis de flavonoides, a continuación se describe brevemente su estructura química e importancia.

Flavonoides

Los flavonoides constituyen una de las clases de compuestos químicos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se pueden encontrar en muchos organismos, como las bacterias, pero prevalecen en las plantas superiores pudiendo hallarse en raíces, tallos, flores, polen, frutos, semillas, madera y corteza (Rouseff, 1980; Markham, 1982). Se estima que aproximadamente el 2% de todo el carbono fotosintetizado por las plantas es convertido en flavonoides o compuestos íntimamente relacionados.

En las plantas los flavonoides existen en una gran variedad de formas estructurales. A pesar de la diversidad, todos contienen 15 átomos de carbono en

sus núcleos básicos los que están ordenados en una configuración C6-C3-C6, es decir dos anillos aromáticos enlazados por una unidad de tres átomos de carbono que pueden o no formar un tercer anillo (**Figura 3**).

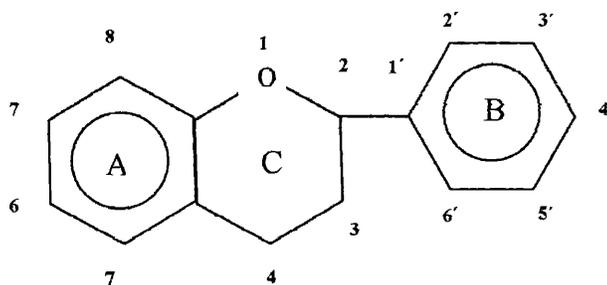


Figura 3: Estructura química general de un flavonoide

Otra importante característica estructural de los flavonoides es la sustitución en los anillos aromáticos por uno o más grupos hidroxilos que pueden estar libres, metilados o enlazados con azúcares. Son polifenólicos y por lo tanto pueden interactuar por enlace de hidrógeno para formar complejos moleculares o enlazarse a otros constituyentes de las plantas tales como las proteínas.

Los flavonoides se dividen en diferentes clases de acuerdo al nivel de oxidación del anillo central (Harborne, 1991): los más ampliamente distribuidos en la naturaleza son los antocianos, las flavononas y los flavonoles. Las diferentes clases varían en sus propiedades.

La mayoría de los flavonoides comunes existen en una amplia variedad de combinaciones glicosídicas.

En los citrus, por ejemplo, se ha encontrado la presencia de 4 tipos de flavonoides: flavononas, flavonoles, flavonas y antocianos, siendo los más

abundantes las flavononas y las menos abundantes, los antocianos. La D- glucosa es el azúcar más frecuente pero también puede ser L-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, L-xilosa, ácido glucurónico, y en algunos casos ácido L-galacturónico. La unión de los azúcares de la serie D es β -glicosídica (Pino, 1997).

Naringina

La naringina (4', 5, 7- trihidroxiflavonona-7-2-O- α -L-ramnopiranosil-D-glucopiranososa), **figura 4**, es uno de los flavonoides más abundantes en los citrus y es el predominante en el pomelo, donde es el principal responsable de su sabor amargo. Fue descubierta en 1857 en los tejidos, flores y frutos de los árboles de pomelo.

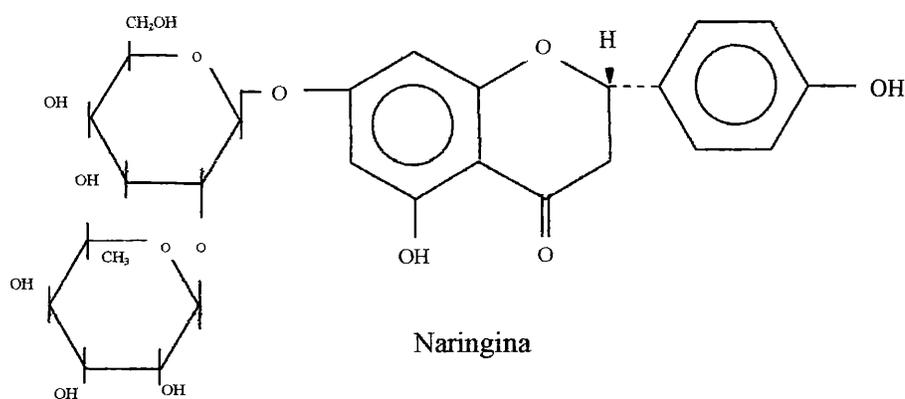


Figura 4: Estructura química de la naringina

En 1958, Ting utilizó Pectinol, una preparación enzimática comercial de origen fúngico para hidrolizar naringina. Desde entonces se buscaron microorganismos productores de esta enzima. Kishi, 1955, 1957, 1958, 1959 estudió 96 cepas de hongos concluyendo que la mejor para producir naringinasa

era una cepa de *Aspergillus niger*. Se han estudiado muchas otras preparaciones de naringinasa producidas por otros microorganismos, tales como *Conothyrium diplodiella* (Nomura, 1965), *Corticium rolfsii* (Kaji & Ichimi, 1973).

Acción enzimática

La naringina puede ser hidrolizada con catálisis ácida o enzimática, siendo los productos de hidrólisis ramnosa, prunina, naringenina y glucosa. Dos de las enzimas más utilizadas para hidrolizar naringina fueron las de *Aspergillus niger* y la de *Penicillium* sp. Las enzimas de ambas fuentes presentan dos actividades: una α -ramnosidasa que cataliza la hidrólisis de naringina a ramnosa y prunina hidrolizando los enlaces α -(1-2) y α -(1-6) entre ramnosa y glucosa, y una β -glucosidasa que cataliza la hidrólisis de prunina a glucosa y naringenina (Versteeg et al., 1977; Roitner et al., 1984; Romero et al., 1985) (**Figura 5**).

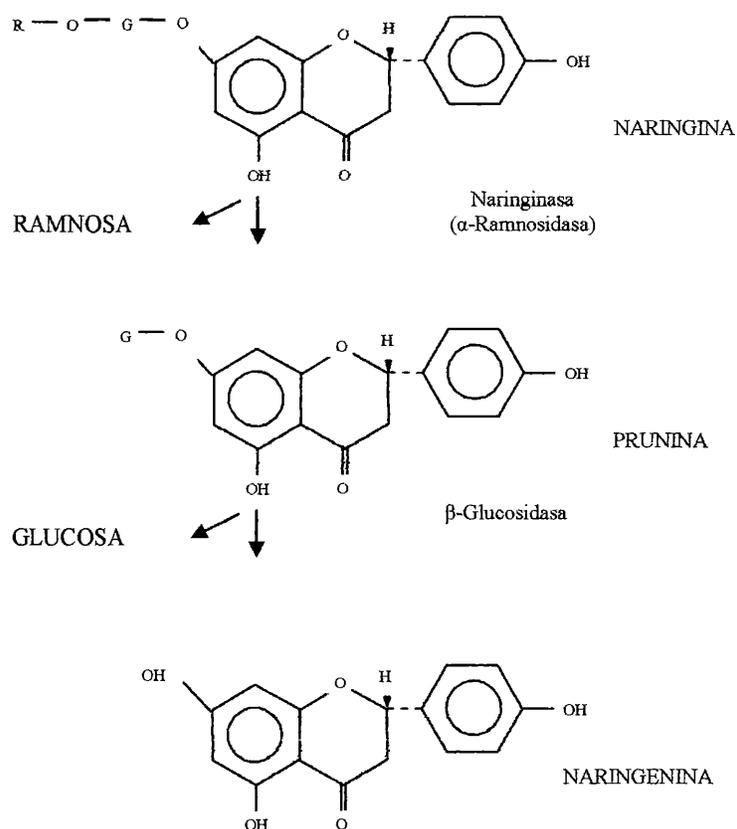


Figura 5: Esquema de la degradación enzimática de la naringina

Uno de los resultados más importantes de los estudios preliminares de screening llevados a cabo en Argentina, fue obtenido por Rojas en el año 2004. En este trabajo fue donde se detectó y describió por primera vez una ramnosidasa alcalina de origen microbiano. Esta enzima fue obtenida del hongo filamentoso *Acrostalagmus luteo- albus* aislado por la Dra. Marta Cabello Instituto Spegazzini (Cabello & Arambarri, 2002). La(s) enzima(s) responsable de tal actividad están siendo purificadas para determinar sus propiedades cinéticas y fisico-químicas. Su campo de aplicación es en la hidrólisis de flavonoides como naringina y hesperidina, para obtener productos de alto valor agregado. Las ramnosidasas microbianas hasta ahora aisladas son activas a pH ácido (pH 5.0-

6.0) condición en la cual los flavonoides son muy poco solubles. En este sentido es altamente deseable una ramnosidasa alcalina que actúa en condiciones de alta solubilidad del sustrato.

Importancia biotecnológica

El jugo y otros productos de pomelos y naranjas amargas, pueden llegar a ser muy amargas si el contenido de naringina es alto. Cabe la posibilidad de desamargar estos productos a través de la hidrólisis enzimática de la naringina ya que la prunina, uno de los productos de su hidrólisis, tiene un sabor amargo que es un tercio menor que el de la naringina y el otro producto de hidrólisis, la naringenina, es insípida y no modificaría el sabor de los productos derivados de los cítricos.

Por otra parte, la naringina puede extraerse fácilmente de las cáscaras de los citrus que los contienen (Calvarano et al., 1996). Este flavonoide y sus productos de hidrólisis tienen un interés creciente debido a los efectos beneficiosos que ejercen sobre la salud humana, y como materia prima para la síntesis de sustancias usadas en la industria de alimentos y farmacéutica.

La naringina puede ser hidrolizada usando ácidos (Cheetham & Meakis, 1989) pero el proceso enzimático tiene las ventajas del trabajo en condiciones suaves, con operaciones no contaminantes en ausencia de productos secundarios.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la biodiversidad fúngica de suelos alcalinos de los bosques de *Celtis tala* Gill ex Planch (Fam. Ulmaceae) (tala) y *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) (coronillo) en el Partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires. Establecer, mediante estudios nutricionales su posible rol en el ecosistema del bosque. Determinar el potencial de estos hongos como fuente de enzimas alcalinas con aplicaciones biotecnológicas

OBJETIVOS PARTICULARES

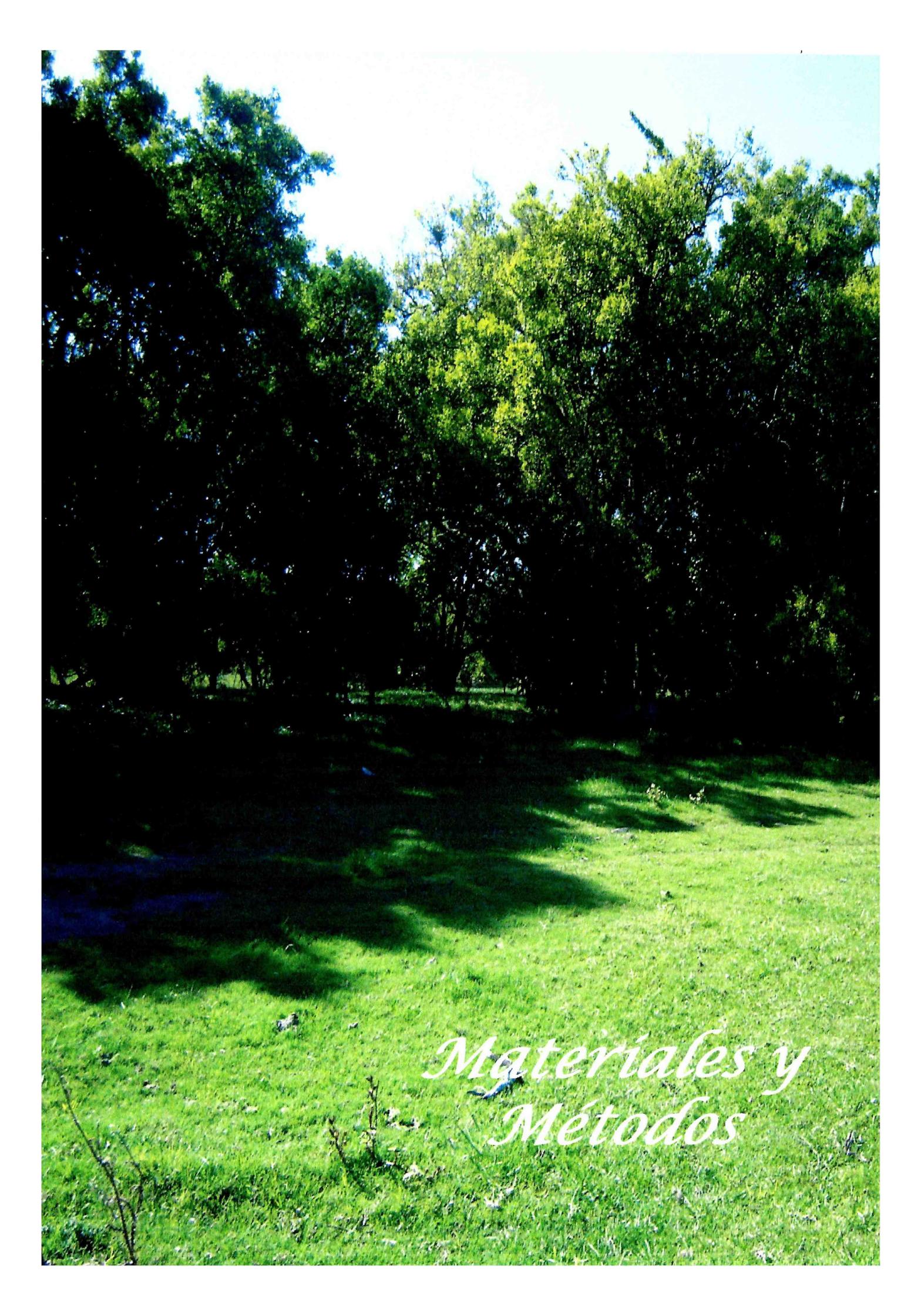
Se proponen los siguientes objetivos específicos referidos a las comunidades nativas de hongos saprótrofos:

- Aislar y determinar los hongos de suelos alcalinos presentes en los cordones de bosques de *Celtis tala* y *Scutia buxifolia* y en la albufera platense, identificando especies fúngicas alcalofílicas y alcalino-tolerantes.
- Observar y comparar la incidencia de las especies fúngicas según las fluctuaciones estacionales, el tipo de suelo y la profundidad.
- Estudiar la comunidad fúngica mediante el cálculo de frecuencias de aparición e índices de diversidad de las distintas especies de hongos alcalofílicos y alcalino- tolerantes, en relación al pH de aislamiento.

- Determinar la capacidad de las especies fúngicas alcalofílicas y alcalino- tolerantes de crecer en diferentes medios y de producir enzimas extracelulares relacionadas con la transformación y degradación de diferentes sustratos.
- Realizar un screening de enzimas alcalinas con potencial biotecnológico, en particular α -ramnosidasas, queratinasas y quitinasas.

HIPÓTESIS

- Existe una microbiota alcalofílica y alcalino- tolerante asociada a los suelos de los bosques de *Celtis tala* y *Scutia buxifolia*, capaz de crecer a pH alcalinos en condiciones de laboratorio.
- La composición de especies en las muestras de suelo analizadas fluctúan estacionalmente según el tipo de suelo y profundidad.
- El pH del suelo condiciona las comunidades fúngicas al establecer diferencias en las frecuencias de aparición de las especies y en los índices de diversidad.
- Los hongos aislados a partir de tres tipos de suelo (Argialbol, Natracualf y Rendol) producen enzimas extracelulares capaces de actuar en condiciones de elevada alcalinidad.
- Hongos aislados de suelos alcalinos producen enzimas de interés en biotecnología como α - ramnosidasas, queratinasas y quitinasas que actúan a altos pH.



*Materiales y
Métodos*

Para explicar las diferentes actividades llevadas a cabo en la realización de esta tesis, se presenta un diagrama de flujo que resume su contenido (**Figura 6**)

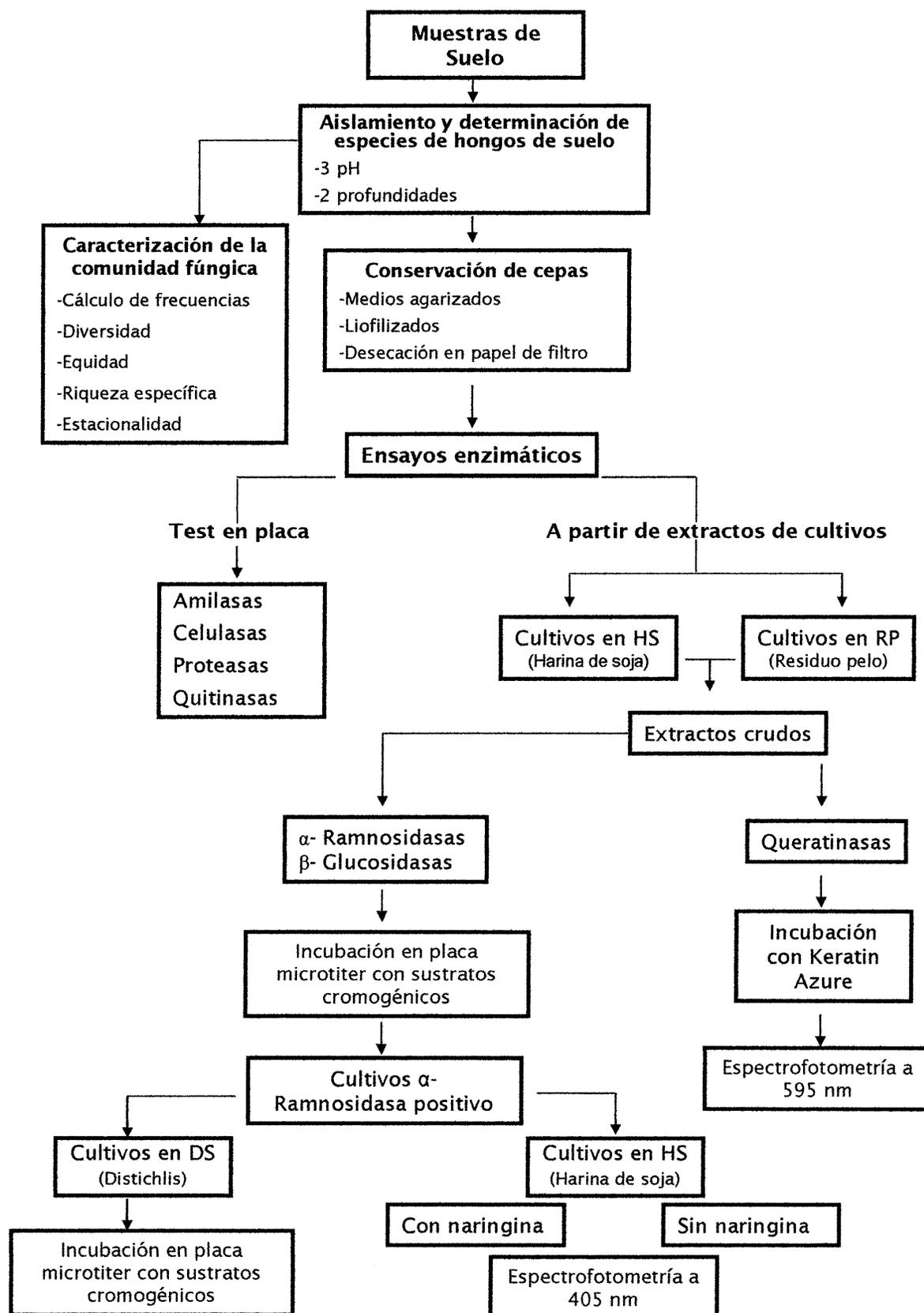


Figura 6. Diagrama de flujo de las actividades llevadas a cabo en la realización de esta tesis

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de muestreo

El área muestreada está ubicada en el partido de Magdalena a 20 Km. al SE de la localidad homónima ($35^{\circ} 11' S$, $57^{\circ} 17' O$) en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. (Figura 6)

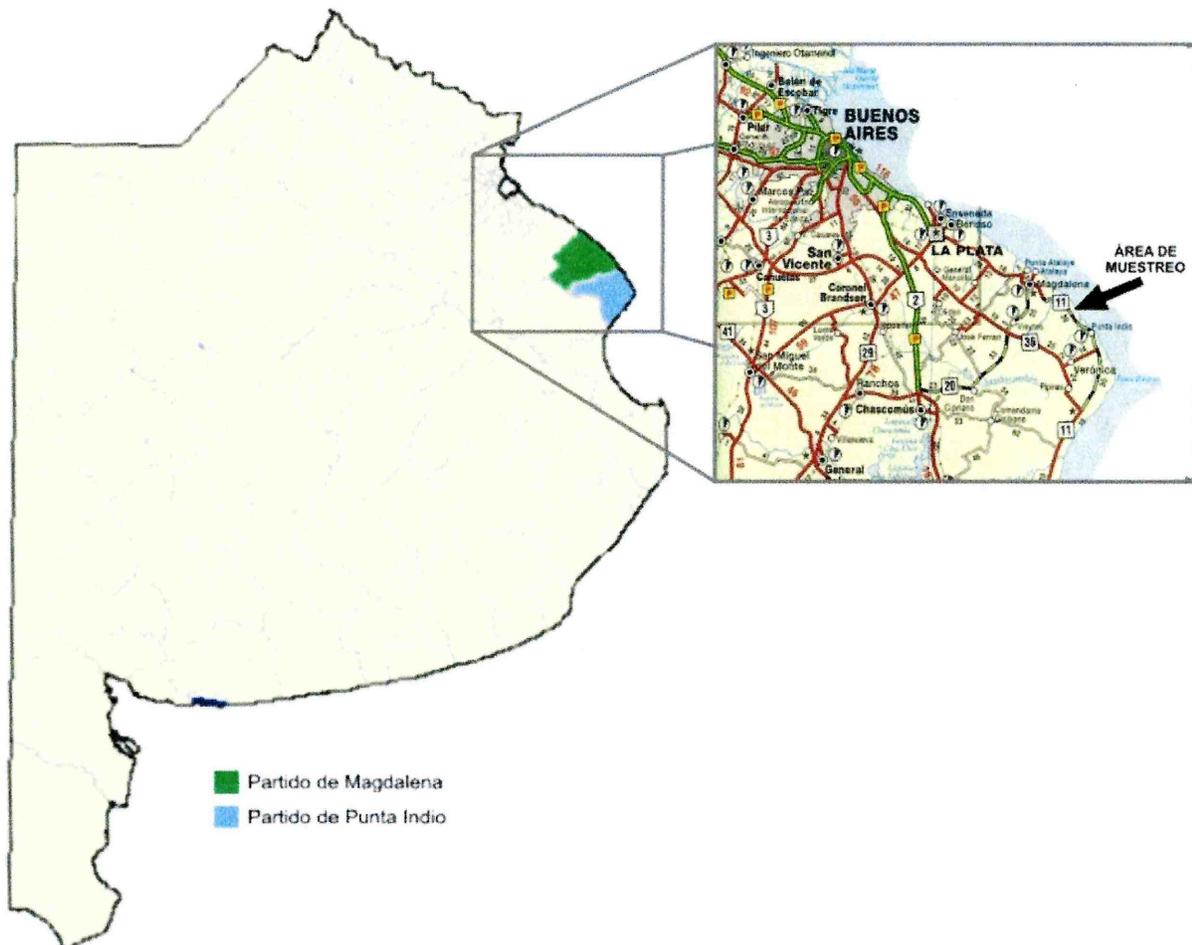


Figura 6. Ubicación del área de muestreo en el mapa de la provincia de Buenos Aires.

En este ambiente, de influencia marina, se desarrollan los “cordones conchiles” que constituyen las geoformas más conspicuas de la zona. Son elevaciones de uno o dos metros sobre el nivel de las áreas adyacentes, constituídas por acumulaciones de valvas de moluscos (conchilla) (León et al., 1979). Estos depósitos marinos se originaron durante ingresiones marinas en el cuaternario (Fidalgo et al., 1975). Tienen esencialmente forma elongada, disponiéndose subparalelamente a la actual línea de ribera y alternan con áreas de relieve negativo (intercordones) en los que se desarrollan pastizales anegables. El ancho de cada cordón varía entre 20 y 60 metros presentando bordes sinuosos; el largo varía entre 400 y 800 metros a menudo interrumpiéndose o bifurcándose. Los cordones adquieren su mayor expresión topográfica entre Punta Piedras y Magdalena atenuándose gradualmente hacia el norte y sur. Limitan hacia el Río de La Plata con su planicie aluvial con la que existe un desnivel de 3 metros (Tricart, 1973).

Sobre estos cordones se desarrollan los talaes, que son bosques xéricos dominados por *Celtis tala* Gil ex Planch (Fam. Ulmaceae) (“tala”) y *Scutia buxifolia* Reiss (Fam. Rhamnaceae) (“coronillo”) y comprenden la comunidad boscosa más importante de la región pampeana. Los talaes se distribuyen desde San Nicolás hasta Mar Chiquita por la Ribera platense y la costa atlántica (Vervoost, 1967) (**Figura 7**).



Figura 7. Fotografía donde se muestra un cordón boscoso del área estudiada.

Al oeste de los cordones los suelos se encuentran dentro del ambiente denominado antigua albúfera platense, también de influencia marina. Se trata de un ambiente plano o plano cóncavo donde alternan sectores planos y antiguos canales de marea de forma meandrosa con distinto grado de rellamamiento.

En las zonas planas son frecuentes las limitantes por alcalinidad sódica desde la superficie, observándose un enlame grisáceo y la presencia de una típica comunidad de pradera salada. Los antiguos canales de marea se destacan de las áreas vecinas por ser inundables y por su vegetación contrastante (**Figura 8**).



Figura 8. Fotografía donde se muestran los antiguos canales de marea con vegetación contrastante con el bosque.

Clima

El clima regional presenta una temperatura media anual de 15,9°C y precipitaciones de 885 mm por año con picos de ocurrencia en otoño y primavera (Servicio Meteorológico Nacional, 1986). La evapotranspiración potencial es de 750 a 800 mm anuales, por lo que en promedio, existe un exceso de agua en el balance anual. Sin embargo, el aumento de evapotranspiración en verano produce una disminución en el almacenaje y pueden existir períodos de déficit (Vervoost, 1967; Arturi, 1997). Existen períodos húmedos en los que se producen inundaciones, sobre

todo en los intercordones alternando con períodos de fuertes sequías tal como sucede en la mayor parte de la región pampeana (Barbagallo, 1983).

La cercanía al Río de La Plata y al Océano Atlántico confiere características oceánicas al clima de la región, con bajas amplitudes térmicas diarias y estacionales. La circulación de los vientos está regulada por la acción del anticiclón del Atlántico sur y del anticiclón del sur del Pacífico. Estos centros emisores hacen que el aire tenga una dirección predominantemente NE-SO con vientos cálidos del Atlántico durante el verano y vientos fríos del Pacífico durante el invierno (Burgos, 1968).

Suelos y vegetación

Desde el punto de vista geomorfológico el NE de la provincia de Buenos Aires representa un área transicional entre la Pampa Ondulada y la Pampa Deprimida. Esta última se caracteriza por su escasa pendiente y es atravesada por cursos de agua que desembocan en el Río de La Plata, la Bahía de Samborombón y en el Océano Atlántico (West et al., 1988).

Uno de los sitios muestreados corresponde al ambiente de influencia marina en contacto con los sedimentos continentales denominada “antigua albúfera platense”. Constituye una franja que hacia el norte del área abarca un ancho de 3 a 4 km y limita hacia el Río de la Plata con los cordones conchiles. A la altura de Punta Piedras prácticamente desaparece. Desde aquí hacia el sur se ensancha considerablemente llegando a tener algo más de 10 km de ancho a la altura del Río Samborombón y al sur de éste se amplía aún más. Se trata de un ambiente plano - cóncavo donde alternan sectores planos y antiguos canales de marea de forma meandrosa con distinto grado de rellenamiento. En las áreas planas de la albúfera predominan suelos de fuerte

desarrollo, generalmente de texturas finas. Los horizontes Bt suelen tener estructura columnar incipiente, presentando un pH cercano a 10. Son pobre o imperfectamente drenados y son clasificados como Natracualfes típicos (Tabla 1).

Tabla 1. Datos analíticos del perfil correspondiente a los suelos de las zonas planas de la albufera (Natracualf típico).

HORIZONTE	Enlame	A3cag	B2tcag	B3cag	Ccag
Profundidad cm	0-3	3-14	14-37	37-64	64-120+
pH (pasta)	9.5	9.6	10.0	9.6	9.7
pH 1:2:5	-	-	-	-	-
pH CIK 1N	-	-	-	-	-
CaCO₃	0.9	2.0	4.7	0.4	0.1
Resistencia (pasta) (Ω)	151	72	71	104	98
Arcilla < 2μ	14.19	27.87	37.82	23.39	23.72
Limo 2-50μ	67.62	57.12	44.65	52.04	50.53
Arena 50-2000μ (total)	18.19	15.01	17.53	24.57	25.75
C org (%)	1.54	0.79	0.34	0.16	0.10
Materia orgánica (%)	2.65	1.36	0.59	0.28	0.17
N total (%)	0.157	0.083	0.034	0.017	0.010
Relación C/N	9.8	9.5	10.0	9.4	10.0
Capac. Int. Cat. (meq/100g)	11.6	17.7	24.5	15.7	28.6
Ca²⁺ (meq/100g)	-	-	-	-	-
Mg²⁺ (meq/100g)	-	-	-	-	-
K⁺ (meq/100g)	3.0	2.8	3.5	2.3	1.9
Na⁺ (meq/100g)	8.7	8.9	16.4	7.7	6.7

Este perfil posee elevados contenidos de sodio intercambiable desde la superficie y tenores significativos de sales solubles. En este caso falta el horizonte A1, existiendo en superficie un enlame que reduce la infiltración a valores muy bajos (0.14 cm/h) y que sobreyace a un horizonte de aspecto transicional y con rasgos de lixiviación. El horizonte B2t tiene textura franco-arcillo-limosa (Sánchez et al. 1976).

La vegetación de los suelos de la albufera es contrastante. Sobre el Natracualf se observa una típica comunidad de pradera salada con *Distichlis scoparia* (Kunth) Arechav. “pasto salado” y *D. spicata* (L.) Greene “pelo de chancho” casi puros, acompañado en mucha menor proporción por *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Figuras 9-10).



Figura 9. Vegetación característica de las zonas planas de la albufera platense (suelo Natracualf)



Figura 10. Detalle de *Distichlis spicata* en el suelo sódico de la albufera.

En los canales de marea existen suelos con drenaje pobre o muy pobre, texturas finas y desarrollo variable. En general, los suelos de estas áreas suelen tener menores contenidos de sodio intercambiable y sales que los de las áreas planas (con pH de 6-7), posiblemente por un mayor lavado, clasificados como Argialboles argiácuicos (**Tabla 2**).

En este perfil el suelo presenta un horizonte A1 oscuro con valores elevados de materia orgánica, el cual sobreyace a un horizonte A2 discontinuo. El horizonte B2t se destaca por su estructura columnar muy bien expresada, estando recubiertas las columnas por una fina película de material lixiviado similar al del horizonte A2.

Tabla 2. Datos analíticos del perfil correspondiente a los suelos Argialboles de los antiguos canales de marea.

HORIZONTE	A1	A2	B21tg	B22tg	B23tg	B3g
Profundidad cm	0-20	20-23	23-33	33-47	47-72	72-94
pH (pasta)	6.0	7.1	7.3	8.0	8.2	8.3
pH 1:2:5	-	-	-	-	-	-
pH CIK 1N	-	-	-	-	-	-
CaCO ₃						
Resistencia (pasta) (Ω)	400	800	235	217	250	365
Arcilla < 2 μ	34.96	18.94	30.40	31.14	29.59	22.41
Limo 2-50 μ	55.27	70.9	55.28	55.32	55.91	56.98
Arena 50-2000 μ (total)	9.77	12.16	14.32	13.54	14.5	20.61
C org (%)	7.89	1.64	0.87	0.50	0.23	0.18
Materia orgánica (%)	13.60	2.83	1.50	0.86	0.40	0.31
N total (%)	0.876	0.165	0.087	0.049	0.025	0.019
Relación C/N	9.0	9.9	10.0	10.2	9.2	9.5
Capac. Int. Cat. (meq/100g)	29.4	11.0	22.1	22.8	21.0	16.8
Ca ²⁺ (meq/100g)	11.9	5.1	7.4	7.0	8.0	6.2
Mg ²⁺ (meq/100g)	5.0	2.9	7.0	7.6	7.7	5.4
K ⁺ (meq/100g)	0.32	0.13	0.29	0.32	0.34	0.28
Na ⁺ (meq/100g)	0.65	0.37	0.95	1.29	1.23	0.58

Los canales de marea donde se ubican los Argialboles, se destacan de las áreas vecinas por la abundancia de *Eryngium eborneum* Decne., el cual es acompañado en menor proporción por *Solanum glaucophyllum* Desf. y *Chenopodium murale* L. (Figuras 11-12)



Figura 11. Vista de la vegetación predominante en las zonas bajas (antiguos canales de marea) de la albufera platense



Figura 12. Detalle de *Eryngium eborneum* en los Argialboles de la albufera.

El ambiente contiguo a la albufera hacia la costa son los cordones conchiles o albardones. El tipo de suelo dominante en los cordones, según la Taxonomía de Suelos es Rendol típico, cuya génesis está condicionada por el carbonato de calcio litogénico y pedogénico; el primero es heredado del material originario y el segundo es de origen secundario formado por el perfil del suelo (West et al., 1988). (Tabla 3)

Tabla 3. Datos analíticos del perfil correspondiente a los suelos Rendol del talar. (1) Capa de conchilla medianamente fragmentada (2) Capa de conchilla escasamente fragmentada (Hurtado *et al.*, 1988).

HORIZONTE	A1	AC	C (1)	C(2)
Profundidad (cm)	0-20	20-35	35-80	80+
pH (pasta)	7.4	7.8		
pH 1:2:5	7.6	7.9		
pH CIK 1N	7.0	7.2		
CaCO ₃	48	94		
Resistencia (pasta) (Ω)	803	1436		
Arcilla < 2μ	9.95	15.56	1.44	0.39
Limo 2-50μ	38.79	16.77		
Arena 50-2000μ (total)	51.26	67.67	98.56	99.61
C org (%)	6.06	2.24		
Materia orgánica (%)	10.44	3.86		
N total (%)	0.665	0.196		
Relación C/N	9.1	11.4		
Capac. Int. Cat. (meq/100g)	54.0	35.0		
Ca ²⁺ (meq/100g)	-	-		
Mg ²⁺ (meq/100g)	-	-		
K ⁺ (meq/100g)	0.9	0.5		
Na ⁺ (meq/100g)	0.7	0.5		

El material constituyente es de origen biológico, valvas de moluscos depositadas durante ingresiones marinas del Cuaternario (Fidalgo et al., 1975) y representan elevaciones de uno o dos metros sobre el nivel de las áreas adyacentes (León et al., 1979). La depositación tuvo lugar en un ambiente de fuerte oleaje del SE, con un nivel marino en progresivo descenso, entre 8000 y 2000 años AP (Cavallotto, 1995). Son considerados como suelos “intrazonales”, debido a que el factor de formación supera al efecto del clima y la vegetación.

El nivel topográfico aumenta suavemente al alejarse de la costa del río por lo que la napa freática se encuentra a menor profundidad en los cordones más cercanos a la costa que en aquellos más alejados.

Los suelos tienen un perfil de escaso desarrollo, con secuencias A1-AC-C o bien A1-C. Las texturas son medianamente gruesas a gruesas, presentando desde superficie fragmentos gruesos (>2mm) constituidos por detritos de conchilla y rodados calcáreos. Su participación aumenta en profundidad, haciéndose máximo en el horizonte C (Hurtado et al., 1988).

El horizonte superficial se caracteriza por su color oscuro, con materia orgánica en contenido variable, alcanzando valores excepcionalmente altos (10-12%). El grado de humificación de la materia orgánica es elevado: 88% para A1 y 84% para AC (Sánchez, 1976). Esto está asociado a la intensa actividad biológica resultante de las condiciones ecológicas locales, como también a otros factores físicos y químicos: pH (cerca de 9), aireación, riqueza de calcio y nitrógeno y a la rápida descomposición biofísica de los restos vegetales que se incorporan al suelo. Estas condiciones favorecen asimismo una buena

agregación, presentando los horizontes A1 una estructura granular o migajosa bien expresada. Esta cualidad, unida a la textura, le confiere al suelo una alta velocidad de infiltración (Hurtado *et al.*, 1988). Por consiguiente, son suelos bien drenados con una moderada permeabilidad.

En los cordones conchiles (Rendoles) se asientan los talares conformados por siete especies arbóreas: *Celtis tala* Gill. ex Planch, *Scutia buxifolia* Reiss.; *Jodinia rhombifolia* H. et al. (“sombra de toro”), *Schinus longifolius* (Lindt.) Speg. (“molle”), *Sambucus australis* Cham et. Schelecht (“sauco”), *Phytolacca dioica* L. (“ombú”) y *Sapium haemospermum* Muell. Arg. (“curupí”) (Goya et al., 1992).

Según su composición específica se los ha considerado como una comunidad edáfica dentro de la Provincia Pampeana (Cabrera & Willink, 1980). De acuerdo con Holdridge (1978) el área corresponde a la zona de vida de “Bosque Seco Templado Cálido”.

Entre los cordones se encuentran pastizales sobre suelos anegadizos, este contraste permite definir claramente el límite entre el bosque y el pastizal, indicando una asociación entre el sustrato y el tipo de vegetación.

En sentido transversal a la costa, se observa una variación espacial claramente definida, en la cual los cordones más alejados al río presentan una clara dominancia de *C. tala*, en los cordones cercanos domina *Scutia buxifolia* y en los intermedios existe una codominancia de ambos (Goya et al., 1992). Esta gradación determina una variación en la composición herbácea, no sólo entre los distintos cordones, sino posiblemente dentro de un mismo cordón, según la

ubicación en éstos (interior del bosque, ecotono, pastizal gramíneo) (**Figuras 13-14**).



Figura 13. Vista de un intercordón donde se aprecia la vegetación de pastizal.



Figura 14. Vista de un cordón conchil sobre el cual se observa la vegetación de los talares.

Fauna

Corresponde a la Región Neotropical Subregión: Guayano-Brasileña
Distrito: Pampásico.

Mamíferos: Hay especies *no propias* del distrito pampásico como *Lutreolina crassicaudata* (comadreja colorada) y otras que si lo son como el *Dusicyon gymnocencus* (zorro gris), *Dasypus hybridus* (mulita) y *Ctenomys talarum* (tucotuco), entre otros. **Anfibios:** La fauna de anfibios se va empobreciendo de Norte a Sur y Punta de Indio es el límite más austral de especies como *Leptodactylus prognathus* e *Hyla nana*. Se los halla preferentemente en pajonales, totorales y juncales aunque suelen utilizar también los pastizales como refugio o sitios para alimentarse. **Aves:** es el estrato faunístico más abundante. En la costa se ven *Ardea cocoi* (garzas mora), *Casmerodius albus* (garza blanca) y *Larus marinus* (gaviotas). En talares hallamos una avifauna típica de monte xerófilo como por ejemplo *Paroania coronata* (cardenal común) *Suiriri suiriri* (suiriri) y *Phitotoma rutila* (cortarramas). Entre las especies migratorias podemos citar a: *Muscivora tyrannus* (tijereta), *Tyrannus melancholicus* (benteveo real), *Progne modesta* (golondrina negra), *Tringa flavipes* (chorlo menor patas amarillas) y *Caladris fuscicollis* (chorlito rabadilla blanca) entre otras.

Conservación

Estos bosques han sufrido un proceso de degradación muy importante desde principios de siglo como consecuencia de la creciente actividad humana

(incremento de áreas urbanas y agrícolas). En la actualidad dicho proceso ha llevado a su desaparición en la zona Norte de la Provincia de Buenos Aires. Las principales actividades económicas llevadas a cabo en la región son la ganadería y la explotación de materiales calcáreos del subsuelo. En 1984 se declaró Reserva de Biosfera (MAB-UNESCO) a una faja costera de 26.000 ha entre las localidades de Magdalena y Pipinas. La mayor parte de esa superficie, en la que se incluye al área de muestreo, corresponde a propiedades privadas. En el Partido de Magdalena y Punta Indio se encuentra la porción mejor conservada de estos bosques (Parodi, 1940).

I Parte

DIVERSIDAD DE HONGOS DE SUELO. METODOLOGÍA

Muestreo

Se tomaron muestras de los tres tipos de suelo a dos profundidades: En el Argialbol, las muestras se tomaron en los horizontes A1 (0-15cm) y A2 (+15cm); en el Natracualf, las muestras se tomaron en los horizontes A3 cag (0-15 cm) y B2t cag (+20cm); y en el Rendol en los horizontes A1 (0-20cm) y AC (+20cm). En cada suelo estudiado se colectaron muestras estacionalmente: otoño (Mayo-2004), invierno (Agosto-2004), primavera (Octubre-2004) y verano (Febrero-2005).

Las muestras de suelo se recolectaron utilizando el método de muestras compuestas al azar (Dick et al., 1996). Se tomaron 5 a 6 submuestras en un área de 3 m² y se mezclaron para conformar una muestra.

Para el aislamiento de hongos de suelo se utilizó el método de lavado de suelo de Parkinson & Williams, (1961). Las partículas retenidas en un tamiz de 0.5 mm de malla se lavaron (10-15 lavados) y transfirieron a una placa de Petri con papel de filtro estéril y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 hs (Widden & Parkinson, 1973) para evitar el crecimiento de bacterias. Se colocaron cien partículas en placas de Petri a razón de 5 partículas por caja, conteniendo agar extracto de malta (AEM) con el agregado de 0.5 % de sulfato de estreptomicina y 0.25 % de cloramfenicol (**anexo I**).

De manera de evaluar el efecto de pH de aislamiento sobre la frecuencia y diversidad de especies fúngicas, el pH inicial del medio de cultivo fue ajustado a 6.0, 8.0, 11.0 con soluciones buffer de sales de sodio, según Nagai et al. 1998 (**soluciones buffer en anexo II**). Las placas se incubaron a 25 °C y se observaron en microscopio óptico semanalmente.

Las especies presentes en las partículas de suelo fueron identificadas taxonómicamente, aisladas y conservadas en el Cepario del Instituto de Botánica Spegazzini, en agar- extracto de malta, agar-papa-glucosado (APG), liofilizadas o bien en ampollas selladas conteniendo papel de filtro con inóculo de cada cepa.

Análisis de los datos

Se calcularon las frecuencias de aparición de las diferentes especies fúngicas (n° de partículas donde crece la especie x / n° de partículas totales \times 100) (Godeas 1983).

Las diferentes especies taxonómicamente determinadas y sus frecuencias de aparición fueron utilizadas para calcular el índice de biodiversidad (H') Shannon- Weiner; riqueza específica (S) y equitabilidad (J') (Magurran 1988).

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i (\log_2 p_i) \quad (1)$$

Donde p_i es la probabilidad de encontrar cada especie i en una muestra.

S es simplemente el número de especies diferentes registradas en las muestras.

La equitabilidad (J') es la distribución de frecuencias por cada especie en todas las muestras.

$$J' = \frac{H'}{\log_2 S} \quad (2)$$

De la ecuación 2 se deduce

$$H' = J' \log_2 S \quad (3)$$

donde el índice de Shannon – Weiner aparece como el producto de dos componentes de la diversidad: equitabilidad y número de especies. Entonces un aumento en la diversidad no sólo es producto del número de especies sino también de la equitatividad de sus distribuciones.

Análisis de componentes principales

Mediante el empleo de análisis de componentes principales (PCA) (Digby & Kempton, 1987) se evaluaron las diferencias de composición de las comunidades frente al pH utilizado para su aislamiento (6.0- 8.0- 11.0).

Este análisis multivariado permite una representación de las diferencias de composición entre muestras a través de su ordenamiento sobre ejes sucesivos. Sólo se analizaron los ejes sobre los que se observaron tendencias consistentes de diferenciación entre las diferentes muestras. El programa utilizado fue MVSP Version 3.13b. Copyright © 1985- 2002 Kovach computing Services. Los datos se transformaron mediante la aplicación de raíz cuadrada y el criterio de selección de los componentes principales se resolvió según la regla de Kaiser.

Para el análisis se utilizaron los valores de frecuencia de las especies aisladas en cada pH de aislamiento y cada uno de los muestreos.

Se utilizó el índice de correlación de Pearson para evaluar las variaciones de diversidad (H') en relación con la riqueza de especies (S) y su distribución en las muestras (J').

Diversidad de hongos aislados de *Distichlis*

En las zonas planas de la antigua albufera platense se desarrolla el suelo más alcalino (Natracualf, pH 10.0). De este tipo de suelo se analizó la micobiota saprótrofa asociada a restos de vegetación sobre el suelo. Los restos corresponden exclusivamente a *Distichlis spicata* (pasto salado).

Distichlis spicata (L.) Greene (Poaceae) es una especie perenne y crece a partir de extensos rizomas escamosos de color amarillento, es la única especie vegetal presente en esta área salina. El contenido de sodio de los suelos donde aparecen las poblaciones de *D. spicata* oscilan entre 5.39 y 13.9 meq 100 g⁻¹ (Sánchez et al. 1976). Esta especie crece en suelos con un rango de pH de 6.8 a 9.6 (Ungar, 1974, Hansen et al., 1976). *D. spicata* está adaptada a ambientes salinos debido a que posee glándulas salinas, las cuales eliminan las sales de sus tejidos (Hansen et al. 1976) y pueden mantener una alta presión osmótica en las células excretando sal (Ungar, 1974). Esta capacidad para excretar sales le permite a la planta retener concentraciones salinas adecuadas en los tejidos de la hoja y entonces superar la toxicidad que causa la acumulación excesiva de iones (Ungar 1974, Hansen et al. 1976). *D. spicata* es utilizada como forraje para el

ganado vacuno principalmente durante los meses julio, enero y abril ya que funciona como suplemento durante estos meses donde otras pasturas contienen bajos niveles proteicos (Somlo et al. 1985).

Se recolectaron plantas secas de *D. spicata* de la superficie del suelo en un muestreo de primavera. Las hojas se separaron de las plantas y se procesaron empleando dos métodos para determinar la microbiota asociada a las hojas:

1) Incubación en cámara húmeda: 200 hojas enteras de *Distichlis* se ubicaron en placas de Petri (90 mm diam. 10 hojas/placa) sobre papel de filtro humedecido (técnica de cámara húmeda).

2) Fragmentación y lavado de hojas de *Distichlis* se fragmentaron las hojas de *Distichlis* utilizando un mixer para obtener un tamaño uniforme de partículas (3–4 mm). Los fragmentos obtenidos se lavaron 10 veces con agua destilada estéril, luego se dejaron secar por 24 horas sobre discos de papel de filtro estériles de manera de evitar el crecimiento de levaduras y bacterias antes de disponer los fragmentos en placas (Widden & Parkinson 1973); se distribuyeron 100 fragmentos en 20 placas de Petri con corn meal agar (CMA) y 0.5 % de estreptomina y 0.25 % cloramfenicol para evitar el crecimiento bacteriano.

Todas las placas se incubaron 25° C y se observaron con microscopio estereoscópico semanalmente. Se determinaron, aislaron y cultivaron las especies fúngicas y se depositaron en el Cepario del Instituto de Botánica Spegazzini (LPS)

Análisis de los datos

En la técnica de cámara húmeda cada hoja se consideró como una unidad muestral. La abundancia de cada especie se calculó en base al número de hojas donde apareció esa especie en particular. La frecuencia porcentual para cada especie fúngica se calculó como sigue:

$$\frac{\text{número de hojas [o número de partículas] donde se encuentra una especie en particular}}{\text{número total de hojas analizadas}} \times 100$$

La frecuencia de cada especie fúngica se utilizó para calcular el índice de diversidad de Shannon-Weiner (H'); riqueza específica (S); y equitabilidad (J') (Magurran 1988; Cabello & Arambarri, 2002).

Métodos de conservación de cepas

Liofilización y deshidratación en papel de filtro

Para la conservación de las cepas mediante liofilización o deshidratación en papel de filtro se sembraron placas con medio APG (agar papa glucosado) o AEM (agar extracto de malta) para la producción de esporas. Cuando el cultivo esporuló suficientemente las esporas fueron resuspendidas en una solución crioprotectora de leche descremada (10 % P/V) conteniendo inositol trifosfato (5 % P/V) (Smith & Kolkowski, 1996). Se colocaron 500 μ l de suspensión de esporas en cada ampolla de vidrio para su liofilización en un equipo L-3

RIFICOR. También se utilizaron rectángulos de papel de filtro embebidos en la misma suspensión de esporas colocados dentro de las ampollas y secados en silicagel (**Figura 15**). Para el desarrollo de los cultivos, las cepas liofilizadas se recuperaron por medio de rehidratación lenta con agua estéril seguida de plaqueo en medio de mantenimiento.

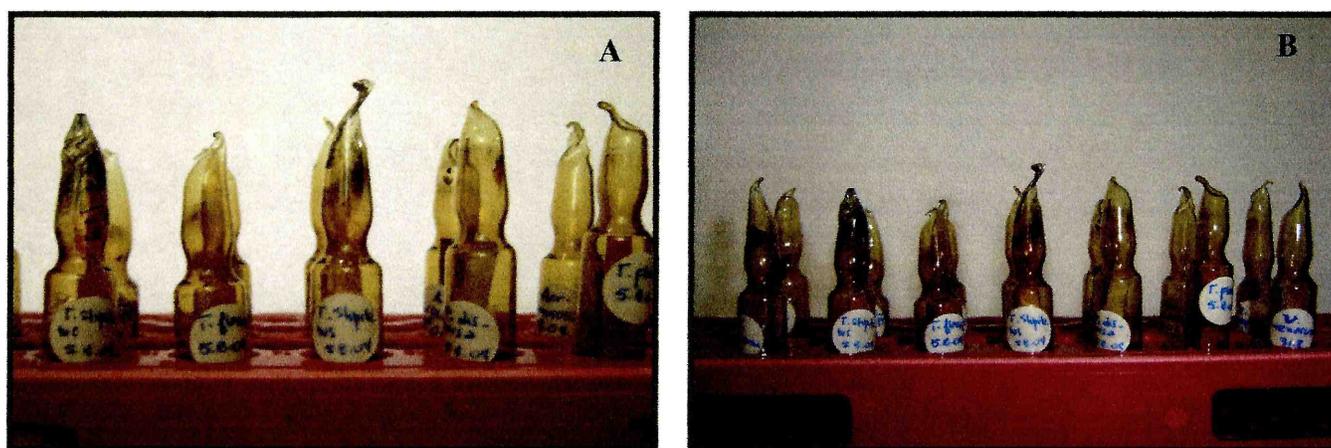


Figura 15. Cepas conservadas en ampollas con papel de filtro (A) y liofilizadas (B).

Mantenimiento en medios agarizados

Para el mantenimiento de las cepas en medios agarizados se preparó APG, AEM, CMA (corn meal agar) (**anexo I**) y se dispusieron en estrías. Las mismas se mantienen en heladera a 5°C (**Figura 16**).



Figura 16. Cepas conservadas en estrias con medios agarizados.

II Parte

CULTIVO DE HONGOS EN DIFERENTES MEDIOS Y ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

Las actividades amilolítica, proteolítica, celulolítica y quitinolítica fueron determinadas mediante test en placa. Las actividades queratinolítica, α -ramnosidasas y β -glucosidasas a partir de extractos de cultivos líquidos y sólidos. Se realizó la caracterización de los medios sólidos de incubación mediante la determinación de sus propiedades de hidratación

Preparación de inóculos

Para la obtención de los inóculos para los cultivos líquidos y sólidos se utilizaron cajas de Petri con 20 ml de medio AEM o APG, los cuales se sembraron a partir de las estrías conservadas de cada cepa. Luego de incubar 10 días a 30°C, los conidios producidos se resuspendieron con 10 ml de solución de glicerol 20% estéril y se congelaron a -10°C.

Para las especies que no esporularon en estos medios, el inóculo consistió en discos de micelio de 6 mm tomados de la zona de crecimiento activo de la colonia, generalmente entre 4 y 6 días de cultivo.

Crecimiento en medio agarizado para los test enzimáticos

Para la determinación de las actividades amilolítica, proteolítica, celulolítica y quitinolítica, se realizaron tests en placa con medio de cultivo agarizado conteniendo los sustratos respectivos: almidón, CMC, caseína (leche) y

Chitin Azure (**anexo I**). En todos los casos el pH del medio se llevó a 9.0 mediante el agregado de solución buffer según Nagai et al. (1985) (**anexo I**). Se realizaron tres repeticiones para cada especie y un control a pH 6.0. Cada placa se inoculó en su centro con un disco de 6 mm de diámetro conteniendo micelio en crecimiento.

Para determinar actividad amilolítica, las placas fueron reveladas con una solución de Iodo al 1% en solución de KI 0,2 % luego de 3 -4 días de incubación. La presencia de una zona amarilla alrededor de la colonia fue indicador de actividad (Hankin & Anagnostakis, 1975).

La actividad celulolítica se reveló con Rojo Congo 0.2 % luego de 5-7 días de incubación.

La producción de proteasas se detectó con solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. La presencia de un halo transparente alrededor de la colonia indicó actividad positiva (Koneman & Roberts, 1987)

Para la visualización de la actividad quitinolítica las placas se incubaron por 3 semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético con papel de filtro humedecido (cámara húmeda) de manera de evitar la deshidratación del medio de cultivo. Cuando Chitin Azure es depolimerizado se observan zonas claras alrededor de la colonia (Howard et al 2003)

En todos los tests, la actividad se expresó semicuantitativamente midiendo el halo de degradación alrededor de la colonia y relacionándolo con el tamaño de la misma:

$$\frac{\text{radio de la colonia} + \text{radio del halo}}{\text{radio de la colonia}}$$

Para la determinación de las actividades queratinolítica, α -ramnosidasa y β -glucosidasa se realizaron cultivos en 3 medios diferentes:

- medio líquido a base de harina de soja (HS) (actividades queratinolítica, α -ramnosidasa y β -glucosidasa)
- medio sólido formado por hojas de *Distichlis spicata* (pasto salado) (actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa)
- medio sólido constituido por pelo vacuno (RP) (actividad queratinolítica)

Medio de cultivo líquido HS (harina de soja)

Para el cultivo de las especies en medio líquido se colocaron 15 ml de medio HS (**anexo I**) en erlenmeyers de 125 ml.

Los erlenmeyers conteniendo el medio se esterilizaron en autoclave por 30 minutos a 121°C. Como antibióticos se utilizaron cloranfenicol 40 ppm y estreptomycinina 100 ppm.

En los casos de cepas de abundante esporulación cada erlenmeyer se inoculó con una suspensión de esporas de 10^6 propágulos/ml (recuento efectuado en cámara de Neubauer).

Para el caso de los micelios no esporulados el inóculo consistió en 5 discos de 6 mm de diámetro con micelio en activo crecimiento. Todos los cultivos se incubaron en agitación orbital a 200 rpm, 28°C durante 15 días (**Figura 17**).



Figura 17. Erlenmeyers conteniendo medio HS, inoculados con suspensión de esporas

En la **tabla 4** se indica la composición química de la harina de soja.

Tabla 4. Propiedades químicas de harina de soja

Proteína cruda %	43,0
Lípidos %	22,0
Carbohidratos solubles %	3,10
Calcio %	0,2
Fósforo %	0,5
Sodio %	4,4
Potasio %	2,1

Cultivos en sustrato sólido. *Distichlis*

En el presente trabajo se aislaron muchas especies alcalofílicas a partir del suelo salino Natracualf. En este suelo crece casi exclusivamente *Distichlis* (pasto salado o pelo de chanco). Para evaluar las actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa en medio sólido, se seleccionaron las especies fúngicas que

presentaron actividad α -ramnosidasa positiva en cultivo líquido, y se realizaron cultivos en restos vegetales de *Distichlis*.

Las hojas de *Distichlis*, previamente lavadas y secadas en estufa durante 24 horas a 80°C se cortaron con tijera de manera de obtener segmentos de 1 cm de largo. El material vegetal así procesado fue acondicionado en placas de Petri de 9 cm de diam a razón de 2 gr/ placa. Las placas con el sustrato se esterilizaron por 30 min a 121°C.

A cada placa se le agregó 8 ml de medio salino (MS) (**anexo I**) conteniendo antibióticos y buffer pH 9.0 dejándolas reposar por 24 hs a 28°C para permitir la completa hidratación de las hojas con medio.

Para la preparación de 100 ml de MS + antibióticos, se mezclaron 90 ml de solución stock con 10 ml de buffer 9.0 (**anexo II**) y 10 ml de solución de cloranfenicol/estreptomicina.

Las placas fueron inoculadas con 100 μ l de suspensión de 10^6 conidios de cada cepa fúngica seleccionada. Para las especies que no esporularon en cultivo se utilizaron como inóculo 5 discos de 6 mm de diámetro, conteniendo micelio en crecimiento activo. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 28°C durante 2 semanas (**Figura 18**) Los cultivos se realizaron por triplicado.

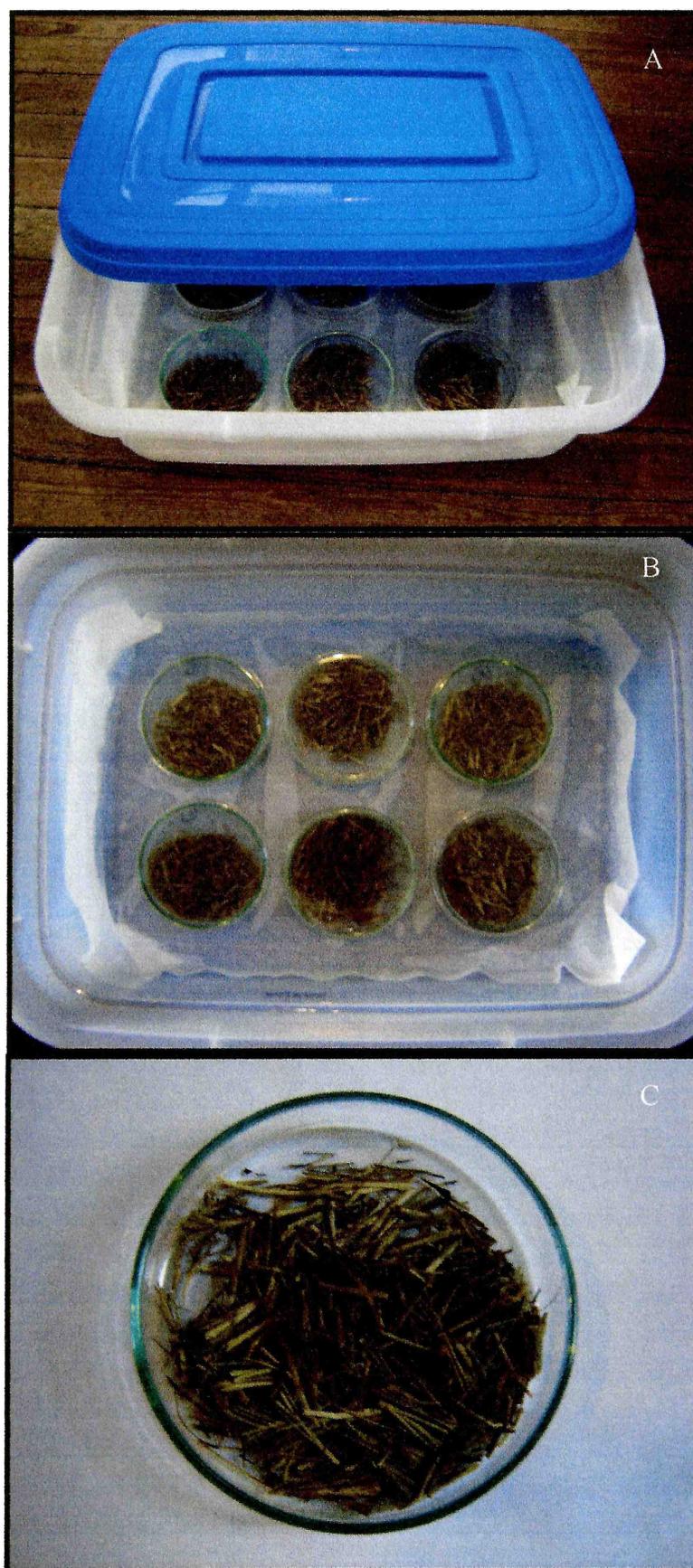


Figura 18. A, B. cámara húmeda con placas de Petri conteniendo hojas de *Distichlis*. C. detalle de placa de Petri con hojas de *Distichlis*

En la **tabla 5** se indica la composición del *Distichlis* representando los componentes de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y lignina, el 86 % del peso seco de la hoja.

Tabla 5. Propiedades químicas de *Distichlis spicata*

Materia orgánica %	84,8
Proteína bruta %	5,9
Celulosa %	36,2
Hemicelulosa %	40,6
Lignina %	10,0
Fósforo %	0,18
Calcio %	0,3
Potasio %	0,87
Materia Seca Digestible %	44,8

Cultivos en sustrato sólido. Pelo vacuno

Para evaluar la actividad queratinolítica las especies fúngicas seleccionadas, se incubaron en placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo cada una 3 gr de pelo vacuno molido y desengrasado. Las placas con pelo vacuno se esterilizaron durante 25 min. a 121°C (**Figura 19**). A cada placa se le agregó 10 ml de medio mineral mínimo (**anexo I**) (Galarza *et al.*, 2002) conteniendo una concentración 10^6 de esporas fúngicas de la especie a probar. El pH fue ajustado a 9.0 para lo cual se utilizaron soluciones buffer (**anexo II**). Las placas se incubaron en cámara húmeda a 28°C durante 20 días. Se realizaron triplicados para cada especie.

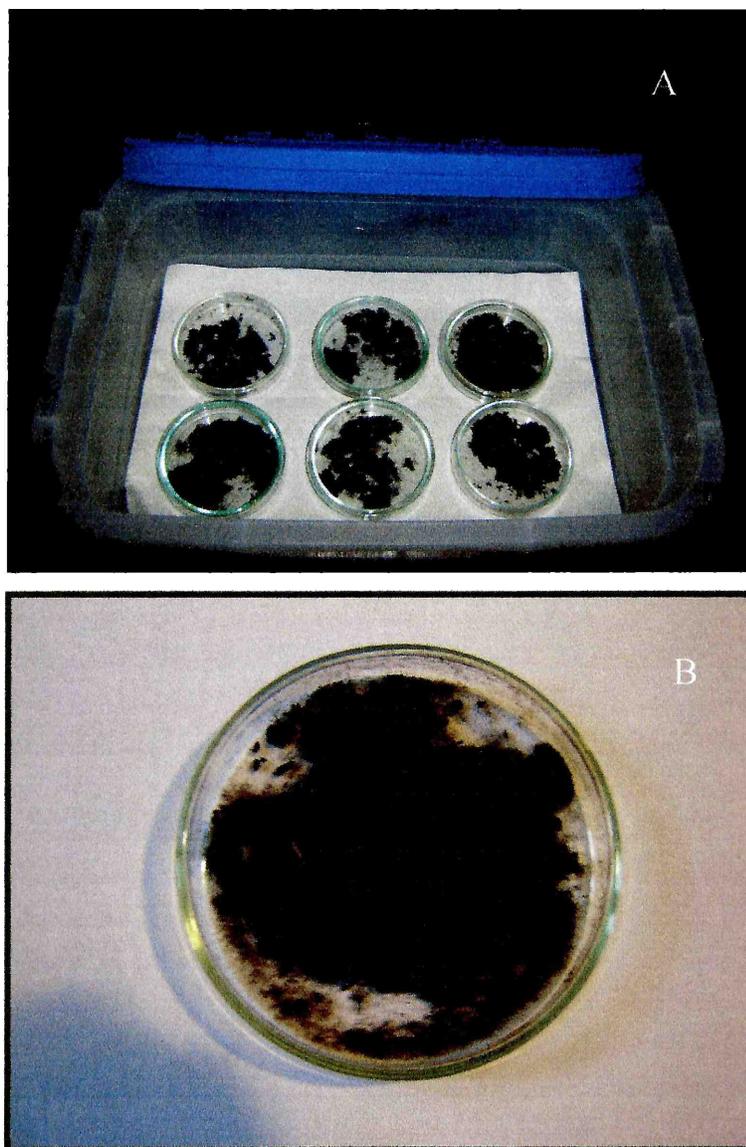


Figura 19. Medio sólido RP. A. Cámara húmeda con placas de Petri con RP B. Detalle de placa de Petri conteniendo RP

En la **tabla 6** se indica la composición del pelo vacuno.

Tabla 6. Propiedades químicas de pelo vacuno

Aminoácidos %	70,0
Proteínas %	28,0
Lípidos %	2,0
Carbono %	44,0
Nitrógeno %	15,1
Azufre %	5,8

Se calculó el promedio de los pesos inicial y final y se determinó pérdida de peso de los cultivos mediante la siguiente fórmula (Choi et al, 2005):

$$\text{Porcentaje de pérdida de peso: } \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

Se midió pH inicial y final de los cultivos en todos los medios utilizados

Caracterización de los sustratos sólidos

Tanto los cultivos en *Distichlis* como en pelo vacuno pueden considerarse como cultivos o fermentaciones en sustrato sólido (FSS). Esta se define básicamente como un cultivo que ocurre en un medio con partículas, generalmente poroso, en ausencia de agua libre. A diferencia de los medios líquidos en los cuales el agua constituye más del 95 % del medio, en la FSS el agua disponible o potencial de agua del sustrato es un parámetro crítico del cultivo. El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad del agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de este líquido en la matriz sólida. El potencial de agua o la actividad del agua (a_{H_2O}) son los parámetros que se han utilizado para caracterizar cuantitativamente el estado del agua en el sistema.

Para caracterizar los sustratos de la FSS en relación a sus propiedades higroscópicas, se determinaron las isotermas de desorción de agua. Esta práctica resulta de importancia ya que una disminución del potencial acuoso (a_w) de los

cultivos por debajo del óptimo (hasta 0.98 para hongos) puede afectar la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa (Aeberhard, 2000).

Las hojas de *Distichlis spicata* se autoclavaron con agua por 20 min a 121°C y luego se hidrataron con un exceso de agua destilada. Para obtener la isoterma las muestras hidratadas se incubaron en recipientes herméticos bajo distintas condiciones de humedad relativa del aire hasta lograr el equilibrio (~15 días). Las distintas condiciones de humedad relativa se obtuvieron empleando soluciones de glicerol, para lo cual la fracción molar de agua (humedad relativa) se calculó mediante la ley de Roulton:

$$a_w = n_1 / (n_1 + n_2)$$

Donde: n_1 moles de agua, n_2 : moles de glicerol

El contenido de agua del material una vez establecido el equilibrio se determinó por gravimetría a 80 °C y se expresó como g agua/ g de material seco (Rojas, 2004). El mismo procedimiento se empleó para la isoterma de pelo vacuno.

Obtención de extractos enzimáticos

Los extractos de los medios líquidos se obtuvieron filtrando el medio a través de un filtro de fibra de vidrio borosilicato OSMONICS (tamaño de poro 0.45 μm) de 47 mm de diámetro con un equipo de vacío. El filtrado fue luego centrifugado a 5° C por 10 minutos a 10000 g para eliminar partículas remanentes. El sobrenadante se paso por una columna PD-10 equilibrada con

Buffer Tris-HCl 20 μ M, pH 9.0 a 37°C y se congeló a -20 °C para su conservación.

Para la obtención de extractos de los cultivos de *Distichlis* se pesaron 2 g de medio y se mezclaron con 4 ml de Tris-ClH, 20 mM, pH 9.0 conteniendo 0.1 M de ClNa. La mezcla se agitó 10 min a 200 rpm y se filtró por filtro de fibra de vidrio borosilicato (poro nominal 1.0 μ) con bomba de vacío. El extracto obtenido se centrifugó a 1000 g x 10 minutos de manera de eliminar restos de sólidos en suspensión.

Para la obtención de los extractos del medio con pelo vacuno, se mezclaron 3 vol de una solución de NaCl 0.6 N con una parte en peso de cultivo. La mezcla se agitó 30 minutos en shaker y se filtró por un microfiltro de fibra de vidrio borosilicato (OSMONICS tamaño de poro 0.45 μ m) de 47 mm de diámetro con un equipo de vacío. Los extractos resultantes se pasaron por columna PD 10 equilibrada con buffer Tris-HCl 20 mM pH 9.0 y fueron concentrados 10 x por liofilización.

Determinación de actividades enzimáticas en extractos de cultivo

Actividad queratinolítica

Para la determinación de la actividad queratinolítica se utilizaron los extractos de cultivos RP. Se determinó también dicha actividad en los extractos HS para las especies que mostraron buen crecimiento en RP.

La actividad queratinolítica se determinó utilizando el sustrato cromogénico Keratin Azure (Sigma código K- 8500) El sustrato queratin azure es un sustrato cromogénico que al incubarse frente a muestras con actividad queratinolítica positiva libera un producto azul medible mediante espectrofotometría. Para llevar a cabo la reacción se colocaron en tubos eppendorff 5 mg de Keratin Azure, 0.4 ml de buffer Borax 0.1 M pH 9.0 y 0.1 ml de extracto enzimático. Se empleó como blanco general la misma mezcla de reacción pero sin el agregado de enzima, colocando en su lugar 0.1 ml de buffer Tris-HCL 20 mM. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los tubos se incubaron en baño termostático a 28 °C durante 7 hs. La reacción se detuvo por el agregado de 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % p/v. Las muestras y los blancos incubados se centrifugaron durante 10 min a 1000 rpm. y la liberación de fracciones solubles coloreadas se determinó midiendo la absorbancia de los sobrenadantes de cada tubo a 595 nm. La actividad se expresó como Uka/ml de extracto, calculada como sigue (Galarza, 2002).

Abs ₅₉₅	1	1
-----	-----	-----
Tiempo de incubación (h)	0.1	vol de extr. enzimático (ml)

Actividad α -ramnosidasa y β -glucosidasa

La actividad de α -Ramnosidasa y β -Glucosidasa se determinaron empleando los sustratos cromogénicos *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (*pnp*-Rha) y *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (*pnp*-Glu). Estos compuestos al ser

hidrolizados desarrollan en medio alcalino un color amarillo por la aparición del anión p-nitrofenolato.

El screening inicial se realizó en placas microtiter. En cada celda se mezclaron 80 μ l de Tris-HCL 20 mM, pH 9.0; 10 μ l de muestra, 10 μ l de sustrato y 1.0 μ l de azida de sodio 0,01%. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Se hicieron blancos de muestra en todos los casos y blancos de sustrato para, en particular para el *pnp*-Glu que es mas inestable en medio alcalino (**Figura 20**).

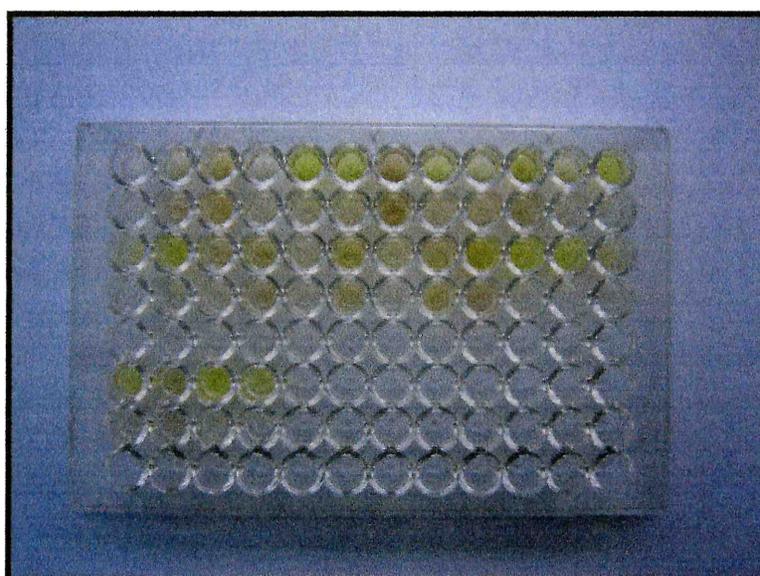


Figura 20. Placa microtiter conteniendo mezcla de reacción para determinar actividad α -ramnosidasa y β -glucosidasa. Las celdas amarillas indican actividad positiva

Para cuantificar la actividad enzimática mediante medidas espectrofotométricas, se incubaron 300 μ l de sustrato (1.0 mM de *pnp*-Rha o *pnp*-Glu) en Tris-HCL 20 mM, pH 9.0 conteniendo CaCl_2 0.6 mM con 20 μ l de muestra enzimática (concentrada 10x por liofilización) durante 90 min a 37 °C, deteniendo la reacción mediante el agregado de 300 μ l de Na_2CO_3 0.6 M. El p-

nitrofenol liberado se evaluó a 405 nm ($\epsilon = 18500\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Los blancos se realizaron con la misma mezcla de reacción inactivando la actividad enzimática con el agregado de 300 μl Na_2CO_3 0.6 M al inicio de la incubación.

Hidrólisis de naringina

La actividad α -ramnosidasa medida con pnp-Ram indica la presencia de una enzima con la capacidad de hidrolizar los enlaces α -(1-2) y α -(1,6) entre ramnosa y glucosa del flavonoide naringina. Este flavonoide es poco soluble en medio ácido (pH 5.0-6.0), condición en la cual actúan la mayoría de las ramnosidasas estudiadas hasta hoy, siendo en este sentido altamente deseable una ramnosidasa alcalina que actúa en condiciones de alta solubilidad del sustrato. Por lo tanto, resultó importante verificar la actividad de la enzima con este flavonoide en condiciones alcalinas.

En este ensayo el estudio se realizó con las cepas fúngicas que mayor actividad α -ramnosidasa mostraron frente a los sustratos cromogénicos.

Para determinar la hidrólisis enzimática de naringina, se preparó una solución stock de sustrato: 7 mM naringina en buffer Tris-Mes 40 mM, la cual se diluyó a la mitad con agua destilada, y mediante el agregado de HCl 0.1 M se llevó a pH: 8.5-9.0. la hidrólisis enzimática se llevó a cabo mezclando 900 μl de sustrato naringina con 100 μl de muestra enzimática parcialmente purificada. En el caso de los blancos de sustrato se reemplazó el extracto enzimático por agua destilada. Las mezclas se incubaron durante 3 horas a 37°C. la reacción se detuvo agregando 300 μl de una solución de H_3PO_4 60 mM con 52% de acetonitrilo. A

tiempo cero también se realizó un procedimiento similar. Las muestras se filtraron con un filtro de 0.45 μm de poro y se cuantificó naringina, naringenina y prunina por HPLC.

Para la separación, identificación y cuantificación de los flavonoides naringina, naringenina y prunina se utilizó una columna Symmetry C18 (3.9mm x 150 mm) y un equipo WATERS de HPLC con detector de arreglo de Fotodiodos. El tiempo de separación fue de 10 min con el siguiente programa: en los primeros 4 minutos se empleó un flujo de 0.68 ml/min acetonitrilo: 0.32 ml/min H_2O y luego un flujo de 1.0 ml/min de acetonitrilo.

Todos los solventes utilizados fueron filtrados con filtros de 0.45 μm de tamaño de poro y desgasificados mediante agitación en vacío.

Purificación de la ramnosidasa alcalina de *Acremonium murorum*

La cepa probada que presentó mayor liberación de prunina como producto de la hidrólisis de la naringina, fue *Acremonium murorum*. Debido a su capacidad para producir una α -ramnosidasa que actúa a pH alcalinos, resultó de interés purificar y caracterizar parcialmente esta enzima.

Un aspecto importante a resolver fue la separación de la actividad α -ramnosidasa de la β -glucosidasa en *A. murorum*, ya que esta última libera glucosa del producto de hidrólisis de la ramnosidasa, interfiriendo de este modo en la reacción.

Para la purificación de la actividad α -Ram se realizaron cultivos de *A. murorum* en medio líquido (HS) con naringina como inductor. A los 15 días de

cultivo se obtuvieron los extractos por filtración. El filtrado resultante se pasó por una columna PD-10 equilibrada con buffer Tris-HCl, 20 mM, pH 8.0 para desalinizar y equilibrar la muestra para la subsiguiente etapa cromatográfica. Dicha solución se aplicó a una columna de intercambio aniónico (Sephacrose Q Fast Flow, 1.0 ml), equilibrada con buffer Tris-HCl 20 mM, pH 8.0. La actividad α -Ram se adsorbió a la matriz bajo estas condiciones. La elución se realizó mediante un gradiente de NaCl (0-0.8 M) en el mismo buffer. El seguimiento de la purificación se realizó midiendo la actividad α -Ram y β -Glu mediante el test en placa. Las fracciones activas de la columna de intercambio aniónico se combinaron y desalinizaron en una columna PD-10 equilibrada con buffer Tris-HCl 5.0 mM, pH 8.0 y se liofilizaron.

Electroforesis: Caracterización por SDS-PAGE

Con las muestras parcialmente purificadas y concentradas 30 X se realizó la caracterización por SDS-Page. La electroforesis desnaturalizante se realizó con geles de poliacrilamida en un equipo Mighty Small II Unit (Hoefer SE 260) a 100 V por 120 min (Smith, 1984). La constitución de cada uno de los geles se detalla en el **anexo III**.

Las muestras fueron disueltas en Tris-HCl pH 9.0, azul de bromofenol 0.01 %, glicerina al 0.002%, SDS al 1% y 2-mercaptoetanol al 1%, se calentaron durante 5 minutos en un baño de agua a 100°C.

El buffer utilizado de electroforesis se preparó mezclando 3.02 g de Tris-base con 14.4 g de glicina por litro de agua y SDS al 0.1 %.

Para la determinación del peso molecular de las proteínas en estudio se utilizó el patrón Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis de Amersham Bioscience que contiene las siguientes proteínas: fosforilasa B 91 Kda, Albúmina 66 Kda, Ovoalbúmina 45 kda, Anhidrasa carbónica 30 Kd, Lactoalbumina 14.4 Kda.

Terminada la técnica electroforética, se procedió a la fijación de las proteínas introduciendo el gel en una solución de ácido tricloroacético al 11.4%, ácido sulfurosalicílico al 3.4 % y metanol al 30 % durante una hora. Para la tinción de las proteínas se sumergió a continuación en una solución de Coomasie R-250 al 0.2%, metanol al 46 % y ácido acético al 8 % durante una hora. Posteriormente se decoloró con una solución de metanol al 27 % y ácido acético al 9 %.

RESULTADOS

I Parte.

DIVERSIDAD DE HONGOS DE SUELO

En el presente estudio se aislaron y determinaron 85 especies fúngicas en los tres suelos estudiados. Cincuenta y nueve especies fueron encontradas en el Argialbol (45 Fungi Imperfecti anamorfos (asexual) de Ascomycota; 5 Zygomycota; 8 teleomorfos (sexual) Ascomycota y 2 micelia sterilia), 56 especies en el Natracualf (43 Fungi Imperfecti anamorfos (asexual) de Ascomycota, 6 Zygomycota, 5 teleomorfos (sexual) Ascomycota; 2 mycelia sterilia); y 69 en el Rendol (53 Fungi Imperfecti anamorfos (asexual) de Ascomycota; 8 Zygomycota; 6 teleomorfos (sexual) Ascomycota; 2 micelia sterilia). Treinta y nueve especies fueron compartidas por los tres suelos muestreados. Las especies aisladas pertenecen a 45 géneros de los cuales los más numerosos fueron *Penicillium*, *Aspergillus* y *Acremonium*. El grupo de Fungi imperfecti (anamorfos de Ascomycota) fue el que mayor número de especies identificadas presentó, variando entre 74 y 82 % del total de la micobiota identificada. Los teleomorfos de Ascomycota representaron entre un 4 y 16 %, dependiendo del tipo de suelo y de la profundidad; así en Argialbol y Rendol, este grupo fue más abundante en los horizontes inferiores. Valores similares se encontraron para el grupo de los Zygomycota, el cual en el Argialbol y Rendol presentó mayor número de especies en los horizontes superficiales. En contraposición, en el Natracualf, la mayor parte de las especies de Ascomycota se encontraron en los horizontes superficiales y las especies

pertenecientes al grupo de los Zygomycota fueron más abundantes en los horizontes más profundos.

Las especies más frecuentes y que más contribuyeron al índice H' son las que sirven para caracterizar a las comunidades fúngicas de los tres tipos de suelo a dos profundidades. El índice de Shannon-Weiner (H') mide la cantidad de información (en bits) aportada por cada individuo en el total de la población observada. La **tabla 7** muestra la contribución al índice de diversidad (H') de todas las especies identificadas (ordenadas alfabéticamente) y los valores totales de diversidad (H'), riqueza (S) y equitabilidad (J') para cada horizonte de los tres tipos de suelo estudiados.

Tabla 7. Contribución al índice de diversidad (H) las especies fúngicas aisladas en dos horizontes del Argialbol, Natracualf y Rendol por el método de lavado de suelo.

SUELOS Horizontes	Argialbol		Natracualf		Rendol	
	sup	.+20	sup	.+20	sup	.+20
FUNGI IMPERFECTI						
<i>Acremonium cerealis</i> (Karst.) Gams	0,06	0,06				0,01
<i>Acremonium killiense</i> Grütz	0,04	0,05	0,03	0,05		0,03
<i>Acremonium murorum</i> (Corda) Gams	0,02	0,17	0,02	0,11	0,03	0,11
<i>Acremonium rutilum</i> Gams				0,01		0,03
<i>Acremonium sp. 1</i>	0,04	0,19	0,11	0,24	0,05	0,12
<i>Acremonium sp. 2</i>		0,05				0,02
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i> (Link: Fr) Zare, Gams et Schroers	0,01	0,01		0,05		0,07
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler				0,04		
<i>Aspergillus niger</i> van Tieghem		0,01			0,04	0,04
<i>Aspergillus sidowii</i> (Bain. et Sart.) Thom et Church.		0,05			0,02	0,02
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	0,09	0,03	0,22	0,15	0,13	0,17
<i>Aspergillus ustus</i> (Bain.) Thom et Church		0,02	0,01	0,01	0,11	0,14
<i>Chloridium virescens</i> (Pers. ex Pers.) Gams et Hol.-Jech.				0,02	0,01	
<i>Chrysosporium aff. xerophilum</i> Pitt	0,01	0,02			0,04	
<i>Chrysosporium sp.</i>						0,04
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	0,01	0,21	0,06	0,16	0,03	0,25
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link ex S. F. Gray		0,06				0,04
<i>Clonostachys rosea</i> (Link: Fr.) Schoers	0,15	0,13	0,01	0,11	0,11	0,21
<i>Clonostachys sp.</i>				0,01		0,02
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn			0,04			
<i>Cylindrocarpon didymum</i> (Hartig) Wollenw.	0,03	0,11	0,05	0,13	0,06	0,09
<i>Cylindrocarpon lucidum</i> Booth				0,01	0,04	0,05
<i>Cylindrocarpon olidum</i> (Wollenw.) Wollenw.	0,06	0,03	0,01	0,07	0,03	0,06
<i>Cylindrocarpon sp.</i>	0,01	0,10		0,04	0,02	0,05
<i>Doratomyces microsporus</i> (Sacc.) Morton et Sm.					0,01	
<i>Doratomyces stemonitis</i> (Pers. ex Steud.) Morton et G. Sm.	0,01	0,06		0,01	0,03	0,11
<i>Drechslera ravenelli</i> (Curt.) Subram. et Jain			0,04			
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	0,01	0,02	0,01	0,03	0,05	0,02
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.:Fr.	0,42	0,29	0,45	0,34	0,41	0,35
<i>Fusarium semitectum</i> Berk. et Rav.	0,23	0,07	0,12	0,22	0,20	0,13
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	0,53	0,53	0,52	0,52	0,50	0,46
<i>Fusarium sp.</i>	0,01		0,01	0,04	0,02	0,03
<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen	0,02		0,06		0,03	0,02
<i>Humicola grisea</i> Traaen	0,01	0,06			0,04	
<i>Metarrhizium anisopliae</i> Metschn.					0,01	0,01
<i>Microsphaeropsis olivacea</i> (Bonord.) Höhn				0,01		
<i>Myrothecium cinctum</i> (Corda) Sacc.			0,01		0,01	0,02
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	0,01					
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Thom) Samson	0,12	0,23	0,02	0,11	0,16	0,29
<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom	0,03	0,17	0,02		0,20	0,12
<i>Penicillium frequentans</i> Westling	0,02	0,10	0,03	0,02	0,11	0,06
<i>Penicillium megasporum</i> Orpurt et Fennell						0,01
<i>Penicillium restrictum</i> Gilman et Abbott		0,06	0,05	0,05		0,02
<i>Penicillium rubrum</i> Stoll	0,07	0,09	0,05	0,09	0,09	

Continuación tabla 5

<i>Penicillium thomii</i> Maire		0,10	0,04	0,03	0,01	0,06
<i>Penicillium sp. 1</i>	0,05		0,01	0,01	0,20	0,05
<i>Penicillium sp. 2</i>		0,05		0,06		
<i>Penicillium sp. 3</i>		0,03				
<i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm.) Stey.		0,02	0,01	0,02	0,07	0,08
<i>Phialophora fastigiata</i> (Lagerb., Lundberg et melin) Conant			0,01	0,11		0,04
<i>Phoma herbarum</i> Westend		0,01				
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier					0,01	
<i>Stachybotrys chartarum</i> (Ehrenb ex Link) Hughes		0,02	0,01			0,02
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bain.	0,21	0,08	0,10	0,11	0,13	0,14
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	0,15	0,06	0,01	0,18	0,18	0,14
<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	0,29	0,15	0,02	0,14	0,09	0,06
<i>Trichoderma saturnisporum</i> Hammill	0,06	0,01		0,01	0,19	0,04
<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke et Berthold					0,06	0,02
<i>Verticillium nigrescens</i> Pethybr.					0,01	0,03
<i>Volutella ciliata</i> Alb. et Schw. ex Fr.	0,01			0,01		
<i>Wardomyces inflatus</i> (Marchal) Hennebert	0,01	0,04				0,03
Unidentified Hyphomycete		0,04				0,04
ZYGOMYCOTA						
<i>Absidia cylindrospora</i> Hagem				0,03		
<i>Absidia spinosa</i> Lendner	0,22	0,12	0,27	0,26	0,14	0,09
<i>Coemansia pectinata</i> Bainier					0,005	
<i>Cunninghamella elegans</i> Lendner	0,01		0,05	0,09	0,01	
<i>Gongronella butleri</i> (Lendner) Peyronel et Dal Vesco	0,03	0,03	0,02	0,06	0,07	
<i>Mortierella sp</i>	0,03		0,03	0,03	0,21	0,12
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer					0,06	0,03
<i>Mucor mucedo</i> L. ex Fr.				0,03	0,05	
<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb. ex. Link) Lind					0,04	0,05
<i>Zygorrhynchus moelleri</i> Vuill.	0,02					
ASCOMYCOTA						
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Steud.		0,01				
<i>Emericella sp.</i>						0,02
<i>Neosartorya stramenia</i> (Novak et Raper) Malloch et Cain			0,04			
<i>Neosartorya sp.</i>		0,06				0,09
<i>Neurospora tetrasperma</i> Shear et Dodge			0,01			
<i>Talaromyces flavus</i> (Klöcker) Stolk et Samson var. <i>flavus</i>	0,01	0,14	0,22	0,07	0,02	0,08
<i>Talaromyces stipitatus</i> (Thom) Benjamin		0,09	0,37	0,05		0,06
<i>Talaromyces sp.</i>		0,03	0,04		0,01	
<i>Thielavia heterotallica</i> Klopotek	0,01	0,02			0,01	
<i>Westerdikella dispersa</i> Clum	0,02	0,02				
Ascomycete no identificado		0,01				
MYCELIA STERILIA						
Micelio dematiaceo estéril 1	0,05	0,09	0,16	0,09	0,07	0,1
Micelio dematiaceo estéril 2	0,02		0,06	0,02	0,02	0,08
Indice de Diversidad (H)	3,20	4,21	3,45	4,05	4,23	4,69
Riqueza de especies (S)	42	51	42	47	52	57
Equitabilidad (J)	0,59	0,74	0,64	0,74	0,74	0,8

Teniendo en cuenta estos valores, se observa que tanto para el Natracualf como para el Argialbol y el Rendol, (H'), (S) y (J') fueron más altos en los horizontes más profundos, siendo el Rendol el que tuvo mayores valores de diversidad en ambos horizontes (4.23 para superficies y 4.69 para +20 cm) y también los valores más altos de riqueza (52 y 57 especies para las muestras superficiales y de +20 cm respectivamente)

Los valores máximos de contribución por especie individual fueron: 0.53 en ambos horizontes del Argialbol; 0.52 en ambos horizontes de Natracualf; y 0.50-0.46 en el horizonte superficial e inferior del Rendol respectivamente. Aquellas especies que presentaron un valor de $(-p_i \log_2 p_i) \geq 0.15$ fueron utilizadas para caracterizar la comunidad. En este sentido se encontró que siete especies *Fusarium solani* (0.53), *F. oxysporum* (0.42), *Trichoderma koningii* (0.29), *Fusarium semitectum* (0.23), *Trichoderma hamatum* (0.21) *T. harzianum* (0.15) y *Clonostachys rosea* (0.15) en el grupo de Fungi Imperfecti (anamorfos de Ascomycota) y *Absidia spinosa* (0.22) en el grupo de Zygomycota, contribuyeron con el 68.75% ($\sum(-p_i \log_2 p_i) = 2.2$) al índice de diversidad total ($H' = 3.20$) en el horizonte superficial del Argialbol. Ocho especies de Fungi imperfecti *Fusarium solani* (0.53), *F. oxysporum* (0.29), *Paecilomyces lilacinus* (0.23), *Claosporium claosporioides* (0.21), *Acremonium spi* (0.19), *Acremonium murorum* (0.17), *Penicillium chrysogenum* (0.17) y *Trichoderma koningii* (0.15) contribuyeron con el 46% ($\sum(-p_i \log_2 p_i) = 1.94$) al total de la diversidad ($H' = 4.18$) en el horizonte más profundo del Argialbol.

En relación a los Zygomycetes, se observó que cinco especies pertenecientes a este grupo, *Absidia spinosa*, *Cunninghamella elegans*, *Gongronella butleri*, *Mortierella* sp. y *Zigorrhynchus moelleri*, contribuyeron con el 10% de la diversidad de los hongos aislados de los horizontes superficiales del Argialbol. La especie predominante fue *Absidia spinosa*, cuya contribución a la diversidad fue 0.22. En el mismo suelo (Argialbol) en el horizonte de +20 cm de profundidad, solamente fueron aisladas *Absidia spinosa* y *Gongronella butleri* y representaron el 3.58% del total de la diversidad. Por el contrario, las especies más representativas de Ascomycota fueron más abundantes en los horizontes profundos donde ocho especies, *Chaetomium globosum*, *Neosartorya* sp., *Talaromyces flavus* var *flavus*, *Talaromyces stipitatus*, *Talaromyces* sp., *Thielavia heterotallica*, *Westerdikella dispersa* y una especie de Ascomycete sin identificar, contribuyeron con el 9% del total de la diversidad, mientras que solo tres especies (*Talaromyces flavus* var *flavus*, *Thielavia heterotallica* y *Westerdikella dispersa*) fueron aisladas en el horizonte superficial

En los horizontes superficiales del Natracualf, *Fusarium solani* (0.52), *F. oxysporum* (0.45) y *Aspergillus terreus* (0.22) en el grupo de Fungi Imperfecti, *Absidia spinosa* (0.27) entre los zygomycetes, dos especies del grupo de Ascomycota *Talaromyces stipitatus* (0.37) and *T. flavus* var. *flavus* (0.22), y un micelio dematiaceo esteril (0.16), contribuyeron con el 64% ($\sum(-p_i \log_2 p_i) = 2.21$) de la diversidad total ($H' = 3.45$). En los horizontes más profundos de este mismo suelo, *Fusarium solani* (0.52), *F. oxysporum* (0.34), *Acremonium* sp. (0.24), *Fusarium semitectum* (0.22), *Trichoderma harzianum* (0.18), *Cladosporium cladosporioides* (0.16) y *Aspergillus*

terreus (0.15) entre los Fungi Imperfecti, y *Absidia spinosa* (0.26) entre los Zygomycota, contribuyeron con el 51% ($\sum(-p_i \log_2 p_i) = 2.07$) a la diversidad total ($H^2 = 4.05$). *Talaromyces stipitatus* (0.37) y *T. flavus var flavus* (0.22) fueron las especies de Ascomycota más abundantes en el horizonte superficial de este suelo; estas especies junto con *Neosartorya stramenia*, *Talaromyces sp.* y *Neurospora tetrasperma* contribuyeron con el 20% al total de la diversidad en el horizonte superficial del Natracualf. Se encontró que *Absidia spinosa* (0.27) fue el representante de los Zygomycota más abundante en este horizonte. El porcentaje de contribución aportado por las especies de Ascomycota y Zygomycota en los horizontes más profundos fueron 3% y 12.34% respectivamente, siendo *Absidia spinosa* (0.26) la especie aislada más frecuentemente entre el grupo de los Zygomycota.

Finalmente, en los horizontes superficiales del Rendol, ocho especies de Fungi Imperfecti contribuyeron con el 48% ($\sum(-p_i \log_2 p_i) = 2.04$) del total de la diversidad ($H^2 = 4.23$). Estas especies fueron: *Fusarium solani* (0.50), *F. oxysporum* (0.41), *Penicillium sp. 1* (0.20), *Penicillium chrysogenum* (0.20), *Fusarium semitectum* (0.20), *Trichoderma saturnisporum* (0.19), *T. harzianum* (0.18) y *Paecilomyces lilacinus* (0.16). Por otra parte, en los horizontes de +20 cm de profundidad seis especies, *Fusarium solani* (0.46), *F. oxysporum* (0.35), *Paecilomyces lilacinus* (0.29), *Cladosporium cladosporioides* (0.25), *Clonostachys rosea* (0.21) y *Aspergillus terreus* (0.17) fueron las especies de mayor importancia. Estas especies contribuyeron con el 37% ($\sum(-p_i \log_2 p_i) = 1.73$) a la diversidad total ($H^2 = 4.66$). En este suelo (Rendol), fueron aisladas ocho especies de Zygomycota en el horizonte superficial: *Absidia*

spinosa, *Coemansia pectinata*, *Cunninghamella elegans*, *Gongronella butleri*, *Mortierella* sp., *Mucor hiemalis*, *Rhizopus stolonifer* y *Zigorrhynchus moelleri*, las cuales contribuyeron con un 14% a la diversidad total, siendo *Absidia spinosa* (0.14) y *Mortierella* sp. (0.22) las especies más abundantes. En los horizontes profundos, se registraron cuatro especies, *Absidia spinosa*, *Mortierella* sp, *Mucor hiemalis* y *Zigorrhynchus moelleri*, las cuales contribuyeron con un 7% al total de la diversidad de este suelo. Por otro lado el grupo de los Ascomycota estuvo escasamente representado, contribuyendo con el 1% y 6% a la diversidad total en el horizonte superficial y en profundidad respectivamente. En el horizonte superficial con las especies. *Talaromyces flavus* var. *flavus*, *Thielavia heterotallica* y *Westerdikella dispersa*, y en los horizontes de +20 cm solo con cuatro especies, *Chaetomium globosum*, *Neosartorya stramenia*, *Talaromyces flavus* var. *flavus* y *Talaromyces stipitatus*.

Efecto del pH del medio de aislamiento y de la profundidad de las muestras sobre la frecuencia y diversidad de especies

El pH de los medios de aislamiento utilizados influyó en el número de partículas colonizadas y en el número de especies aisladas. Las **figuras 21, 22 y 23** muestran el número de partículas colonizadas y el número de especies aisladas en cada tipo de suelo en ambas profundidades muestreadas y para cada valor de pH del medio de aislamiento utilizado. En los tres tipos de suelo se observó que el número de partículas colonizadas fue menor para las muestras correspondientes a los horizontes más

profundos. Por el contrario el número de especies aisladas fue mayor en los horizontes de más de 20 cm, en los tres suelos estudiados en todos los pH de aislamiento.

Tanto el número de partículas colonizadas como el número de especies aisladas mostraron una disminución con el aumento de pH de aislamiento. A lo largo de los muestreos, para el Argialbol el número de especies osciló entre 12 y 21 (superficie), 13 y 23 (+ 20 cm) para el pH control; 11 y 14 (superficie), 5 y 16 (+ 20 cm), para pH 8.0; 5 y 10 (superficie), 7 y 12 (+ 20 cm) para pH 11.0

En el Natracualf, se observó que el número de especies varió entre 2 y 10 (superficie), 15 y 23 (+ 20 cm) para el pH control; 7 y 19 (superficie), 11 y 18 (+ 20 cm) para pH 8.0; 11 y 4 (superficie), 7 y 13 (+ 20 cm) para pH 11.0

En el Rendol, el número de especies aisladas presentó los siguientes valores: entre 20 y 10 (superficie), 24 y 15 (+ 20 cm) para el pH control; entre 11 y 16 (superficie), 14 y 18 (+ 20 cm) para pH 8.0 y entre 9 y 17 (superficie), 11 y 15 (+ 20 cm) para pH 11.0

En el Argialbol, el número de especies aisladas fue menor en el muestreo de agosto, sin embargo el número de partículas colonizadas en este suelo se mantuvo estable en todos los muestreos.

En el Natracualf, el número de especies aisladas fue más alto en el muestreo de octubre para ambos horizontes. El número de partículas colonizadas se mantuvo en valores similares en todos los muestreos.

En el Rendol sólo se observaron pequeñas variaciones en el número de especies aisladas y el número de partículas colonizadas a lo largo de los muestreos, habiéndose

registrado el más alto número de especies en el horizonte de +20 cm en pH control del mes de febrero.

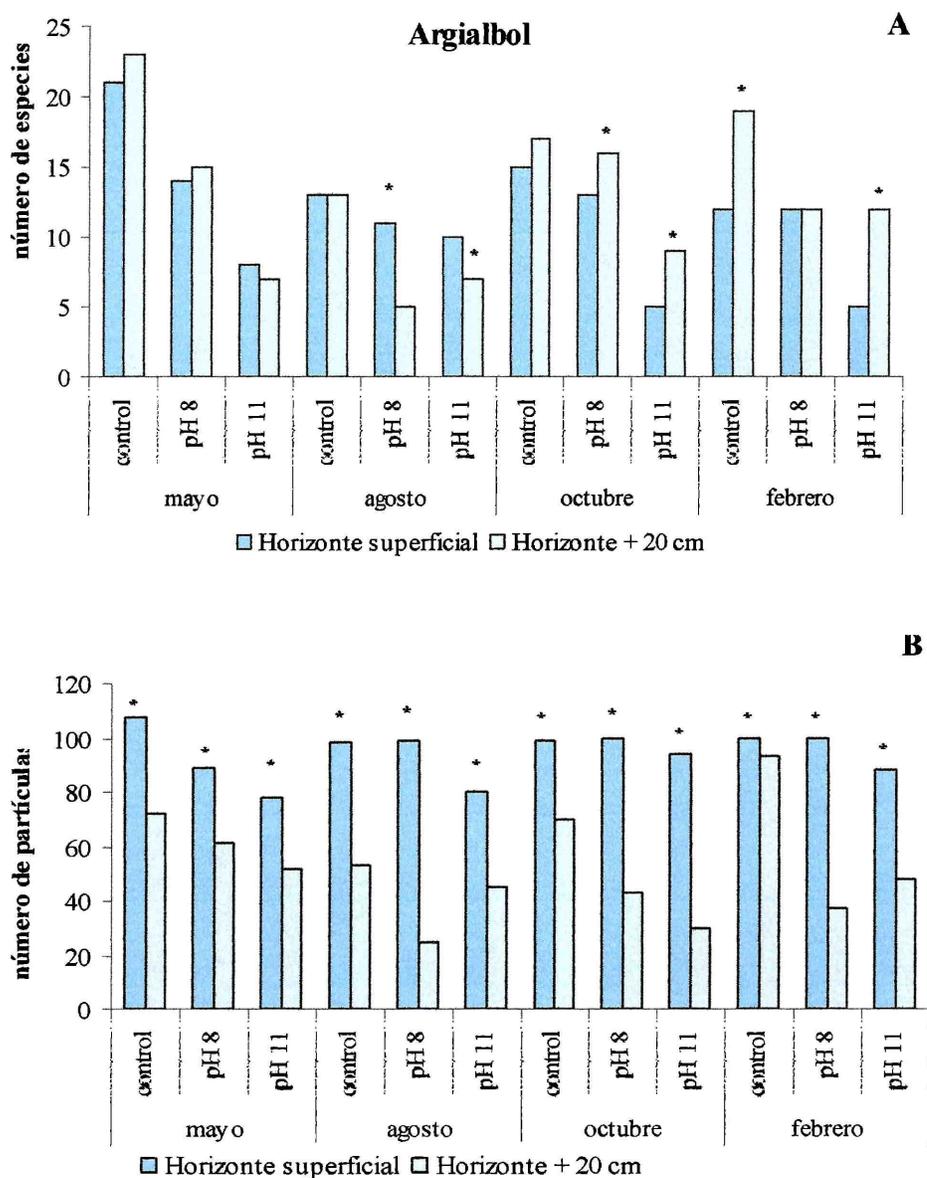


Figura 21. Número de especies aisladas y porcentaje de partículas colonizadas para dos profundidades y diferentes pH de aislamiento de Argialbol **A.** número de especies aisladas **B.** Porcentaje de partículas colonizadas. (Los asteriscos denotan diferencias significativas entre profundidades ($P \leq 0.05$) determinado con test-*t*).

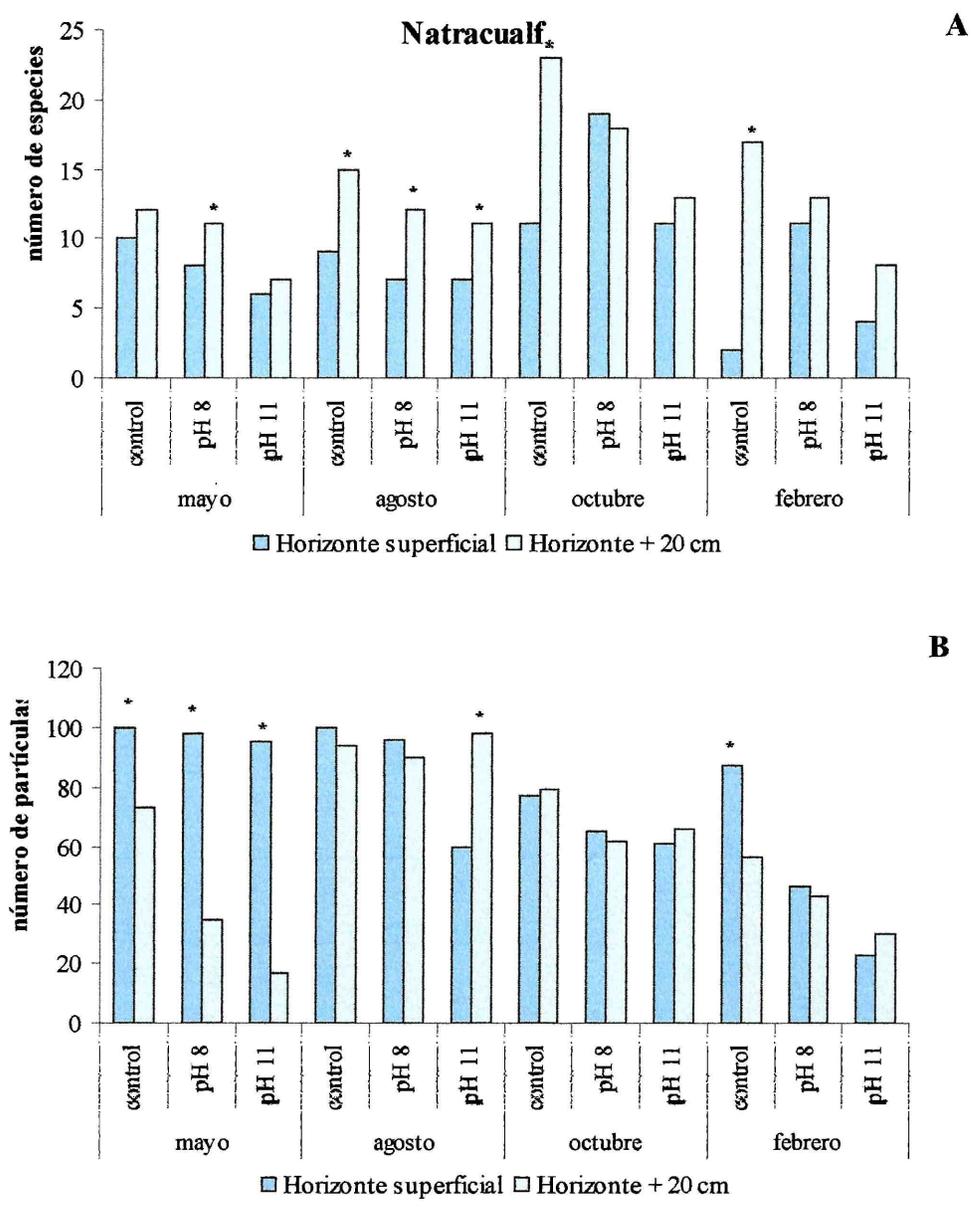


Figura 22. Número de especies aisladas y porcentaje de partículas colonizadas para dos profundidades y diferentes pH de aislamiento de Natracualf A. número de especies aisladas B. Porcentaje de partículas colonizadas. (Los asteriscos denotan diferencias significativas entre profundidades ($P \leq 0.05$) determinado con test-t).

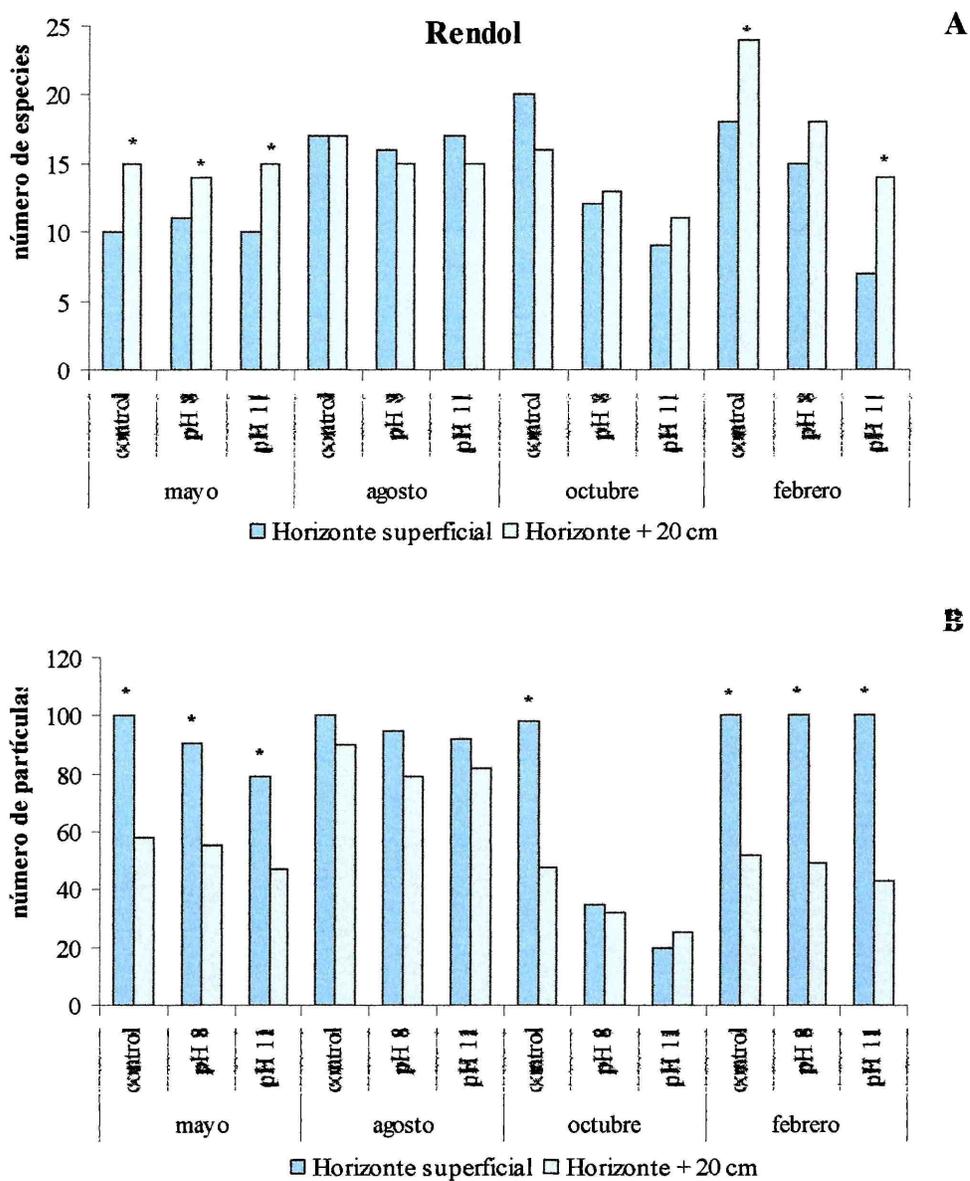


Figura 23. Número de especies aisladas y porcentaje de partículas colonizadas para dos profundidades y diferentes pH de aislamiento de Rendol. A. número de especies aisladas B. Porcentaje de partículas colonizadas. (Los asteriscos denotan diferencias significativas entre profundidades ($P \leq 0.05$) determinado con test t).

Las especies se aislaron a partir de muestras tomadas de los horizontes A1 (superficial) y A2 (+ de 20 cm), para el suelo Argialbol; B1 (superficial) y B21t (+ de 20 cm) para Natracualf y A1(superficial) y AC (+ de 20 cm), para Rendol utilizando 3 rangos de pH 6.0, 8.0 y 11.0.

Las **tablas 8, 9 y 10** muestran las frecuencias de aparición de las especies fúngicas cuya contribución a la diversidad fue ≥ 0.05 (última columna).

Tabla 8. Frecuencia de aparición de las especies fúngicas aisladas del **Argialbol** por la técnica de lavado de suelo a diferentes pH del medio de aislamiento. Las especies están ordenadas de acuerdo a su contribución (hasta $H \geq 0.05$) al índice de diversidad (H (última columna))

Horizonte A1	agosto-2004			octubre-2004			febrero-2005			mayo-2005			Cont. H
	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	
FUNGI IMPERFECTI													
<i>Fusarium solani</i>	9,37	37,9	63,6	20,4	41,9	76,9	1,3	5,83	91,4	19,4	51,7	71,8	0,53
<i>Fusarium oxysporum</i>	19,8	22,1		31,6	23,8	13,2	33,5	26,2		15,7	3,37		0,42
<i>Trichoderma koningii</i>	35,3	11,5		3,7	1,9		9,67	3,64		17,7	13,5		0,29
<i>Fusarium semitectum</i>	1,4	6,3	21	2,77	11,5	4,39		5,1	1,21	5,5	3,37	5,12	0,23
<i>Trichoderma hamatum</i>	4,15			21,3	2,85		2	4,37		5,5			0,21
<i>Clonostachys rosea</i>	2,1	2,1	4,5	0,92	3,8		2,6	15,3	4,87				0,15
<i>Trichoderma harzianum</i>	15,6	5,26		6,48	1,9					5,5	2,24		0,15
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	4,15	6,3	2,7			3,29				2,77	3,37	2,56	0,12
<i>Aspergillus terreus</i>		2,1	2,7	0,92	2,85			1,45		0,92	5,61		0,09
<i>Penicillium rubrum</i>	1,4						2,6			1,1			0,07
<i>Acremonium cerealis</i>										0,92	2,24	6,41	0,06
<i>Cylindrocarpon olidum</i>		2,1		2,77	2,85	2,19				0,92			0,06
<i>Trichoderma saturnisporum</i>				0,92			9,67						0,06
<i>Penicillium sp</i>	3,12	3,15									1,12		0,05
ZYGOMYCOTA													
<i>Absidia spinosa</i>							15,5	31,4		5,5	8,98		0,22
Horizonte A2													
Horizonte A2	agosto-2004			octubre-2004			febrero-2005			mayo-2005			Cont. H
	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	
FUNGI IMPERFECTI													
<i>Fusarium solani</i>	24	66,6	57,7	11,8	8,88	0	24	23,6	53,8	25	24,6	75	0,53
<i>Fusarium oxysporum</i>	8	13,3	3,8	1,96	17,7	11,8	13,5	10,5	1,9	4,16	4,91	1,9	0,29
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	12		11,5	1,96			4,16	7,9	5,76	4,16	13,1	3,84	0,23
<i>Cladosporium cladosporioides</i>					8,88	17,6	1,4	13,1		2,77	4,91	7,7	0,21
<i>Acremonium sp 1</i>			7,7		8,88	29,5			1,9	1,38			0,19
<i>Acremonium murorum</i>	4						2,8	2,63	15,4	2,77	14,8		0,17
<i>Penicillium chrysogenum</i>		6,6		9,8	2,22	11,8	1,4	2,63		5,55	3,27		0,17
<i>Trichoderma koningii</i>	16						5,2	2,63			9,83		0,15
<i>Clonostachys rosea</i>	4		7,7				8,33	2,63	5,76	1,38			0,13
<i>Cylindrocarpon didymum</i>				3,92	8,88		5,2				4,91		0,11
<i>Cylindrocarpon sp</i>		6,6					4,16	7,9			1,63		0,10
<i>Penicillium frequentans</i>	4			7,8	8,88								0,10
<i>Penicillium thomii</i>				9,8	8,88		1,4						0,10
<i>Penicillium rubrum</i>				9,8			2,8	2,63		2,77			0,09
<i>Trichoderma hamatum</i>							9,37				6,55		0,08
<i>Fusarium semitectum</i>							1,4		3,8	5,55	1,63	1,9	0,07
<i>Acremonium cerealis</i>											3,27	7,7	0,06
<i>Cladosporium herbarum</i>					4,44	5,88							0,06
<i>Doratomyces stemonitis</i>			7,7						3,8				0,06
<i>Humicola grisea</i>			3,8			5,88							0,06
<i>Penicillium restrictum</i>				3,92	6,66								0,06
<i>Trichoderma harzianum</i>	4						1,4			5,55			0,06
<i>Acremonium kiliense</i>						5,88						1,9	0,05

Continuación tabla 6

<i>Acremonium sp 2</i>				5,88		1,9		0,05
<i>Aspergillus sidowii</i>	4			4,44				0,05
<i>Penicillium sp2</i>	8							0,05
ZYGOMYCOTA								
<i>Absidia spinosa</i>						21	4,16	0,12
ASCOMYCOTA								
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>				9,8	9,37		12,6	0,14
<i>Talaromyces stipitatus</i>				7,8	5,2		2,77 1,63	0,09
<i>Neosartorya sp</i>				9,8				0,06
MYCELIA STERILIA								
<i>Micelio dematiaceo estéril 1</i>	4		1,96 2,22			2,63 1,9	4,16	0,09

Tabla 9. Frecuencia de aparición de las especies fúngicas aisladas del **Natracualf** por la técnica de lavado de suelo a diferentes pH del medio de aislamiento. Las especies está ordenadas de acuerdo a su contribución (hasta $H \geq 0.05$) al índice de diversidad (H (última columna))

Horizonte B1	mayo-2004			agosto-2004			octubre-2004			febrero-2005			Cont. H
	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	
FUNGI IMPERFECTI													
<i>Fusarium solani</i>	46,3	67,7	71,4		10,2	66,6	14	25,8	48,4		2,2	20	0,52
<i>Fusarium oxysporum</i>	37	22,5	18,7	40,8	23		15,2	25,8	32,3				0,45
<i>Aspergillus terreus</i>		1,1				1,3	2,51	3,22	3,22	2,91	8,8	40	0,22
<i>Fusarium semitectum</i>					4,3	21,3			1,61				0,12
<i>Acremonium sp.</i>		1,1				2,6						20	0,11
<i>Trichoderma hamatum</i>	0,95			18,2									0,10
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		4,3						4,83	1,61				0,06
<i>Humicola fusco-atra</i>							5,06	4,83					0,06
<i>Penicillium restrictum</i>	0,95							3,22			4,5		0,05
<i>Cylindrocarpon didymum</i>								6,45	1,61				0,05
<i>Penicillium rubrum</i>	4,6			0,86			2,53						0,05
ZYGOMYCOTA													
<i>Absidia spinosa</i>				32,1	53								0,27
<i>Cunninghamella elegans</i>				0,86	7,7								0,05
ASCOMYCOTA													
<i>Talaromyces stipitatus</i>								1,61		97,1	46,6		0,37
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>					0,85		50,6	3,22			8,8		0,22
MYCELIA STERILIA													
<i>Micelio dematiaceo estéril 1</i>	1,85	1,1	1,1				1,26	1,61	3,22		8,8	20	0,16
<i>Micelio dematiaceo estéril 2</i>						2,6					8,8		0,06
Horizonte B21t													
	mayo-2004			agosto-2004			octubre-2004			febrero-2005			Cont. H
	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	
FUNGI IMPERFECTI													
<i>Fusarium solani</i>	3,5	23,6	21,4	13,4	2,9	72,9	15,5	35,6	55,8	11,3	44,7	69,4	0,52
<i>Fusarium oxysporum</i>	8,7	14,3	21,4	23	9,7		10,7	1,61	14,7	13,2	8,5	2,04	0,34
<i>Acremonium sp.</i>	1,75	9,5	21,4			0,9			1,47	13,2	8,5	12,2	0,24
<i>Fusarium semitectum</i>				10,5	12,6	8,4	2,38	4,83		3,77	14,9	4,08	0,22
<i>Trichoderma harzianum</i>	42,3				0,97		1,19						0,18
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,75	9,5						6,45	1,47	11,3	4,25	4,08	0,16
<i>Aspergillus terreus</i>	1,75	4,8			0,97	10,3	1,19	3,22		5,66	4,25	4,08	0,15
<i>Trichoderma koningii</i>	10,6			16,3	1,95		4,76						0,14
<i>Cylindrocarpon didymum</i>							15,5	9,67	1,47		2,12		0,13
<i>Acremonium murorum</i>		4,8				1,9	2,38	4,83	7,35		2,12		0,11
<i>Clonostachys rosea</i>	3,5			0,96		0,9	2,38		5,88	5,66	4,25		0,11
<i>Paecilomyces lilacinus</i>					1,95	0,9	10,7	4,83	4,41				0,11
<i>Phialophora fastigiata</i>		4,8	14,2				1,19	1,61	1,47				0,11
<i>Trichoderma hamatum</i>	14			2,9			7,14						0,11
<i>Penicillium rubrum</i>		14,3		0,96			1,19	1,61					0,09
<i>Cylindrocarpon olidum</i>							11,9						0,07
<i>Penicillium sp2</i>	8,7			0,96									0,06
<i>Penicillium restrictum</i>		4,8					1,19		1,47	1,88			0,05
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>			7,2					1,61					0,05
<i>Acremonium kiliense</i>							1,19	1,61	1,47			4,08	0,05

Continuación tabla 7

ZYGOMYCOTA						
<i>Absidia spinosa</i>	22,1	49,5			7,54	0,26
<i>Cunninghamella elengans</i>	2,9	13,6				0,09
<i>Gongronella butleri</i>				9,67		0,06
ASCOMYCOTA						
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>	0,96		2,38		9,4	0,07
<i>Talaromyces stipitatus</i>					5,7	2,1
MYCELIA STERILIA						
<i>Micelio dematiaceo estéril 1</i>	7,2		0,9	2,38	6,45	0,09

Tabla 10. Frecuencia de aparición de las especies fúngicas aisladas del Rendol por la técnica de lavado de suelo a diferentes pH del medio de aislamiento. Las especies están ordenadas de acuerdo a su contribución (hasta $H \geq 0.05$) al índice de diversidad (H (última columna))

Horizonte A1	mayo-2004			agosto-2004			octubre-2004			febrero-2005			Cont. H
	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	
FUNGI IMPERFECTI													
<i>Fusarium solani</i>	19	30,6	29,3	7,38	3,2	36	11,8	18,8	12	9,02	26,6	92,1	0,50
<i>Fusarium oxysporum</i>	30,5	22,5	17,4	19,4	8,5	2,3	3,19	3,12	17,6	40,9	14,5	0,99	0,41
<i>Penicillium spl</i>	16,2	8	29,3		1,06								0,20
<i>Penicillium chrysogenum</i>						1,16	2,12	31,3	17,6				0,20
<i>Fusarium semitectum</i>				2,5	7,4	11,6	3,19				23,4	2,9	0,20
<i>Trichoderma saturnisporum</i>				1,4			48,9						0,19
<i>Trichoderma harzianum</i>	14,3			20,6	6,38					2,77			0,18
<i>Paecilomyces lilacinus</i>		1,2		6,4	4,25	14			12		0,8		0,16
<i>Aspergillus terreus</i>		2,2	2,2			1,16		3,12		5,55	14,5		0,13
<i>Trichoderma hamatum</i>	9,5			4,4			1,06			12,5			0,13
<i>Aspergillus ustus</i>				1,9		3,5		3,12		9,02	5,64	0,99	0,11
<i>Clonostachys rosea</i>	1,9			4	3,2	10,5	1,06			0,7		0,99	0,11
<i>Penicillium frequentans</i>							9,57	6,25	5,8				0,11
<i>Penicillium rubrum</i>				1,9			4,25	6,25	5,8				0,09
<i>Trichoderma koningii</i>	1,9			3,4	6,38					3,47	1,61		0,09
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>		8	2,2							2,08	0,8		0,07
<i>Cylindrocarpon didymum</i>				1,9	2,12			3,12		1,38	0,8		0,06
<i>Verticillium albo-atrum</i>								9,37					0,06
<i>Acremonium sp.</i>						5,8		3,12					0,05
<i>Epicoccum nigrum</i>								3,12	5,8				0,05
ZYGOMYCOTA													
<i>Mortierella sp</i>				5	48,9	1,16							0,21
<i>Absidia spinosa</i>	3,8	9	9,8	4,4	2,12					1,38	0,8		0,14
<i>Gongronella butleri</i>		12,5					1,06						0,07
<i>Mucor hiemalis</i>	1	1,2	2,2		1,06					0,7	3,22		0,06
<i>Mucor mucedo</i>			1,1	0,5						3,47	3,22		0,05
MYCELIA STERILLA													
<i>Micelio dematiaceo estéril 2</i>				0,5	1,12		2,12	3,12	5,8				0,07
Horizonte AC													
	mayo-2004			agosto-2004			octubre-2004			febrero-2005			Cont. H
	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	pH6	pH8	pH11	
FUNGI IMPERFECTI													
<i>Fusarium solani</i>	6,1	31,5	27	5,3	14,5	26	21,3	6,6	33,3	2,04	33,3	32,6	0,46
<i>Fusarium oxysporum</i>	14,3	24	12,1	20,6	13	4,1	2,9	10,5	5,5	8,16	11,7	4,65	0,35
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	10,2	5,5	7,3	9,4	13,4	23,2	5,8			10,2	1,9	9,3	0,29
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10,2		4,9	0,6				23,3	16,6	6,12	3,9	11,6	0,25
<i>Clonostachys rosea</i>	10,2	5,5	9,7	1,17	7,2	8,2				6,12		11,6	0,21
<i>Aspergillus terreus</i>		7,4	4,9	1,17	2,19			20	5,5				0,17
<i>Trichoderma hamatum</i>	18,1	3,7		4,7			2,9			4,08			0,14
<i>Aspergillus ustus</i>				0,6	1,4	4,1		3,3	5,5	2,04	9,8	4,65	0,14
<i>Trichoderma harzianum</i>	4,1	5,5		11,7	5,8						3,9		0,14
<i>Fusarium semitectum</i>					11,5	5,45	2,9				7,84	2,32	0,13
<i>Penicillium chrysogenum</i>							11,8	6,6	5,5	2,04			0,12

Continuación tabla 8

<i>Acremonium sp. 1</i>			2,45		2,7	2,9	3,3	5,5	4,08		4,65	0,12	
<i>Doratomyces stemonitis</i>	4,1	1,9	0	2,9	1,4	5,45			2,04	1,9	4,65	0,11	
<i>Acremonium murorum</i>	2,1		2,45		1,4	8,2	2,9	3,3			2,32	0,11	
<i>Cylindrocarpon didymum</i>				1,7	5,8	2,7		3,3	2,04	1,9		0,09	
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>			2,45						12,2			0,08	
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>			9,7	1,17						1,9		0,07	
<i>Cylindrocarpon olidum</i>				8,82		1,35						0,06	
<i>Penicillium frequentans</i>				5,3	1,4			3,3				0,06	
<i>Penicillium thomii</i>							8,8			1,9		0,06	
<i>Trichoderma koningii</i>	6,1			1,17						3,9		0,06	
<i>Cylindrocarpon lucidum</i>	4,1	1,9							2,04			0,05	
<i>Cylindrocarpon sp.</i>									4,08		4,65	0,05	
<i>Penicillium sp. 1</i>		5,5	2,45									0,05	
ZYGOMYCOTA													
<i>Mortierella sp.</i>				11,1	13,4					2,04		0,12	
<i>Absidia spinosa</i>		1,9	2,45	4,7	5,8					1,9		0,09	
<i>Rhizopus stolonifer</i>		1,9	2,45	1,17	2,9							0,05	
ASCOMYCOTA													
<i>Neosartorya sp.</i>							11,8		5,5			0,09	
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>				2,35	1,4	4,35	5,8			2,04		0,08	
<i>Talaromyces stipitatus</i>							2,9	6,6				0,06	
MYCELLIA STERILLA													
<i>Micelio dematiaceo estéril 1</i>	2,1	1,9				4,1				6,12	3,9	2,36	0,10
<i>Micelio dematiaceo estéril 2</i>				0,6					5,5	10,2			0,08

Se observó que dentro del género *Aspergillus*, especies como *Aspergillus niger*, *A. sidowii*, *A. terreus* y *A. ustus*, mostraron las frecuencias mas altas a pH 11.0

Las especies de *Acremonium*, *Acrostalagmus luteo- albus*, *Clonostachys rosea* y *Clonostachys sp*, las especies de *Fusarium*, *Humicola fuscoatrs* y *H. grisea*, *Paecilomyces lilacinus*, en menor medida *Doratomyces microsporus*, *D. stemonitis* y las especies de *Cylindrocarpon*, en menor medida, fueron mas abundantes a pH 8.0 y 11.0.

Las especies de *Penicillium* y *Trichoderma* fueron aislados a pH ácidos. Entre los *Ascomycota*, las especies de *Talaromyces* fueron aisladas sólo hasta pH 8.0 en

todos los suelos, sin embargo *Neosartorya stramenia* fue aislada a pH 11.0 del horizonte profundo del Rendol.

Entre las especies de *Zygomycota*, *Absidia spinosa* y *Mortierella* sp., fueron aisladas mas frecuentemente a pH 6.0 y 8.0.

Análisis de Componentes principales

Para corroborar la observaciones anteriores, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en el cual se utilizaron las frecuencias de aparición de las diferentes especies aisladas sobre medios de cultivo a pH 6.0, pH 8.0 y pH 11.0, para cada uno de los suelos muestreados. En estos diagramas bidimensionales se representa la distribución de las muestras en los ejes x e y.

El diagrama de ACP para el Argialbol superficial (**Fig. 24 A**) mostró que los ejes 1 y 2 en conjunto explicaron el 63,57% de la varianza acumulada. El eje 1 absorbió el 48,05% de la varianza total y el eje 2 el 15,42 %. Este gráfico muestra la separación de tres grupos que corresponden a los tres valores de pH utilizados (6.0, 8.0, 11.0) siendo el eje 1 un buen discriminante, donde los aislamientos de pH 6.0 se ubicaron en el extremo negativo del eje, mientras que las muestras de pH 11.0 se ubicaron en el extremo positivo, los aislamientos de pH 8.0 se ubicaron en la zona intermedia. La **tabla 11** muestra el aporte de cada una de las especies a los dos primeros ejes. *F. solani* se ubicó a la derecha del eje 1 caracterizando las muestras de pH alcalinos (especies alcalofílicas y alcalino tolerantes) con un alto valor de aporte,

mientras que hacia la izquierda del gráfico se encuentran las especies que caracterizaron las muestras de pH neutro (*Fusarium oxysporum*, *Trichoderma hamatum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*)

En el Argialbol de 20 cm se observó que los dos primeros ejes explicaron el 43,49% de la varianza acumulada. El eje 1 absorbió el 26,6% y el eje 2 el 16,88% de la varianza total (**Fig. 24 B**). En el diagrama el segundo eje aparece como buen discriminante de los aislamientos de pH 11.0 y 8.0 hacia la escala positiva y los aislamientos de pH 6.0 hacia la escala negativa. El aporte de cada una de las especies a los dos primeros ejes se muestra en la **tabla 12**. *Acremonium sp 1*, *Cladosporium cladosporioides*, *Humicola grisea*, *Acremonium kiliense*, *Acremonium sp 2*, *Fusarium solani*, *Doratomyces stemonitis*, son las especies que más aportan en el extremo positivo del eje 2 (pH más altos) y son las especies más tolerantes a pH alcalinos. *Penicillium rubrum*, *P. thomii*, *P. frequentans*, *Neosartorya sp.*, *Talaromyces flavus* var. *flavus*, *T. stipitatus* y *Cylindrocarpon didymum* son las especies que más aportan en el extremo negativo del mismo eje, asociadas así a pH neutros.

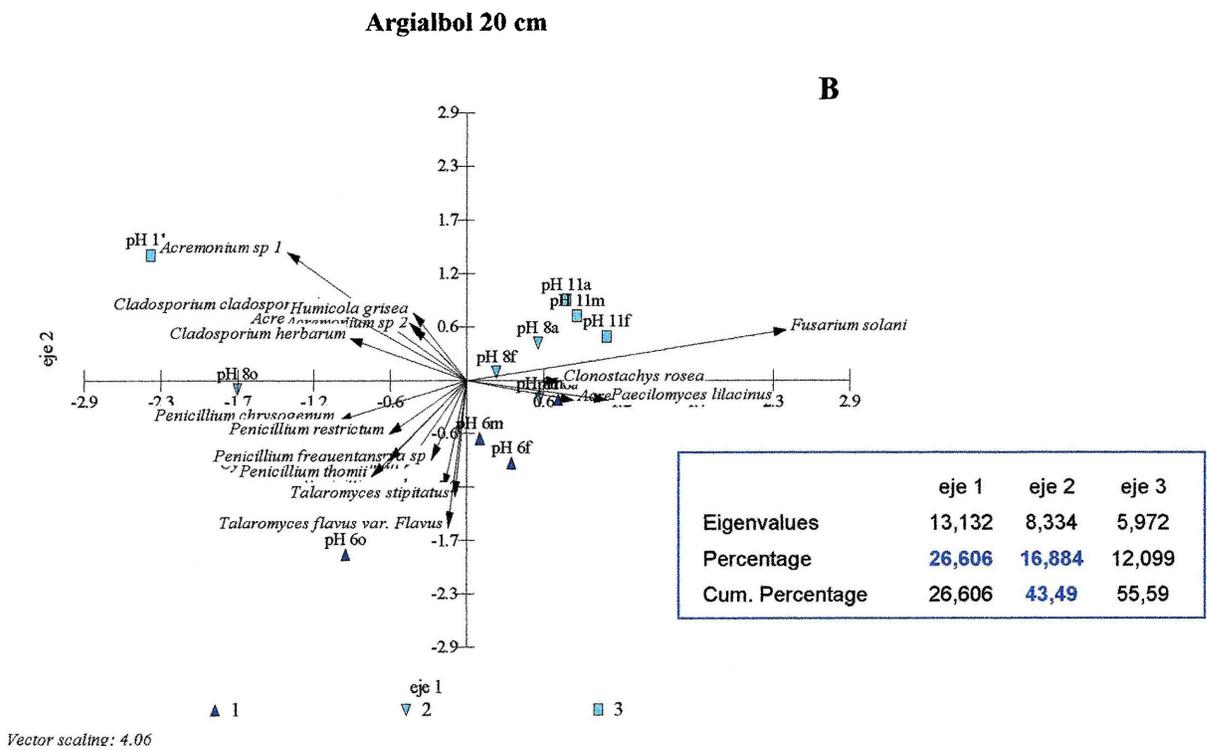
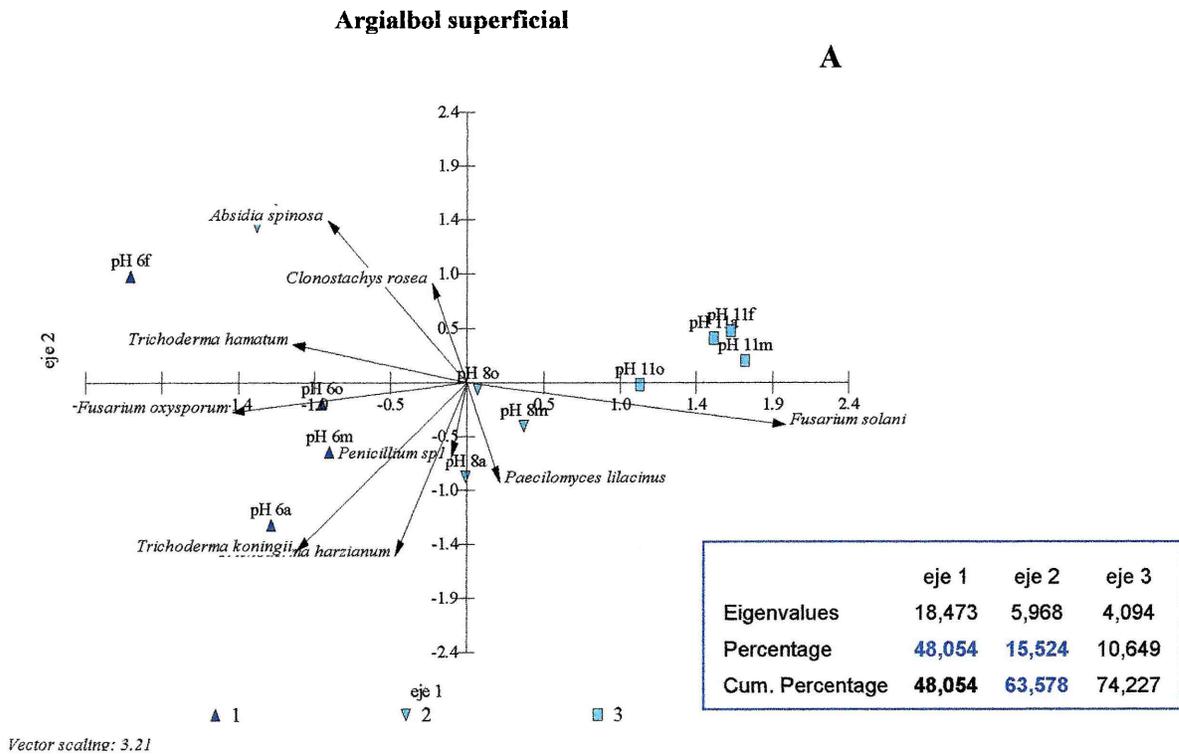


Figura 24. Análisis de componentes principales, gráficos bidimensionales (ejes 1 y 2) para Argialbol superficial **A** y de 20 cm. **B.** 1: pH 6, 2: pH 8, 3: pH 11

Tabla 11. Valores de aporte de las especies aisladas a los dos primeros ejes de variación para Argialbol superficial

ARG SUP	Eje 1	Eje 2
<i>Absidia spinosa</i>	-0,27	0,443
<i>Acremonium killiense</i>	0,071	0,024
<i>Acremonium murorum</i>	0,085	0,055
<i>Acremonium sp 1</i>	0,088	0,041
<i>Fusarium oxysporum</i>	-0,456	-0,081
<i>Fusarium semitectum</i>	0,133	-0,011
<i>Fusarium solani</i>	0,616	-0,116
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,065	-0,275
<i>Penicillium rubrum</i>	-0,12	-0,087
<i>Trichoderma hamatum</i>	-0,338	0,106
<i>Trichoderma harzianum</i>	-0,139	-0,476
<i>Trichoderma koningii</i>	-0,329	-0,461
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	-0,121	0,138

Tabla 12. Valores de aporte de las especies aisladas a los dos primeros ejes de variación para Argialbol 20 cm

ARG 20cm	Eje 1	Eje 2
<i>Acremonium killiense</i>	-0,107	0,154
<i>Acremonium sp 1</i>	-0,333	0,341
<i>Acremonium sp 2</i>	-0,1	0,143
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-0,239	0,191
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	-0,115	-0,235
<i>Doratomyces stemonitis</i>	0,095	0,122
<i>Fusarium solani</i>	0,593	0,134
<i>Humicola grisea</i>	-0,1	0,181
<i>Neosartorya sp</i>	-0,066	-0,213
<i>Penicillium frequentans</i>	-0,146	-0,215
<i>Penicillium rubrum</i>	-0,043	-0,293
<i>Penicillium thomii</i>	-0,177	-0,256
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>	-0,034	-0,394
<i>Talaromyces stipitatus</i>	-0,021	-0,311

El diagrama de ACP para el Natracualf superficial (**Figura 25 A**) mostró que los ejes 1, 2 y 3 en conjunto explicaron el 69,65 % de la varianza acumulada. El eje 2 absorbió el 23,64 % de la varianza total y el eje 3 el 12,14 %. Este gráfico mostró una

buena separación en dos grupos, siendo el eje 2 un buen discriminante, donde los aislamientos de pH 6.0 se encontraron hacia el extremo positivo del eje y las muestras de pH 8.0 y de pH 11.0 se encontraron asociadas entre si hacia el extremo negativo del mismo eje. En la **tabla 13** se muestra el aporte de cada una de las especies a los tres primeros ejes. *Absidia spinosa*, *Chloridium sp*, *Epicoccum nigrum* y *Trichoderma hamatum* son las especies que más aportaron al extremo positivo del eje, asociadas a las muestras de pH 6.0. *Acremonium sp 1*, *Aspergillus sidowii*, *Cylindrocarpon sp y Fusarium semitectum* presentaron altos valores de aporte al extremo negativo de por lo que se ven asociadas a las muestras de pH alcalinos y neutros (8.0 y 11,0).

En Natracualf de 20 cm se observó que los ejes 1, 2 y 3 explicaron el 59,75 % de la varianza acumulada. El eje 1 absorbió el 28,97 % y el eje 3 el 14,21 % de la varianza total. (**Figura 25 B**). En el gráfico bidimensional el primer eje apareció como buen discriminante de los aislamientos de pH 11.0 y 8.0 hacia la escala negativa y los aislamientos de pH 6.0 hacia la escala positiva. El aporte de cada una de las especies a los tres primeros ejes se muestra en la **tabla 14**. *Absidia spinosa*, *Cunninghamella elengans*, *Trichoderma harzianum* y *T. koningii* fueron frecuentemente aislados pH 6.0 y aportaron al extremo positivo del eje 1, mientras que *F. solani*, *C. cladosporioides* y *Acremonium sp 1* caracterizan los aislamientos de pH alcalinos y neutros y aportaron al extremo negativo del mismo eje.

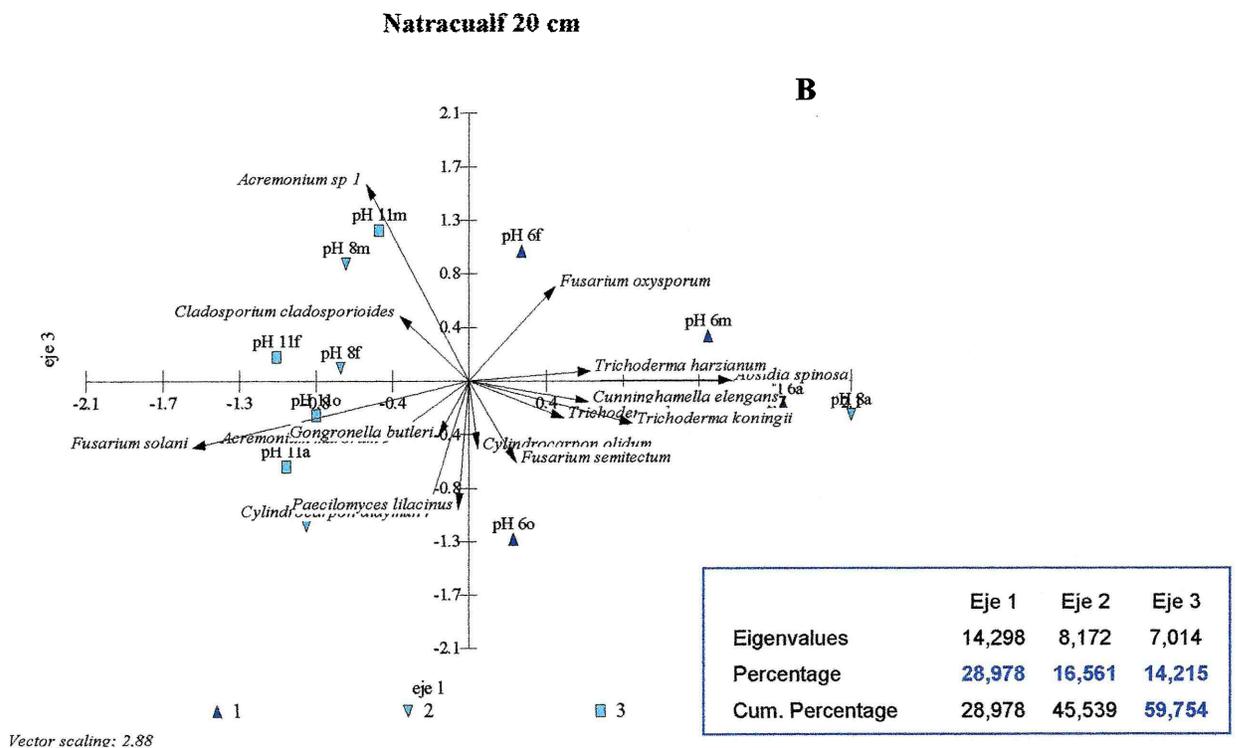
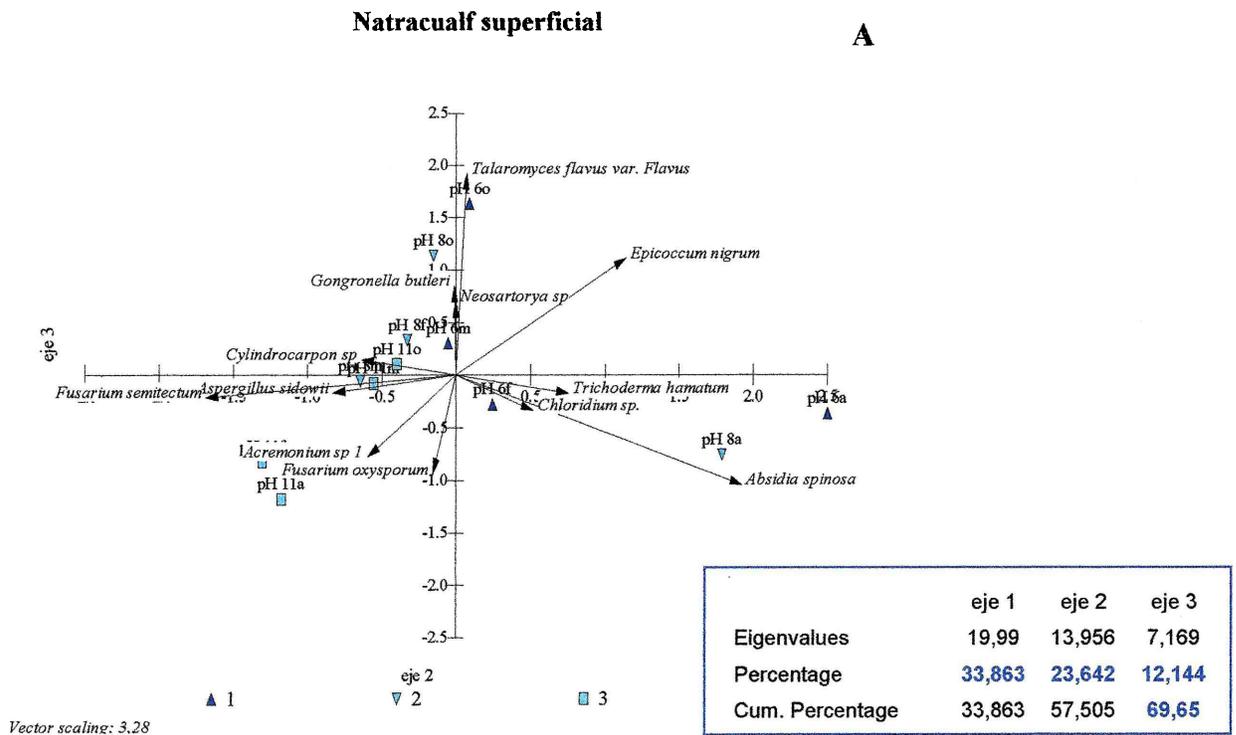


Figura 25: Análisis de componentes principales, gráficos bidimensionales (ejes 2 y 3) Natracualf superficial A y (ejes 1 y 3) 20 cm B, 1: pH 6, 2: pH 8, 3: pH 11

Tabla 13. Valores de aporte de las especies aisladas a los dos primeros ejes de variación para Natracualf superficial

NATR. SUP	Eje 1	Eje 2	Eje 3
<i>Absidia spinosa</i>	0,081	0,594	-0,321
<i>Acremonium sp 1</i>	-0,005	-0,184	-0,239
<i>Aspergillus sidowii</i>	-0,172	-0,256	-0,052
<i>Chloridium sp.</i>	0,026	0,159	-0,103
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,063	-0,048	0,107
<i>Cladosporium herbarum</i>	0,028	0,035	0,053
<i>Coemansia pectinata</i>	0,07	-0,03	0,022
<i>Cunninghamella elengans</i>	0,031	-0,02	0,129
<i>Cylindrocarpon sp</i>	-0,055	-0,196	0,046
<i>Epicoccum nigrum</i>	0,423	0,351	0,343
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,069	-0,049	-0,291
<i>Fusarium semitectum</i>	0,511	-0,521	-0,065
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	0,014	-0,051	-0,1
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,013	0,043	-0,077
<i>Penicillium rubrum</i>	0,04	0,051	0,124
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	0,008	0,036	-0,03
<i>Trichoderma hamatum</i>	0,032	0,232	-0,053
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,005	0,072	-0,02
<i>Trichoderma koningii</i>	0,006	0,088	-0,025

Tabla 14. Valores de aporte de las especies aisladas a los dos primeros ejes de variación para Argialbol 20 cm

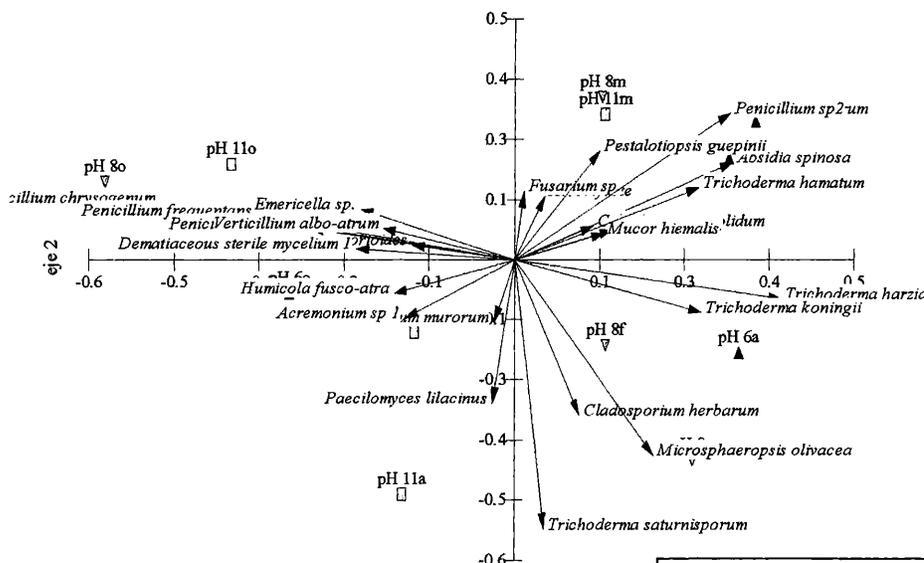
NATR. 20cm	Eje 1	Eje 2	Eje 3
<i>Absidia spinosa</i>	0,503	0,476	0,002
<i>Acremonium murorum</i>	-0,165	-0,045	-0,168
<i>Acremonium sp 1</i>	-0,198	0,014	0,54
<i>Aspergillus terreus</i>	-0,109	0,069	-0,013
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-0,133	0,006	0,178
<i>Cunninghamella elengans</i>	0,227	0,204	-0,056
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,165	-0,07	0,26
<i>Fusarium solani</i>	-0,531	0,203	-0,182
Micelio dematiáceo estéril 1	-0,089	-0,079	-0,098
<i>Penicillium sp2</i>	0,118	-0,197	0,037
<i>Phialophora fastigiata</i>	-0,111	-0,117	0,145
<i>Trichoderma hamatum</i>	0,181	-0,344	-0,1
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,231	-0,476	0,029
<i>Trichoderma koningii</i>	0,312	-0,177	-0,116

El ACP para Rendol superficial (**Figura 26 A**) mostró que los ejes 1 y 2 explicaron en conjunto el 47,12 % de la varianza acumulada. El eje 1 absorbió el

26,31 % de la varianza total y el eje 2 el 20,81 %. En este gráfico los aislamientos de pH 11.0 se agruparon en el extremo negativo del eje 1 y los aislamientos de pH 6.0 hacia el extremo positivo, sin embargo las muestras correspondientes a pH 8.0 no se encontraron en un grupo evidente. En la **tabla 15** se muestra el aporte de cada una de las especies a los dos primeros ejes. *Absidia spinosa*, *Epicoccum nigrum* *Penicillium* sp 2, *Trichoderma harzianum* y *T. koningii* son las especies que más aportaron al extremo positivo del eje y por lo tanto se encontraron asociadas a los aislamientos de pH 6.0. *Penicillium chrysogenum*, *P. frequentans* y *P. rubrum* presentaron altos valores de aporte al extremo negativo del mismo eje.

En Rendol de 20 cm se observó que los ejes 1, 2 y 3 explicaron el 50,78 % de la varianza acumulada. . El eje 1 absorbió el 22,31 % y el eje 3 el 14,83 % de la varianza total (**Fig. 23 B**). En el gráfico bidimensional el tercer eje apareció como buen discriminante de los aislamientos de pH 11.0 y 8.0 hacia la escala positiva y los aislamientos de pH 6.0 hacia la escala negativa El aporte de cada una de las especies a los tres primeros ejes se muestra en la **tabla 16**. *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* fueron las especies que más aportaron al extremo positivo del eje 3 caracterizando a los aislamientos de pH alcalinos y neutros, mientras que *Neosartorya* sp., *Penicillium thomii* y *Talaromyces flavus* var. *flavus* fueron las especies que más aportaron al extremo negativo del mismo eje.

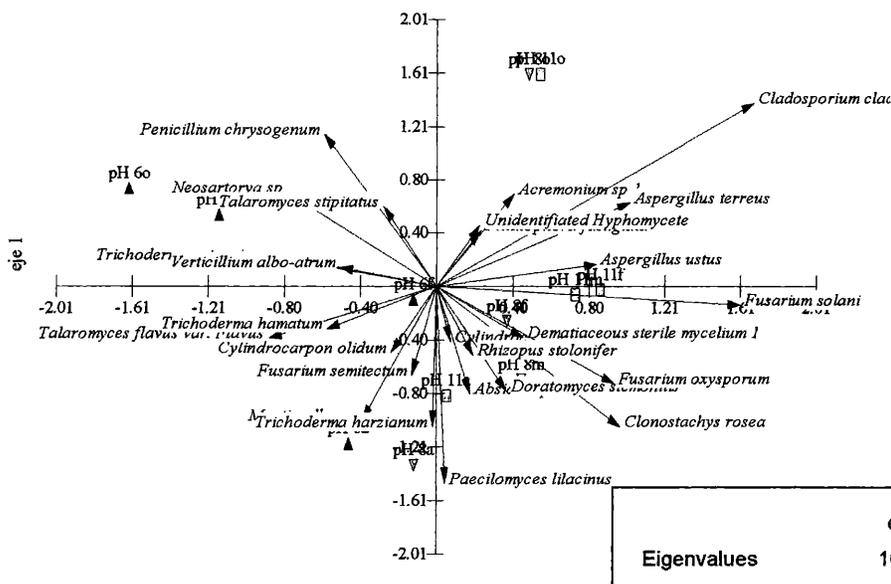
Rendol superficial



Vector scaling: 1.27

	eje 1	eje 2	eje 3
Eigenvalues	1,216	0,962	0,734
Percentage	26,315	20,813	15,876
Cum. Percentage	26,315	47,128	63,004

Rendol 20 cm



Vector scaling: 3.87

	eje 1	eje 2	eje 3
Eigenvalues	10,412	6,923	6,361
Percentage	22,315	14,838	13,633
Cum. Percentage	22,315	37,153	50,786

Figura 26. Análisis de componentes principales, gráficos bidimensionales (ejes 1 y 2) Rendol superficial A y (ejes 1 y 3) 20 cm. B 1: pH 6, 2: pH 8, 3: pH 11

Tabla 15. Valores de aporte de las especies aisladas a los dos primeros ejes de variación para Rendol superficial

RENDOL SUP	Eje 1	Eje 2	Eje 3
<i>Absidia spinosa</i>	0,26	0,164	-0,011
Dematiaceous sterile mycelium 1	-0,188	0,019	-0,206
<i>Emericella sp.</i>	-0,183	0,085	-0,132
<i>Epicoccum nigrum</i>	0,257	0,246	-0,114
<i>Humicola fusco-atra</i>	-0,143	-0,057	0,008
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	0,166	-0,33	-0,289
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-0,422	0,096	-0,209
<i>Penicillium frequentans</i>	-0,307	0,075	-0,162
<i>Penicillium rubrum</i>	-0,242	0,053	-0,228
<i>Penicillium sp 2</i>	0,257	0,246	-0,114
<i>Trichoderma hamatum</i>	0,22	0,122	-0,184
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,318	-0,066	-0,389
<i>Trichoderma koningii</i>	0,223	-0,089	-0,151
<i>Verticillium albo-atrum</i>	-0,156	0,053	-0,041

Tabla 16. Valores de aporte de las especies aisladas a los dos primeros ejes de variación para Rendol 20 cm

RENDOL 20cm	Eje 1	Eje 2	Eje 3
<i>Aspergillus terreus</i>	0,163	-0,337	0,264
<i>Aspergillus ustus</i>	0,043	0,12	0,218
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,358	-0,071	0,434
<i>Cladosporium herbarum</i>	0,052	0,105	-0,186
<i>Clonostachys rosea</i>	-0,272	0,15	0,251
<i>Fusarium oxysporum</i>	-0,189	-0,208	0,243
<i>Fusarium solani</i>	-0,037	0,412	0,416
Micelio dematiáceo estéril 1	-0,099	0,189	0,118
<i>Neosartorya sp</i>	0,183	0,152	-0,205
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,298	0,04	-0,154
<i>Penicillium thomii</i>	0,053	0,155	-0,205
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>	-0,1	0,112	-0,229
<i>Trichoderma hamatum</i>	-0,082	-0,077	-0,15
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	0,052	0,105	-0,186

En la **tabla 17** se muestran los Índices de diversidad (H'), equitabilidad (J') y riqueza de especies (S) de los tres suelos para los dos horizontes muestreados y los 3 pH de aislamiento usados para cada mes de muestreo.

Tabla 17. Índices de diversidad (H'), equitabilidad (J') y riqueza de especies (S) de los tres suelos para los dos horizontes muestreados y los tres pH de aislamiento usados.

ARGIALBOL		Horizonte superficial			Horizonte +20cm		
		H	E	S	H	E	S
mayo	pH6	3,53	0,82	20	3,9	0,87	22
	pH8	2,53	0,66	14	3,39	0,87	15
	pH11	1,59	0,53	8	1,39	0,49	7
agosto	pH6	2,78	0,75	13	3,24	0,9	12
	pH8	2,68	0,77	11	1,55	0,67	5
	pH11	1,72	0,52	10	2,03	0,72	7
octubre	pH6	2,83	0,72	15	3,8	0,93	17
	pH8	2,6	0,7	13	3,7	0,92	16
	pH11	1,16	0,5	5	2,89	0,91	9
febrero	pH6	2,73	0,76	12	3,58	0,84	19
	pH8	2,73	0,76	12	3,1	0,86	12
	pH11	0,56	0,24	5	2,29	0,66	11
NATRACUALF		H	E	S	H	E	S
mayo	pH6	1,92	0,58	10	2,7	0,75	12
	pH8	1,42	0,47	8	3,2	0,92	11
	pH11	1,27	0,49	6	2,65	0,94	7
agosto	pH6	2,02	0,64	9	2,98	0,76	15
	pH8	1,91	0,68	7	2,42	0,67	12
	pH11	1,49	0,53	7	1,51	0,44	11
octubre	pH6	2,26	0,68	10	3,77	0,85	22
	pH8	3,37	0,8	18	3,35	0,8	18
	pH11	2,09	0,6	11	2,31	0,62	13
febrero	pH6	0,19	0,19	2	3,69	0,92	16
	pH8	2,6	0,78	10	2,7	0,75	12
	pH11	1,92	0,96	4	1,6	0,57	7
RENDOL		H	E	S	H	E	S
mayo	pH6	2,7	0,81	10	3,57	0,91	15
	pH8	2,74	0,79	11	3,04	0,8	14
	pH11	2,56	0,77	10	3,42	0,87	15
agosto	pH6	3,76	0,83	23	3,8	0,83	24
	pH8	2,86	0,7	17	3,56	0,89	16
	pH11	3	0,75	16	3,29	0,84	15
octubre	pH6	2,86	0,66	20	3,65	0,91	16
	pH8	3,2	0,84	14	3,3	0,89	13
	pH11	3	0,95	9	3,04	0,88	11
febrero	pH6	3,05	0,73	18	4,25	0,93	24
	pH8	2,92	0,75	17	3,41	0,82	18
	pH11	0,58	0,2	7	3,23	0,85	14

En el Argialbol, se observó una disminución en el índice de diversidad (H) en todas las muestras a pH 11.0. Un comportamiento similar se observó para la equitabilidad (J'). Los mayores valores de diversidad se obtuvieron siempre en los horizontes más profundos, donde también se encontraron los mayores valores de riqueza específica, excepto en el muestreo de agosto. En el Natracualf, los valores más altos de H se observaron en el horizonte +20 cm, mientras que el incremento del pH no incidió en el índice H. El índice de equitabilidad y la riqueza específica fueron siempre mayores en los horizontes de +20cm. En el Rendol no se observaron diferencias en el índice H', excepto en pH 11.0 en las muestras superficiales de febrero, y en los pH 8.0 y pH 11.0 de las muestras de +20 cm del mismo mes. Los valores de equitabilidad y riqueza específica fueron mayores en los horizontes de +20cm.

El índice de Shannon – Weiner expresa el producto de dos componentes de la diversidad: equidad y número de especies (riqueza específica). Entonces un aumento en la diversidad no sólo es producto del número de especies sino también de la equitatividad de sus distribuciones.

Para establecer el componente que más contribuye a la diversidad de cada suelo, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores del índice de diversidad (H') de equitabilidad (J') y riqueza específica (S) de todas las muestras por pH y por horizonte (**Figura 27**).

Los valores de riqueza específica (S) y equidad (J') mostraron una correlación positiva con los valores de biodiversidad (H'). Para Argialbol $r = 0,88$ y $0,93$,

Natracualf $r = 0,82$ y $0,81$ $P < 0.001$ y para Rendol $r = 0,69$, $P < 0.001$ y $0,87$ $P < 0.001$ respectivamente. La riqueza de especies es el componente que mejor explicó la biodiversidad en el Natracualf mientras que la equidad lo fue para Rendol y Argialbol. Esto significa que la elevada diversidad de especies fúngicas observada en los aislamientos de suelo se debe, en el caso de los suelos sódicos (Natracualf) al gran número de especies presentes, mientras que en Rendol y Argialbol se explica debido a la equidad con que sus frecuencias se distribuyen.

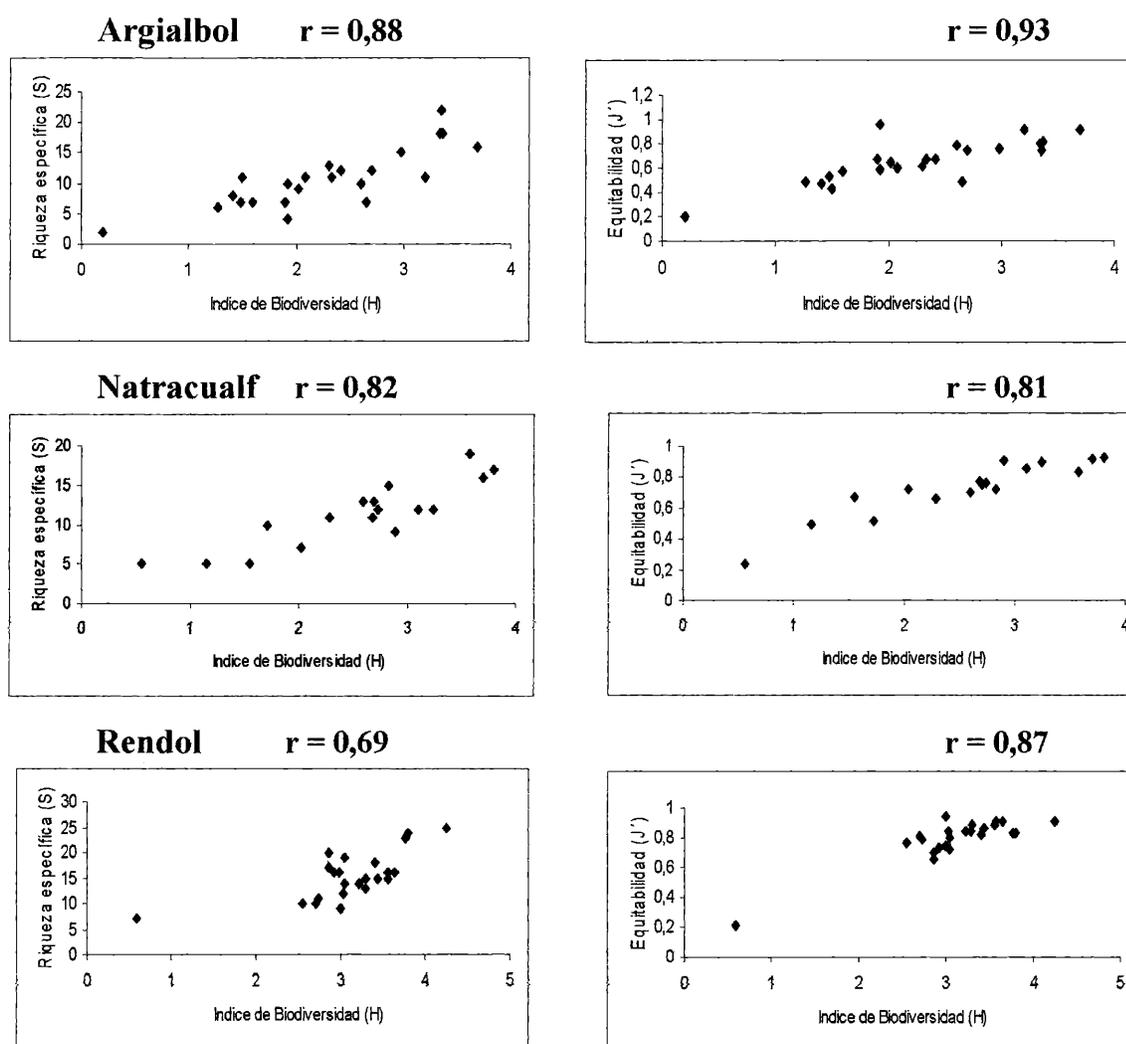


Figura 27. Variación del índice de diversidad de Shannon-Wiener en relación a la riqueza de especies e índice de equitabilidad para cada tipo de suelo

Diversidad de hongos aislados de *Distichlis*

Como se señaló en materiales y métodos, en las zonas planas de la antigua albufera platense se desarrolla el suelo más alcalino (pH 10.0) de los tres suelos muestreados. En estos suelos alcalino-sódicos la vegetación que se desarrolla es casi exclusivamente *Distichlis spicata* (L.) Greene (pasto salado). Por lo tanto resultó de interés analizar la micobiota asociada al filoplano de estos pastos que soportan altas concentraciones de sodio en suelo y que sólo se encuentran en ambientes alcalinos.

Se aislaron 33 especies fúngicas, 25 de cámara húmeda (**tabla 18**) y 12 de partículas de hojas lavadas (**tabla 19**). Sólo cuatro especies (*Curvularia protuberata* Nelson & Hodges, *Nigrospora sphaerica* (Sacc.) Mason, *Phoma putaminum* Speg. y *Sordaria fimicola* (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not), se aislaron utilizando ambas metodologías.

En la **tabla 18** se muestran las especies fúngicas aisladas a partir de hojas incubadas en cámara húmeda. *Phoma putaminum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, *Periconia minutissima* y *Epicoccum nigrum* son las especies que mostraron los valores más altos de contribución al índice de diversidad $H' (-\sum p_i \log_2 p_i \geq 0.25)$.

En la **tabla 19** aparecen las especies de hongos aislados a partir del método de lavado y fragmentación de las hojas. Sólo se observaron 12 especies fúngicas. Los valores más altos de frecuencia de aparición se observaron para *Sporormia fimetaria*, *Sporormia* sp. y *Sordaria fimicola*.

Tabla 18. Abundancia y frecuencias porcentuales de las especies fúngicas aisladas a partir de muestras de hojas de *Distichlis spicata* incubadas en cámaras húmedas, y su contribución al índice de diversidad Shannon-Weiner (H'). Los números en negrita indican las especies que presentaron valores más elevados de contribución al índice de diversidad H'.

Taxa	Abundancia	frecuencia %	Contribución a H ($-\pi \log_2 \pi$)
<i>Phoma putaminum</i> Speg.	63	31.50	0.47
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	43	21.50	0.40
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) de Vries	37	18.50	0.37
<i>Periconia minutissima</i> Corda	26	13	0.30
<i>Epicoccum nigrum</i> Ehrenb.	21	10.50	0.26
<i>Bipolaris cynodontis</i> (Marig.) Shoem.	13	6.50	0.19
<i>Ramichloridium schulzeri</i> (Sacc.) de Hoog	13	6.50	0.19
<i>Myrothecium verrucaria</i> (Alb. & Schwein.) Ditmar	11	5.50	0.17
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld.	9	4.50	0.15
<i>Phoma leveillei</i> Boerema & Bollen	9	4.50	0.15
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	8	4	0.14
<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.	8	4	0.14
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	7	3.50	0.12
<i>Minimidochium parvum</i> Cabello, Aramb. & Cazau	7	3.50	0.12
<i>Acremonium</i> sp.	6	3	0.11
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	6	3	0.11
<i>Fusarium semitectum</i> Berk. & Ravenel	4	2	0.08
<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	4	2	0.08
<i>Fusarium</i> sp.	3	1.50	0.07
<i>Phoma herbarum</i> Westend.	3	1.50	0.07
<i>Curvularia protuberata</i> Nelson & Hodges	2	1	0.05
<i>Volutella ciliata</i> (Alb. & Schwein.) Fr.	2	1	0.05
<i>Acremonium terricola</i> (Mill., Giddens & Foster) Gams	1	0.50	0.03
<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.	1	0.50	0.03
<i>Tetraploa aristata</i> Berk. & Br.	1	0.50	0.03
Indice Shannon-Weiner (H')			3.86
Riqueza específica(S)			25
Equitabilidad (J')			0.83

Table 19. Frecuencias porcentuales de las especies fúngicas aisladas a partir de partículas lavadas de *Distichlis spicata* y su contribución al índice de diversidad Shannon-Weiner (H'). Los números en negrita indican las especies que presentaron valores más elevados de contribución al índice de diversidad H'.

Taxa	frecuencia %	Contribución a H ($-pi \log_2 pi$)
<i>Phoma putaminum</i> Speg.	54	0.48
<i>Sporormia fimetaria</i> De Not.	16	0.42
<i>Nigrospora sphaerica</i> (Sacc.) Mason	7	0.27
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge ex Desm.) Ces. & De Not.	6	0.24
<i>Sporormia</i> sp.	6	0.24
<i>Talaromyces stipitatus</i> (Thom) Benjamin	3	0.15
Micelio Dematiáceo estéril	3	0.15
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	1	0.07
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	1	0.07
<i>Curvularia protuberata</i> Nelson & Hodges	1	0.07
<i>Penicillium thomii</i> Maire	1	0.07
<i>Rhodotorula</i> sp.	1	0.07
Indice Shannon-Weiner (H')		2.29
Riqueza específica(S)		12
Equitabilidad (J')		0.92

II Parte

FUNCIONES: CULTIVO DE HONGOS EN DIFERENTES MEDIOS Y ANÁLISIS ENZIMÁTICOS

En estos suelos con un pH entre 7.2 y 10 habitan especies de la microbiota con capacidad de crecer en medios altamente alcalinos. Esta capacidad adaptativa hace suponer que puedan segregar enzimas alcalino-tolerantes o alcalino-activas, requeridas para la degradación de los sustratos presentes en el suelo.

Para realizar el screening de la actividad enzimática se emplearon dos estrategias. La primera consistió en la realización de cultivos en medios agarizados conteniendo como nutriente el sustrato objeto de la degradación, para visualizar luego del desarrollo de la colonia, la degradación *in situ* del sustrato. De esta forma se evaluó la capacidad de los hongos de producir proteasas, amilasas, celulasas (CMCasas) y quitinasas. La actividad celulolítica está asociada a la capacidad del hongo de degradar los componentes más refractarios de la pared celular vegetal (celulosa, lignina) y en el caso de las quitinasas el componente principal del exo-esqueleto de los insectos y de la pared celular de los hongos. Ambos, pared celular vegetal y exo-esqueleto, constituyen fuentes de carbono y energía presente en el suelo que en general son degradadas por una comunidad limitada de hongos. La segunda estrategia consistió en cultivar los hongos en medios sólidos o líquidos con nutrientes que puedan inducir una determinada actividad enzimática. Esta estrategia se empleó para determinar la producción de queratinasas, α -ramnosidasas y β -glucosidasas. En realidad la actividad

principal en el screening de las glicosidasas fue la búsqueda de cepas con actividad ramnosidasa. Sin embargo dado que en la hidrólisis de flavonoides como la naringina, también actúan enzimas que hidrolizan el β -glucósido (prunina), el screening incluyó la actividad β -glucosídasa. Es importante resaltar que la β -glucosídasa es una enzima que también forma parte del complejo celulolítico ya que hidroliza la celobiosa, uno de los productos resultante de la hidrólisis de la celulosa. por la acción de las endo/exoglucanasas.

Crecimiento fúngico en medios sólidos y líquidos

Caracterización de los medios sólidos: Propiedades de hidratación de los sustratos

Un aspecto crítico para de la fermentación en sustrato sólido es el control de la actividad acuosa (a_w) del medio, ya que en este tipo de cultivos la mayor parte del agua se encuentra adsorbida en el material poroso. La disminución de a_w a valores por debajo del óptimo afecta marcadamente el crecimiento de los hongos lo que se manifiesta en una extensión de la fase de latencia, disminución de la velocidad de crecimiento y reducción de la cantidad de biomasa. Si bien los hongos pueden tolerar valores de a_w del orden de 0.95, en este trabajo se asumió como valor mínimo aceptable para el crecimiento, un valor de a_w de 0.98.

Todo cuerpo poroso en contacto con un ambiente adsorbe o pierde humedad si no hay una igualdad entre las presiones parciales de vapor del aire circundante y el

medio húmedo. Mientras que los valores de presión de vapor sean diferentes, habrá una transferencia de humedad del cuerpo al medio circundante y viceversa. La magnitud de esta diferencia depende esencialmente de la humedad relativa del aire. Se llega de esta forma a la noción de equilibrio higroscópico que corresponde al equilibrio entre las presiones parciales de vapor del aire del ambiente y del sustrato húmedo. Por definición, la a_w del sólido es el valor de la humedad relativa con la cual está en equilibrio y corresponde a la disponibilidad del agua para intervenir en reacciones de cualquier tipo.

Para caracterizar el pasto salado (*Distichlis* sp) y el sustrato pelo vacuno en relación a sus propiedades de hidratación (relación entre contenido de agua y a_w), se determinaron las isotermas de desorción de agua en el rango de 1.0 a 0.9. Comúnmente se realizan isotermas de adsorción y desorción para caracterizar las propiedades de hidratación de un sólido y en general son diferentes (histéresis). En nuestro caso se consideró únicamente la isoterma de desorción ya que en la práctica el medio sólido se prepara con una humedad inicial equivalente a una actividad de 1.0 y se asume que en el transcurso del cultivo la humedad puede disminuir a un valor crítico para el crecimiento microbiano. En la **tabla 20** se muestran los valores de humedad en equilibrio para el proceso de desorción de agua en ambos sustratos sólidos. El procedimiento empleado en ambos casos fue el de esterilizar el sólido con su humedad natural y luego hidratarlo con un exceso de agua durante al menos 24 hs. Una vez eliminada el agua libre se llevó el sustrato húmedo a recipientes con diferentes humedades relativas hasta alcanzar el equilibrio.

Tabla 20. Valores de humedad en equilibrio a 25 °C en función de la humedad relativa para *Distichlis* sp y sustrato pelo vacuno autoclavados 30 min a 121°C y luego impregnados con agua deionizada hasta saturación .

	Hojas de <i>Distichlis</i>	Pelo vacuno desengrasado
actividad acuosa a_w	Humedad (gr de agua/ gr seco)	
0,90	0,24	1,24
0,92	0,20	1,52
0,94	0,79	1,68
0,96	1,29	-
0,97	1,84	1,90
0,98	2,64	2,37
0,99	3,40	2,55

A partir de los resultados obtenidos de las isotermas se determinó que para lograr un valor de a_w de 0.98 como mínimo aceptable para los cultivos fúngicos, la humedad del medio debe ser \geq a 2.64 gr de agua/ gr de sólido seco para el *Distichlis* y 2.37 gr de agua/ gr de sólido para sustrato pelo vacuno.

Crecimiento fúngico en diferentes medios

Las diferentes cepas de hongos aisladas de suelo y de *Distichlis* mostraron buen crecimiento tanto en medio líquido con harina de soja (HS) como en ambos medios sólidos (pelo vacuno y hojas de *Distichlis*).

En la **tabla 21** se muestra el crecimiento relativo en diferentes medios de cultivo de las cepas fúngicas aisladas de suelo y de *Distichlis* sp.

Tabla 21. Crecimientos relativos de las especies aisladas de suelo y de *Distichlis* sp. en los diferentes medios de cultivo utilizados en los ensayos enzimáticos. Para evaluar dicho crecimiento se asignaron las siguientes categorías: - sin crecimiento, + crecimiento pobre, ++ buen crecimiento, +++ crecimiento vigoroso, np no probado

N° de Cultivo LPS	Especies	medio líquido	medios sólidos		conservación	
		HS	Distichlis sp.	Pelo vacuno	estrias APG	Liofilizado
	FUNGI IMPERFECTI					
928	<i>Acremonium cerealis</i>	+	+	+	x	
958	<i>Acremonium killiense</i>	+	np	+	x	x
927	<i>Acremonium murorum</i>	++	++	+	x	x
sn	<i>Acremonium sp. 1</i>	+	np	+	x	
427	<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	++	++	+++	x	x
sn	<i>Alternaria alternata</i>	++	np	np	x	
845	<i>Aspergillus niger</i>	+++	np	++	x	x
931	<i>Aspergillus sidowii</i>	++	np	++	x	x
994	<i>Aspergillus terreus (2)</i>	++	++	++	x	
sn	<i>Aspergillus terreus</i>	++	np	++	x	x
981	<i>Aspergillus ustus</i>	++	+	++	x	x
995	<i>Bipolaris cynodontis</i>	+++	np	np	x	
959	<i>Bipolaris ellisii</i>	+++	np	np	x	
1000	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	+++	np	np	x	
951	<i>Chrysosporium sp.</i>	+	++	++	x	
953	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	++	++	++	x	
949	<i>Cladosporium herbarum</i>	++	np	np	x	
930	<i>Clonostachys rosea</i>	++	++	++	x	x
934	<i>Curvularia lunata</i>	+	np	np	x	
975	<i>Curvularia protuberata</i>	+	np	np	x	
962	<i>Cylinprocarpon didymum</i>	+	++	+	x	
956	<i>Cylinprocarpon lucidum</i>	+	np	np	x	
923	<i>Cylinprocarpon olidum</i>	++	++	+	x	
984	<i>Doratomyces stemonitis</i>	+	np	++	x	
999	<i>Drechslera halodes</i>	+	np	np	x	
932	<i>Drechslera ravenelli</i>	+	np	np	x	
940	<i>Epicoccum nigrum</i>	+	np	np	x	x
sn	<i>Exserohillum rostratum</i>	+	np	np	x	
sn	<i>Fusarium equisetii</i>	++	++	np	x	
961	<i>Fusarium oxysporum.</i>	+++	np	++	x	
935	<i>Fusarium semitectum</i>	np	np	++	x	
936	<i>Fusarium solani</i>	+++	np	++	x	
933	<i>Humicola grisea</i>	+	np	+	x	
993	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	+	++	+	x	
944	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	+	+	np	x	

979	<i>Myrothecium cinctum</i>	+	np	np	x	
971	<i>Nigrospora sphaerica</i>	+	np	np	x	
952	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	+++	+++	++	x	x
983	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	+++	+++	+++	x	x
sn	<i>Penicillium chrysogenum</i>	++	np	np	x	
945	<i>Penicillium thomii</i>	+	++	np	x	
954	<i>Penicillium restrictum</i>	+	np	np	x	
943	<i>Periconia minutissima</i>	+	++	+	x	
929	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	+	+++	++	x	
992	<i>Phialocephala sp</i>	+	+	+	x	
942	<i>Phialophora fastigiata</i>	+	np	np	x	
947	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	+	np	-	x	
922	<i>Stachybotrys chartarum</i>	++	++	++	x	
997	<i>Stachybotrys elegans</i>	++	np	np	x	
sn	<i>Trichoderma harzianum</i>	++	np	np	x	
878	<i>Trichoderma saturnisporum</i>	++	++	np	x	
941	<i>Verticillium albo-atrum</i>	+	np	++	x	x
939	<i>Verticillium nigrescens.</i>	+	np	np	x	x
946	<i>Volutella ciliata</i>	+	np	np	x	
955	<i>Wardomyces inflatus</i>	+	+	np	x	
	ZYGOMYCOTA					
960	<i>Absidia spinosa</i>	+++	np	np	x	
985	<i>Cunninghamella elegans</i>	+	np	np	x	
991	<i>Gongronella butleri</i>	+	+++	np	x	
	ASCOMYCOTA					
950	<i>Chaetomium globosum</i>	+	np	np	x	
839	<i>Emericellopsis minima</i>	+	np	np	x	
833	<i>Neosartorya stramenia</i>	+	++	np	x	x
837	<i>Neurospora tetrasperma</i>	+++	np	+++	x	x
339	<i>Sporormia fimetaria</i>	++	++	np	x	
sn	<i>Sporormia sp.</i>	++	++	np	x	
838	<i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i>	+	np	np	x	x
835	<i>Talaromyces stipitatus</i>	+	np	+	x	x
831	<i>Talaromyces trachyspermus</i>	+	np	+	x	x
830	<i>Westerdikella dispersa</i>	++	+	+++	x	
	MYCELIA STERILIA					
989	Micelio dematiáceo estéril I	++	np	np	x	

Acremonium murorum, *Acrostalagmus luteo-albus*, *Aspergillus niger*, *Paecilomyces lilacinus*, *Pestalotiopsis guepinii* y *Neurospora tetrasperma*, fueron las especies que presentaron mayor crecimiento micelial y esporulación.

En las fotografías de la **figura 28** se aprecia el crecimiento micelial de dos cepas fúngicas luego de 15 días de incubación. En los cultivos sólidos se observó que en todos los casos el crecimiento de las hifas fue externo.

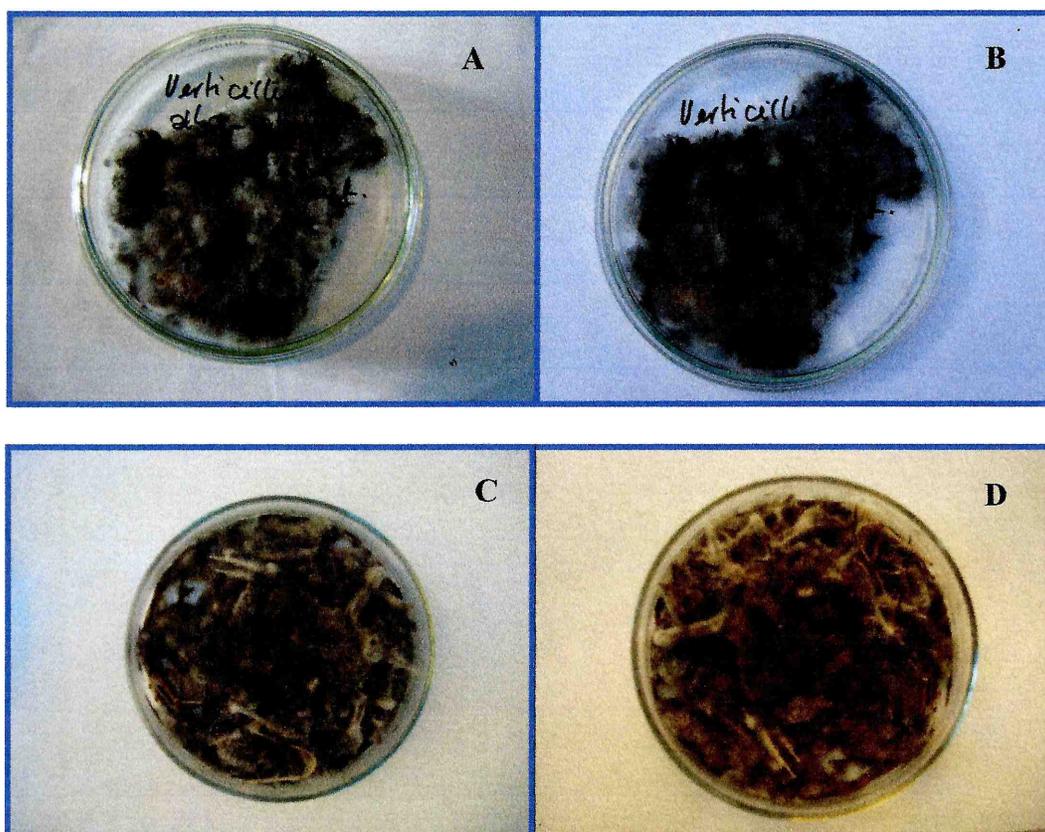


Figura 28. Cultivos en medios sólidos luego de 15 días de incubación. **A-B** cultivos en sustrato pelo vacuno de *Verticillium albo-atrum*. **C-D** cultivos en *Distichlis* de *Cylindrocarpon olidum*.

Determinación de actividades enzimáticas

Tabla 22. Actividad proteolítica, amilolítica, celulolítica y quitinolítica de las cepas fúngicas aisladas a dos pH.

	Proteasa		Amilasa		Celulasa		Quitinasa
	pH 6.0	pH 9.0	pH 6.0	pH 9.0	pH 6.0	pH 9.0	pH 9.0
FUNGI IMPERFECTI							
<i>Acremonium cerealis</i>	1,72	1,4	1,6	1,42	0	0	np
<i>Acremonium killiense</i>	2	1,31	1,23	1,23	0	0	np
<i>Acremonium murorum</i>	2	2,13	0	0	0	0	++
<i>Acremonium rutilum</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	1,25	1,26	0	0	0	0	-
<i>Alternaria alternata</i>	np	np	0	0	0	0	np
<i>Aspergillus niger</i>	1,16	1,18	1,6	1,5	1,23	1,23	-
<i>Aspergillus sidowii</i>	1,4	1,35	2	1,82	1,5	1,35	-
<i>Aspergillus terreus</i>	1,2	1,24	1,24	1,18	1,03	1,13	-
<i>Aspergillus terreus</i>	1,24	1,32	1,2	1,26	1,4	1,33	np
<i>Aspergillus ustus</i>	np	np	0	0	0	0	np
<i>Chrysosporium aff. xerophilum</i>	1,5	1,13	1,2	1,32	0	0	np
<i>Chrysosporium sp.</i>	1,6	1,5	1,2	1,37	0	0	np
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Clonostachys rosea</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Clonostachys sp.</i>	np	np	0	0	0	0	np
<i>Cylinprocarpon didymum</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Cylinprocarpon lucidum</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Cylinprocarpon olidum</i>	2	1,38	1,36	1,47	0	0	-
<i>Doratomyces stemonitis</i>	0	0	np	np	np	np	np
<i>Drechslera ravenelli</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Epicoccum nigrum</i>	1,2	1	0	0	0	0	np
<i>Fusarium equisetii</i>	0	0	np	np	np	np	np
<i>Fusarium oxysporum</i>	1,4	1,24	0	0	0	0	-
<i>Fusarium semitectum</i>	1,36	1,52	0	0	0	0	np
<i>Fusarium solani</i>	1,7	1,6	0	0	2,7	2,27	-
<i>Humicola fuscoatra</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Humicola grisea</i>	0	0	0	0	0	0	+
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	1,7	1,8	0	0	0	0	+
<i>Microsphaeropsis olivacea</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Myrothecium cinctum</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Nigrospora sphaerica</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	2,2	2,21	0	0	0	0	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1,35	1,71	0	0	0	0	np
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1,23	1,42	0	0	0	0	np
<i>Penicillium frequentans</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Penicillium megasporum</i>	0	0	np	np	np	np	np
<i>Penicillium restrictum</i>	0	0	np	np	0	0	np
<i>Penicillium rubrum</i>	0	0	np	np	np	np	np
<i>Penicillium thomii</i>	1,42	1,41	0	0	0	0	np
<i>Periconia minutissima</i>	np	np	np	np	np	np	-

<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	1,36	1,22	1,25	1,33	0	0	-
<i>Phialocephala sp</i>	1	1,01	0	0	1,02	1,02	np
<i>Phialophora fastigiata</i>	1,4	1,33	np	np	np	np	np
<i>Phoma herbarum</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	2,01	2,06	2,3	1,9	0	0	+
<i>Stachybotrys elegans</i>	2,06	2,01	0	0	0	0	np
<i>Stachybotrys chartarum</i>	1,69	1,7	0	0	1,65	1,49	+
<i>Trichoderma hamatum</i>	0	0	0	0	np	np	np
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,62	1,26	0	0	np	np	np
<i>Trichoderma koningii</i>	0	0	0	0	np	np	np
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	1,7	1,43	0	0	np	np	-
<i>Verticillium albo-atrum</i>	2	1,29	0	0	0	0	-
<i>Verticillium nigrescens</i>	1,36	1,3	0	0	0	0	-
<i>Volutella ciliata</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Wardomyces inflatus</i>	0	0	np	np	np	np	-
ZYGOMYCOTA							
<i>Absidia spinosa</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Cunninghamella elegans</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Gongronella butleri</i>	np	np	np	np	np	np	-
<i>Mortierella sp.</i>	np	np	np	np	np	np	-
<i>Zygorrhynchus moelleri</i>	0	0	0	0	0	0	np
ASCOMYCOTA							
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	np	np	np	np	-
<i>Melanospora zamiae</i>	1,2	2,04	1,23	1,27	0	0	np
<i>Neosartorya stramenia</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Neurospora tetrasperma</i>	1,7	2,08	0	0	1,23	1,51	np
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Talaromyces stipitatus</i>	0	0	0	0	0	0	-
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	1,25	1,29	0	0	1,66	1,38	-
<i>Thielavia heterotallica</i>	0	0	0	0	0	0	np
<i>Westerdikella dispersa</i>	1,6	2,27	1,6	1,73	1,03	1,14	np
MYCELIA STERILIA							
<i>Micelio dematiáceo estéril 1</i>	1,2	1,52	0	0	0	0	-

Las actividades proteolítica, amilolítica y celulolítica se expresaron como la relación entre el halo de actividad y el tamaño de la colonia. En color se señalan las cepas con altos valores de contribución al índice de diversidad (H). La actividad quitinilítica se determinó frente al sustrato cromogénico Kitin Azure.

Test en medios agarizados: actividades proteolítica, amilolítica y celulolítica

La determinación de las actividades proteolítica, amilolítica y celulolítica en placa se realizaron a dos pH (6.0 y 9.0). Los valores de la **tabla 22** corresponden a la

relación entre el halo de actividad y el tamaño de la colonia según se indica en materiales y métodos. El signo – se utilizó para señalar ausencia de actividad observada y las cepas señaladas np no fueron probadas.

De las cepas probadas 35 presentaron actividad proteolítica, 12 actividad amilolítica y 10 actividad celulolítica a pH 9.0.

Analizando las especies que presentaron altos valores de contribución al índice de diversidad (H'), *Acremonium murorum* tuvo valores altos de actividad proteolítica y también evidenció actividad amilolítica. Otras especies de *Acremonium* mostraron actividad proteolítica y amilolítica en placa incluso a pH 9.0, sin embargo ninguna de estas cepas tuvieron actividad celulolítica en ningún pH de cultivo. Las especies de *Aspegillus* fueron capaces de producir proteasas, amilasas y celulasas en cultivo a ambos pH, excepto *A. ustus* que no presentó actividad de las enzimas probadas. Las especies de *Fusarium* presentaron actividad proteolítica a ambos pH y no evidenciaron actividad amilolítica ni celulolítica excepto, *F. solani* que produjo celulasas a pH 6.0 y 9.0. *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium chrysogenum* presentaron actividad proteolítica a los dos pH probados, pero fueron negativas sus actividades amilolítica y celulolítica. *Trichoderma harzianum* y *T. saturnisporum* presentaron actividad proteolítica a ambos pH. Entre los Zygomycota *Absidia espinosa* y entre los Ascomycota, *Talaromyces flavus* var. *flavus* y *Talaromyces stipitatus* no mostraron actividad de estas tres enzimas a ningún pH probado.

Actividad quitinolítica

Se determinó la actividad quitinolítica en placa de 34 especies fúngicas aisladas de suelos alcalinos. Para esta determinación se utilizó el sustrato cromogénico Kitin Azure, el cual necesita un tiempo prolongado de incubación para poder ser degradado. Las cepas seleccionadas para la determinación fueron aquellas cuyo crecimiento en cultivo no produjeron excesiva cantidad de micelio aéreo de manera de poder observar en las placas la decoloración del sustrato cromogénico en medio agarizado al final de la incubación. La **tabla 22** muestra la presencia o ausencia de actividad a pH 9.0 De las 34 especies probadas *Acremonium murorum*, *Humicola grisea*, *Metarrhizium anisopliae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Stachybotrys chartarum* presentaron actividad positiva en pH 9.0 y en el control a pH 6.0.

En extractos de cultivo: Actividad queratinolítica

En la **tabla 23** se indican los valores de actividad queratinolítica en los extractos crudos obtenidos de los cultivos en los medios pelo vacuno y harina de soja.

De las 33 especies probadas frente al sustrato cromogénico Keratin Azure, 28 presentaron actividad queratinolítica. *Acremonium murorum*, *Acremonium* sp.1, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sidowii*, *Chrysosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Cylindrocarpon didymum*, *Cylindrocarpon olidum*, *Metarrhizium anisopliae*, *Neurospora tetrasperma*, *Paecilomyces lilacinus*, *Periconia minutissima* y *Westerdikella dispersa* presentaron alta actividad. Los valores de actividad son

similares tanto para los extractos provenientes de cultivos realizados en pelo vacuno como para aquellos obtenidos de medio líquido de harina de soja.

Tabla 23. Actividad queratinolítica (Uka/ml) de los extractos fúngicos frente al sustrato cromogénico Keratin Azure. ($1U_{ka} = 0.1 \text{ Abs}_{595}/\text{h/ml}$)

Especies	Unidades enzimáticas por ml (Uka/ml)			
	Sustrato pelo		HS	
	promedio	desvío	promedio	desvío
<i>Acremonium murorum</i>	1,129	0,212	1,000	0,114
<i>Acremonium cerealis</i>	0,367	0,032	0,489	0,022
<i>Acremonium killiense</i>	0,516	0,047	0,579	0,008
<i>Acremonium sp.1</i>	0,869	0,052	0,987	0,036
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	0,646	0,031	0,283	0,106
<i>Aspergillus niger</i>	1,997	0,143	1,695	0,038
<i>Aspergillus sidowii</i>	1,139	0,112	1,227	0,021
<i>Aspergillus terreus</i>	0,766	0,061	0,903	0,050
<i>Aspergillus terreus (2)</i>	0,529	0,024	0,866	0,127
<i>Aspergillus ustus</i>	0,199	0,029	0,299	0,009
<i>Chrysosporium sp.</i>	1,064	0,024	1,256	0,014
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1,279	0,137	1,911	0,604
<i>Clonostachys rosea</i>	0,557	0,032	0,712	0,047
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	1,032	0,080	0,967	0,193
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	0,979	0,179	1,101	0,127
<i>Doratomyces stemonitis</i>	0,052	0,008	0,076	0,003
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,189	0,019	0,406	0,046
<i>Fusarium semitectum</i>	0,714	0,025	-	-
<i>Fusarium solani</i>	0,583	0,070	0,850	0,126
<i>Humicola grisea</i>	0,009	0,007	0,010	0,007
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	2,088	0,722	2,338	0,809
<i>Neurospora tetrasperma</i>	1,824	0,217	2,339	0,484
<i>Paecilomyces lilacinus (pelo)</i>	0,932	0,061	0,925	0,016
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,958	0,146	1,518	0,028
<i>Periconia minutissima</i>	0,505	0,108	0,963	0,192
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	0,003	0,001	0,009	0,001
<i>Phialocephala sp.</i>	0,014	0,002	0,040	0,029
<i>Sporormia fimetaria</i>	-	-	1,954	0,135
<i>Stachybotrys chartarum</i>	0,533	0,046	0,386	0,018
<i>Talaromyces stipitatus</i>	0,113	0,009	0,147	0,019
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	0,098	0,006	0,123	0,005
<i>Verticillium albo-atrum</i>	0,592	0,044	0,751	0,008
<i>Westerdikella dispersa</i>	1,925	0,172	2,239	0,338

Pérdida de peso

Los cultivos sólidos húmedos se pesaron al inicio de la incubación y luego de 15 días. Se calculó la pérdida de peso porcentual de cada cultivo utilizando los valores promedio de peso inicial y final de las tres réplicas como se indica en la **tabla 24**.

La alta producción de queratinasas en *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Neurospora tetrasperma* y *Westerdikella dispersa*, se correlacionó con un mayor crecimiento macroscópico y una mayor pérdida de peso, tanto en medio RP como HS (sin embargo en *Metarrhizium anisopliae* presentó la mayor actividad queratinolítica).

Tabla 24. Pesos iniciales y finales promedio de los cultivos de residuo pelo (RP) y porcentaje de pérdida de peso calculada.

Especies	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Porcentaje de pérdida de peso
<i>Acremonium murorum</i>	13,22	12,03	9,0015
<i>Acremonium cerealis</i>	14,06	13,02	7,3969
<i>Acremonium killiense</i>	10,03	9,25	7,7767
<i>Acremonium sp.1</i>	11,54	10,83	6,1525
<i>Acrostalagmus luteo-albus</i>	8,43	8,42	0,1186
<i>Aspergillus niger</i>	9,81	8,02	18,2467
<i>Aspergillus sidowii</i>	10,83	10,28	5,0785
<i>Aspergillus terreus</i>	11,1	10,03	9,6396
<i>Aspergillus terreus (2)</i>	9,3	9,28	0,2151
<i>Aspergillus ustus</i>	8,84	8,72	1,3575
<i>Chrysosporium sp.</i>	15,33	11,5	24,9837
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	11,5	9,62	16,3478
<i>Clonostachys rosea</i>	12,22	12,03	1,5548
<i>Cylinprocarpon didymun</i>	8,5	8,11	4,5882
<i>Cylinprocarpon olidum</i>	8,57	8,04	6,1844
<i>Doratomyces stemonitis</i>	9,32	9,23	0,9657
<i>Fusarium oxysporum</i>	10,23	9,58	6,3539
<i>Fusarium semitectum</i>	10,01	10,0	0,0999
<i>Fusarium solani</i>	9,34	9,02	3,4261
<i>Humicola grisea</i>	10,2	9,99	2,0588
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	14,05	10,28	26,8327

<i>Neurospora tetrasperma</i>	13,08	11,31	13,5321
<i>Paecilomyces lilacinus (pelo)</i>	11,51	11,2	2,6933
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	8,12	7,4	8,8670
<i>Periconia minutissima</i>	9,05	8,84	2,3204
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	9,25	8,75	5,4054
<i>Phialocephala sp.</i>	11,23	11,09	1,2467
<i>Sporormia fimetaria</i>	np	np	np
<i>Stachybotrys chartarum</i>	9,62	9,55	0,7277
<i>Talaromyces stipitatus</i>	11,51	11,03	4,1703
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	10,66	10,46	1,8762
<i>Verticillium albo-atrum</i>	8,09	8,02	0,8653
<i>Westerdikella dispersa</i>	11,21	9,43	15,8787

Actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa

En la figura se muestra el test en placa empleado inicialmente para el screening de las actividades ramnosidasa y glucosidasa (**figura 29**)

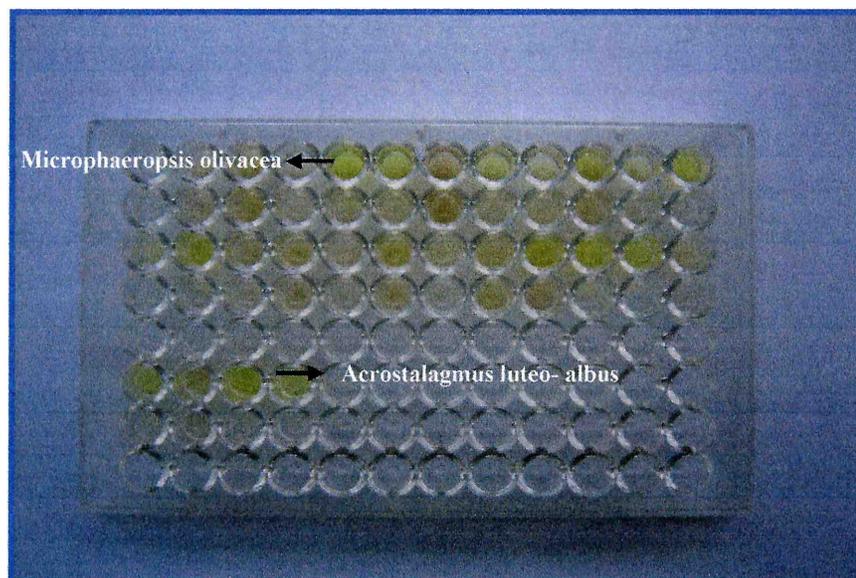


Figura 29. Foto de placa microtiter luego de 24 hs de incubación de los extractos fúngicos frente a los sustratos cromogénicos

En la **tabla 25** se muestran las habilidades de las diferentes especies fúngicas para producir enzimas α -ramnosidasa y β -glucosidasa alcalinas en cultivo líquido (HS).

De las 74 especies probadas 28 mostraron actividad α -ramnosidasa positivo y 24 mostraron β -glucosidasas positivo frente al sustrato cromogénico.

La mayoría de los cultivos presentaron actividad α -ramnosidasa en 7 días de incubación, excepto *Chrysosporium* sp., *Clonostachys rosea*, *Fusarium equisetii*, *Gongronella butleri*, *Neosartorya stramenia* y *Trichoderma saturnisporum* en los cuales se detectó a partir del día 15 de incubación.

Los valores de pH del medio líquido al final de la incubación variaron considerablemente en muchos de los cultivos. En el caso de *Aspergillus niger*, *Drechslera halodes* y *Myrothecium cinctum* el pH se acidificó durante el proceso. El resto de los cultivos evidenciaron pH neutros y alcalinos al final de la incubación.

Tabla 25. Estimación de las actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa alcalinas en cultivo líquido (HS).
+ actividad positiva; - actividad no detectada en las condiciones de cultivo utilizadas.

ESPECIES	Actividad α -ramnosidasa		β -glucosidasas	pH
	muestra 7 días	15 días	15 días	15 días
<i>Absidia spinosa</i>	-	-	-	7,6
<i>Acremonium cerealis</i>	+	+	-	9,06
<i>Acremonium kiliense</i>	-	-	-	8,2
<i>Acremonium murorum</i>	+	+	-	8,8
<i>Acremonium Sp1 Blanco</i>	-	-	-	9,04
<i>Acrostalagmus luteo- albus</i>	+	+	+	9,26
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	+	8,79
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	-	5,4
<i>Aspergillus sidowii</i>	-	-	+++	8,86
<i>Aspergillus terreus</i> (2)	+	+	++	7,7
<i>Aspergillus terreus</i>	-	-	-	7,84
<i>Aspergillus ustus</i>	+	+	+++	8,8
<i>Bipolaris cynodontis</i> (Distichlis)	-	-	+	8,98
<i>Bipolaris ellisii</i>	-	-	+++	7,2
<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Distichlis)	-	-	-	9,43
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	+	+	-	9,19
<i>Chaetomium globosum</i>	-	-	++	8,5
<i>Chrysosporium sp.</i>	-	+	-	7,44
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+	+	+++	8,73
<i>Cladosporium herbarum</i> (Distichlis)	-	-	++	9
<i>Clonostachys rosea</i>	-	+	-	8,73
<i>Cunninghamella elegans</i>	-	-	-	9,14
<i>Curvularia lunata</i>	-	-	-	8,74
<i>Curvularia protuberata</i> (Distichlis)	-	-	+	9,18
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	+	+	-	9,23
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	+	+	-	9,2
<i>Cylindrocarpon lucidum</i>	-	-	-	9,34
<i>Doratomyces stemonitis</i>	-	-	-	8,66
<i>Drechslera ravenelli</i>	-	-	-	8,8
<i>Drechslera halodes</i> (Distichlis)	-	-	-	6,2
<i>Emericellopsis minima</i>	-	-	++	9,18
<i>Epicoccum nigrum</i>	-	-	++	8,2
<i>Exserohillum rostratum</i> (Distichlis)	-	-	-	8,3
<i>Fusarium equisetii</i>	-	+	++	9,46
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	9,1
<i>Fusarium semitectum</i>	-	-	-	9,2
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	7,9
<i>Fusarium sp</i>	-	-	-	8,3
<i>Gongronella butleri</i>	-	+	-	9,45
<i>Humicola grisea</i>	-	-	-	8,2
<i>Melanosora zamiae</i>	-	-	-	8,1
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	+	+	-	8,5
<i>Mic. Dem. Esteril 1</i>	-	-	+++	9,12

<i>Microphaeropsis olivacea</i>	+	+	-	9,06
<i>Myrothecium cinctum</i>	-	-	-	5,9
<i>Neosartorya stramenia</i>	-	+	-	8,94
<i>Neosartorya o Eupenicillium</i>	-	-	-	8,94
<i>Neurospora tetrasperma</i>	-	-	-	8,1
<i>Nigrospora sphaerica (Distichlis)</i>	-	-	++	8,12
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	+	+	-	9,03
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	+	+	-	8,23
<i>Penicillium chrysogenum</i>	-	-	-	7,56
<i>Penicillium retriectum</i>	-	-	-	9,1
<i>Penicillium thomii</i>	+	+	-	7,9
<i>Periconia minutissima (Distichlis)</i>	+	+	++++	9,2
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	+	+	+	8,9
<i>Phialocephala</i>	+	+	+	7,2
<i>Phialophora fastigiata</i>	-	-	++	8,2
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	++++	9,22
<i>Sporormia fimetaria (Distichlis)</i>	+	+	-	9,18
<i>Sporormia sp (Distichlis)</i>	-	-	-	9,07
<i>Stachybotrys elegans</i>	-	-	-	9,1
<i>Stachybotrys chartarum</i>	+	+	-	9,1
<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>	-	-	-	7,13
<i>Talaromyces stipitatus</i>	-	-	+++	8,96
<i>Talaromyces trachyspermus</i>	-	-	-	8,2
<i>Trichoderma harzianum</i>	-	-	-	8,3
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	-	+	-	8,33
<i>Verticillium albo- atrum</i>	-	-	-	8,44
<i>Verticillium nigrescens</i>	-	-	+++	8,96
<i>Volutella cilliata</i>	-	-	-	9,36
<i>Wardomyces inflatus</i>	+	+	-	8,81
<i>Westerdikella dispersa</i>	+	+	+	9,1
<i>Zigorhinchus moelleri</i>	-	-	-	9,26

Luego del primer screening se realizaron cultivos en HS conteniendo naringina para potenciar la producción de ramnosidasa, ya que estas enzimas suelen ser inducibles. En la **tabla 26** se muestran los valores de actividad enzimática en los medios con y sin naringina.

Tabla 26. Determinación de actividades de α -ramosidasas y β -glucosidasas por absorbancia a 405 nm de las especies fúngicas aisladas de suelo y de *Distichlis* en cultivos HS con y sin naringina, *Los extractos de cultivo fueron concentrados 10 X por liofilización sin pasar por columna PD10.

Especie	+ naringina			- naringina		
	pH	Actividad (mU/ml)		pH	Actividad (mU/ml)	
		α -Ram	β -Glu		α -Ram	β -Glu
<i>Acremonium cerealis</i>	9,24	14,2343	1,5599	9,02	3,0342	0,0180
<i>Acremonium murorum</i>	9,37	15,4639	0,2492	9,15	15,0089	7,1825
<i>Acrostalagmus luteo- albus</i>	9,35	14,1262	19,0221	8,78	0,9263	13,4956
<i>Aspergillus niger</i>	7,21	24,4420	4,5041	8,4	26,5589	0,3153
<i>Aspergillus terreus</i>	9,51	15,4939	21,1315	9,12	6,3207	16,3632
<i>Aspergillus ustus</i>	9,09	5,2382	15,1216	8,85	1,7851	15,0480
<i>Chrysosporium sp.</i>	8,98	9,3309	27,6909	8,2	4,8223	15,6756
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	9,38	29,1352	33,6093	9,15	6,9783	21,8747
<i>Clonostachys rosea</i>	7,3	4,4065	0,7282	8,6	3,8585	7,2846
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	9,39	4,7202	12,6444	8,87	0,6726	1,0840
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	9,43	15,3798	16,3167	9,09	8,4226	13,4116
<i>Fusarium equisetii</i>	9,24	12,4117	18,6558	9,12	0,9759	13,9776
<i>Gongronella butleri</i>	8,32	9,0126	15,0586	9,15	2,1379	14,1307
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	7,51	0,9909	4,5041	7,2	2,1469	0,0991
<i>Microphaeropsis olivacea</i>	9,1	29,5166	30,0420	6	14,0091	27,8501
<i>Neosartorya stramenia</i>	9,2	12,4612	27,4387	8,21	1,5044	16,1726
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	9,03	11,4403	0,0045	9,23	11,1806	0,0045
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	9,26	27,0213	2,4712	9,08	14,9940	0,0165
<i>Penicillium thomii</i>	9,04	9,6702	15,9203	9	1,5014	10,1672
<i>Periconia minutissima (Distichlys)</i>	8,81	12,0408	27,6624	8,2	1,7506	15,0390
<i>Phialocephala</i>	9,68	15,5825	1,7851	9,15	26,4748	2,0508
<i>Sporormia fimetaria (Distichlys)</i>	9,62	26,1055	13,8304	9,14	15,1111	1,2536
<i>Stachybotrys chartarum</i>	8,84	19,0762	4,2789	8,18	10,2993	0,2642
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	9,23	0,6321	6,9377	8,46	0,0330	0,4954
<i>Wardomyces inflatus</i>	9,33	15,8783	12,6939	9,11	12,5543	0,0180

Para los cultivos con naringina como inductor se observaron valores de mU/ml mayores que para los cultivos sin naringina, excepto *P. lilacinus* y *A. niger* que presentaron la misma actividad en ambos medios.

Las especies que mostraron mayor actividad ramnosidasa en condiciones inducidas fueron *Aspergillus niger*; *A. terreus*; *Cladosporium cladosporioides*;

Cylindrocarpon olidum; *Microphaeropsis olivacea*; *Paecilomyces lilacinus*
Phialocephala sp.; *Sporormia fimetaria*; *Wardomyces inflatus*; *Stachybotrys*
chartarum; *Acrostalagmus luteo-albus* y *Acremonium murorum*.

La mayoría de las cepas con actividad ramnosidasa alta (en medio con naringina como inductor) presentaron altos valores de actividad β -glucosidasa alcalina, excepto *A. cerealis*, *A. murorum*, *A. niger*, dos cepas de *P. lilacinus* y *Phialocephala* sp donde esta actividad fue baja. La actividad β -glucosidasa alcalina disminuyó en cultivos sin naringina como inductor pero en menor proporción que las actividad α -ramnosidasa alcalina.

Los valores de actividad indicados anteriormente se determinaron en extractos crudos directamente. Algunos de los extractos con mayor actividad α -ram se desalinizaron con una columna PD-10 equilibrada con buffer Tris-HCl 20 mM pH 9.0 y se determinó nuevamente la actividad. Los extractos de *A. murorum*, *A. luteo-albus*, *C. cladosporioides*, *M. olivacea*, *S. chartarum*, *W. inflatus* y *S. fimetaria* mantuvieron los valores de actividad mientras que los extractos de *A. niger*, *A. terreus*, *C. olidum*, *P. lilacinus*, *Phialocephala* sp. perdieron actividad al ser pasados por columna (**tabla 27**). Estos resultados indican que ciertas ramnosidasas son más inestables que otras o bien se adsorbieron a la columna de tamiz molecular durante la desalinización. La primera hipótesis es la mas probable ya que muchas enzimas son estabilizadas por los componentes del medio de cultivo y se desnaturalizan rápidamente cuando de encuentran diluídas en soluciones buffer.

Tabla 27. Actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa medidas a 405 nm de los cultivos en HS con naringina. Pasados por columna PD10. Concentrados 10X por liofilización. Tiempo de incubación 90 min

Especies	mU/ml Gluc	mU/ml Ram
<i>Acremonium cerealis</i>	2,0974	9,6417
<i>Acremonium murorum</i>	2,4322	15,4909
<i>Acrostalagmus luteo- albus</i>	15,9248	21,1630
<i>Aspergillus niger</i>	3,1243	10,6746
<i>Aspergillus terreus</i>	12,3426	10,8698
<i>Aspergillus ustus</i>	24,7137	2,0148
<i>Chrysosporium sp.</i>	18,1994	3,1679
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	18,3615	15,6186
<i>Clonostachys rosea</i>	17,0929	10,0966
<i>Cylindrocarpon didymum</i>	3,9335	0,1832
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	8,6223	3,3405
<i>Fusarium equisetii</i>	11,5829	1,4338
<i>Gongronella butleri</i>	0,6801	4,6482
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	10,4884	4,4710
<i>Microphaeropsis olivacea</i>	29,9099	27,7810
<i>Neosartorya stramenia</i>	23,1613	7,0083
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	0,0315	10,3909
<i>Penicillium thomii</i>	14,9475	3,7128
<i>Periconia minutissima (Distichlis)</i>	12,7540	4,5041
<i>Phialocephala</i>	4,3254	10,7070
<i>Sporormia fimetaria (Distichlis)</i>	1,2536	15,3798
<i>Stachybotrys chartarum</i>	5,9303	20,5790
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	0,4834	0,4669
<i>Wardomyces inflatus</i>	10,1281	10,1822

Dado que la mayoría de las especies fúngicas cultivadas en pasto salado presentaron buen crecimiento en sustrato sólido (hojas de *Distichlis*) y considerando que este pasto es la vegetación natural que crece en suelos alcalino-sódicos, se determinó la presencia o ausencia de actividad α -ramnosidasa y β -glucosidasa para las especies que presentaron actividades positivas en medio de cultivo líquido.

De las 28 especies fúngicas cultivadas en medio sólido (*Distichlis*) a pH 9.0, 17 presentaron actividad α -ramnosidasa y 26 β -glucosidasa (**tabla 28**)

Las especies que presentaron actividad α -ramnosidasa elevada en medio líquido, fueron positivas para la misma actividad en cultivo de *Distichlis*. Las especies con valores bajos de esta actividad en HS fueron negativas en *Distichlis*.

Excepto *Neosartorya stramenia* y *Phialocephala* sp, todas las cepas probadas en *Distichlis* mostraron actividad β -glucosidasa positiva independientemente de su actividad α -ramnosidasa. *M. anisopliae* presentó actividades β -glucosidasa y α -ramnosidasa positivas en cultivos de *Distichlis*, sin embargo dichas actividades fueron muy bajas en los extractos de cultivo líquido HS con y sin naringina.

Tabla 28. Actividad α -ramnosidasa y β -glucosidasa de los extractos del cultivo de las especies fúngicas cultivadas en *Distichlis* sp

Cultivos α -ram + en HS	activ α -ramnosidasa	activ β -glucosidasa
<i>Acremonium cerealis</i>	-	+
<i>Acremonium murorum</i>	++	++
<i>Acrostalagmus luteo- albus</i>	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+
<i>Aspergillus terreus</i>	-	+
<i>Aspergillus ustus</i>	-	+
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	+	+
<i>Chrysosporium</i> sp.	-	+
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	+
<i>Clonostachys rosea</i>	-	+
<i>Cylindrocarpon didymun</i>	+	+
<i>Cylindrocarpon olidum</i>	+	+
<i>Fusarium equisetii</i>	+	+
<i>Gongronella butleri</i>	+	+
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	+	+
<i>Microphaeropsis olivacea</i>	+	+
<i>Neosartorya stramenia</i>	-	-
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	+	++
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	+	++
<i>Penicillium thomii</i>	-	+
<i>Periconia minutissima (Distichlis)</i>	+	+
<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	+	+
<i>Phialocephala</i> sp.	-	-

<i>Sporormia fimetaria (Dstichlis)</i>	+	+
<i>Stachybotrys chartarum</i>	++	++
<i>Trichoderma saturnisporum</i>	-	+
<i>Wardomyces inflatus</i>	+	+
<i>Westerdikella dispersa</i>	-	+

Determinación de la capacidad de hidrólisis de naringina

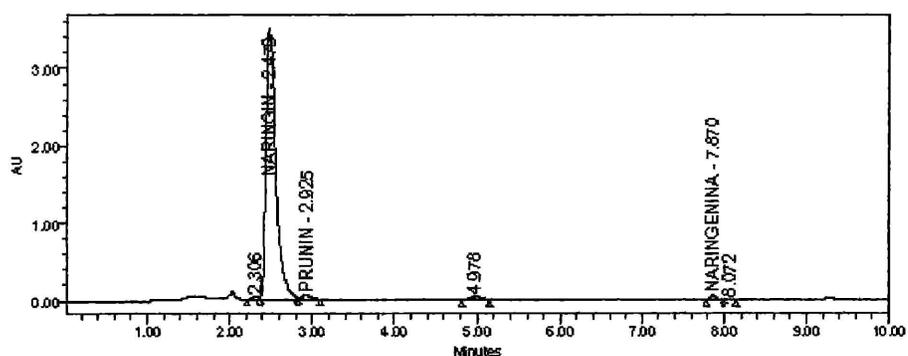
Como se mencionó en la introducción, la naringina es un flavonoide muy abundante en la naturaleza principalmente en frutas y cítricos. La acción de la enzima α -ramnosidasa produce la hidrólisis de la naringina generando productos de reacción de interés en biotecnología de alimentos. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de ciertos hongos para producir enzimas que intervengan en este proceso de hidrólisis.

Para la hidrólisis de naringina se seleccionaron las especies que presentaron mayor actividad α -ramnosidasa en los ensayos con sustratos cromogénicos: *Acremonium murorum*, *Acrostalagmus luteo-albus*, *Microphaeropsis olivacea*, *Paecilomyces lilacinus* y *Stachybotrys chartarum*

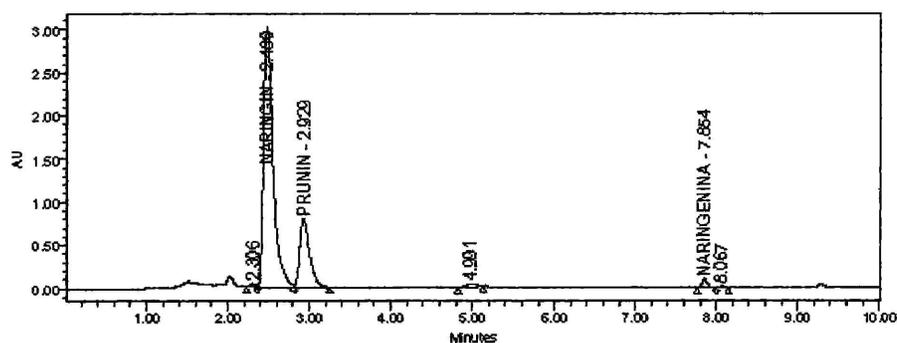
En la **tabla 29** se muestran los valores de concentración de naringina y de sus productos de hidrólisis (prunina y naringenina) luego del análisis con HPLC, en las muestras incubadas por 3 horas con naringina como sustrato. *Acremonium murorum* presentó la mayor actividad sobre el sustrato ya que esta especie fue la que generó mayor liberación de prunina (1,76 g/l) En la **figura 30** se muestra un cromatograma típico de hidrólisis de naringina, en este caso correspondió a la hidrólisis efectuada con la muestra de *A. murorum*.

Tabla 29. Valores de concentración de naringina, prunina y naringenina luego del análisis con HPLC, en las muestras incubadas por 3 horas con naringina como sustrato.

Muestra	[Naringina] (g/l)	[Prunina] (g/l)	[Naringenina] (g/l)
Blanco	10.39	0.20	0.09
<i>A. murorum</i>	8.68	1.76	0.12
<i>A. luteo-albus</i>	9.75	0.42	0.17
<i>M. olivacea</i>	9.66	0.27	0.04
<i>P. lilacinus</i>	9.49	0.52	0.04
<i>S. chartarum</i>	9.54	0.17	0.06



A. Blanco (sin enzima) 3 hs de incubación



B. *Acremonium murorum* 3 hs de incubación

Figura 30. Cromatogramas de hidrólisis de naringina. A. Blanco de reacción. B. extracto enzimático de *A. murorum* proveniente de cultivo HS con naringina.

Purificación parcial de la ramnosidasa de *Acremonium murorum*

La cepa que presentó alta actividad α -ramnosidasa y mayor hidrólisis de la naringina, fue *Acremonium murorum*, por lo tanto se realizó la purificación parcial de esta enzima a partir de los extractos de incubación en medio líquido con naringina. Como se mencionó anteriormente esta actividad fue relativamente estable a la desalinización. Con la muestra desalinizada con PD-10 se realizó una cromatografía de intercambio aniónico con una columna Resource Q. El análisis de las fracciones recolectadas mostró un solo pico de actividad α -ramnosidasa libre de β -glucosidasa en las fracciones 20 y 21 (**figura 31**), lo cual demuestra que ambas actividades son llevadas a cabo por enzimas diferentes.

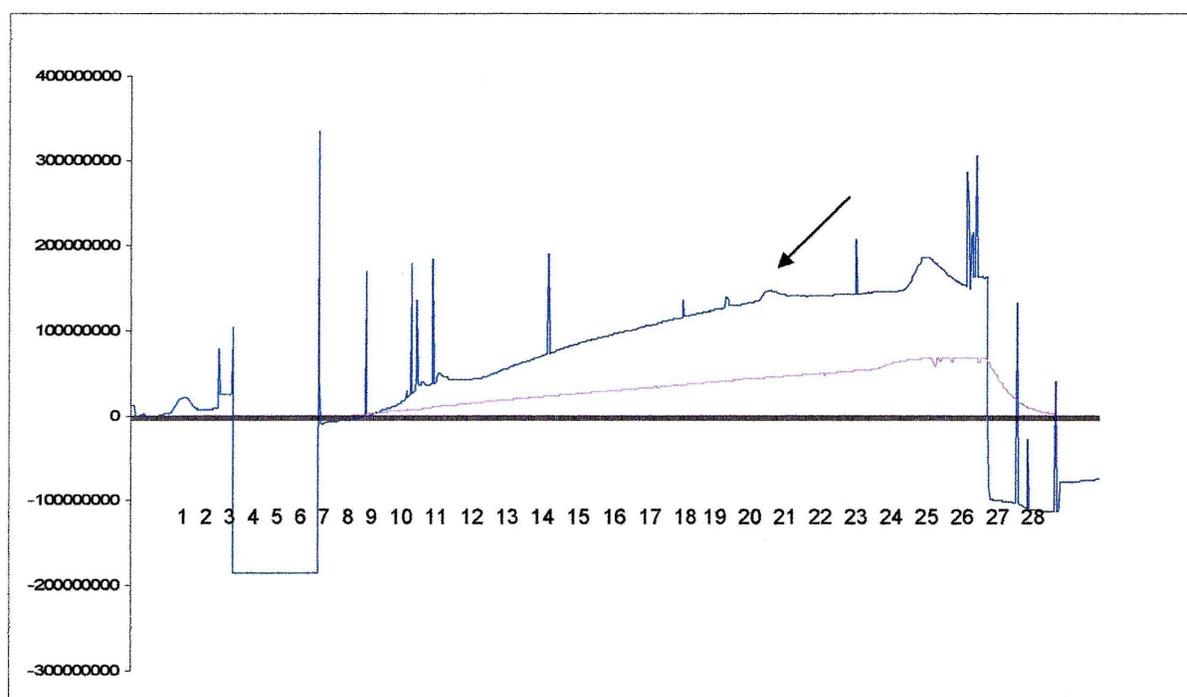


Figura 31. Cromatografía de intercambio aniónico con columna Q Resouse de la muestra de *A murorum*.

Análisis por SDS- PAGE

Las fracciones 20 y 21 de la cromatografía en Resource Q se combinaron y concentraron por liofilización. El análisis por SDS-PAGE de la muestra enzimática mostró la presencia de al menos cuatro bandas de proteína de peso molecular superior a 66 kDa. La elución de estas bandas de un gel paralelo y la medida de actividad indicaron que la proteína con actividad ram tiene un PM aproximado de 90 kDa.

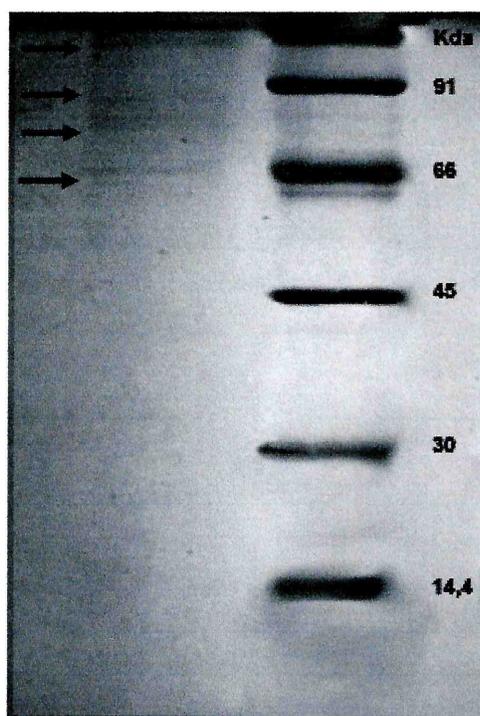
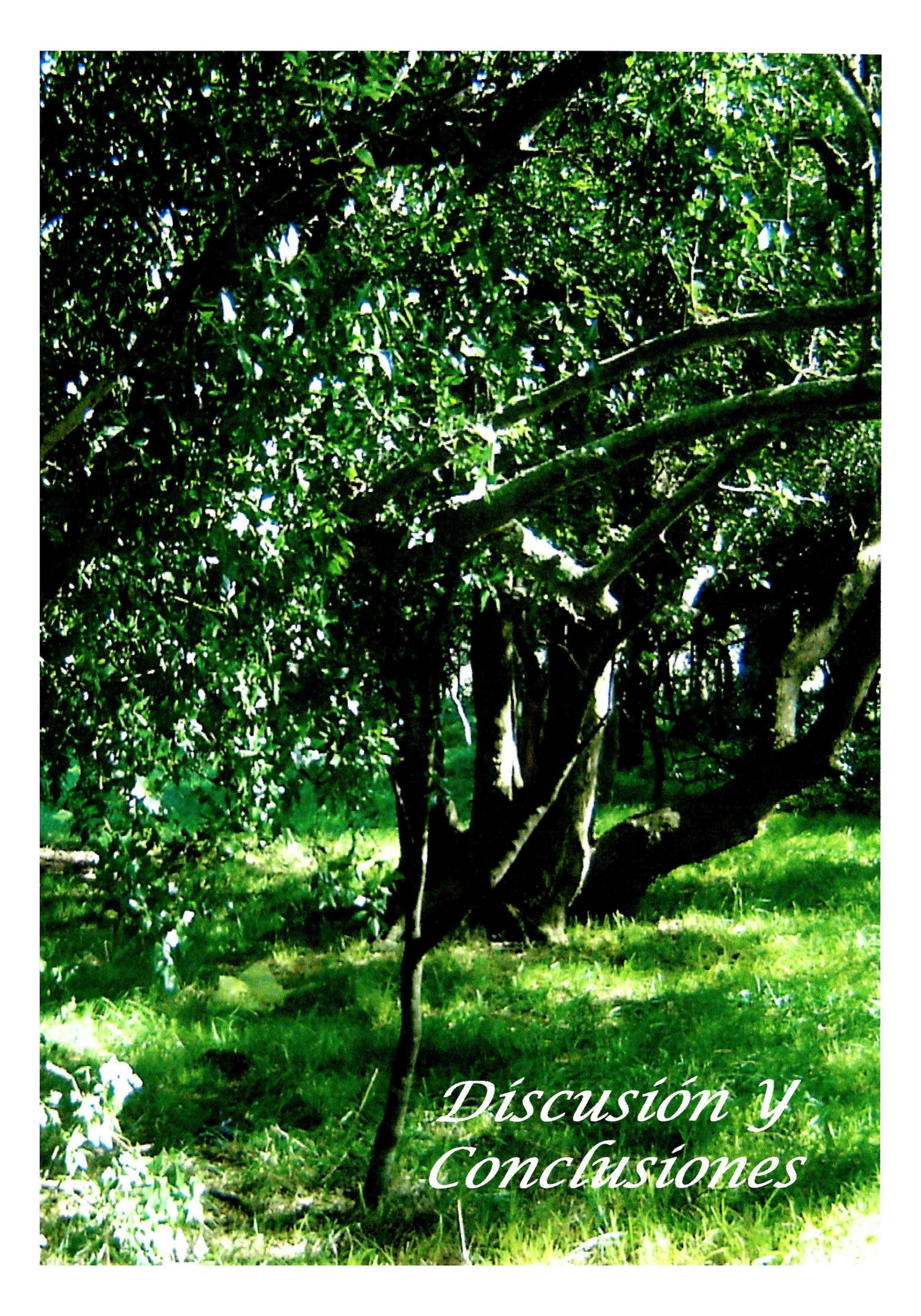


Figura 37. SDS-PAGE: análisis del preparado purificado de α - ramnosidasa alcalina de *A. murorum*. Línea izquierda: bandas de proteína de la muestra analizada. Línea derecha: patrones de proteína de bajo peso molecular (14,4 a 94 Kda)

A photograph of a large, leafy tree in a grassy field. The tree has a thick, dark trunk and many green branches with dense foliage. The ground is covered in green grass, and the background shows more trees and a bright sky. The text "Discusión y Conclusiones" is overlaid in the bottom right corner in a white, italicized font.

*Discusión y
Conclusiones*



Resultados

Discusión

Diversidad de hongos de suelo

En este trabajo se monitorearon estacionalmente (mayo – agosto – octubre 2004 y febrero 2005) las comunidades fúngicas de tres tipos de suelo (Argialbol, Rendol y Natracualf) a dos profundidades (superficie y + de 20 cm). Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias estacionales en la distribución de especies en los distintos suelos estudiados. Treinta y nueve de las especies aisladas están presentes en los tres tipos de suelo estudiados, pero sus patrones de distribución mostraron diferencias en relación al tipo de suelo, y al pH de aislamiento utilizado, observando la presencia de especies típicas de pH alcalinos (*Clonostachys rosea*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium albo-atrum*, y especies de *Acremonium* y *Aspergillus*), especies relacionadas con suelos calcáreos (especies de *Trichoderma* sp.) y especies que sólo fueron aisladas del suelo sódico Natracualf (*Neosartorya stramenia* y *Neurospora tetrasperma*).

Los grupos fúngicos identificados en este trabajo tales como Fungi Imperfecti y Zygomycota son consistentes con los resultados obtenidos previamente para Argentina en suelos de bosque y agroecosistemas (Cabello & Arambarri 2002, Cabello et al. 2003, Eliades et al. 2004). Sin embargo, el número de especies de Ascomycota aislados fue mayor que en otros trabajos realizados en los Rendoles de Magdalena, Argentina (Cabello & Arambarri 2002) y en suelos cálcicos de Grecia (Vardavakis 1990).

Burges (1963) y Visser & Parkinson (1975) señalaron que la distribución de los hongos en el suelo no es homogénea; y que existen numerosos factores

que condicionan el crecimiento y establecimiento de las distintas comunidades fúngicas. Las diferencias en las condiciones físico-químicas del suelo a medida que aumenta la profundidad determinan cambios en estas comunidades fúngicas. Giri et al. (2005) encontró que la distribución específica está regulada por la disponibilidad de materia orgánica y por la relación entre oxígeno y dióxido de carbono presente en los espacios porales del suelo a diferentes profundidades. Las especies fúngicas tolerantes al dióxido de carbono se distribuyen en los horizontes más profundos (Burges & Fenton, 1953). Sin embargo, Nilson et al. (1992) no encontraron cambios considerables en las poblaciones de los horizontes de suelos Podzólicos. Resultados previos obtenidos por Aon & Colaneri, 2001, mostraron que las actividades bioquímicas tienden a ser mayores en las capas superficiales del suelo (0-8 cm.) de acuerdo con la concentración de nutrientes en particular la disponibilidad de oxígeno. Por otra parte los sustratos orgánicos en los diferentes horizontes del suelo se encuentran en distintos estados de descomposición y humificación; entonces el conocimiento de las capacidades de descomposición de las especies fúngicas pueden contribuir al entendimiento del patrón de distribución.

En el presente estudio se observó una disminución significativa de la colonización de partículas sembradas, a medida que aumentó la profundidad. Los resultados obtenidos mostraron que las especies de *Penicillium* y *Trichoderma* son las más representadas en las comunidades fúngicas de los horizontes superficiales del Argialbol y Rendol, dado que los valores de contribución al índice de diversidad de estas especies fueron elevados (**tabla 5**), teniendo en

cuenta que se utilizaron diferentes pH en el medio de aislamiento utilizado como se menciona mas adelante. Por otra parte, las especies de *Acremonium*, *Aspergillus* y *Cladosporium cladosporioides* mostraron mayores frecuencias en los horizontes profundos. Estas tendencias, sin embargo, no se observaron en el Natracualf.

Grishkan & Nevo (2008), en su trabajo acerca de la estructura de las comunidades fúngicas presentes a diferentes profundidades en un suelo de Israel, señalaron que, la diversidad fúngica de suelo muestra variaciones al aumentar la profundidad, y que esto respondería en gran parte a las condiciones del suelo (temperatura, humedad y exposición a la luz). De esta manera concluyen que en los estratos superficiales, más expuestos a la luz, predominan los hongos dematiáceos y a medida que aumenta la profundidad en el perfil del suelo, predominan las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, ya que en los horizontes profundos se encuentran protegidos de la desecación y la luz. En nuestro estudio la distribución de las especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y especies dematiáceas no siguieron ningún patrón específico relacionado con la diferente exposición a la luz, sino que la distribución de estas cepas responderían más a condiciones de pH.

Garret (1951), señaló que muchas especies tienden a disminuir al aumentar la profundidad, pero otras habitualmente son encontradas en horizontes inferiores. La mayoría de los Mucorales están usualmente confinados a los horizontes superficiales, las especies de *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*,

Sagenomella y *Oididendron* comúnmente aparecen a mayor profundidad. Widden & Parkinson (1973).

De todas las especies aisladas, *Fusarium solani* y *F. oxysporum*, especies que han sido reportadas como patógenas de plantas vasculares (Onyike & Nelson, 1993), estuvieron presentes en todos los suelos y horizontes analizados y en todos lo pH de aislamiento. Cabello & Arambarri (2002), Eliades et al. (2004, 2006) obtuvieron resultados similares, en estudios sobre hongos de suelos alcalinos de Argentina encontraron asociaciones fúngicas que representan un patrón que refleja las interacciones entre los microorganismos y la vegetación, conjuntamente con las características del suelo.

En este estudio varias especies de *Penicillium* y *Trichoderma* fueron aisladas a pH ácidos. Las especies de *Penicillium* prefieren valores bajos de pH para su crecimiento (Gams 1992), y es conocida su capacidad para producir metabolitos antibióticos (Domsch et al. 1993), mientras que las especies de *Trichoderma* actúan como antagonistas de ciertos patógenos de plantas cultivables (Ahmad & Baker 1987), y presentan una correlación positiva con el contenido de calcio en suelo (Oyarbide et al. 2001).

Las diferencias específicas que se encontraron al usar diferentes valores de pH en los medios de aislamiento, reveló una respuesta adaptativa de la microbiota, que puede observarse también en su hábitat natural con consecuencias significativas para el ecosistema (Cabello & Arambarri 2002). Además, los cambios en el pH en condiciones naturales puede alterar la distribución de las frecuencias de estas especies (Burges, 1963). Varias especies de *Acremonium*,

Clonostachys rosea y *Paecilomyces lilacinus* fueron aisladas a partir de todos los pH probados pero fueron más abundantes a pH 8.0 y 11.0. *Acremonium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium solani*, *F. semitectum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Doratomyces stemonitis*, *Cylindrocarpon didymum* y *C. olidum*, fueron las especies más abundantes a pH alcalinos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nagai et al. (1995) y Cabello & Arambarri (2002). *Acremonium murorum*, que es una especie alcalofílica (Nagai et al. 1995), presentó las frecuencias más altas con el aumento de pH, y también evidenció un aumento en su frecuencia de aparición con la profundidad en todos los tipos de suelo estudiados. Estos hallazgos son de interés dado que la mayoría de los hongos son dominantes en suelos ácidos debido a que estos ambientes de pH bajos no son propicios para el desarrollo de bacterias o actinomicetes; de esta manera los hongos monopolizan la utilización de los sustratos orgánicos (Bolton et al., 1993). Algunos hongos son capaces también de crecer en suelos de pH neutro o alcalino y algunos pueden tolerar pH superiores a 9.0. En esta tesis especies de *Aspergillus*, tales como *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* y *A. ustus*, mostraron mayores frecuencias de aparición a pH 11.0.

Las especies pertenecientes a Zygomycota, *Absidia spinosa* y *Mortierella* sp., fueron aisladas usualmente a pH 6.0 y 8.0. Sampó et al. (1997) encontró altas frecuencias de Zygomycota en suelos ácidos de Italia. Cabello y Arambarri (2002) observaron en su estudio que las especies de este Phylum fueron aisladas mayormente a partir de medios de cultivo ácidos. Esos resultados se confirmaron en este trabajo, donde se demostró el carácter alcalofóbico de este grupo. De los

suelos estudiados, en el Argialbol y Rendol, la contribución de los Zygomycota fue mayor en los horizontes superficiales. En el Natracualf, los Zygomycota estuvieron poco representados en ambos horizontes excepto *Absidia spinosa*. Esto se debe a que el Natracualf es un suelo salino con valores de pH cercanos a 10.0. Entre los Ascomycota, las especies de *Talaromyces* fueron aisladas hasta pH 8.0 en todos los tipos de suelo; sin embargo, *Neosartorya stramenia* fue aislada a pH 11.0 a partir de muestras del horizonte profundo del Rendol. Eliades et al. (2006) establecieron el carácter alcalofílico de esta especie, y se definieron a las especies de *Talaromyces* como especies alcalino tolerantes.

Para caracterizar las comunidades, las especies se ordenaron de manera decreciente según su contribución al índice de diversidad. Las especies *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Trichoderma koningii*, *F. semitectum*, *T. hamatum*, *Clonostachys rosea*, *T. harzianum*, *Paecilomyces lilacinus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Acremonium murorum*, *Absidia spinosa* caracterizan la micobiota del Argialbol y Rendol. En el Natracualf se observó una micobiota alcalofílica caracterizada por *F. solani*, *F. oxysporum*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium* sp. En este estudio se encontró que los índices de diversidad aparecen como el producto de dos componentes: equitatividad y riqueza de especies, las cuales son muy útiles para caracterizar las comunidades fúngicas. Un incremento en la diversidad implica no sólo un aumento en el número de especies sino también una mayor equitabilidad en sus distribuciones (Frontier & Pichod-Viale, 1995). La caracterización de las comunidades mediante el empleo de la contribución de las diferentes especies fúngicas al

índice de diversidad, es una herramienta muy útil que revela la interacción entre asociaciones fúngicas y propiedades físico-químicas del suelo y con otros microorganismos. Estas interacciones pueden caracterizar funciones muy importantes, tales como mineralización del fósforo, potasio, azufre, nitrógeno y otros iones provenientes de materia orgánica e inorgánica, relacionadas con las características del suelo estudiado. Este hecho es importante no sólo para la producción primaria sino también para el funcionamiento a largo plazo del ecosistema (Doran & Parkin, 1994, 1996).

Los porcentajes de hongos cultivables encontrados en esta investigación, son consistentes con la estimación del 17% de especies conocidas actualmente depositadas en colecciones de cultivos (ceparios) (Hawksworth, 1991). El aislamiento y conservación de las especies fúngicas en bancos de germoplasma, junto con la conservación de los ecosistemas es el único camino efectivo para la conservación de la diversidad.

Diversidad de hongos aislados de *Distichlis*

De la hojarasca de *Distichlis* se aislaron 33 taxa de hongos, 25 utilizando cámara húmeda y 12 de hojas particuladas y lavadas. La mayoría de los hongos identificados son especies reportadas de diferentes tipos de suelo en la misma área de estudio (Cabello & Arambarri 2002, Elíades et al 2004, 2006).

En la micobiota asociada a *Distichlis*, utilizando el método de lavado y particulado de hojas, se observaron altas frecuencias de las especies *Sporormia fimetaria*, *Sporormia* sp. y *Sordaria fimicola*. Estas especies son Ascomycota

coprófilos (Lundqvist 1972, Dissing 1992). Los hongos coprófilos se encuentran adaptados fisiológicamente a una amplia gama de condiciones que deben resistir de manera de explotar nutricionalmente su sustrato (Webster, 1970). Se realizaron varias investigaciones que comparan las comunidades fúngicas provenientes de distintos pastos, capaces de colonizar las heces de diferentes tipos de herbívoros (Angel & Wicklow, 1975, 1983; Wicklow & Angel, 1983).

Existen muy pocos trabajos a cerca de la micobiota asociada a hojas vivas y hojarasca de *Distichlis* (Farr et al. 1989, Torzilli et al. 2006). En el presente estudio se demostró que el número de especies aisladas a partir cámara húmeda, fue mayor que al utilizar el método de lavado de partículas. La característica más relevante de *D. spicata* es su habilidad para colonizar suelos salinos, en donde es utilizado para alimentación de ganado, aportando una importante fuente de proteínas a la dieta. Su sistema radicular le permite a *D. spicata* manejar el stress que se produce por la sequía en verano o por inundación en primavera (Sala et al. 1961).

Enzimas de interés biotecnológico

Los hongos son muy versátiles en cuanto a su capacidad para utilizar una gran variedad de sustratos orgánicos poliméricos ya que poseen la capacidad de producir enzimas extracelulares que degradan estos sustratos en compuestos simples y asimilables. En la determinación de las actividades **proteolítica**, **amilolítica** y **celulolítica** en placa, de las 66 especies probadas en su capacidad para producir proteasas a pH 9.0, el 52% presentó actividad positiva. Estos

resultados concuerdan con Meenakshi (2004) quien determinó que de 27 especies probadas en su capacidad de producir proteasas en placa a pH 9.4, 14 mostraron actividad positiva. De las 60 especies probadas en su capacidad para producir amilasas al mismo pH, el 21% mostró actividad amilolítica, y de las 57 especies probadas para utilizar celulosa el 17% presentó actividad celulolítica a pH 9.0. El screening realizado por Meenakshi (2004) mostró un porcentaje mayor que los obtenidos en este trabajo para la actividad celulolítica en placa a pH alcalinos, quien de 50 especies testeadas obtuvo 13 cepas positivas. Sin embargo cuando esa actividad fue evaluada en cultivos líquidos de las mismas especies, sólo 2 mostraron actividad. Estos porcentajes difieren de los determinados por Söderström (1975) quien aisló 60 especies de hongos de suelo de bosque y los separó por la posibilidad de utilizar diferentes sustratos. Encontró que el 85% de las especies utilizaban proteínas y el 52% celulosa pero a pH neutros. Anagnostakis (1975) señaló que las especies de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Mucor* produjeron proteasas en ensayos en placa a pH 6.0. Resultados similares fueron obtenidos a pH 9.0 en el presente estudio, pero las especies de Zygomycota no evidenciaron ninguna actividad enzimática en placa a pH 9.0, lo cual es consistente con las características bioquímicas ampliamente reportadas para estos hongos, que utilizan sustratos simples para su crecimiento. La actividad amilolítica sin embargo mostró diferencias con el estudio de Anagnostakis (1975) quien observó actividad en las especies de *Fusarium* y no detectó dicha actividad en especies de *Aspergillus*. Las especies de *Fusarium* probadas en nuestro trabajo no produjeron amilasas en las condiciones de cultivo utilizadas y

sin embargo las especies de *Aspergillus* probadas mostraron buena actividad amilolítica a pH 9.0.

En este trabajo se observó que las capacidades enzimáticas de las especies aisladas, variaron entre los diferentes aislamientos, el número de repiques y los medios de cultivo utilizados. Resultados similares fueron mostrados por Domsch & Gams (1969) quienes establecieron que varios aislamientos de la misma especie variaban su capacidad de descomponer diferentes sustratos.

En el screening de la actividad **quitinolítica** en placa el 17 % de las 34 cepas probadas fue capaz de degradar el sustrato cromogénico Kitin Azure. En todos los casos la degradación se evidenció tanto a pH 9.0 como en el control a pH 6.0. Después de la celulosa, la quitina es el segundo compuesto más abundante en la biósfera (Tharanathan & Kittur, 2003). Es el principal compuesto del exoesqueleto de insectos y un componente estructural esencial de la pared celular de hongos filamentosos. En base a datos genómicos se ha podido establecer que las bacterias producen entre 2 a 4 quitinasas, mientras que el genoma fúngico contiene genes que pueden expresar entre 10 y 25 quitinasas diferentes. La razón por la cual los hongos poseen tantas quitinasas no es bien conocido, sin embargo se estudian en la actualidad tres potenciales roles fisiológicos de estas enzimas. Estos incluyen: la degradación de la quitina externa presente en restos de hifas muertas y en restos de exoesqueletos de artrópodos, para la utilización de los productos de degradación como fuente de nutrientes, la remodelación de las células fúngicas durante el crecimiento hifal, ramificación, fusión y autólisis y finalmente competición y defensa contra otros

hongos o artrópodos (Seidl, 2008). El mismo autor señala que existen diversos subgrupos de quitinasas y ciertas especies presentan mayor número de enzimas involucradas en la degradación de quitina que otras.

Entre las especies analizadas en su capacidad para degradar Kitin Azure, encontramos que *Metharrhizium anisopliae* mostró actividad positiva, esta especie ha sido citada como entomopatógena (Freimoser et al., 2005). Seidl (2008) señaló que especies como *Stachybotrys elegans* y *M. anisopliae* expresan quitinasas específicas en presencia de quitina en el medio de cultivo.

Aspergillus niger, *A. terreus*, *Fusarium oxysporum* y *Stachybotrys elegans* no presentaron capacidad de degradar Kitin Azure en cultivo sólido a pH 9.0 y 6.0. Esto no coincide con los estudios realizados por Seidl (2008).

La capacidad de producir enzimas proteolíticas que degradan queratina está ampliamente difundida entre los miembros de la comunidad de hongos de ambientes alcalinos. En este estudio la actividad **queratinolítica** fue positiva para cepas tales como: *Acremonium murorum*, *Acremonium* sp.1, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sidowii*, *Chrysosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Cylindrocarpon didymum*, *Cylindrocarpon olidum*, *Metarrhizium anisopliae*, *Neurospora tetrasperma*, *Paecilomyces lilacinus*, *Periconia minutissima* y *Westerdikella dispersa* poseen alta actividad queratinolítica y podrían ser de interés para el aislamiento de proteasas alcalinas que degraden eficientemente queratina.

La actividad queratinolítica se ensayó sobre sustrato de pelo vacuno desengrasado y medio de cultivo líquido con harina de soja (HS). Ninguna de las

especies probadas mostró diferencias dependientes del medio de cultivo utilizado. En nuestros estudios el cultivo en ambos medios y la determinación de la actividad queratinolítica se realizó a pH 9.0. Los valores de actividad encontrados en especies saprótrofas aisladas de suelo, fueron similares a los obtenidos para *Trichophyton ajelloi*, un dermatofito humano (Galarza et al. 2004, 2002). Merece destacarse que resulta de interés la búsqueda de organismos saprótrofos, no patógenos, productores de estas enzimas en un ambiente donde la alcalinidad sea una condición natural y donde puedan expresar su máximo potencial enzimático. La caracterización del pool enzimático podría ser de interés en tecnología del cuero no sólo para el depilado sino también en otros procesos húmedos (como remojo y rendido) donde cobra importancia una acción proteolítica no colagénica. Al mismo tiempo una desorganización más avanzada de la fibra de queratina, puede acortar los tiempos del compostaje en el proceso de degradación del residuo pelo (Galarza et al. 2002, 2004).

En el estudio de las actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa se probaron 64 especies fúngicas aisladas de partículas de suelo y de hojarasca de *Distichlis*. El 40% presentó actividad α -ramnosidasa y el 29% β -glucosidasa alcalinas a pH 9.0; este hallazgo demuestra que la actividad α -ramnosidasa alcalina se encuentra muy difundida entre los hongos aislados de estos suelos sódicos y cálcicos, como lo determinó Rojas (2004) con aislamientos provenientes de Rendoles de Magdalena obtenidos por Cabello & Arambarri (2002).

En este estudio especies tales como *Acrostalagmus luteo-albus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Microphaeropsis olivacea*, *Sporormia fimetaria*, *Stachybotrys chartarum* y *Paecilomyces lilacinus* presentaron altas actividades α -ramnosidasa y β -glucosidasa alcalinas. *Acremonium murorum* presentó una elevada actividad α -ramnosidasa alcalina. Resultados similares obtuvo Rojas (2004) con *Acrostalagmus luteo-albus*.

Kishi (1955, 1957, 1958, 1959) estudió 96 cepas de hongos y determinó que *Aspergillus niger* fue la cepa que presentó mayor capacidad de degradar naringina a pH ácidos. En nuestro estudio *Aspergillus niger* evidenció actividad α -ramnosidasa a pH 9.0.

El screening de la actividad α -ramnosidasa fue inicialmente realizado con el sustrato cromogénico específico, el *pnp*-Rham. Sin embargo lo importante fue conocer la capacidad de estas enzimas de hidrolizar sustratos naturales que contienen enlaces de α -ramnosa como la naringina, hesperidina o quercetina, entre otros. Como sustrato testigo se utilizó el flavonoide naringina ya que es muy abundante en ciertos cítricos y por lo tanto una fuente relativamente económica de sustrato para la α -ramnosidasa.

. En la acción sobre este sustrato, la α -ramnosidasa hidroliza el enlace α -1,2 entre la ramnosa y la glucosa dando como productos de reacción ramnosa y prunina. En presencia de β -glucosidasa la prunina es luego hidrolizada a glucosa y naringenina (aglicón). Aparentemente existen enzimas que llevan a cabo las dos actividades y se denominan genéricamente como naringinasas (Versteeg et al., 1977). De los tres productos de hidrólisis, la ramnosa es la de mayor valor

comercial ya que es utilizada en procesos de síntesis orgánica para la obtención de compuestos de interés farmacéutico. En este sentido es indeseable la presencia de naringinas ya que la hidrólisis completa de la naringina puede complicar la purificación posterior de la ramnosa y además hidrolizaría la prunina. Considerando esto es que se testeó la capacidad de algunos hongos que mostraron una relativamente alta actividad frente a *pnp*-Ram de hidrolizar naringina. En todos los casos la actividad sobre naringina fue positiva lo cual demuestra que la hidrólisis de *pnp*-Ram es un buen indicador de la presencia de enzimas que hidrolizan los enlaces α -1,2 de ramnosa. De los hongos estudiados resultó interesante *Acremonium murorum* ya que fue la cepa que mostró la mayor actividad en la hidrólisis del flavonoide y a su vez se caracterizó por una muy baja producción de β -glucosidasa lo que sugirió en principio que este hongo no produce naringinas. La purificación parcial de la actividad enzimática por cromatografía de intercambio aniónico mostró que efectivamente este hongo produce una única proteína con actividad α -ramnosidasa libre de actividad β -glucosidasa. Actualmente se está realizando la purificación completa y caracterización de esta enzima que podría ser utilizada convenientemente en la hidrólisis de α -ramnósidos en medios alcalinos.

Cabe señalar que finalmente investigaciones futuras van a determinar cual de las ramnosidasas fúngicas detectadas es la más apropiada para un reactor enzimático de hidrólisis de naringina en medio alcalino. Esto dependerá de varios factores como la estabilidad de la enzima, sus propiedades cinéticas, pH óptimo etc, como así también de la factibilidad de clonar los genes que expresan la

enzima y sobreexpresarlos en algún microorganismo recombinante. Estas mismas consideraciones son extensibles a otras enzimas de interés biotecnológico como las queratinasas o quitinasas.

La detección de actividades enzimáticas alcalinas en gran parte de las cepas aisladas de estos suelos, indica que los hongos aquí presentes evidentemente cuentan con un pool enzimático adecuado para su crecimiento y desarrollo en estos ambientes extremos.

En la siguiente tabla resumen (**tabla 30**) se muestran las actividades enzimáticas determinadas a pH 9.0 de las cepas aisladas tanto en medios sólidos como a partir de extractos de cultivo. Se muestran también el suelo, profundidad y pH de aislamiento de cada una de las especies.

A partir de estos datos se evidencia que algunas especies producen un gran número de enzimas (especies de *Aspergillus* y *Acremonium*, *Westerdikella dispersa*, *Stachybotrys chartarum*) mientras que otras sólo producen pocas enzimas (Zygomycota). Algunas especies producen principalmente enzimas proteolíticas que degradan queratina y caseína, como las especies de *Fusarium*. Se observa también que existe una gran diversidad de hongos alcalinotolerantes en los suelos alcalinos, lo cual coincide con las observaciones de Meenakshi (2004) en suelos alcalinos de Rajasthan, donde las cepas alcalinotolerantes más frecuentes fueron especies de *Scopulariopsis*, *Cephalophora* y *Clonostachys*.

Tabla 30. Resumen de suelo, profundidad y pH de aislamiento de cada una de las especies aisladas y actividades enzimáticas determinadas a pH 9.0 de las cepas en medios sólidos y a partir de extractos de cultivo.

LPS	Especies	Suelos			Horizonte		pH de aislamiento			Actividades enzimáticas a pH 9.0						
		Rendol	Argialbol	Natracaulf	sup.	20cm	pH 6	pH 8	pH 11	α -ram	β -gluc	Queratina	Quitinasa	Amilasa	Proteasa	Celulasa
	<i>FUNGI IMPERFECTI</i>															
928	<i>Acremonium cerealis</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	-	+		+	+	-
958	<i>Acremonium kiliense</i>	X	X		X	X	X	X	X	-	-	+		+	+	-
927	<i>Acremonium murorum</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	-	+	+		+	-
sn	<i>Acremonium rutilum</i>				X	X	X	X	X					-	-	-
sn	<i>Acremonium sp. 1</i>	X	X		X	X	X	X	X	-	-	+		-	-	-
sn	<i>Acremonium sp. 2</i>	X	X			X	X	X	X					-	+	-
427	<i>Acrostalagmus luteo-almus</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	+	+	-	-	+	-
sn	<i>Alternaria alternata</i>					X		X	X	-	+			-		-
845	<i>Aspergillus niger</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	-	+		+	+	+
931	<i>Aspergillus sidowii</i>	X	X		X	X	X	X	X	-	+	+		+	+	+
sn	<i>Aspergillus terreus</i>	X	X		X	X	X	X	X	-	-	+	-	+	+	+
994	<i>Aspergillus terreus</i>				X		X		X	+	+	+		+	+	+
981	<i>Aspergillus ustus</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	+	+		-		-
995	<i>Bipolaris cynodontis</i>				X		X	X	X	-	+					
959	<i>Bipolaris ellisii</i>				X		X			-	+					
1000	<i>Bipolaris sorokiniana</i>				X		X	X	X	-	-					
sn	<i>Chloridium virescens</i>	X			X	X										
sn	<i>Chrysosporium aff. xerophilum</i>	X	X		X	X	X	X	X					+	+	-
951	<i>Chrysosporium sp.</i>	X				X		X	X	+	-	+		+	+	-
953	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	+	+		-	-	-
949	<i>Cladosporium herbarum</i>	X	X		X	X	X	X	X	-	+					
930	<i>Clonostachys rosea</i>	X	X		X	X	X	X	X	+	-	+		-	-	-
sn	<i>Clonostachys sp.</i>	X			X			X	X					-		-
934	<i>Curvularia lanata</i>				X		X	X	X	-	-					
975	<i>Curvularia protuberata Distichlis</i>				X		X	X	X	-	+					

ASCOMYCOTA													
950	<i>Chaetomium globosum</i>												
833	<i>Neosartorya stramenia</i>			X									
sn	<i>Neosartorya sp.</i>	X				X							
837	<i>Neurospora tetrasperma</i>				X								
339	<i>Sporormia fimetaria</i>				X								
sn	<i>Sporormia sp.</i>				X								
838	<i>Talaromyces flavus var. flavus</i>	X			X								
835	<i>Talaromyces stipitatus</i>	X			X								
sn	<i>Talaromyces sp.</i>	X			X								
sn	<i>Thielavia heterotallica</i>	X			X								
830	<i>Westerdikella dispersa</i>				X								
sn	<i>Ascomycete no identificado</i>												
MYCELIA STERILIA													
989	<i>Micelio dematiáceo estéril 1</i>	X			X								
sn	<i>Micelio dematiáceo estéril 2</i>	X			X								

Las actividades amilolítica, celulolítica, proteolítica y quitinolítica se determinaron en cultivos sólidos. Las actividades α -ramnosidasa, β -glucosidasa se determinaron en extractos de cultivo líquido HS y la actividad queratinolítica en extractos de cultivo sólido (RP) y líquido (HS). Las medidas se realizaron sobre extractos concentrados 10 X por liofilización. Las especies marcadas con color corresponden a cepas aisladas de *Distichlis*.

CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES

- Diferentes especies fúngicas son capaces de crecer en los suelos alcalinos (calcáreos y sódicos) en el área de los bosques de tala y coronillo del Partido de Magdalena. Estas cepas pueden crecer a pH tan elevados como 9.0 y 11.0. Se concluye que existe una microbiota alcalofílica y alcalino-tolerante asociada a esos suelos, por lo que se acepta la primera hipótesis planteada.
- La composición de especies en las muestras de los tres tipos de suelo analizadas no presentó variaciones estacionales (rechazándose en parte la segunda hipótesis planteada). Sin embargo, se observaron variaciones en la composición específica y en el número de especies observadas dependiendo del tipo de suelo y de la profundidad de la muestra, aceptándose parcialmente la segunda hipótesis.
- Las frecuencias de las diferentes especies fúngicas aisladas y la diversidad observada que caracteriza a las comunidades en los suelos alcalinos, estuvo condicionada por el pH del suelo. Se acepta la tercer hipótesis.
- Las cepas fúngicas aisladas a partir de los tres tipos de suelo presentaron capacidad de **producir** proteasas, amilasas, celulasas, queratinasas, quitinasas, α -ramnosidasas y β -glucosidasas en

medios de cultivo a pH elevados siendo activas en condiciones de elevada alcalinidad. Se acepta la cuarta hipótesis planteada.

- Los suelos alcalinos son fuente de microorganismos con capacidades enzimáticas de potencial utilización en la industria. Entre las cepas aisladas de suelos alcalinos *Acremonium murorum*, *Acremonium* sp.1, *Aspergillus niger*, *A. sidowii*, *Chrysosporium* sp., *Cladosporium cladosporioides*, *Cylindrocarpon didymum*, *C. olidum*, *Metarrhizium anisopliae*, *Neurospora tetrasperma*, *Paecilomyces lilacinus*, *Periconia minutissima* y *Westerdikella dispersa* presentaron elevada actividad queratinolítica y quitinolítica ambas alcalinas. *Acremonium murorum* fue la cepa con mayor capacidad de producción de α -ramnosidasa alcalina de interés en biotecnología de alimentos. Todas las especies arriba mencionadas poseen actividades enzimáticas a pH alcalinos con potencialidades biotecnológicas. Se acepta la quinta hipótesis.

A photograph of a vast, open landscape. The foreground and middle ground are filled with lush green grass, some taller stalks, and small clumps of vegetation. The horizon is flat, with a few scattered trees and bushes visible against a clear, bright blue sky. The overall scene is bright and open.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

AEBERHARD, R. 2000. Determinación de las isothermas de sorción de materiales constructivos porosos e higroscópicos (madera). Grupo de Investigación de Energías Renovables (GIDER). Departamento de Termodinámica. Facultad de Ingeniería. UNNE.

AHMAD, J. S. & BAKER, R. 1987. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189

ALEXANDER, M. 1977. Introduction to soil microbiology. Eds. John Wiley & Sons. New York. 467 pp

ANGEL, K. & WICKLOW, D. T. 1975. Relationships between coprophilous fungi and fecal substrates in a Colorado grassland. *Mycologia* 67: 63-74

ANGEL, K. & WICKLOW, D. T. 1983. Coprophilous fungal communities in semi-arid to mesic grasslands. *Canadian Journal of Botany* 61: 594-602

AON, M. A. & COLANERI, A. C. 2001. II. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 18: 255-270

ARTURI, M. 1997. Regeneración de *Celtis tala* en el Noreste de la Provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

AUSTIN, P., BRINE, C., CASTLE, J. & ZIKAKIS, J. 1981. Chitin: new facets of research. *Science* 212: 749-753

BARBAGALLO, J. 1983. Las áreas anegables de La Pampa Deprimida en planteo agrohidrológico para su solución. Actas: *Coloquio Internacional sobre hidrología de Grandes Llanuras*, Olavarría. 787-827

BATTLE, E. H. & BARTLET, E. J. 1966. A convenient pH-gradient method for the determination of the maximum and minimum pH for microbial growth. *Antonie van Leeuwenhoek* 32: 245- 255

BILLS, F. G., CHRISTENSEN, M., POWELL, M. & THORN, G. 2004. Saprobic soil fungi. En: Muller, G. M., Bills, F. G. & Foster M. S. (eds) *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic press, San Diego. Cap 13. 271-302

BISBY, G. R., JAMES, N. & TIMONIN, L. 1933. Fungi isolated from Manitoba soil by the plate method. *Canadian Journal Research* 8: 253-275

BISBY, G. R., JAMES, N. & TIMONIN, L. 1935. Fungi isolated from soil profiles in Manitoba. *Canadian Journal Research* 13: 47-65

BOGOEV, V. M., KENAROVA, A. E., VASILEV, V. L. & GYOSHEVA, M. M. 2002. Quantitative Distribution of Microbial Biomass in the Soil Profile of a High-Mountain Grassy Ecosystem. *Folia Microbiologica* 47: 56-60

BOLTON, H. JR., FREDRIKSON, J. K. & ELLIOT, L. E. 1993. Microbiology of the rhizosphere. En: Metting, F. B. Jr (ed). *Soil microbial ecology*. Marcel Dekker, New York : 27-63.

BONANTS, P., FITTERS, P., THIJS, H., DEN BENDER, E., WAALWIJK, C., & HENFLING, J. 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. *Microbiology* 141: 775-784.

BURGES, A. 1963. Some problems in soil microbiology. *Transactions of British Mycological Society* .46: 1-14

BURGES, A. & FENTON, E. 1953. The effect of carbon dioxide on the growth of certain soil fungi *Transactions of British Mycological Society* 36: 104

BURGOS, J. J. 1968. El clima de la provincia de Buenos Aires en relación con la vegetación natural y el suelo. En: Cabrera, A. L. (ed.). Flora de la provincia de Buenos Aires, INTA, Colección Científica, 4 (1): 33-99

CABELLO, M. N. & ARAMBARRI, A. M. 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiological Research* 157:115-125

CABELLO, M. N., AON, M. A. & VELÁZQUEZ, M. S. 2003. Diversity, structure, and evolution of fungal communities in soils under different agricultural management practices. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38: 225-232.

CABRERA, A. L. & WILLINK, A. 1980. Biogeografía de América Latina. Washington DC, USA. 117 Pp

CALVARANO, M., PASTORINO, E., GIONFRIDO, F., CALVARANO, I. & BOVALO, F. 1996. Naringin extraction from exhausted bergamot peels. *Perfum Flavor*. 21: 1-4

CARDENAS, G., ORLANDO, P. & EDELIO, T. 2001. Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. *International Journal of Biology Macromolecular* 28: 167- 174

CAVALLOTTO, J. L. 1995. Evolución geomorfológica de la llanura costera ubicada en el margen sur del Río de La Plata. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de la Plata, 635-237

CHEETHAM, P. S. & MEAKINS, S. E. 1989. Glycoside Hydrolysis. *Europe Pathology* 31703689.05.24

CHRISTENSEN, M. 1981. Species diversity and dominance in fungal communities. En: Wicklow, D. T. & Carroll, G. (eds). *The Fungal Community* Marcel Dekker, New York, USA: 201-232

DE VRIES, R. P. 2003. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plants cell wall polysaccharide- degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 10-20

DICK, R. P., THOMAS, D. R. & TURCO R. F. 1996. Standardized methods, sampling, and sampling treatments. En: Doran, J. W. & Jones, A. J. (eds). *Methods for assessing soil quality*. Soil Science Society of America. Madison, WI: 107-121

DIGBY, P. G. N. & KEMPTON, R. A. 1987. Multivariate analysis of ecological communities. Eds. Chapman & Hall London press, UK.

DIGHTON, J. 2003. Fungi on Ecosystems Processes. Vol. 17 Chapter 2 27-83. Ed. J. W. Bennet. Marcel Decker. New York. USA

DISSING, H. 1992. Notes on the coprophilous Pyrenomycete *Sporormia fimetaria*. *Persoonia* 14: 389-394.

DOMSCH, H. K. & GAMS, W. 1969. Variability and potential soil fungus population to decompose pectin, xylan and carboxymethyl cellulose. *Soil Biology and Biochemistry* 1: 29-36

DOMSCH, K. H., GAMS, W. & ANDERSON, T. 1993. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching, Germany pp. 859

DOZIE, I. N. S., OKEKE, C. L. & UNEZE, N. C. 1994. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World Journal of Biotechnology* 10: 563-567

DORAN, J. W. & PARKIN, T. B. 1994. Defining and assessing soil quality En: Doran, J. W. (ed). *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment. Science of Society of America*, Special Publication 35. Madison, WI: 3-21

DORAN, J. W. & PARKIN, T. B. 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. En: Doran, J. W. & Jones, A. J. (eds.). *Methods for assessing soil quality*. Soil Science Society of America. Madison, WI: 25-37.

DROZD, N., SHER, A., MAKAROV, V., GALBRAIKH, L., VIKHOREVA, G. & GORBACHIOVA, I. 2001. Comparison of antithrombin activity of the polysulphate chitosan derivatives in vivo and in vitro system. *Thrombosis Research* 102: 445- 455

ELÍADES, L. A., BUCSINSZKY, A. M. & CABELLO, M. N. 2004. Micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante en suelos de bosques xéricos en una localidad de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. *Boletín Micológico* 19: 41-47.

ELÍADES, L. A., CABELLO, M. N., & VOGET, C. E. 2006. Contribution to the study of alkalophilic and álcali-tolerant Ascomycota from Argentina. *Darwiniana* 44 (1): 64- 73

FARR D. F., BILLS G. F., CHAMURIS, G. P. & ROSSMAN A. Y. 1989. Fungi on plants and plant products in the United States. St Paul, APS Press.

FIDALGO, F., DE FRANCESCO, F. O. & PASCUAL, R. 1975. Geología superficial de la llanura bonaerense, Argentina. Relatorio VI Congreso Geol. Arg., Bahía Blanca.

FIERER, N. SCHIMEL, J. P. & HOLDEN, P. A. 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 35: 167-176

FILIPELLO, M. V. 1986. Keratinolytic and keratinophilic fungi of children's sandpits in the city of Turin. *Mycopathology* 94: 163-172

FILIPELLO, M. V. 2000. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. En: Kushwaha, R. K. S. & Guarro, J. (eds.). *Biology of Dermatophytes and other keratinophilic Fungi*. *Revista Iberoamericana de Micología*. Bilbao. 86-92.

FINDLAY, S., TANK, J., DYE, S., VALETT, H. M., MULHOLAND, P. J., DODDS, W., & BOWDER, W. B. 2002. A Cross-system comparison of bacterial and fungal biomass in detritus pools of headwater streams. *Microbial Ecology* 43: 55-66

FLANAGRAN, P. W. 1981. Fungal taxa, physiological groups and biomass: a comparison between ecosystems. En: Carroll, G. & Wicklow, D. T. (eds). *The Fungal Community*. Marcel Dekker. New York. USA 169-183

FREIMOSER, F. H., HU, G. & ST LEGER, R. J. 2005. Variation in gene expression patterns as the insect pathogen *Metharhizium anisopliae* adapts to

different host cuticule or nutrient deprivation in vitro. *Microbiology (Read.)* 151: 361-371

FRONTIER, S. & PICHOD-VIALE, D. 1995. Écosystèmes. Structure, fonctionnement, evolution. Masson, Paris: 290-311.

FUNG, K., ZHAO, K., HE, Z. & CHYE, M. 2002. Tobacco- expressed *Brassica juncea* chitinase BjCHII shows antifungal activity in vitro. *Plant Molecular Biology* 50: 283- 294

GADD, G. M. 2004. Mycotransformation of organic and inorganic substrates. *Mycologist* 18: 60-70

GALARZA, B. C., GOYA, L. M., CANTERA, C. S. & REINOSO, H. E. 2002. Biotransformación fúngica del pelo vacuno. Parte I. *Tecnología del Cuero* 47: 19-27.

GALARZA, B. C., GOYA, L. M., CANTERA, C. S., REINOSO, H. E. & LOPEZ, L. M. I. 2004. Fungal transformation of bovine hair. Part 1: Isolation of fungus with keratinolytic activity. *JSLTC* 88 n° 3, 93-98.

GAMS, W. 1992. The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi. En: Winterhoff, W. (ed.). *Fungi in vegetation science*. Kluwer Academic publishers. London. pp 184.

GAMS, W. & DOMSCH, K. H. 1967. Beiträge zur Anuendung der Bondenwaschtechnik für die Isolierung von Bondenpilsen. *Arch. Microbiology* 58: 134-144

GARRET, S. D. 1951. Ecological groups of soil fungi of survey of substrate relationships. *New Phytologist* 50: 149-166.

GASPAR, M. L., CABELLO, M. N., POLLERO, R. J. & AON, M. A. 2001. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. *Current Microbiology* 42: 339-334.

GIRI B., GIANG P. H., KUMARI, R., PRASAD, R. & VARMA, A. 2005. Microbial diversity in soils. En: Buscot F, Varma S. (eds.). *Micro-organisms in soils: roles in genesis and functions*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 195–212

GOCHENAUR, S. E. 1984. Fungi on Long Island oak-birch forest I. Community organization and seasonal occurrence of the opportunistic decomposers of the A horizons. *Mycologia* 70: 975-994

GODDARD, D. R. & MICHAELIS, L. 1934. A study of keratin. *The journal Biological Chemistry* 106: 604-614

GODEAS, A. M. 1983. Estudios cuali-cuantitativos de los hongos de suelo de *Nothofagus dombeyi*. *Ciencia del Suelo* 1, 21- 31

GOYA, J. F., PLACÍ, G., ARTURI, M. F. & BROWN, A. D. 1992. Distribución y Características estructurales de los talares de la Reserva de Biosfera Parque Costero Sur. *Revista de la Facultad de Agronomía* 68: 53-64

GRISHKAN, I. & NEVO, E. 2008. Vertical divergence of microfungal communities in soil profiles of “Evolution Canyon” I, Lower Nahal Oren, Mount Carmel, Israel. *Plant Biosystems, Giornale Botanico Italiano*. 142 (1): 51-58

GUTCHO, S. J. 1974. *Microbial Enzyme Production*. Park Ridge, New Jersey: Notes Data Corporation pp. 172-173

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S. L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607

HANSEN, D. J., DAYANANDAN, P., KAUFMAN, P. B. & BROTHERSON, J. D. 1976. Ecological adaptation of salt marsh grass and environmental factors affecting its growth and distribution. *American Journal of Botany* 63: 635-650.

HARBORNE, J. B. 1991. Flavonoid pigments in herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Eds. Rosenthal, G. A. & Berenbaum, M. R. Academic Press, Inc

HAWKSWORTH, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research* 95: 641-655

HAWKSWORTH, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 105: 1422-1432

HILTNER, L. 1904. Über neuere Erfahrungen un Probleme auf dem Gebiet der Bondenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb. dt. Landw. Ges.* 98: 59- 78

HOLDRIDGE, L. 1978. Ecología basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. Pp 216.

HOWARD, M., EKBORG, N., TAYLOR, L., WEINER, R. & HUTCHESON, S. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifyig anzymes. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 30: 627-635

HUBALEK, Z. 2000. Keratinophilic fungi associated with free-living mammals and birds. En: Kushwaha, R. K. S. & Guarro, J. (eds.) *Biology of Dermatophytes and other keratinophilic Fungi*. *Revista Iberoamericana*, Bilbao. 93-103

HURTADO, M., IMBELLONE, P., DUYMOVICH, O., GIMENEZ, J., CAMILLIÓN, M., DA SILVA, M. & PIANTAIDA, F. 1988. *Guía de campo II Jornadas de Suelos de la Región Pampaeana*. 84 Pp

JENSEN, C. N. 1912. Fungus flora of the soil. N. Y. Agri. Exp. Sta. Bull. 315: 414-501.

JOHNSON, L. F. & CURL, E. A. 1972. Methods for research on the ecology of soil -borne plant pathogens. Burges Publ. Co., Minneapolis

KAJI, A. & ICHIMI, T. 1973. α - L-ramnosidasa activity in culture filtrate of *corticium rolfsii* enzymic activity at low pH. *Agricultural Biology and Chemistry* 37: 431-432

KEYHANI, N. & ROSEMAN, S. 1996. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinasa. *Journal of Biology and Chemistry* 271: 33414- 33424

KISHI, K. 1955. Naringinase I. Selection of naringinasa secreting strains. *Science of India* 29: 140- 145

KISHI, K. 1957. Naringinase II. Culture conditions and naringinase formation. *Kagaku to Kôgiô* 31: 328- 333

KISHI, K. 1958. Naringinase III. The soybean constituent effective for the formation of naringinase. *Kagaku to Kôgiô* 32: 389- 392

KISHI, K. 1955. Naringinase IV. End products of enzymic hydrolysis of naringin. *Kagaku to Kôgiô* 33: 185- 187

- KJØLLER, A. & STRUWE, S. 1982. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. *Oikos* 39: 389- 422
- KLADWANG, W., BHUMIRATTANA, A. & HYWEL-JONES, N. 2003. Alkaline-tolerant fungi from Thailand. *Fungal Diversity*. 13:69-84.
- KONEMAN, E. & ROBERTS, G. 1987 Micología. Practica de laboratorio. Editorial Médica Panamericana S.A. Bs. As. ed. tercera. Pp 351
- KUNERT, J. 2000. Physiology of keratinophilic fungi. En: Eds. Kushwaha, R.K.S. & Guarro, J. Biology of Dermatophytes and other keratinophilic Fungi. *Revista Iberoamericana*, Bilbao. 77-85
- LEÓN, J. C., BURKART, S. E. & MOVIA, C. 1979. Relevamiento fitosociológico del pastizal del norte de la Depresión del Salado (Partidos de Magdalena y Brandsen. Provincia de Buenos Aires). INTA. *Serie Fitogeográfica* 17: 1-88.
- LORITO, M., HARMAN, G., HAYES, C., BROADWAY, R., TRONSMO, A., WOO, S. & DI PIETRO, A. 1993. Chitinolytic Enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307
- LUNDQVIST, N. 1972. Nordic Sordariaceae s. lat. *Symbolae Botanicae Upsalienses* 30: 1- 374.
- LYNCH, J. M. & BRAGG, E. 1985. Microorganisms and soil agrégate stability. *Advances in soil Science* 2: 133-171
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. & PARKER, J. 2003. Brock-Biology of Microorganisms. 10º ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, cap.5 17-19

- MAGURRAN, A. E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Croom Helm, London.
- MANGIATERRA, M., GIUSANO, G., DELUCA, G. & ALONSO, J. 2000. Geohongos queratinofilicos en áreas de recreación de jardines de infantes en Rosario (Argentina) *Boletín Micológico*. 15: 101-106
- MARCHAND, S. G., CABRAL, D. & WRIGHT, J. E. 1976. Tres nuevos géneros de hifomicetes de Tierra del Fuego. *Boletín de la Sociada Argentina de Botánica* 17: 63-72
- MARK, N. BIKALES, M., OVERBERGER, C. & MENGES, G. 1988. Eds., Encyclopedia of Polymer Science and Engineering. Vol 2: 286-287.
- MARKHAM, K. R. 1982. Isolation and analytical techniques. En: Techniques of flavonoid identification. London: Academic Press pp. 15-35
- MARSCHNER, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. 2nd Edition. Academic press, London, p 889.
- MARTÍNEZ, E. M. 1999. Estudio ecológico de los hongos del suelo de un bosque de *Pinus taeda*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA
- MEENAKSHI, V. R. 2004. Biodiversity and germoplasm collection of alkalophilic fungi and actinomycetes for biotechnology application. Project Completion Report. National Chemical Laboratory. Pune pp 421
- MUKERJI, K. G. 1965. Ecological studies on the microorganic population of usar soils. *Mycopathology and Mycology Applied*. 29: 339-341.

MULLER, G. M. & BILLS, G. F. 2004. Introduction. En: Muller, G. M., & Bills, Foster M. S. (eds) *Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic press, San Diego, pp 1-4.

MUZZARELLI, R., MATTIOLI- BELMONTE, R., PUGNALONI, A. & BIAGINI, G. 1999. Biochemistry, histology and clinical uses of chitins and chitosans in wound healing, *EXS* 87: 251-264

NAGAI, K., SAKAI, T., RATIATMODJO, R. M., SUZUKI, K., GAMS, W. & OKADA, G. 1995. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali- tolerant soil fungi I. *Mycoscience* 36: 247-256.

NAGAI, K., SUZUKI, K. & OKADA, G. 1998. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali- tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan. *Mycoscience* 39, 293- 298.

NILSSON, M. BÅÅTH, E. & SÖDERSTRÖN, B. 1992. The microfungal communities of a mixed mire in northern Sweden. *Canadian Journal of Botany* 70:272-276

NOMURA, D. 1965. Studies of naringinase produced by *Conothyrium diplodiella*, the properties of naringinase and the removal of co-existing pectinase from the enzyme preparation. *Enzymologia* 29: 3- 5

ONYIKE, N. B. N. & NELSON, P. E. 1993. The distribution of *Fusarium* species in soils planted to millet and sorghum in Loosotho, Nigeria and Zimbabwe. *Mycopathologia* 121: 105-114

OYARBIDE, F., OSTERRIETH, M. L. & CABELLO, M. N. 2001. *Trichoderma koningii* as a biomineralizing fungus agent of calcium oxalate

crystals in typical Argiudolls of the Los Padres Lake natural reserve (Buenos Aires, Argentina) *Microbiological Research* 156: 113-119

PANDEY, R. R., CHATURVEDI, A. P. & DWIVEDI, R. S. 1991. Ecology of microfungi in soil profile of guava orchard with reference to edaphic factors. *Proc. Nat. Acad. Sci. India Sec. B-Biol. Sci.* 61: 97-108

PARKINSON, D. & WILLIAMS, S. T. 1961. A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and Soil* 13: 347-355

PARODI, L. 1940. Distribución geográfica de los talares de la Pcia. de Buenos Aires. *Darwiniana* 4: 33-56.

PINO, J. A. 1997. Los flavonoides presentes en los cítricos. *Alimentaria* Oct: 63-79

PIONTELLI, E. TORO, M. & CASANOVA, D. 1984. Diversity-Dominance and sucesion of fungal communities in sandy soils (A Beach of V region- Chile) on keratinic Substrata. I. *Boletín Micológico.* 2: 73-89.

PUGH, G. J. F. & DICKINSON, C. H. 1965. Studies on fungi in coastal soils. VI. *Gliocladium roseum* Bainier. *Transactions of the British Mycological Society* 48: 279-285.

RAI, J. N., AGARWAL, S. C. & TEWARI, J. P. 1971. Fungal microflora of usar soils of India. *Journal of the Indian Botanical Society* 50: 63-74.

RITZ, K. & YOUNG, I. M. 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist.* Vol 18 part 2: 52-59.

ROITNER, M., SCHALKHAMER, T. H. & PITNER, F. 1984. Characterization of naringinase from *Aspergillus niger*. *Monatsh Chemistry* 115: 1255-1267

ROJAS, N. L. 2004. Hongos alcalofílicos como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico. Tesina de la Licenciatura en Biotecnología. UNQuilmes

ROMERO, C., MANJÓN, A., BASTIDA, J. & IBORRA, J. L. 1985. A method for assaying the rhamnosidase activity of naringinase. *Analytical Biochemistry* 149: 566-571

ROUSEFF, R. L. 1980. Flavonoids and citrus quality. *ACS Symp. Ser.* 143: 83-108

SALA O., SORIANO, A. & PERELMAN, S. 1961. Relaciones hídricas de algunos componentes de un pastizal de la Depresión del Salado. *Revista Facultad de Agronomía UBA* 2: 1-10.

SAMPÓ, S., BERGERO, R., BUFFA, G. & LUPPI-MOSCA, A. M. 1997. Soil fungal communities in a young and an old *Alnus viridis* coenosis. *Mycologia* 89: 837-845.

SÁNCHEZ, R. O., FERRER, J. A., DUYMOVICH, O. A. & HURTADO, M. A. 1976. Estudio pedológico integral de los Partidos de Magdalena y Brandsen (Provincia de Buenos Aires). *Anales del LEMIT, serie II N° 310. Ministerio de Obras Públicas de la Provincia de Buenos Aires.* 1-123.

SAPPA, F. 1955. La micoflora del terreno quasi elemento strutturale delle comunità vegetali: I. Saggi metodologici sul Calluneto di San Francesco al Campo (Torino). *Allonia* 2: 293-345

SCHÜRER, J., CLAROLM, M. & ROSSWOLL, T. 1985. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil biology and Biochemistry* 17: 611- 618

SEIDL, V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42

SHIGEMASA, Y. & MINAMI, S. 1996. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnological Genetics Engineering Reviews* 13: 383- 320

SIMPANYA, M. 2000. Dermatophytes: Their taxonomy, ecology and patogenicity. En Kushwaha, R. K. S. & Guarro, J. (eds.) *Biology of Dermatophytes and other keratinophilic Fungi. Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao. 1-12

SINSABAUGH, R. L., ANTIBUS, R. K., LINKINS, A. E. & MCCLAUGHTERY, C. A. 1993. Wood descomposition: Nitrogen and Phosphorous dynamics in relation to extracellular enzyme activity *Ecology* 74(5): 1586-1593

SMITH, B. J. 1984. SDS polyacrilamide gel electrophoresis of proteins. En: *Methods in molecular Biology*. Eds. Walker, J. M. E. New Jersey Vol 1 41-56.

SMITH, D., KOLKOWSKI, J. 1996. Fungi. En: Hunter-Cevera, J. C. & Belt, A. (Eds). *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. Academic Press, Inc, California 101-132.

SÖDERSTRÖM, B. E. 1975. Vertical distribution of microfungi in a spruce forest soil in the south of Sweden. *Transactions of the British Mycological Society* 65: 419-425

SOMLO, R., DURAÑONA, C. & ORTIZ, R. 1985. Valor nutritivo de especies forrajeras patagónicas. *Revista Argentina de Producción Animal* 5: 590-601.

STENTON, H. 1953. The soil fungi of Wicken Fen. *Transactions of the British Mycological Society* 36: 304-314.

SYLVIA, D. M. 1999. Mycorrhizal Symbiosis. En: Sylvia, D. M., Fuhrmann, C. Hartel, D. & Zuberer, W (eds.). *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, NJ, USA. ISBN 0-13-459991- cap 188: 408-426

TABATABAI, M. A. 1994. Soil Enzymes. En: SSSA, Methods of soil Analysis, Part 2: Microbiological and biochemical Properties (Book series N° 5) 775-833p

TABATABAI, M. A. & SINGH, B. B. 1976. Rhodanese activity of soils. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 40: 381-385

THARANATHAN, R. N. & KITTUR, F. S. 2003. Chitin-the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 61-87

THORNTON, R. H. 1956. Fungi occurring in mixed oakwood and heath soil profiles. *Transactions of the British Mycological Society* 39: 485-494

TIKHONOV, V., LOPEZ-LLORCA, L., SALINAS, J. & JANSSON, H. 2002. Purification and characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology* 35: 67-78.

TING, S. V. 1958. Enzymic hydrolysis of narigin and grapefruit. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 6: 546-549

TORZILLI, A. P., SIKAROODI, M., CHALKLEY, D. & GILLEVET, P. M. 2006. A comparison of fungal communities from four salt marsh plants using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). *Mycologia* 98: 690-698.

TRAPPE, J. M. & LUOMA, D. L. 1992. The ties that Bind: Fungi in Ecosystems. En: Carroll, G. & Wicklow, D. T. (eds). Marcel Dekker *The fungal community*. New York. USA pp 17-27

TRICART, J. L. F. 1973. Geomorfología de La Pampa Deprimida. Bases para los estudios edafológicos y agronómicos. En: Colección Científica del INTA. Buenos Aires, Argentina

TSIGOS, I., MARTINO, A., KAFETZOPOULOS, D. & BOURIOTIS, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18: 305- 312

ULFIG, K. 2000. The occurrence of keratinolytic fungi in waste and wast-contaminated habitats: en Kushwaha, R. K. S. & Guarro, J. (eds.) *Biology of Dermatophytes and other keratinophilic Fungi*. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao. 44-50

ULFIG, K. & KORCZ, M. 1995. Isolation of keratinolytic fungi from a coal mine dump. *Mycopathology* 129: 83- 86

UNGAR, I. 1974. Inland halophytes of the United States. En: Reimold, R. J. & Queen W. H. (eds.). *Ecology of Halophytes*. Academic Press, Inc., New York: 235-305.

VALENCIA CANTERO, E. & PEÑA CABRIALES, J. J. 2001. El suelo y sus habitantes microbianos: consideraciones ecológicas. *Avance y Perspectiva* Vol 20: 401-406.

VARDAVAKIS, E. 1990. Seasonal fluctuations of soil microfungi in correlation with some soil enzyme activities and VA mycorrhizae associated with certain plants of a typical calxicerol soil in Greece. *Mycologia* 82: 715-726.

VARSAVSKY, E. 1962. Aislamiento de *Keratinomyces ajelloi* y *Microsporium gypseum* del suelo de la ciudad de Buenos Aires. *Mycopathology and Mycology Applied* 22: 81-90

VARSAVSKY, E. 1964. Occurrence of keratinophilic human pathogenic fungi in soils of Argentina. *Mycopathology and Mycology Applied*

VARSAVSKY, E. 1965. Contribución al conocimiento de las Gymnoascaceae argentinas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA

VERSTEEG, C., MARTENS, L. J. H., ROMBOUTS, F. M., VORAGEN, A. G. J. & PILNIK, W. 1977. Enzymatic hydrolysis of naringin in grapefruit juice. *Lebensm. Wiss. Technol.* 10: 268-272

VISSER, S & PARKINSON, D 1975. Fungal succession on aspen poplar leaf litter. *Canadian Journal of Botany* 53: 1640-1651.

WAINWRIGHT, M. 1993. Oligotrophic growth of fungi- stress or natural state? En: Jennings, D. H. (eds.). *Stress tolerance of fungi*. Marcel Dekker, New York. 124-144

WAKSMAN, S. A. 1917. Is there any fungus flora of the soil. *Soil Science* 3: 565-589

- WARCUP, J. J. 1950. The soil- plate method. *Nature*, London 170: 166-167.
- WARCUP, J. H. 1951. The ecology of soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 34: 376-399.
- WARCUP, J. H. 1955. On the origin of the fungi developing on soil dilution plates *Transactions of the British Mycological Society* 38: 298-301
- WEBSTER, J. R. 1970. Coprophilous fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 54: 161-180.
- WEBSTER, J. R. & BENFIELD, E. F. 1986. Vascular Plant Breakdown in Freshwater System. *Annales of Reviews of Ecology and Systematics*. 17:567-594
- WEST, L. T., DREES, L. R., WILDING L. P. & RABENHORST, M. C. 1988. Differentiation of pedogenic and lithogenic carbonate forms in Texas. *Geoderma* 43: 271-287.
- WICKLOW, D. T. & ANGEL, K. 1983. Some reproductive characteristics of coprophilous Ascomycetes in three prairie ecosystems. *Mycologia* 75: 1070-1073.
- WIDDEN, P. & PARKINSON, D. 1973. Fungi from coniferous forest soils. *Canadian Journal of Botany* 51: 2275-2290.
- WRIGHT, S. F. & UPADHYAYA, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hiphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97-107

YLITALO, R., LEHTINEN, S., WOLIJOKI, E., YLITALO, P. & LEHTIMAKI, T. 2002. Colesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung* 52: 1-7



Anexos

ANEXO I

Medios de cultivo

Agar extracto de malta(AEM)

10g de extracto de malta en polvo

2,5g de peptona

20g de agar

1000 ml de agua deionizada

pH 6.5

Agar papa glucosado(APG)

250 g de papa

20 g de glucosa

1000 ml de agua deionizada

pH 6.5

Agar corn meal (CMA)

15 g de harina de maíz

20 g de agar

1000 ml de agua deionizada

pH 6.5

Medio líquido harina de soja (HS)

1.5 gr de harina de soja

0.25 gr de triptona

0.05 gr de KCl

0.05 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 ml solución stock de $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

100 ml de H_2O

Solución stock: Ácido cítrico 0.1 gr, $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 gr, H_2O 100 ml.

pH 9.0

Medio mineral mínimo

496 mg de NaH_2PO_4

2486 mg de K_2HPO_4

20 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

16 mg de FeCl

13 mg de Cl_2Zn

Medio salino (MS) (solución stock)

0,25 g de EDTA

0.025 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.05 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.05 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0.005 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.005 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.05 g de H_3BO_3

0.005 g de KI.

100 ml de agua deionizada

Méδιο agarizado actividad amilolítica

0.8% de caldo nutritivo Britania

0.2% de almidón soluble

1000 ml de agua destilada.

Méδιο agarizado actividad celulolítica

0.1 g de extracto de levadura

0.5 g de peptona

16 g de agar

0.5 % de Carboxymetilcelulosa

1000 ml de agua destilada

Méδιο agarizado actividad proteolítica

50 g de leche descremada

10 g de agar

1000 ml de agua destilada

ANEXO II

Soluciones buffer Nagai *et al.* 1985

Composición de las soluciones buffer mmol/100ml

PH final	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃	Na ₂ HPO ₄	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O
11	50.0			
10	27.5	22.5		
9	3.0	47.0		
8			49.0	1.0
7			27.5	22.5
6			5.0	45.0
5				50.0

Buffer 9.0

0.07 g de MgSO₄·7H₂O

0.01 g de CaCl₂·2H₂O

0.22 g de KCl

100 ml de agua deionizada

ANEXO III

Composición química de geles SDS

Gel empaquetador (acrilamida al 4% y bisacrilamida a 10.1%)

0.61 ml de buffer Tris ClH 0.5 M (pH6.8)

0.4 ml de acrilamida (29%) / bisacrilamida (0.8%)

10 µl de persulfato amónico (10%)

5 µl de TEMED (N, N N', N'-tetrametiletilendiamina), 1.6 ml de agua deionizada.

Gel de separación (acrilamida 7.5% y bisacrilamida 0.2%)

3.5 ml de Tris ClH 1.5 M (pH 8.8)

7 ml de acrilamida (30%)/ bisacrilamida (0.8%)

70 µl de persulfato amónico (10%)

7 µl de TEMED, 100 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) 10%

3.5 ml de agua deionizada.

Figuras de las portadas

Portada general: fotografía electrónica (MEB) de fiálides y conidios de *Penicillium sp.* estado imperfecto de *Talaromyces stipitatus*.

Introducción: fotografía del interior de un cordón del bosque de tala.

Objetivos e Hipótesis: Idem

Materiales y Métodos: vista externa de un cordón de tala

Resultados: Idem

Discusión: fotografía de un árbol de tala de la zona de estudio.

Conclusiones y Consideraciones finales: fotografía del interior de un cordón mixto de tala y coronillo.

Bibliografía: fotografía del paisaje de la Antigua Albufera Platense (suelos salinos)

Anexos: fotografía electrónica (MEB) de ascospora de *Neurospora tetrasperma*.