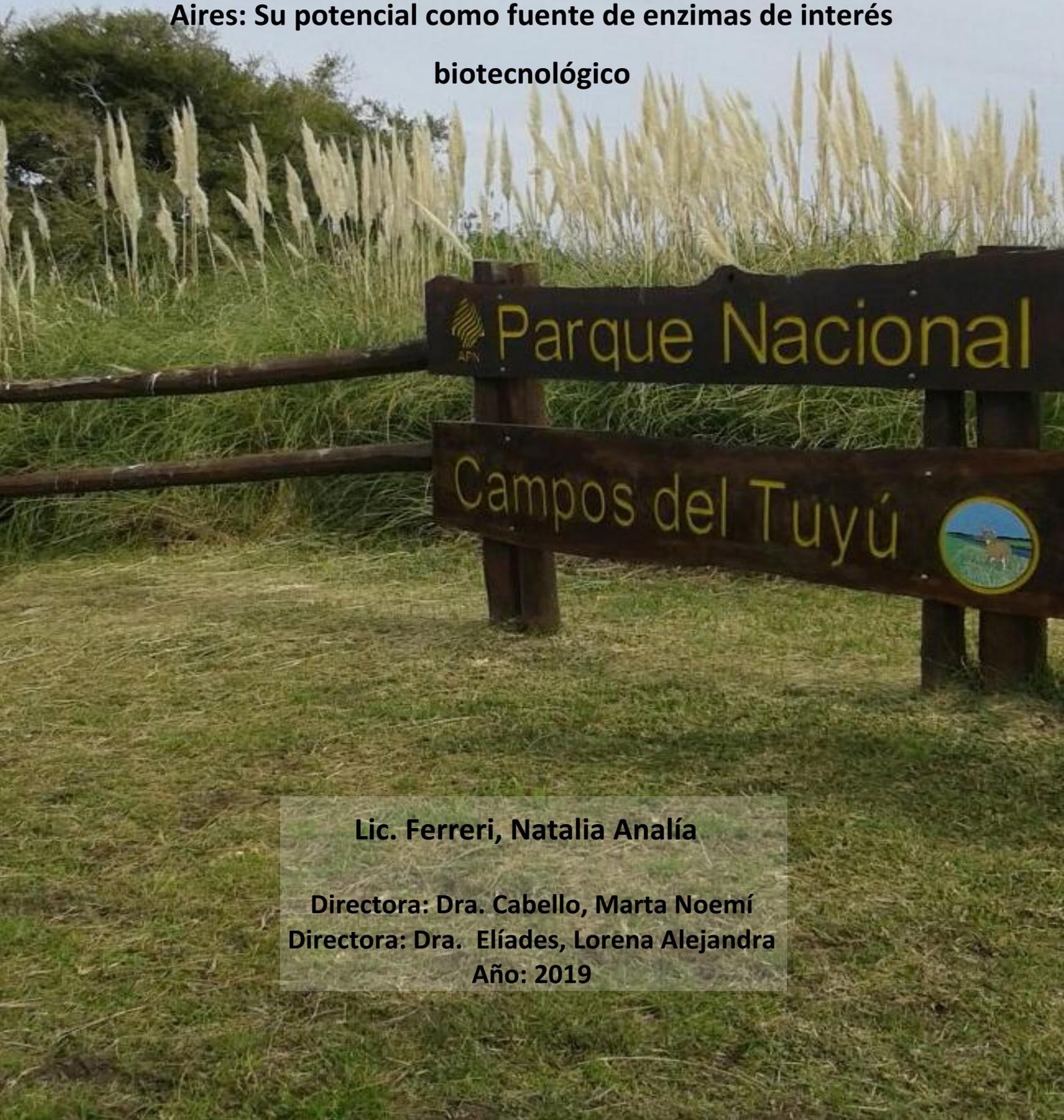




Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Caracterización de la microbiota de suelos salino-sódicos de  
cangrejales de la Reserva Campos del Tuyú Prov. de Buenos  
Aires: Su potencial como fuente de enzimas de interés  
biotecnológico**



**Lic. Ferreri, Natalia Analía**

**Directora: Dra. Cabello, Marta Noemí**  
**Directora: Dra. Elíades, Lorena Alejandra**  
**Año: 2019**

*A mis padres: Liliana y Domingo*

*A mi familia*

## Agradecimientos

A mi directora Dra. Lorena Elíades por la posibilidad de este sueño llamado doctorado, por todos los conocimientos brindados a lo largo de este camino y por su cariño, comprensión y dedicación para conmigo.

A mi directora Dra. Marta Cabello por sus innumerables aportes y oportunidades brindadas.

A CONICET por financiar mi estudio de posgrado y a la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP) por la formación recibida.

A la administración de Parques Nacionales en especial a Mario Beade, intendente del Parque Nacional Campos del Tuyú, por ofrecerme todo lo indispensable para poder realizar este proyecto. A los guardaparques por su compañía, en las largas horas de trabajo y por los momentos dedicados a contemplar el venado de las Pampas, así como toda la maravillosa biodiversidad presente en el lugar.

A Emilio Mela mi compañero de vida y de campañas, por trabajar conmigo a la par en los muestreos, por estar siempre dispuesto a ayudarme, por sus ideas, su entusiasmo y las tardes de playa compartidas después de cada muestreo.

A la cátedra de Microbiología Agrícola, por abrirme las puertas para poder realizar los análisis de actividad enzimática en suelo, en especial al Dr. Mario Saparrat por todo su afecto y las oportunidades brindadas.

A la cátedra de Edafología por permitirme realizar los análisis fisicoquímicos del suelo, en especial a los ingenieros Luciano Larrieu, Víctor Merani y Guillermo Millán por su generosidad y brindarme todos sus conocimientos para la realización de estos análisis y la interpretación de los datos obtenidos.

A la Dra. Virginia Moreno investigadora del Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (BIOLAB) por su gran aporte a esta tesis al realizar los estudios moleculares de las cepas fúngicas que no pudieron determinarse mediante taxonomía clásica.

A toda la gente de CITEC-CIC, por los momentos compartidos y su generosidad para conmigo. A la Lic. Betina Galarza, Dra. Laura Garro y Dra. María Eugenia Errasti por recibirme en CITEC y brindarme sus conocimientos y la posibilidad de realizar parte de mi tesis en su lugar de trabajo.

A mi familia: A mis padres Linliana Frezzini y Domingo Ferreri por todo lo que me dieron y me dan cada día de sus vidas, a mis hermanos María Laura y Hernán por estar siempre juntos en todo momento; a mis sobrinos y sobrinas por sus sonrisas, besos y abrazos.

A mi hermana por nuestras charlas, nuestras reflexiones y por ser siempre para mí una guía, una compañía y por sobre todo una gran amiga.

A mis amigas y colegas María Inés Troncozo, Leticia Russo y Florencia Vianna que me ayudaron muchísimo en el armado de la tesis y por todos los momentos de risas en el Instituto.

A mis amigos por estar siempre en las buenas y en las malas, y por transformar cada día juntas en momentos de alegría. A Flavia, Diana, María, Romi, Dani, Flor, Egly, Ceci, Leti, Lilen, Anyi, Key, Inés, Aldi, Leo, Enzo y Fabri, mil gracias a ustedes por el aguante.

A mis compañeros del instituto Spegazzini, por todo lo brindado durante estos años, por los lindos momentos compartidos, los mates, las charlas y los tradicionales almuerzos en el instituto.

## Índice de Contenidos

<b>RESUMEN .....</b>	<b>9</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS .....	15
DIVERSIDAD FÚNGICA ACTUAL .....	16
EL SUELO Y SUS MICROORGANISMOS .....	18
<i>El suelo</i> .....	18
<i>Los hongos de suelo</i> .....	20
AMBIENTES EXTREMOS Y MICROORGANISMOS EXTREMÓFILOS .....	22
<i>Ambientes extremos</i> .....	22
<i>Suelos salino-sódicos (alcalinos)</i> .....	23
<i>Microorganismos extremófilos</i> .....	23
<i>Hongos alcalinotolerantes y alcalofílicos</i> .....	25
ENZIMAS FÚNGICAS Y SUS APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS E INDUSTRIALES .....	27
<i>Enzimas fúngicas</i> .....	27
<i>Aplicaciones industriales y biotecnológicas</i> .....	28
Proteasas: .....	28
Quitinasas: .....	29
Queratinasas: .....	30
Lipasas: .....	30
Amilasas: .....	31
Celulasas: .....	32
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>34</b>
OBJETIVO GENERAL .....	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	35
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>

ÁREA DE ESTUDIO .....	37
<i>Ubicación geográfica</i> .....	37
<i>Geología y geomorfología</i> .....	39
<i>Clima</i> .....	40
<i>Suelo</i> .....	40
<i>Vegetación</i> .....	42
<i>Sitios de Muestreo</i> .....	43
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUELO .....	45
<i>Toma y acondicionamiento de las muestras</i> .....	45
<i>Determinaciones analíticas de los parámetros fisicoquímicos</i> .....	45
<i>Humedad</i> .....	45
<i>Textura</i> .....	46
<i>Obtención de la pasta de suelo (PS) y su extracto de saturación (EPS)</i> .....	46
<i>Sodio (Na), Potasio (K); Calcio y Magnesio (Ca<sup>+2</sup> +Mg<sup>+2</sup>)</i> .....	47
<i>Cálculo de la Relación de Adsorción de Sodio (RAS)</i> .....	47
<i>pH actual (pH<sub>a</sub>)</i> .....	47
<i>Conductividad eléctrica (CE)</i> .....	48
<i>Materia orgánica (MO) y ceniza</i> .....	48
<i>Carbono orgánico total (COT)</i> .....	48
<i>Nitrógeno total (NT)</i> .....	49
<i>Fósforo total (PT)</i> .....	49
<i>Análisis de los datos</i> .....	51
DIVERSIDAD DE LOS HONGOS AISLADOS DE LOS SUELOS SALINOS-SÓDICOS .....	51
<i>Toma y acondicionamiento de las muestras de suelo</i> .....	51
<i>Aislamiento y caracterización taxonómica/morfológica de especies fúngicas</i> .....	52
<i>Determinación molecular de cepas fúngicas seleccionadas y micelios estériles</i> .....	53
<i>Cultivos monospóricos</i> .....	53
<i>Obtención de ADN genómico total</i> .....	54
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	55
CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS.....	56

<i>Análisis de los datos</i> .....	57
DETERMINACIÓN DE CAPACIDADES ENZIMÁTICAS .....	59
<i>Actividad enzimática en suelo</i> .....	59
<i>Actividad deshidrogenasa</i> .....	59
<i>Actividad fosfatasa</i> .....	60
<i>Actividad ureasa</i> .....	61
<i>Actividad celulolítica</i> .....	61
<i>Análisis de los datos</i> .....	62
<i>Actividad enzimática de cepas fúngicas: Screening enzimático en medio sólido</i> .....	62
Elección de cepas fúngicas y preparación de los inóculos .....	62
Preparación de medios agarizados específicos.....	63
<i>Actividad enzimática de cepas fúngicas: Screening preliminar en medio líquido</i> .....	64
Preparación de medios líquidos específicos .....	64
Obtención de extractos enzimáticos.....	65
Determinación de las actividades enzimáticas: quitinolítica, queratinolítica y caseinolítica a partir de los extractos enzimáticos .....	65
<i>Actividad quitinolítica:</i> .....	66
<i>Actividad queratinolítica:</i> .....	66
<i>Actividad caseinolítica:</i> .....	67
<i>Análisis de los datos</i> .....	68
DEPILADO ENZIMÁTICO SOBRE CUEROS BOVINOS CON EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DE HONGOS AISLADOS DEL CANGREJAL .....	69
<i>Selección de los extractos crudos de enzimas</i> .....	69
<i>Ensayo de la actividad queratinolítica</i> .....	70
<i>Ensayo con piel bovina sumergida en extractos de hongos</i> .....	70
<i>Observación al microscopio electrónico de barrido</i> .....	71
<i>Análisis de los datos</i> .....	71
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LOS SUELOS SALINO-SÓDICOS DEL CANGREJAL .....	73

DIVERSIDAD FÚNGICA DE LOS SUELOS SALINO-SÓDICOS .....	77
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS SUELOS SALINO-SÓDICOS DEL CANGREJAL	91
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CEPAS FÚNGICAS: SCREENING ENZIMÁTICO EN MEDIO SÓLIDO .....	92
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CEPAS FÚNGICAS: SCREENING PRELIMINAR EN EXTRACTOS DE CULTIVOS LIQUIDOS .....	105
DEPILADO ENZIMÁTICO SOBRE CUEROS BOVINOS CON EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DE HONGOS AISLADOS DEL CANGREJAL .....	106
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>110</b>
SUELOS SALINO-SÓDICOS DE LOS CANGREJALES .....	110
LA DIVERSIDAD FÚNGICA DE LOS SUELOS SALINOS-SÓDICOS.....	111
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO.....	117
EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE AISLAMIENTOS FÚNGICOS: TEST EN PLACA.....	119
EVALUACIÓN ENZIMÁTICA DE AISLAMIENTOS FÚNGICOS: TEST EN MEDIO LÍQUIDO .....	124
DEPILADO ENZIMÁTICO SOBRE CUEROS BOVINOS A PARTIR DE EXTRACTOS CRUDOS PROVENIENTES DE AISLAMIENTOS FÚNGICOS DE SUELO .....	126
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>130</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>172</b>
ANEXO 1:.....	172
ANEXO 2:.....	175
ANEXO 3:.....	176

# Resumen

El Parque Nacional Campos del Tuyú corresponde a un área protegida de la Provincia de Buenos Aires, ubicada en Bahía Samborombón, en un paisaje costero que se extiende a lo largo de 150 km sobre la costa occidental del Río de La Plata. Dentro de esta área se encuentran cangrejales, en zonas bajas del terreno, mal drenadas con alto contenido de arcillas y suelos salino-sódicos. Estos suelos, por sus características fisicoquímicas, se consideran como ambientes extremos. Existen comunidades particulares de microorganismos capaces de vivir bajo estas condiciones, lo que los convierte en una fuente prometedora de biomoléculas con capacidad para soportar condiciones drásticas en procesos industriales.

El conocimiento de la diversidad fúngica de hongos microscópicos en los cangrejales es aún desconocida. Por tanto, el objetivo principal de esta tesis fue analizar la comunidad fúngica asociada a suelos salino-sódicos de los cangrejales del Parque Nacional Campos del Tuyú, evaluar el potencial enzimático de las especies más representativas de este ambiente para su posible uso en biotecnología y para su conservación en el medio ambiente en el que viven ya que cumplen roles ecológicos indispensables en la comunidad del suelo de los cangrejales. El aislamiento y la conservación *ex situ* de estos microorganismos permitirán salvaguardar su potencial genético y podrán ser estudiados por la comunidad científica.

Se seleccionaron tres sitios de muestreo, que corresponden a tres cangrejales dentro del Parque. Se determinaron distintos parámetros fisicoquímicos para los tres sitios correspondientes a dos años de muestreo. Al comparar los sitios se observaron diferencias significativas para el primer año, pero no para el segundo año de muestreo en cuanto a dichas propiedades estudiadas. Al comparar entre sí los dos años de estudio, se encontraron diferencias significativas en algunos de los parámetros analizados. Los valores de pH, salinidad y conductividad eléctrica caracterizaron a estos suelos como salino-sódicos. El análisis de fósforo, nitrógeno, carbono orgánico y materia orgánica mostró que el suelo es pobre en el contenido de estos nutrientes.

El aislamiento fúngico se realizó de manera estacional para los tres sitios de estudio seleccionados durante dos años. La identificación taxonómica, tanto morfológica como molecular, permitió conocer la micobiota característica de los cangrejales, aportando los primeros registros de la diversidad fúngica actual ya que no existían estudios previos sobre la micobiota de este lugar. Las especies más abundantes y que caracterizaron a los cangrejales correspondieron a especies típicas de ambientes marinos y salobres, así como también a especies alcalinotolerantes y alcalinofílicas propias de suelos con pH elevado. Las especies aisladas con más frecuencia se asignaron a los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Emericellopsis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Purpureocillium* y *Trichoderma*. Todas habían sido reportadas previamente como especies asociadas a ambientes alcalinos. Mientras que para los géneros *Corollospora* y *Neocamarosporium* las especies recuperadas habían sido reportadas en medios marinos o asociadas a ambientes salinos.

La comunidad microbiana del suelo de los cangrejales presentó actividad enzimática deshidrogenasa, fosfatasa y ureasa, que reflejan la producción de biomasa, la degradación de materia orgánica y la conservación del suelo. No se registran estudios previos de actividad enzimática para los suelos de cangrejales de la provincia de Buenos Aires, siendo estos los primeros reportes del estudio de las actividades enzimáticas mencionadas para dichos suelos. Estos resultados podran ser usados como indicadores de calidad y sanidad del suelo en futuros estudios de conservación ambiental.

Las cepas fúngicas más representativas aisladas de los cangrejales mostraron potencial enzimático lipolítico, amilolítico, caseinolítico, celulolítico, quitinolítico y queratinolítico. Muchas cepas fúngicas mostraron buena actividad a pH alcalino, ofreciendo una alternativa viable para el uso y aplicación de estas extremoenzimas en biotecnología y varias industrias. La industria del cuero ha sido una actividad industrial promisoría en la zona, actualmente existe un compromiso creciente por parte de esta industria de implementar el uso de enzimas en el proceso de curtido; en este sentido se probaron las capacidades de veinte cepas seleccionadas capaces de producir enzimas de interés en el proceso de depilado de cueros, de las cuales 7 de ellas fueron utilizadas para realizar el depilado

enzimático sobre cuero bovino. *Fusarium oxysporum* y *Acremonium* sp. mostraron buena capacidad enzimática sobre cuero bovino en el depilado enzimático.

El uso de enzimas provenientes de microorganismos resulta de gran interés ya que actualmente existe una tendencia creciente a reemplazar algunos procesos químicos tradicionales por procesos biotecnológicos, que no sólo constituyen una alternativa menos agresiva para el medio ambiente, sino también son económicamente más viables.

## Summary

Campos del Tuyú National Park belongs to a protected area in the Buenos Aires province, located in Samborombón bay. This is a seaside environment extending 150 km along the occidental coast of the Rio de la Plata. On this area "cangrejales" are found, on low land zones, with alkaline-sodic soils that are poorly drained and with a high clay content. These type of soils, for their physicochemical characteristics, are considered as extreme environments. There are particular microorganism communities that are able to live under these conditions; this capacity turns them into a promising source of biomolecules with abilities to tolerate drastic conditions during industrial processes.

Knowledge about fungal diversity of microscopic fungi on this type of environment is still unknown. In this sense, the main objective of this thesis was to analyze the fungal community associated to alkaline-sodic soils from "cangrejales" in the National Park Campos del Tuyú, to evaluate the enzymatic activity of the most representative species in the environment, to its potential use in biotechnology and for its conservation in the habitat since they play key ecological roles in the soil community of the cangrejales.

Three sample sites were selected, belonging to "cangrejales" inside the National Park. Physicochemical parameters were determined and were compared among sites. There were no differences between sites as to these properties; however, there were significant differences between years of sampling. Salinity, pH, and electrical conductivity values allowed describing these soils as alkaline saline soils the P, N, organic C and organic matter analysis showed that this type of soil has low content of these nutrients.

Fungal isolation was performed by seasons for the three selected sites during two years. Taxonomic identification, morphologic and molecular, allowed describing the mycobiota present in "cangrejales", contributing to record fungal diversity in a habitat where no records of these microorganisms exist. The most abundant species correspond to those typical of marine and brackish environments, as well as alkaline-tolerant and alkaliphilic species, which are found in soils with, elevated pH values. The most frequent strains belonged to the

genera *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Emericellopsis*, *Penicillium*, *Purpureocillium* and *Trichoderma*, all reported as species associated to alkaline environments. On the other hand, there are no records of species belonging to the genera *Corlospora*, *Neocamarosporium* and *Microsphaeropsis* in marine nor saline environments.

Microbial community of “cangrejales” soil showed dehydrogenase, phosphatase and urease (enzymatic) activity, reflecting biomass production, organic matter degradation and soil conservation. There are no previous records on the enzymatic activity of “cangrejales” soils from Buenos Aires province. The results from this study represents the first report of the aforementioned enzymatic activities in this type of habitat and could be utilized as indicators of quality and sanity of the soil in future studies of environmental conservation.

The most representative fungal strains of the “cangrejales” showed lipolytic, amyolytic, caseinolytic, cellulolytic, chitinolytic and keratinolytic (enzymatic) potential. Many of the fungal strains displayed a good performance at alkaline pH, constituting a viable alternative to the use and application of these extreme-enzymes in biotechnology and several industries.

Leather industry has been a promising industrial activity in the zone and nowadays this industry it is committed to employ enzymes in the tanning process. In this sense, the capacity to produce enzymes on the leather unhairing process of twenty strains was tested. Seven of them were selected for their utilization in bovine leather unhairing process. The strains *Fusarium oxysporum* y *Acremonium* sp. showed enzymatic capacity in the bovine unhairing process.

The use of enzymes from microorganisms is of great interest since it exists an increasing tendency to replace some traditional chemical processes with biotechnological ones. Biotechnological processes are less harmful to the environment and economically more viable alternatives.



## *Introducción y antecedentes*

# Introducción y Antecedentes

---

## Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos que se nutren por absorción, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, y con pared celular constituida principalmente de quitina (Herrera y Ulloa, 1990).

El Reino Fungi presenta una gran variedad de organismos tanto unicelulares como multicelulares. El término "hongo filamentoso" hace referencia a todos aquellos hongos que no son levaduriformes, son multicelulares y su crecimiento supone la formación de hifas (Beck et al., 2013), formando el cuerpo fúngico o micelio (Walker y White, 2011). En todos los Phyla del Reino Fungi existen especies microscópicas, la gran mayoría de los hongos filamentosos se encuentran dentro del Phylum Ascomycota (Taylor et al., 2006), que incluyen los hongos con reproducción sexual mediante ascas y sus anamorfos, antiguamente conocidos como Hongos Imperfectos, debido a que no se les ha descubierto mecanismos de reproducción sexual.

En general en todos los hongos, ya sean macro o microscópicos, su fase somática está adaptada a la exploración y explotación de los materiales o sustratos que colonizan. El cuerpo de los hongos se origina a partir de diferentes propágulos de fácil dispersión, los cuales en contacto con algún sustrato germina para formar hifas que se ramifican y forman el micelio. Las hifas avanzan en la búsqueda de moléculas energéticas, la presencia de quitina en su pared celular le confiere fuerza para atravesar los sustratos. Esta pared celular delimita su morfología y mantiene la osmolaridad en el interior celular (Klis et al., 2001), posibilitando la adaptación del hongo a cambios ambientales o estrés extremo (Latgé y Beauvais, 2014).

Los hongos son capaces de colonizar un elevado número de nichos ecológicos y a eso se debe su gran éxito evolutivo. En los hongos se reconocen tres modelos nutricionales de acuerdo a la manera que utilizan para explotar los diversos sustratos (Thrower, 1966). Se denominan saprótrofos cuando se nutren

degradando sustratos muertos, necrótrofos cuando los tejidos vivos primero son muertos y luego utilizados saprotróficamente y biótrofos cuando sólo obtienen su alimento a partir de células vivas. En la naturaleza, los hongos pueden depender de un solo modo nutricional (carácter obligado) o combinar más de un modo de nutrición en su ciclo de vida.

La mayoría de los micromicetes son organismos saprobios que se desarrollan en cualquier material orgánico. Sin embargo, determinadas especies se especializaron en colonizar nichos específicos como son la hojarasca, la madera en descomposición, el suelo, el papel, los alimentos, los textiles, entre otros. Junto a las bacterias y los artrópodos actúan como descomponedores de la materia orgánica y a su vez degradan plásticos y productos industriales.

## Diversidad fúngica actual

Los hongos son un grupo inmensamente diverso de organismos, con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida, cuya actividad ecológica, es cruciales en todos los ecosistemas.

Blackwell (2011) estimó que en los últimos 65 años se han descrito más de 60 mil especies. Hawksworth (1991; 2001) sostiene la existencia de 1,5 millones de especies fúngicas.

Las estimaciones de la diversidad fúngica en el suelo dependen en gran medida, del método de aislamiento usado y del número de aislamientos obtenidos. El conocimiento actual de la diversidad de los hongos en el suelo se basa en gran medida en observaciones de esporóforos presentes en ambientes, o en cultivos de aislamiento. Ambos enfoques tienen serias limitaciones para la detección de la verdadera diversidad, un hongo que existe sólo en una forma micelial en el suelo es poco probable que se identifique a partir de la observación clásica a través de microscopía si no forma una estructura reproductiva, mientras que en los cultivos de microhongos a partir de aislamientos de suelo crecerán sólo aquellos propágulos que son capaces de desarrollarse y esporular en el medio de aislamiento utilizado.

Los Basidiomycotas representan, a menudo, más de la mitad de la biomasa y la actividad de los hongos en el suelo, sin embargo, las técnicas de aislamiento más usadas no permiten recuperarlos con éxito (Gams, 1992). Los Ascomycota comúnmente denominados ascomicetes, representan aproximadamente el 75% de todos los hongos descritos hasta el presente, incluyendo muchos que sólo pueden reproducirse exclusivamente mediante un ciclo asexual. Teniendo en cuenta que solo el 17 % de las especies de hongos conocidas pueden ser cultivadas con éxito en medios de cultivo (Pugh, 1969), las estimaciones de la diversidad fúngica a partir de estas técnicas conducen a medidas muy reducidas de la diversidad.

El desarrollo de técnicas moleculares ha proporcionado una nueva gama de herramientas para el análisis de las comunidades de suelo que pueden dar respuestas a la diversidad del ecosistema (Wardl y Lindahl, 2014). Sin embargo, esta técnica no distingue entre etapas activas y en reposo, y para interpretar los resultados con precisión, se requiere un conocimiento *a priori* de la ecología y la función de los organismos (Bridge y Spooner, 2001).

Micólogos contemporáneos han sugerido que para calcular la diversidad fúngica se deben tener en cuenta distintos parámetros como la distribución geográfica, endemismos, especificidad de hospedadores, diversidad de macro y microhongos en diversos hábitats, así como su asociación con otros organismos (Schmit y Muller, 2007).

Tedersoo et al. (2014), recolectaron cerca de 15.000 muestras de tierra de 365 sitios en todo el mundo y secuenciaron sus genomas. Los resultados revelaron que la estimación de la riqueza de hongos se aproxima al número de especies registradas hasta la fecha. Determinaron los principales patrones biogeográficos de la diversidad de hongos y la composición de la comunidad. La precipitación media anual tuvo los efectos más fuertes en la riqueza de los hongos, la mayoría de los grupos de hongos alcanzó su punto máximo en los ecosistemas tropicales, pero los hongos ectomicorrícicos fueron más diversos en los ecosistemas templados o boreales y muchos grupos de hongos mostraron distintas preferencias por condiciones edáficas específicas (como pH, calcio o fósforo). En general, encontraron una disminución notable en la riqueza de especies de

hongos con la distancia del Ecuador. Sin embargo, para algunos grupos de especialistas, la diversidad dependía más de la abundancia de plantas hospedadoras que de la diversidad o la geografía del hospedador.

## El suelo y sus microorganismos

### El suelo

El suelo es una entidad dinámica con multitud de procesos biológicos y geoquímicos que muestran una elevada heterogeneidad espacial y temporal (Ochoa et al., 2007) el cual se define como una mezcla compleja de materiales inorgánicos (arena, limo y arcilla), materia orgánica en descomposición, agua, aire y organismos vivos. Es considerado uno de los principales reservorios de diversidad microbiana para la degradación o transformación de compuestos orgánicos sobre el planeta (Bridge y Spooner, 2001).

En un suelo superficial de buena calidad, el 50% corresponde a una fase sólida, mientras que la otra mitad consiste en espacios porosos, por donde circulan el aire y el agua (Tarbuck y Lutgens, 2005). Los porcentajes de minerales y la materia orgánica se organizan en micro y macroagregados ( $\geq 250 \mu\text{m}$  y  $\leq 250 \mu\text{m}$  respectivamente) que determinan la textura y estructura del suelo (Robe, 2003).

En los suelos maduros se pueden reconocer capas denominadas horizontes edáficos. Cada horizonte tiene diferentes texturas y composición que varía con los distintos tipos de suelos. Las capas superficiales contienen: (I) componentes biológicos (bacterias, hongos, lombrices, pequeños insectos y raíces de plantas) los cuales están estrechamente relacionados con las propiedades biológicas, físicas y químicas del suelo (Christensen, 1996) y (II) componentes orgánicos en distintas etapas de descomposición. Los microorganismos degradan parcialmente la materia orgánica dejando humus que se une a los minerales contribuyendo a la retención de agua y nutrientes (Miller, 1994).

El suelo, donde habitan los microorganismos, está definido por una red tridimensional de poros que regula el movimiento de los gases, líquidos y organismos, y a través de ella ocurren los procesos de adsorción de agua,

nutrientes y se llevan a cabo distintas reacciones químicas. Las interfaces sólido-líquido y líquido-sólido son los sitios donde viven los microorganismos y donde existen gradientes de nutrientes, gases, pH, ya sea en el interior de microporos o entre poros contiguos, formándose microambientes que ofrecen distintos nichos ecológicos (Valencia-Cantero y Peña-Cabriales, 2001). Esta compleja estructura del suelo genera un nivel de heterogeneidad de hábitats donde nutriente y agua tienen distintos grados de disponibilidad, esto se observa tanto a escala microscópica como a nivel paisaje (Ettema, 2002).

Condiciones fisicoquímicas adecuadas tales como el contenido de agua, el pH, contenido de carbono orgánico y nutriente, son reflejo de una óptima actividad microbiana (Ramos-Vásquez y Zúñiga-Dávila, 2008). El agua es un regulador importante en las actividades físicas, químicas y biológicas en el suelo (Topp et al., 1993), los cambios drásticos en el contenido de agua del suelo, desde situaciones de saturación hasta sequías extremas, afectan drásticamente la población microbiana. En consecuencia, la composición microbiana del suelo fluctúa (Kieft et al., 1987). El pH es considerado una variable principal en los suelos ya que controla muchos procesos químicos, afecta específicamente la disponibilidad de los nutrientes, mediante el control de sus formas químicas, afectando directamente el desarrollo de los seres vivos (microorganismos y plantas). El carbono orgánico, es uno de los principales compuestos de los seres vivos, aproximadamente el 50 % del peso seco de la materia orgánica es carbono. En el medio ambiente su ciclo está estrechamente ligado al flujo de energía (Tiessen y Moir, 1993). La descomposición de la materia orgánica se produce en los horizontes superficiales (2-10 cm), donde se encuentra el mayor número y biomasa de hongos (Bills et al., 2004).

Determinar la calidad o sanidad del suelo resulta clave para la protección ambiental a escalas local, regional y global. Hasta el momento, se han utilizado indicadores basados en las propiedades fisicoquímicas para medir la producción del suelo. En la actualidad las propiedades bioquímicas y biológicas son consideradas herramientas promisorias para medir su calidad (Ocho et al., 2007). Entre las propiedades bioquímicas, la actividad enzimática del suelo es importante porque refleja el estado en el que se encuentran sus poblaciones

microbianas y su relación con la biología del suelo, la producción de biomasa, la degradación de contaminantes y la conservación de ecosistemas (Doran, 2000; Gianfreda y Ruggiero, 2006). Son los microorganismos, debido a su gran biomasa, los que contribuyen en mayor medida al proceso de liberación enzimática (Ceron y Melgarejo, 2005). Las enzimas son responsables de la degradación de moléculas orgánicas y tienen una participación vital en el ciclo del nitrógeno, del fósforo y del carbono. Cumplen un papel relevante en procesos tales como la mineralización, inmovilización de nutrientes y fijación biológica de nitrógeno, entre otros (Caldwell, 2004; Carpa, 2009; Coyne, 2000; Dick y Tabatabai, 1993).

## Los hongos de suelo

Los hongos se destacan por su alta diversidad, amplia distribución y abundancia, es decir conforman una importante fracción de la biomasa total microbiana del suelo (Castillo et al., 2013). Probablemente la gran mayoría de las más de 80 mil especies de hongos nombrados y descritas hasta ahora se encuentren en alguna etapa de su ciclo de vida en el ambiente suelo cumpliendo diversas funciones (Bridge, 2001). El micelio, la estructura somática de los hongos filamentosos, es una adaptación efectiva a la vida en un medio como el suelo. Las hifas que conforman el micelio se originan por la germinación de una sola espora. El crecimiento tiene la particularidad de que se produce en los extremos de las hifas. Si bien los hongos son inmóviles sus esporas pueden ser llevadas a grandes distancias por el viento. El crecimiento del micelio reemplaza a la movilidad, poniendo al organismo en contacto con nuevos nutrientes. Esta propiedad favorece a los hongos filamentosos para 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 y Young, 2004). Los horizontes edáficos con mayor riqueza de materia orgánica son los que contienen el mayor número de especies fúngicas (Fierer et al., 2003), estos horizontes son los superficiales 2-10 cm del perfil (Bills et al., 2004), mientras que la disponibilidad del carbono disminuye con la profundidad en el perfil.

Los hongos requieren nitrógeno en altas cantidades, no solo para sintetizar los compuestos estructurales celulares como proteínas, ácidos nucleídos y quitina sino también para la síntesis de enzimas que son indispensables para extraer los nutrientes del medio. Aunque no son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, los hongos pueden asimilar nitrógeno inorgánico como nitrato o amonio además de usar diferentes moléculas con nitrógeno combinado como aminoácidos, glutamatos, glutamina, aspartato y asparagina (Deacon, 2005).

Los hongos son de vital importancia en la descomposición y mineralización de la materia orgánica, tanto vegetal como animal; son responsables de la fertilidad del suelo al restituirles los principales nutrientes (C, N, P, S) desempeñando un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos de la biósfera (Elíades et al., 2004). Entre los microorganismos que habitan el suelo, son los más abundantes en términos de biomasa y actividad fisiológica, comprenden un 75% a 95% de la biomasa microbiana del suelo (Campbell, 1987) y junto con las bacterias son responsables del 90% del flujo total de energía por descomposición de la materia orgánica.

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

Los principales grupos taxonómicos de hongos se encuentran representados en el suelo. Entre los órdenes más frecuentes pueden mencionarse Mucorales, Eurotiales, Hypocreales, Sordariales, Onygenales, Leotiales, Pezizales.

Los géneros más frecuentemente identificados en las muestras de suelo corresponden a *Acremonium* (Gams, 1971; 1989), *Aspergillus* y sus teleomorfos (Raper y Fennell, 1977; Klitch y Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989), *Cylindrocarpon* (Booth, 1966; Brayford, 1992) *Cylindrocladium* (Crous y Wingfield, 1994), *Fusarium* (Booth, 1971; Gerlach y Nirenberg 1982; Nelson et al., 1983), *Mortierella* (Linnemann, 1941; Gams, 1977), *Mucor* (Schiper, 1978), *Myrothecium* (Tulloc, 1972), *Oidiodendron* (Barron, 1962), *Paecilomyces* y sus telomorfos (Stolk y Samson, 1972; Pitt, 1979; Ramirez, 1982) *Phoma* (Dorenbosch, 1970; Gruyter y Noordeloos, 1992;

Boerema et al., 1994), *Trichoderma* (Rifai, 1969; Bissett, 1991; Samuels et al., 2003) y *Verticillium* (Gams y Van Zaayen, 1982).

## Ambientes extremos y microorganismos extremófilos

### Ambientes extremos

La naturaleza posee una amplia variación de nichos ambientales con diversas condiciones abióticas. En algunos lugares los factores abióticos pueden desviarse de los de la mayoría de los hábitats, dando como resultado zonas específicas denominadas "Hábitats extremos", que restringen el crecimiento de la mayoría de los organismos (Grum-Grzhimaylo et al., 2015). El término "Ambiente extremo", es relativo, ya que los ambientes que pueden ser extremos para un organismo, pueden ser esenciales para la supervivencia de otro. Los extremófilos se desarrollan bajo condiciones que podría matar a la mayoría de los organismos y muchos no pueden sobrevivir en los ambientes considerados globalmente normales. Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperaturas muy elevadas (55-121°C) o bajas (-2-20°C), alta salinidad (NaCl 2-5M) y alta alcalinidad (pH por encima de 8) o alta acidez (pH menor de 4) (Grant, 1993; Rodríguez-Valera, 1993).

Los hábitats donde viven los extremófilos incluyen manantiales calientes, sistemas hidrotermales submarinos poco profundos o sistemas de aberturas termales abisales, tierras y mares polares fríos y glaciares alpinos; lagos salinos y ambientes con valores de pH extremos, ya sea ácido (zonas de solfataras, minas) o alcalino (fuentes carbónicas, tierras y lagos alcalinos); y con relativa frecuencia, en zonas que combinan dos o más factores extremos, como alta temperatura y condiciones ácidas, en los manantiales ácidos y calientes de zonas volcánicas, o baja temperatura y alta presión, en los fondos marinos (Madigan y Marrs, 1997; Rothschild y Mancinelli, 2001; Canganella y Wiegel, 2011). En Argentina, se han aislado bacterias no filamentosas y Actinomycetes de ecosistemas glaciares de la Antártida (Garzón-Obando, 2013) y especies de hongos del suelo de los alrededores de las bases antárticas (Cabello, 1989, 1994; Comerio y Mac

Cormack, 2004; Stchigel et al., 2009), en suelos contaminados con hidrocarburos donde Liporace et al. (2019) aislaron bacterias degradadoras de hidrocarburos, en zonas volcánicas. Cabello y Arambarri (2002), Elíades et al. (2004, 2006) aislaron hongos alcalino tolerantes de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

## **Suelos salino-sódicos (alcalinos)**

Los suelos salinos-sódicos son los ambientes más alcalinos de La tierra, con un pH que generalmente varía entre 8,5 y 11, estos entornos también suelen ser muy salados, con altas concentraciones de  $\text{Na}^+$  (carbonato de sodio o complejos hidratados de esta sal) que genera altos valores de pH. Se piensa que la acumulación de sodio es un proceso común, asociado con las sabanas, las estepas y las regiones desérticas de todo el mundo, la fuerza impulsora para la acumulación de sodio es el agotamiento del  $\text{Ca}^{+2}$  atrapado por el ion  $\text{CO}_3^{+2}$ , dejando el  $\text{Na}^+$  como el catión dominante (Jones et al., 1998). Los suelos sódicos se forman como resultado de la acumulación de carbonato en condiciones pobres de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ . La evaporación del agua refuerza el proceso de acumulación de sodio y salinidad.

Los suelos de cangrejales del Parque Nacional Campos del Tuyú son un ejemplo de esto eventos extremos ya que poseen escaso drenaje, permeabilidad lenta, elevada salinidad y alcalinidad. En las zonas bajas, estos suelos son de tipo aluvial, salinos-sódico, "humic gley" (Moscatelli y Scoppa, 1996). Estos suelos extremos están poblados por grupos de organismos específicamente adaptados a estas condiciones particulares, estos microorganismos son llamados alcalinófilos y alcalitolerantes.

## **Microorganismos extremófilos**

El término extremófilo fue usado por primera vez por Mac Elroy (Mac Elroy, 1974), para referirse a los microorganismos que tienen como hábitat natural ambientes que antiguamente se consideraban demasiado hostiles para permitir la supervivencia de los organismos. Se clasifican en base a la condición física o química extrema del ambiente donde se desarrollan: termófilos (temperatura

óptima de crecimiento superior a 45 °C); dentro de éstos se encuentran los hipertermófilos (temperatura óptima de crecimiento superior a 80 °C) y los psicrófilos (temperatura óptima de crecimiento por debajo de 10 °C); acidófilos (pH óptimo de crecimiento por debajo de 5); alcalófilos (pH óptimo de crecimiento por encima de 8); halófilos (habitan en medios hipersalinos, de 5 % a 30 % p/v de sal); osmófilos (viven a altas presiones osmóticas); radiófilos (resisten altos niveles de radiación); metalófilos (toleran altas concentraciones de metales pesados); piezófilos (antes llamados barófilos, requieren o toleran presión hidrostática de 40 atm a 60 atm) (Antranikian et al., 2005; Ferrer et al., 2007; Jia et al., 2011; Reed et al., 2013).

Las condiciones físico-químicas de estos ambientes distan de los valores en los que la vida de muchos organismos es posible. El agua líquida, el suministro de energía y las condiciones de óxido-reducción ambientales son indispensables para la vida, por lo que los extremófilos deben vivir dentro de esos parámetros o bien ser capaces de mantenerlos regulados intracelularmente (Rothschild y Mancinelli, 2001). Por lo tanto han desarrollado varios mecanismos para prosperar en condiciones tan duras; los acidófilos y alcalófilos poseen mecanismos de regulación del pH intracelular para mantenerlo en valores cercanos a la neutralidad a través de diversas adaptaciones en las membranas celulares y en los transportadores de iones transmembranales (Reed et al., 2013); los termófilos contiene ácidos grasos saturados en la membrana celular que mantiene a la célula lo suficientemente rígida para sobrevivir a elevadas temperaturas (Rothschild y Mancinelli, 2001; Gomes y Steiner, 2004).

Hay ambientes naturales en el planeta en los que viven estos microorganismos y que son parte de los ciclos biogeoquímicos, en los que se produce la interacción entre los compuestos químicos inorgánicos presentes en el ambiente y los organismos vivos. Estos microorganismos están allí oxidando y reduciendo compuestos inorgánicos, por lo tanto, ellos determinan en gran medida la composición de la superficie de la tierra. Participan, por ejemplo, en los ciclos del oxígeno, del azufre, del hierro, del fósforo, del carbono y muchos otros elementos químicos.

El descubrimiento de los microorganismos extremófilos, capaces de vivir bajo condiciones extremas de temperatura, pH, presión, salinidad, radiación y sus combinaciones, ha proporcionado herramientas invaluable para su aplicación en una amplia gama de procesos biotecnológicos, permitiendo el manejo racional de los recursos naturales (Reed et al., 2013). Por otra parte, los extremófilos son una fuente potente de enzimas, que poseen alta estabilidad bajo condiciones extremas (Adams et al., 1995, Haki et al., 2003, Yano et al., 2003). Por ello han despertado el interés en aplicaciones industriales y biotecnológicas, ya que son extremadamente termoestables y generalmente resistentes a la acción de agentes desnaturalizantes, detergentes, solventes orgánicos y a la exposición a valores extremos de pH (Sarmiento et al., 2015). Las enzimas habituales tienen ciertas limitaciones, sin embargo, las extremoenzimas, empiezan a operar justo en el punto donde las habituales dejan de funcionar. Existen numerosos procesos industriales que requieren el uso de estos aceleradores químicos, tal es el caso de las enzimas que participan en la producción de edulcorantes, papel, síntesis de detergentes, elaboración de alimentos como pan y vino y tratamiento de residuos (Van-Den-Burg, 2003; Hasan et al., 2010).

## **Hongos alcalinotolerantes y alcalofílicos**

Los microorganismos adaptados a los ambientes alcalinos se pueden clasificar en dos grupos principales: los alcalofílicos y los alcalinotolerantes. El término alcalófilos está generalmente restringido a aquellos microorganismos que realmente requieren medios alcalinos para el crecimiento, la tasa de crecimiento óptima de estos microorganismos se observa en al menos dos unidades de pH por encima de la neutralidad. Los organismos capaces de crecer en valores de pH superiores a 9 o 10, pero con tasas de crecimiento óptimas en torno a la neutralidad o menos, se denominan alcalinotolerantes (Jones et al., 1994; Grant et al., 1980; Kroll et al., 1991).

Si bien la mayoría de los hongos crecen a pH neutro o ácido, se ha demostrado que algunos hongos filamentosos pueden crecer óptimamente a valores de pH superiores a 9 (Nagai et al., 1995; 1998, Grum-Grzhimaylo et al.,

2013). *Acremonium* sp., *Acrostalagmos luteoalbus*, *Alternaria* sp., *Clonostachys rosea*, *Emericellopsis alkalina*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Purpureocillium lilacinum* *Thielavia* sp. y *Verticillium albo-atrum* son especies fúngicas aisladas frecuentemente de suelos alcalinos (Elíades et al., 2011, Grum-Grzhimaylo et al., 2015).

La alcalinofilia en hongos filamentosos es poco común, mientras que la alcalinotolerancia es mucho más generalizada. Los hongos alcalinotolerantes pueden encontrarse en muchos suelos neutros (Kladwang et al., 2003, Elíades et al., 2006). En términos generales, la frecuencia de los hongos alcalinofílicos es baja, mientras que los alcalinotolerantes parecen estar mucho más extendidos, ya que estos se encuentran en muchos tipos de suelos neutros. Warcup (1951), Stenton (1953), Murkerji (1965), Pugh y Dickinson (1965), Rai et al. (1971), Nagai et al. (1995; 1998) analizaron la composición fúngica de suelos alcalinos. Los suelos alcalinos-sódicos están habitados por un número considerable de hongos filamentosos alcalinotolerantes y alcalinofílicos. Grum-Grzhimaylo et al. (2014) demostraron que los hongos alcalinofílicos y alcalinotolerantes son polifiléticos y se propagan a través de varias familias de Ascomycota, lo que sugiere una evolución independiente y varios orígenes del rasgo alcalinofílico en hongos filamentosos. Aún así la mayoría de hongos alcalinofílicos se ubica en Hypocreales.

La micobiota alcalino y alcalinotolerante de la Argentina es aún poco conocida. Cabello y Arambarri (2002) y Elíades et al. (2005, 2006, 2010) estudiaron la composición fúngica de suelos con estas características en Magdalena, Prov. de Buenos Aires. Elíades et al. (2011) encontraron que el 82% de los aislamientos correspondieron a anamorfos de Ascomycota, siendo las especies más representativas representantes de *Acremonium*, *Aspergillus* y *Penicillium*.

# Enzimas fúngicas y sus aplicaciones biotecnológicas e industriales

## Enzimas fúngicas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos (Cremosi, 2002).

Las hifas de los hongos filamentosos facilitan la penetración y dispersión en el sustrato, el micelio vegetativo coloniza profundamente el medio y se ramifica permitiendo descargar las enzimas necesarias para la digestión extracelular del sustrato y finalmente la absorción de los nutrientes por las hifas. Tanto el potencial de dispersión como su eficiente sistema enzimático les garantiza su modo de vida (Gams, 1992).

Existe una diferencia en la habilidad de las especies para acceder a carbohidratos simples o complejos. En gran medida el tipo de enzimas que poseen condiciona su capacidad para desarrollarse en un determinado sustrato. El *pool* enzimático/las capacidades enzimáticas de los microorganismos varían según el grupo de hongos y el hábitat en el que se desarrollan. La descomposición de sustratos es producto de la actividad enzimática donde los tipos de enzimas requeridas son dependientes del sustrato disponible (Dighton, 2003).

Las enzimas en el suelo son esenciales para la transformación de energía y el ciclaje de nutrientes. La disposición de nitrógeno y fósforo en el suelo regula la producción de enzimas por parte de los microorganismos, esto significa que la síntesis enzimática está regulada por mecanismos de inducción/represión a cargo de sustancias presentes en el suelo (De Vries, 2003).

Las principales enzimas se pueden clasificar en oxidoreductasas como por ejemplo la catalasa, glucosa oxidasa, deshidrogenasa y peroxidasa, las transferasas como la transaminasa e hidrolasas como la celulasa, lipasa,  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa y ureasa (Alef y Nannipieri, 1995; Paul y Clark, 2007). Las enzimas deshidrogenasa,  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa y ureasa son responsables de la liberación de C, P, y N, elementos importantes en la nutrición de las plantas. La

actividad de la deshidrogenasa permite, de manera global, tener una idea de los procesos microbianos que ocurren en el suelo debido a que se encuentran presentes únicamente en sistemas vivos, además, indican la tasa de oxidación de la materia orgánica y las actividades enzimáticas involucradas en el ciclo del carbono. La  $\beta$ -glucosidasa es una enzima que se destaca por su importante papel en la degradación de carbohidratos del suelo; la enzima ureasa, por otro lado, cataliza la conversión de la urea a amonio y dióxido de carbono, en tanto que la fosfatasa está involucrada en el ciclo de P (Gajda y Martyniuk, 2005; Gil-Sostres et al., 2005; Paul y Clark, 2007).

## **Aplicaciones industriales y biotecnológicas**

La producción de enzimas constituye un desafío para la industria biotecnológica actual. A partir de la expansión y diversificación de los mercados de enzimas, los desarrollos biotecnológicos han sustentado esta creciente demanda, generando un interesante incremento en la variedad de enzimas disponibles (Rojas, 2009).

La principal ventaja que nos ofrece la aplicación de enzimas en procesos industriales se basa en su alto grado de especificidad y adaptabilidad, volviendo los procesos más eficientes y menos costosos.

La búsqueda, aislamiento y caracterización de microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes extremos ha recibido gran atención. Estos microorganismos extremófilos son una valiosa fuente de nuevas enzimas (Pilnik y Rombouts, 1979; Sakai et al., 1993).

### ***Proteasas:***

Los hongos filamentosos pueden segregar varias enzimas hidrolíticas y uno de los principales grupos de enzimas secretadas por los hongos son las enzimas proteolíticas comúnmente llamadas proteasas (Guadix et al., 2000). La importancia de las proteasas radica en su gran inclusión en el mercado al constituir uno de los grupos más importantes de las enzimas industriales debido a

que ocupan una posición primaria en el campo comercial, (Kembhavi et al., 1993) ya que pueden ser utilizadas en procesos productivos, como en la industria de los detergentes, alimentaria y del cuero (Smith y Brekke, 1984). Adicionalmente una variedad de proteasas contienen importantes aplicaciones farmacéuticas (Chandrasekaran y Dhar, 1986; Vázquez et al., 2008).

Aunque la mayoría de las proteasas comerciales se originaron a partir de microorganismos que pertenecen al género *Bacillus*, los hongos exhiben una variedad más amplia de proteasas que las bacterias. Además, los hongos son organismos considerados seguros y producen enzimas extracelulares, las cuales son fácilmente recuperables a partir del caldo de fermentación (Sandhya et al., 2005).

### **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.

Muchas bacterias y hongos han desarrollado sistemas para depolimerizar, transportar y metabolizar la quitina. La degradación microbiana de la quitina involucra la actividad de diferentes enzimas (Keyhani, 1996), las cuales podría ser explotadas para producir compuestos derivados de quitina que posean interés comercial. En la actualidad se realizan investigaciones de la aplicación de estos polímeros en la industria y la medicina. Dentro de los usos industriales, la quitina y quitosano han sido empleados en la biorremediación de la contaminación con metales pesados (Cardenas, 2001), en la producción textil y papelera (Shigemasa y Minami, 1996), como aditivos 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 y compuestos antibacterianos (Drozd et al., 2001). Por otra parte, los hongos capaces de producir enzimas quitinolíticas tendrían potencial aplicación como antifúngicos (Fung et al., 2002) y en el control biológico.

### ***Queratinasas:***

Las queratinasas son las enzimas responsables de la degradación de la queratina. Esta es, una escleroproteína altamente resistente y no reactiva químicamente. La queratina posee cisteína, un aminoácido que contiene azufre en su estructura que hace que las cadenas de queratina se encuentren unidas por enlaces bisulfuros (Mark et al., 1988). La queratina se encuentra en la epidermis de la piel de los animales, pelos, uñas, plumas, escamas, espinas, cuernos y pezuñas (Goddard y Michaelis, 1934; Gutcho, 1974; Ulfing y Korczak, 1995).

Algunos hongos son capaces de ejercer la acción de queratólisis, es decir, de destruir y/o descomponer a la queratina. Los más activos en este sentido son los dermatofitos que poseen propiedades queratinolíticas por excelencia (Filipello, 2000; Simpanya, 2000).

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 en la etapa de depilado, disminuyendo los niveles de sulfuro eliminados en los efluentes (Galarza et al., 2002; 2004; Errasti et al., 2017)

### ***Lipasas:***

Las lipasas (triacilglicerolacil hidrolasas), son enzimas con actividad biológica sobre el enlace éster de las moléculas de triacilglicerol presentes en las grasas o en los aceites. Las lipasas son proteínas ubicuas, distribuidas ampliamente en la naturaleza, están presentes en los animales, en las plantas y en los microorganismos, éstos últimos, bacterias y hongos, generalmente, las secretan al medio extracelular facilitando, así, los procesos de extracción y purificación para la industria (Anobom et al., 2014).

Las lipasas son uno de los grupos de enzimas con mayor cantidad de aplicaciones industriales y biotecnológicas: en el procesamiento de alimentos lácteos y aceites, detergentes, cosméticos, cuero, productos farmacéuticos, papel, producción de surfactantes, biodiesel y recientemente como una alternativa promisoría para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con

lípidos (Anobom et al., 2014; Rabbani et al., 2013; Brabcová et al., 2014; Gopinath et al., 2014).

### *Amilasas:*

Las enzimas amilolíticas están distribuidas ampliamente en la naturaleza. Ellas actúan hidrolizando uniones entre residuos de glucosa adyacentes. El tipo de unión hidrolizada, así como el producto final de la hidrólisis, es característico de cada tipo enzima. El término amilasa fue usado originalmente para designar a las enzimas capaces de hidrolizar las uniones glicosídicas del tipo  $\alpha$ -1,4 de amilosa, amilopectina, glucógeno y de sus productos de degradación. Actualmente, las enzimas amilolíticas pueden agruparse según su patrón de hidrólisis en seis diferentes clases (Fogarty y Kelly, 1979; 1980).

Si bien la estructura de la amilosa es preponderantemente lineal, existen evidencias acerca de la existencia de 2 a 8 puntos de ramificación por molécula (Mitchell et al., 1992).

El almidón está compuesto básicamente por dos tipos de polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina. La proporción de cada una de estas especies varía según el origen del almidón. El almidón, es utilizado como fuente de carbono por una gran variedad de microorganismos, ellos lo degradan empleando distintas enzimas que en su conjunto se denominan amilasas. Las enzimas amilolíticas degradan más fácilmente al almidón gelatinizado y, por esta razón los microorganismos crecen mejor sobre almidón gelatinizado como sustrato que con almidón sin gelatinizar (Leloup et al., 1990; Mitchell, et al., 1992).

La primera enzima producida industrialmente fue una amilasa de origen fúngico en 1894, que se utilizó para el tratamiento del sistema digestivo. En la actualidad se encuentran entre las enzimas más importantes y son de gran importancia en la biotecnología actual, ya que representan aproximadamente el 25% del mercado de enzimas, representando un grupo de gran importancia para la industria alimentaria.

Las amilasas pueden obtenerse de varias fuentes, como plantas, animales y microorganismos. Desechos agrícolas como cereales, paja, hojas, salvado, sirven

de sustrato para el cultivo de microorganismos productores de amilasa a bajo costo.

### ***Celulasas:***

La celulosa, el principal polisacárido de la pared celular de las plantas que consiste completamente de glucosa con uniones  $\beta$ -1,4 no ramificada, es la fuente de carbono no fósil más abundante y renovable en la Tierra.

Las celulasas son las enzimas que hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 en la celulosa. Se dividen en tres grupos: exo-1,4- $\beta$ -glucanasas, endo-1,4- $\beta$ -glucanasas y  $\beta$ -glucosidasas (Bhat et al., 1997). Son un grupo complejo de enzimas que son secretadas por hongos, bacterias y actinomicetos. En el entorno natural, las interacciones sinérgicas entre los microorganismos celulolíticos juegan un papel importante en la hidrólisis de materiales poliméricos lignocelulósicos. De hecho, es la acción combinada de tres enzimas principales lo que determina la eficiencia de este proceso. Se utiliza una amplia diversidad de microorganismos para descomponer los materiales de desecho celulósicos en muchos productos útiles (Jungebloud et al., 2007). Cepas fúngicas de varias especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* (Douglas et al., 2018) y *Fusarium* son utilizadas principalmente en la producción de celulasa para diferentes propósitos (Iqbal et al., 2011). La selección de especies fúngicas se basa en varios factores como el tipo de producción de celulasa, las condiciones de optimización fúngica, el sustrato y la caracterización (Malik et al., 2010).

Las celulasas son las segundas enzimas industriales que continúan aumentando con la mayor demanda de diversas aplicaciones industriales, como la industria de detergentes, textil, de procesamiento de papel (Cui et al., 2015; Polizeli et al., 2005), de la alimentación animal y de jugos de frutas, sin embargo, la importancia del etanol lignocelulósico ha llevado a las celulasas a ser el principal foco de interés en investigación entre otras posibles aplicaciones industriales de esta enzima (Sukumaran et al., 2005; Singhania et al., 2010).

# *Objetivos e Hipótesis*



# Objetivos e Hipótesis

---

## Objetivo general

Analizar la diversidad de la comunidad fúngica del suelo de la Reserva de Vida Silvestre Campos del Tuyú y determinar y evaluar el potencial enzimático de las especies más representativas de la microbiota aislada, para su posible aplicación en biotecnología.

## Objetivos específicos

- ❖ Establecer propiedades físico-químicas del suelo de los cangrejales.
- ❖ Aislar e identificar, a los integrantes de la microbiota presente en suelos salino-sódicos de áreas protegidas de la Bahía de Samborombón, Provincia de Buenos Aires.
- ❖ Estimar la diversidad fúngica mediante el cálculo de abundancia, frecuencia de aparición de las distintas especies de hongos e índices de diversidad.
- ❖ Caracterizar molecularmente las especies fúngicas de los cangrejales y preservar las especies aisladas en el Cepario del Instituto Spegazzini (LPSc) cumpliendo, de esta manera, con el art. 9 "conservación ex situ" de la Ley Nacional 24.375 de Diversidad biológica.
- ❖ Determinar las actividades enzimáticas presentes en el suelo, relacionadas con la disponibilidad de nutrientes ( $\beta$ -1,4- endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa) y otras relacionadas con la microbiota del suelo y ciclos biogeoquímicos (como deshidrogenasa, fosfatasa y ureasa).

- ❖ Realizar un perfil preliminar de las capacidades enzimáticas de las especies más abundantes, para establecer roles ecosistémicos de los diferentes componentes de las comunidades fúngicas y de enzimas de interés en biotecnología.

## Hipótesis de Trabajo

La diversidad de los hongos aislados de suelos salino-sódicos de los cangrejales de áreas protegidas de la Bahía de Samborombón, responde a las características del ambiente produciendo enzimas extracelulares específicas que actúan en condiciones extremas de alcalinidad, interviniendo en la descomposición de la materia orgánica, lo que los hace tolerantes al ambiente.

# *Materiales y Métodos*



# Materiales y Métodos

---

## Área de estudio

### Ubicación geográfica

El área de muestreo seleccionada corresponde a un área protegida de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, ubicada en la Bahía Samborombón. Es un paisaje costero que se extiende a lo largo de 150 km sobre la costa occidental del Río de La Plata, desde Punta Piedra ( $35^{\circ} 27'S$ ;  $56^{\circ} 45'O$ ) hasta Punta Rasa ( $36^{\circ} 2'S$ ;  $56^{\circ} 35'O$ ). Abarca en su extensión, una franja terrestre variable de 2 a 23 km de ancho y una porción de aguas someras hasta la isobata de 3,5 m (Volpedo et al 2006), comprende áreas protegidas de diferente categoría, jurisdicción y administración, como son: Refugio de Vida Silvestre Bahía de Samborombón (250.000 ha), Reservas Naturales Provinciales Bahía Samborombón (9311 ha) y Rincón de Ajó (2312 ha), la Reserva Nacional de Punta Rasa (520 ha) y el Parque Nacional Campos del Tuyú (3500 ha).

El Parque Nacional Campos del Tuyú se encuentra comprendido entre las coordenadas  $36^{\circ} 19' - 36^{\circ} 23' S$ , y  $57^{\circ} 50' - 57^{\circ} 55' O$  en el partido de General Lavalle. Comprende una porción costera de la Bahía Samborombón, el límite norte de la unidad de conservación está dado por el Río de la Plata, mientras que su límite oeste corresponde a la Ría de Ajó. Hacia el este está limitada por el Arroyo las Tijeras, y por las Estancias La Linconia y Las Tijeras al sur (Figura 1).

La Fundación Vida Silvestre Argentina (FVSA) creó la Reserva Vida Silvestre Campos del Tuyú en 1979, con el fin de proteger y conservar una población relictual de venados de las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus celer*) y su hábitat asociado. En 2009 la reserva se convirtió en el primer Parque Nacional de la Provincia de Buenos Aires bajo la Ley 26-499. La unidad de conservación Campos del Tuyú se incorpora como área protegida Nacional al conjunto de unidades de conservación de la Provincia de Buenos Aires que interactúan en el paisaje de la Bahía Samborombón (APN, 2014).

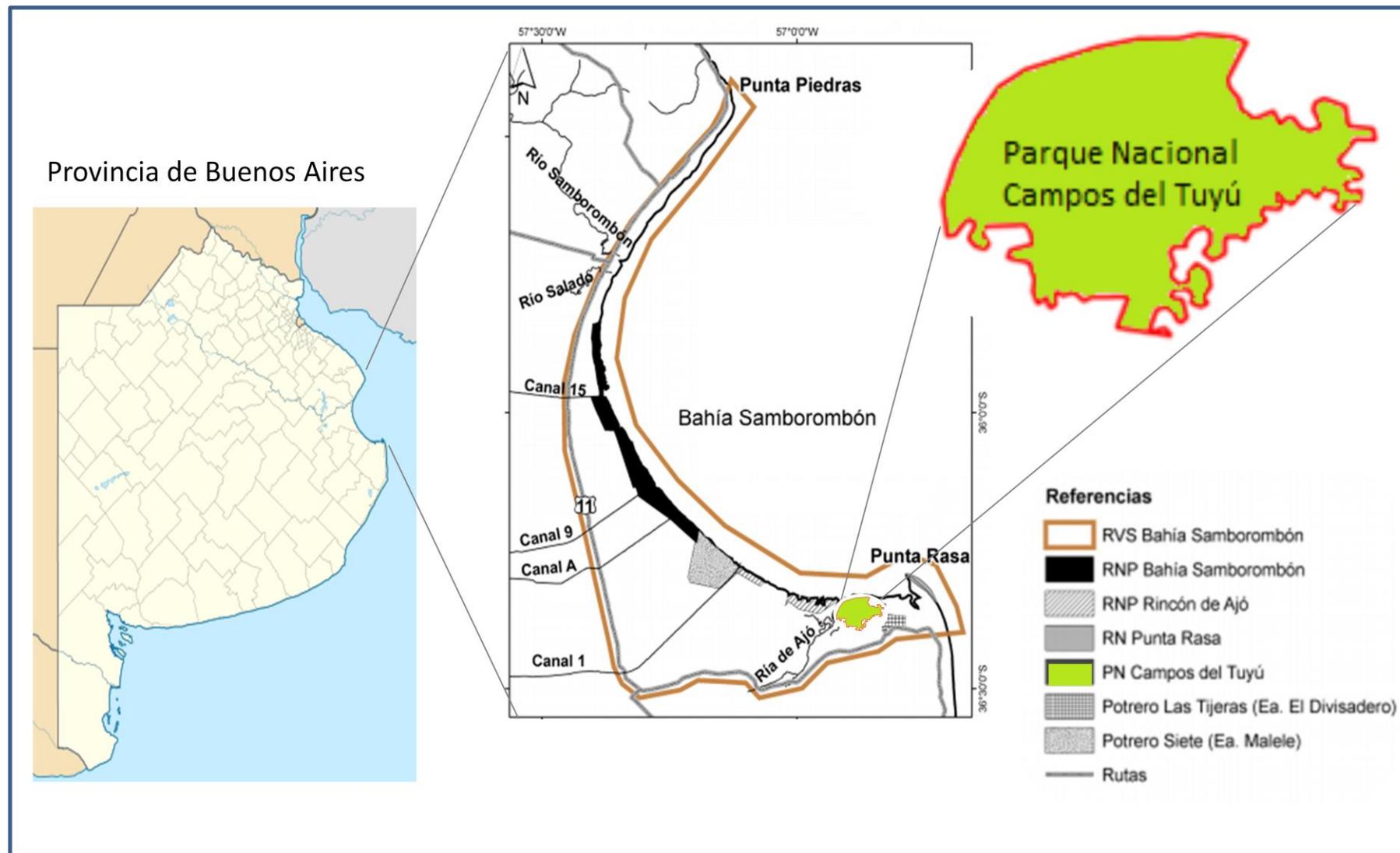


Figura 1. Localización del Refugio de Vida Silvestre Bahía Samborombón comprendida entre la Ruta Provincial N° 11 y la costa, desde Punta Piedras hasta San Clemente del Tuyú, las Reservas Naturales Provinciales Bahía Samborombón y Rincón de Ajó, la Reserva Nacional Punta Rasa y el Parque Nacional Campos del Tuyú.

## Geología y geomorfología

El área en estudio forma parte de una Reserva que está emplazada en el extremo oriental de la Cuenca Sedimentaria del Salado y abarca tierras bajas de menos de 4 m de altura sobre el nivel del mar, con una gran proporción de tierras anegadas y canales de desagüe. La cuenca sedimentaria del Salado se formó hace aproximadamente 140 millones de años (Jurásico-Cretácico) durante los fallamientos que dieron origen al Océano Atlántico (Ewing et al., 1963). Desde entonces estaría sufriendo una serie de subsidencias, registrándose al presente un hundimiento de 4 cm/1000 años (Introcaso y Gerster, 1985). Desde el punto de vista geomorfológico, conforma el límite oriental de la "Pampa deprimida" o "Depresión del Salado", con dos subáreas principales: Los cordones litorales de "conchilla", de origen marino, y la costa "sub-reciente y actual", como planicie aluvial del Río de La Plata cuyas formas características son los "cangrejales". La formación de la Bahía Samborombón estuvo marcada por procesos complejos resultantes del desarrollo simultáneo de una barrera litoral que migró hacia el norte (espiga de Punta Rasa) y cordones de playa que se formaron en el interior de la Bahía, con la rápida colmatación de la zona debido a aportes sedimentarios del Salado y del Río de la Plata (Aldazábal et al., 2002). Esta zona está caracterizada por una alta proporción de suelos halomórficos y deficientes condiciones de drenaje, con pendiente menor al 0,1 %, lo que determina la presencia de ambientes que funcionan a modo de planicies de marea y de otros que permanecen saturados de agua o inundados durante gran parte del año. En estas planicies de marea se destacan paleocostas que datarían del Holoceno Medio (Tricart, 1973), paralelas a la costa actual, de 1-2 m sobre el relieve circundante, y que se encuentran en formas aisladas o formando grupos a modo de barreras litorales y cheniers. Estas crestas de playa están compuestas por abundante cantidad de conchilla (valvas de moluscos) dentro de una matriz areno-limosa, material aportado por la actividad marina y retransportado por la actividad eólica (Giménez-Dixon, 1991).

A partir de la cota de 1,5 m y hacia la línea de costa actual, se encuentra una amplia llanura de marea cursada por numerosos canales e islas, esta área

corresponde a la zona de cangrejales, las cuales pasan por inundaciones periódicas generadas por la acción de las mareas. La napa freática está prácticamente en superficie, afectada directamente por las oscilaciones del nivel del estuario durante las mareas, tormentas y crecidas (Giménez-Dixon, 1991). Aunque la amplitud de las mareas es baja, los vientos, particularmente del sudeste, pueden incrementar su valor hasta 6 veces, inundando gran parte del área. La influencia de las mareas aportando agua salobre y, por otra parte, la de los ríos, canales y arroyos que aportan agua dulce, crean un complejo sistema hidrológico con gran variedad de humedales sujeto a pulsaciones según la interacción de los factores antes mencionados.

## Clima

El clima es templado húmedo, con precipitaciones de 1000 mm anuales, y temperatura media anual de 15 °C, con máximas de 40 °C y mínimas de 4 °C. La temperatura media de verano es de 21 °C mientras que en invierno es de 9 °C. Se lo considera un clima oceánico, con inviernos relativamente suaves, si bien las temperaturas medias mínimas de los meses más fríos no descienden por debajo de los 0°C, suelen producirse heladas entre abril y octubre. Los vientos predominantes son del este, con velocidades medias que oscilan entre 11 y 16 km/h. Las precipitaciones se producen durante todo el año, aunque son característicos dos períodos de lluvias, el primero y más importante se produce durante marzo y abril, mientras que el segundo se produce entre octubre y noviembre. Los mínimos más importantes se producen uno a fines del invierno y otro en enero; este último coincide con las máximas temperaturas anuales, siendo el que más influye sobre el desarrollo de las comunidades vegetales (Vervoost, 1967). Las abundantes lluvias de otoño e invierno son causantes, de grandes inundaciones en la región.

## Suelo

Los suelos presentes en las zonas bajas (cangrejales y depresiones inundables) son de tipo aluvial, sódico salinos, "humic gley" y semipantanosos de textura arcillosas (Figura 2), mal drenados (Figura 3), con permeabilidad lenta,

elevada proporción de salinidad y alcalinidad. Son de escasa o nula utilidad agropecuaria (Capacidad de Uso VII ws. y VIII ws.). Las zonas altas correspondientes a conformaciones de conchillas, poseen suelos de tipo Rendzina, arenosos, bien drenados, permeables, ricos en calcio por el aporte de la conchilla, con bajos tenores de alcalinidad y salinidad (Fidalgo et al., 1973; Sanchez et al., 1976).



Figura 2. Suelos de textura arcillosa



Figura 3. Suelos mal drenados.

## Vegetación

El Parque Nacional Campos del Tuyú se encuentra dentro del Distrito Oriental de la Provincia Fitogeografía Pampeana (Cabrera, 1971). Las comunidades vegetales presentes en la Reserva son comunidades edáficas, es decir que responden las características del suelo (Vervoost, 1967). Dadas las condiciones extremas de existencia a las que son sometidas las especies, sufriendo inundaciones, y soportando una alta salinidad, las comunidades de la Reserva se caracterizan por una escasa riqueza específica y una reducida estratificación (Cagnoni y Faggi, 1993). A excepción de los pastos que crecen entre los talaes, y los pastizales de *Paspalum*, los cuales representan el 1% de la superficie de la reserva, los pastos presentes en la reserva son en su mayor parte duros y de escaso valor forrajero. La comunidad dominante en el área son los amplios espartillares de *Spartina densiflora* Brongn, que cubren casi el 50 % de la Reserva (Figura 4). Están presentes en suelos muy arcillosos y húmedos, suelen alcanzar alturas de hasta 1 m. Otra comunidad presente en esta área es la de los pastizales de *Spartina alterniflora* Loisel (espartillo de cangrejal), los cuales se extienden sobre la costa de la Bahía Samborombón (APN, 2008). Esta formación es sumamente homogénea y monoespecífica, presentándose, al igual que los pastizales de *Salicornia* (*Salicornia ambigua* L.), en áreas inundadas y salinas, al borde de ríos, canales y arroyos, donde otras especies no pueden prosperar (Giménez-Dixon, 1991).

En las zonas de tierras más altas, en suelos secos y profundos con conchilla y horizontes superficiales arenosos, está presente una comunidad de bosque xeromórfico subclimático (Cabrera y Zardini, 1978), comúnmente denominado "talar" donde predomina el tala (*Celtis tala* Gillet ex Planchon) y el coronillo (*Scutia buxifolia* Reiss), con un estrato arbustivo formado por *Jodina rhombifolia* (Hook. y Arn.) Reissek sombra de toro, y duraznillo negro (*Cestrum parquii* Saponins), y algunas enredaderas como *Passiflora caerulea* L. Los talaes son formaciones boscosas discontinuas de poca extensión, que ocupan menos del 1 % de la superficie de la Reserva.

En las áreas más altas, con un buen desarrollo de la capa de humus y sustrato de arena existe un estrato herbáceo dominado por cebadilla (*Bromus*

*unioloides* H.B.K.), ray grass (*Lolium* sp.), pasto miel (*Paspalum dilatatum* Poir), trébol de olor (*Melilotus officinalis* (L) Pally M. *albinus* Medik.), trébol (*Trifolium* sp.) y gramillón (*Sternotaphylum secundatum*).



Figura 4. Comunidad vegetal típica de cangrejales.

## Sitios de Muestreo

Los sitios de muestreo corresponden a tres cangrejales del Parque Nacional Campos del Tuyú: Cangrejal 1 (S1) "Entrada al parque" ( $36^{\circ} 21' 46,60''$  S  $56^{\circ} 50' 98''$  O), (Figura 5), cangrejal 2 (S2) "Camino al monte de la mira" ( $36^{\circ} 21' 10,50''$  S  $56^{\circ} 51' 17,97''$  O), (Figura 6) y cangrejal 3 (S3) "Camino al monte de los perros" ( $36^{\circ} 21' 33,47''$  S  $56^{\circ} 50' 59,14''$  O), (Figura 7).

La elección de estos sitios de muestreo se realizó en base su accesibilidad durante todo el año, ya que se trata de un ambiente con suelos caracterizados por períodos de anegamiento.



Figura 5. Sitio de muestreo 1 (S1) "Entrada al Parque"



Figura 6. Sitio 2 (S2) "Monte de la mira"



Figura 7. Sitio de muestreo 3 (S3) "Monte de los perros"

# Caracterización fisicoquímica del suelo

## Toma y acondicionamiento de las muestras

Se recolectaron muestras de suelo superficiales (2-15 cm) de los tres sitios de muestreo, por cada campaña estacional se obtuvieron un total de 15 muestras, correspondientes cinco submuestras de cada sitio.

Los parámetros fisicoquímicos se determinaron a partir de las muestras de suelo obtenidas en cada muestreo estacional, las cuales se mezclaron para obtener muestras compuestas y posteriormente realizar un análisis comparativo entre sitios y entre años. Sub-muestras del último año de muestreo fueron analizadas estacionalmente, sin tener en cuenta los sitios de estudio.

Se pesaron, 5 g de suelo de cada sitio para la determinación de su contenido hídrico, el resto de las muestras fueron secadas en estufa a 40°C hasta peso constante, se desagregaron y tamizaron por una malla de 2 mm (Figura 8), para luego realizar las determinaciones fisicoquímicas.



Figura 8. Molido y tamizado de suelo.

## Determinaciones analíticas de los parámetros fisicoquímicos

### *Humedad*

El contenido de humedad (%) de las muestras de suelo se calculó como la diferencia entre 1 g de suelo fresco y su peso luego de secarlo en estufa a 60 °C

hasta peso constante. El porcentaje de humedad se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad} = \frac{\text{peso fresco} - \text{peso seco}}{\text{peso fresco}} * 100$$

### ***Textura***

La textura del suelo se determinó por el método de Bouyoucos (1961): se pesaron 50 g de suelo seco, en erlenmeyer se les adicionó 10 ml de dispersante (NaOH), se dejó reposar durante unos minutos y luego se agitó por 5 minutos. La suspensión del suelo se vertió en el cilindro de 1000 ml, con agua destilada hasta llevar el nivel del agua a la marca inferior del cilindro con el hidrómetro dentro, se agitó vigorosamente y sumergió el hidrómetro a los 40 segundos para tomar la lectura del hidrómetro y la temperatura, sin perturbar la solución. Las lecturas se repitieron luego de 2 hs. Las clases texturales del suelo se analizaron con el diagrama triangular de las clases texturales básicas del suelo según el tamaño de las partículas, de acuerdo con el USDA (1954).

### ***Obtención de la pasta de suelo (PS) y su extracto de saturación (EPS)***

A una alícuota de 12 g de suelo seco se le adicionó agua destilada y se obtuvo una PS (1:2,5), caracterizada con un brillo metálico en ausencia de agua libre. Trascorridas 24 hs de reposo a temperatura ambiente, la pasta se filtró utilizando un embudo Büchner con papel de filtro Whatman n° 40 y se colectó la fase acuosa (EPS) que se conservó a 4 °C (Figura 9).



Figura 9. Obtención de los extractos de saturación de suelo.

### ***Sodio (Na), Potasio (K); Calcio y Magnesio (Ca<sup>2+</sup> +Mg<sup>2+</sup>)***

Se determinó el contenido de Na y K presentes en el EPS correspondientes a las muestras de suelo usando un fotómetro de llama (ZF 250 Zeltec ®) (Figura 10); el contenido de Ca y Mg mediante complejometría con EDTA 0,02 N (SAGyP/AACS, 2013). Los datos obtenidos fueron expresados como g/Kg de suelo seco, excepto para el Na que fue expresado como mg/Kg de suelo seco.



Figura 10. Espectro de llama para medición de Na y K.

### ***Cálculo de la Relación de Adsorción de Sodio (RAS)***

Se midió analizando la concentración de estos tres iones (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) en el EPS y utilizando la siguiente ecuación:

$$RAS = \frac{Na^+}{\sqrt{\frac{Ca^{++} + Mg^{++}}{2}}}$$

Los datos obtenidos se expresaron en (mmolL<sup>-1</sup>)<sup>1/2</sup>

### ***pH actual (pH<sub>a</sub>)***

El  $pH_a$  se determinó a partir de la Pasta de Suelo (PS) de las muestras utilizando un Benchtop pH/mv meter (Sper Scientific).

### ***Conductividad eléctrica (CE)***

Se determinó la CE en el EPS de las muestras de suelo utilizando un Benchtop pH/mv meter (Sper Scientific). Los datos obtenidos se expresaron como  $mS/m^{-1}$ .

### ***Materia orgánica (MO) y ceniza***

El contenido porcentual de materia orgánica y cenizas se determinó calcinando una muestra de 5 g de materia seca (5g) en mufla a  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  (PROMAR, 1991) (Figura 11).



Figura 11. Calcinación del suelo en mufla.

### ***Carbono orgánico total (COT)***

El contenido porcentual de COT se determinó siguiendo el método de Walkley & Black (IRAM-SAGPyA 29571-2, 2011). Para ello, una alícuota de 0,2 g de muestra seca se sometió a un tratamiento con 5 ml de  $K_2Cr_2O_7$  1 N y 10 ml de  $H_2SO_4$ . La mezcla resultante se mantuvo en reposo durante 30 min a temperatura

ambiente y luego, se llevó a un volumen final de 15 ml con agua destilada. Posteriormente, se transfirieron 10 ml de la solución a un erlenmeyer al cual se le adicionó 1ml de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , unas gotas de difenilamina (indicador) y se valoró el exceso de dicromato utilizando una solución de sal de Mohr.

### *Nitrógeno total (NT)*

El contenido porcentual de NT fue determinado por el procedimiento micro-Kjeldahl (PROMAR, 1991). Se fraccionó 0,1 g de muestra seca en un tubo al que se le adicionó 0,3 ml de agua destilada, 0,2 g de mezcla catalítica y 0,5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (98 %). Se colocó el tubo en un digestor a 100 °C durante 3 min, hasta que la mezcla resultante adquirió color verde pálido (indicativo de la total conversión del nitrógeno orgánico a  $\text{NH}_4\text{SO}_3$ ). Posteriormente, toda la mezcla de reacción se llevó a volumen con agua destilada y una alícuota se destiló por vapor de arrastre sobre  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , para finalmente valorarse con 0,1 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Figura 12).

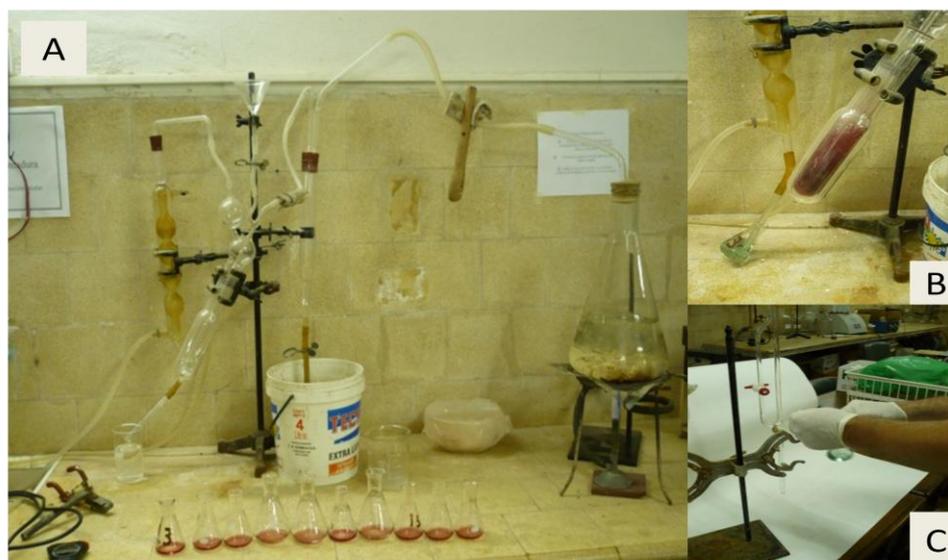


Figura 12. Determinación de Nitrógeno total. A) Microkjedahl, B) Destilación de  $\text{NH}_3$  por arrastre de vapor, C) Titulación con Ácido sulfúrico.

### *Fósforo total (PT)*

El contenido de PT se determinó siguiendo el método de amarillo vanadato-molibdato, (Chapman y Pratt, 1973), usando como estándar una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50 ppm). Para ello, a partir de una alícuota de ceniza (0,2 g) derivada de una muestra seca de suelo se llevó a cabo una digestión con  $\text{HNO}_3$  0,2 N a temperatura ambiente, llevando la mezcla resultante a un volumen final de 50 ml con agua destilada (Figura 13). Posteriormente, utilizando una alícuota de esta solución se llevó a cabo una reacción con molibdato de amonio-vanadato de amonio durante 30 min a temperatura ambiente (Figura 14). Al final de la reacción, se midió la absorbancia de la mezcla a 470 nm usando un espectrofotómetro Metrolab (225 BD UV vis). El contenido de FT fue expresado como g/kg de peso seco de suelo.



Figura 13. Digestión de cenizas de suelo con  $\text{HNO}_3$  0,2 N

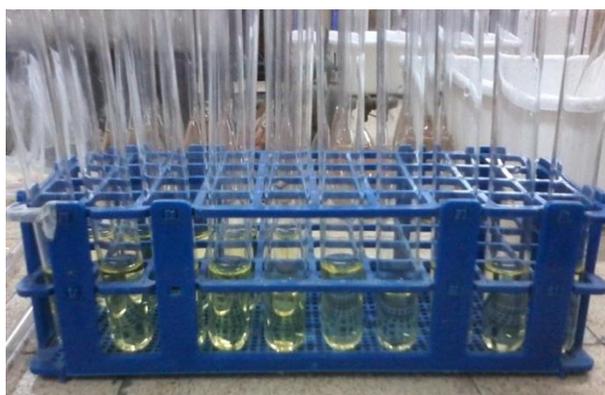


Figura 14. Reacción con molibdato de amonio-vanadato de amonio durante 30 min a temperatura ambiente.

## Análisis de los datos

A través de una prueba t-Student se compararon los dos años de muestreo y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para los sitios de muestreo sobre las variables Materia orgánica (MO), Carbono orgánico (COT), Nitrógeno total (NT), Relación C/N, Fosforo total (PT), Potasio (K), Sodio (Na), Calcio y Magnesio ( $\text{Ca}^{+2}+\text{Mg}^{+2}$ ), RAS (Relación de adsorción de Sodio), pH y Conductividad eléctrica (CE) y test de tukey para las variables significativas. Para el análisis estacional se realizó un ANOVA sobre las mismas variables fisicoquímicas y test de tukey para las variables significativas.

Las texturas de los suelos estudiados se determinaron usando el diagrama triangular de las clases texturales básicas del suelo según el tamaño de las partículas, de acuerdo con el USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) (Anexo 1)

El suelo se clasificó según Agriculture Handbook, USSLS (1954) teniendo en cuenta Conductividad eléctrica (CE), Relación de adsorción de sodio (RAS) y pH.

Para la clasificación de Nitrógeno total (NT), Carbono orgánico (CO), Materia orgánica (MO), Fósforo total (PT) y rangos de clasificación del pH se usaron tablas de clasificación (Anexo 1) aportadas por la Cátedra de Edafología de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP).

## Diversidad de los hongos aislados de los suelos salinos-sódicos

### Toma y acondicionamiento de las muestras de suelo

Se realizaron muestreos estacionales durante dos años correspondientes a los periodos 2015-2016 y 2016-2017 en tres cangrejales que conformaron los sitios de muestreo. Se recolectaron 5 submuestras (A, B, C, D, E) de suelo del horizonte superficial (2-15 cm), utilizando el método de muestras compuestas al azar (Dick et al., 1996), obteniéndose un total de 15 muestras en cada muestreo estacional, las cuales se conservaron en bolsas de plástico a 4°C hasta su uso (Figura 15).



Figura 15. A) Obtención de las muestras de suelos. B) Conservación de las muestras en bolsas de plástico.

### **Aislamiento y caracterización taxonómica/morfológica de especies fúngicas**

Para el aislamiento de hongos a partir de suelo se utilizó el método de lavado de suelo de Parkinson y Williams (1961). Para ello se dispusieron dos tamices, uno con abertura de malla de 700  $\mu\text{m}$  y el otro con una abertura de 250  $\mu\text{m}$ , se dispuso el primero sobre el segundo de manera tal de conservar las partículas de suelo retenidas entre los tamices, es decir la fracción de suelo comprendida entre 700 y 200  $\mu\text{m}$ . Luego se realizó una serie de lavados de los suelos para eliminar posibles esporas de hongos y permitir que las colonias que se desarrollen provengan de hifas en activo crecimiento; las partículas de suelo lavadas se filtraron por presión de vacío utilizando discos papeles de filtro estériles y luego se dejaron secar dentro de capsulas de Petri tapadas a temperatura ambiente durante 24 hs (Figura 16). Siguiendo el método de Widden y Parkinson (1973), para cada muestra se sembraron 100 partículas en placas de Petri a razón de 5 partículas por caja. El medio de cultivo empleado fue corn meal agar glucosado (CMyG) con el agregado de una solución de 0,5 % (p/v) de sulfato de estreptomicina y 0,25 % (p/v) de cloranfenicol (Anexo 2). Las placas se incubaron

a 25°C y se observaron en microscopio óptico. Las especies presentes en las partículas de suelo fueron identificadas taxonómicamente según Ellis (1971); Carmichael et al. (1980); Domsch et al. (1980); Ramírez y Martínez (1982) (Figura 17).

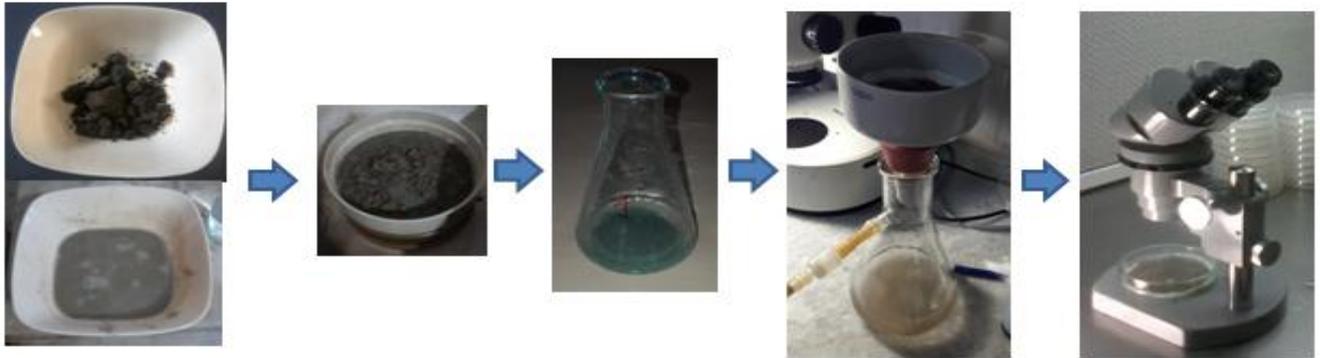


Figura 16. Lavado de suelo y sembrado de partículas.



Figura 17. Aislamiento, purificación, determinación y conservación de especies fúngicas.

## **Determinación molecular de cepas fúngicas seleccionadas y micelios estériles**

En los casos en los que la identificación morfológica no fue suficiente para la identificación de las especies, los aislamientos se corroboraron molecularmente mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y cebadores para regiones conservadas. Los análisis correspondientes se realizaron en BIOLAB, Facultad de Agronomía de Azul-Azul, Prov. de Buenos Aires.

### ***Cultivos monospóricos***

La obtención de los cultivos monospóricos de los aislamientos fúngicos, se llevó a cabo partiendo de una suspensión de conidios, provenientes de un cultivo puro de cada cepa, en 2 ml de agua estéril. De dicha suspensión, se tomaron 100  $\mu$ l, las cuales, se sembraron en superficie en placas de Petri con medio de cultivo APG al 2%. Se incubaron en estufa a 25°C con alternancia 12hs luz/oscuridad. Luego de transcurridos 2 días en las condiciones antes citadas, se procedió al traspaso de las colonias iniciadas de una espora a otra caja de Petri con medio de cultivo APG 2%.

### ***Obtención de ADN genómico total***

Para la obtención del ADN puro se cultivaron entre 5 y 8 cajas de cada aislamiento en placas de Petri con APG 2% y se incubaron en una cámara de cultivo para hongos durante 7 días a  $22 \pm 2$  °C. El ADN fue extraído utilizando el protocolo de bromuro de cetil trimetil bromuro de amonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1990) modificado por Stenglein y Balatti (2006). Esta técnica se inicia raspando el micelio aéreo proveniente de 2 a 5 cajas de Petri (dependiendo del crecimiento miceliar) con un bisturí previamente lavado con alcohol 70% y flameado en mechero. Se colocó en un mortero estéril con nitrógeno líquido y se molió rápidamente. Una vez molido el micelio, se añadió 800  $\mu$ l de 'buffer' (100 mM Tris-HCl + 20 mM EDTA + 1,4 M NaCl + 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol) al cual se le adicionó 200  $\mu$ l de CTAB al 10% + 1% polivinil-pirrolidona (PVP) y finalmente se lo trituró.

El micelio triturado se colocó en tubos Eppendorf estériles de 2 ml, que se incubaron 30 minutos a 60°C en un termobloque seco (Major Science CO., LTD). Posteriormente, se lavó con cloroformo isoamilalcohol (12:1) ( $\pm$  600  $\mu$ l), se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos a 14.000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf estéril de 2 ml, al cual se le agregó 2/3 de volumen de isopropanol frío (aprox. 500-600  $\mu$ l) y se lo colocó en el freezer -20°C para que precipite el ADN durante toda la noche. El ADN precipitado se centrifugó durante 7-10 minutos a 14.000 rpm y se lavó el 'pellet' con etanol al 75% - acetato de amonio 10 mM (200-400  $\mu$ l). Se golpeó suavemente para facilitar el desprendimiento del 'pellet' y se centrifugó de 5-10 minutos a 14.000 rpm. La fase

líquida se descartó y el 'pellet' se lavó con etanol frío 70% (200-300 µl). Se centrifugó nuevamente 1-5 minutos a 14.000 rpm, se secó el 'pellet' y se resuspendió en 150 µl de 'buffer' TE (10 mM Tris-HCl pH 8 + 1 mM EDTA pH 8). Se lo dejó durante 1 h a 37°C y se lo colocó en el freezer a -20°C. Para comprobar la calidad del ADN extraído, se realizaron corridas electroforéticas del ADN extraído en geles de agarosa al 0,8% conteniendo 4 µl de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA) en 'buffer' TBE 1X (90 mM Tris-borato + 1 mM EDTA). Las corridas electroforéticas se realizaron a una corriente de 80 voltios durante 2 h. La visualización del ADN se realizó por medio de irradiación con luz UV. Los geles se documentaron digitalmente (DOC-6490, Biodynamics S.R.L, Buenos Aires, Argentina).

### ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)***

Posteriormente se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores para regiones conservadas (Tabla 1) para su posterior secuenciación, en el caso de *Acremonium* sp. se usó la región 28S del gen nuclear de ARNr y los dominios D1 / D2, se amplificaron respectivamente con los pares de cebadores NL1 / NL4, siguiendo los protocolos de Cano et al. (2004) y Gilgado et al. (2005). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo 10-20 ng de ADN genómico, 'buffer' de reacción 10X (20 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM KCL, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0,5% Tween 20® y 0,5% Nonidet P40®), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada cebador, 1,25 unidades de *Taq* polimerasa (InbioHigway, Tandil), 10% de solución de Cresol Red (Sigma-Aldrich Co. St Louis, MO), 0,05% Tween 20®, 0,05% Nonidet P40® y agua destilada estéril hasta completar el volumen final. El termociclador (XP Termal Cyler, Bioer Technology Co, LTD) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos. Luego, 29 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 30 segundos, apareamiento a la temperatura descrita para cada par de cebadores (Tabla 1) por 30 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos, la reacción se finalizó con 2 minutos de extensión final a 72°C. Posteriormente, los productos de PCR obtenidos se sembraron en geles de

agarosa al 1,5% con 4 µl de GelRed™ (Biotium, Hayward, CA, USA). Los geles fueron inmersos en 'buffer' TBE 1X (90 mM Tris-borato + 1 mM EDTA) y posteriormente la visualización de los fragmentos se realizó por irradiación con luz UV.

Los fragmentos correspondientes a cada aislamiento fueron purificados con el kit de purificación GeneJet PCR purification kit de ThermoScientific. Posteriormente, los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación CERELA-CONICET. Las secuencias se compararon con la base de datos NCBI utilizando BLASTN (Altschul *et al.*, 1990).

Tabla 1: Cebadores para las regiones conservadas

Cebadores	SECUENCIA	T°DE MELTIN	FUENTE
<b>ITS 4</b>	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'	55°C	White <i>et al.</i> , 1990
<b>ITS 5</b>	5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3'	55°C	White <i>et al.</i> , 1990
<b>ITS1F</b>	5' CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A 3'	51°C	White <i>et al.</i> , 1990
<b>NL1</b>	5' GAC TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3'	52°C	Cano <i>et al.</i> , 2004
<b>NL4</b>	5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG 3'	52°C	Gilgado <i>et al.</i> , 2005

## Conservación de las cepas fúngicas

Las especies fúngicas aisladas de los cangrejales y caracterizadas taxonómicamente, tanto a través de métodos morfológicos clásicos como de análisis moleculares, fueron preservadas en el Cepario del Instituto Spegazzini (LPSc) cumpliendo, de esta manera, con el art. 9 "conservación ex situ" de la Ley Nacional 24.375 de Diversidad Biológica.

Las cepas aisladas de las partículas de suelo, se repicaron en cajas con APG y se conservaron inmediatamente luego de su identificación taxonómica con el fin de garantizar su viabilidad, pureza y estabilidad, para su exitosa conservación.

Las formas en que se encuentran conservadas las cepas fungicas en el Cepario Spegazzini (LPSC) son: En tubos de ensayo conteniendo diferentes medios agraizados por ejemplo agar papa dextrosa (APG), agar extracto de malta (ME), corn meal glucosa (CMyG) (Anexo 2) sembradas en estrías para su almacenamiento a 4°C. Este tipo de conservación en medio solido es de corto plazo, ya que las cepas consumen el medio en un plazo promedio de un año, por otro lado muchas cepas se pueden conservar en papel de filtro o agua destilada, lo que favorece la disminución de recursos destinados a su conservación, ya que no se necesitan medios de cultivos y requieren poco espacio de guardado.

La conservación en aceite mineral, asegura que las cepas se preserven bajo estas condiciones aproximadamente 30 años y se pueden conservar a temperatura ambiente.

Finalmente, el método que es más utilizado debido a sus buenos resultados en la conservación a largo plazo es el liofilizado, que consiste en la deshidratación en frío de las cepas fúngicas, este método asegura una conservación promedio de 40 años de las especies bajo esta condición.

## **Análisis de los datos**

Se calcularon las frecuencias de aparición de las diferentes especies fúngicas ( $n^\circ$  de partículas donde crece la especie  $x$  /  $n^\circ$  de partículas totales  $x$  100) (Godeas 1983). Las diferentes especies taxonómicamente determinadas y sus frecuencias de aparición fueron utilizadas para calcular el índice de Diversidad de Shannon- Weiner ( $H'$ ); la Riqueza específica ( $S$ ) y Equitabilidad ( $J'$ ) (Magurran, 1988).

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

Donde  $p_i$  es la probabilidad de encontrar cada especie  $i$  en una muestra.  $S$  es el número de especies diferentes registradas en las muestras.

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

$$J' = \frac{H'}{\log_2 S}$$

De la segunda ecuación se deduce

$$H' = J' * (\log_2 * S)$$

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.

Los índices de Diversidad ( $H'$ ); Riqueza específica ( $S$ ) y Equitabilidad ( $J'$ ) fueron analizadas estadísticamente utilizando un ANOVA bifactorial y test a posteriori Tukey para comparar estas variables en función de las estaciones y los años de muestreo.

Para el análisis estadístico de porcentaje de partículas colonizadas en cada sitio y en cada estación durante los dos años de muestreo, se realizó un ANOVA multifactorial y test de Tukey para las variables significativas.

Los análisis de ANOVA y Tukey se realizaron usando InfoStat versión 2008 en todos los casos.

Mediante el empleo de un análisis de componentes principales (PCA) (Digby y Kempton, 1987) se evaluaron las diferencias de composición de las comunidades fúngicas de cada sitio frente a las estaciones en la que fueron aisladas (invierno, primavera, verano, otoño) para cada año. Este análisis multivariado permite una representación de estas muestras a través de su ordenamiento sobre ejes sucesivos, por lo tanto, sólo se analizaron los ejes sobre los que se observaron tendencias consistentes de variación entre las diferentes muestras. El programa MVSP 3.1 (Program Multi-Variate Statilcal Package) (Kovach, 1999).

## Determinación de capacidades enzimáticas

### Actividad enzimática en suelo

Para una evaluación de la presencia de enzimas asociadas a la dinámica de nutrientes presentes en el suelo del cangrejal, se determinaron las siguientes actividades enzimáticas: *deshidrogenasa*, *fosfatasa*, *ureasa* y *carboxilasa*. Dichas actividades se detectaron para cada sitio de estudio a partir de suelo correspondiente al último período de muestreo en el mes de mayo. Las muestras fueron tomadas de la superficie (2-15 cm) del suelo de los tres cangrejales de estudio durante el otoño y se conservaron a 4°C en bolsas plásticas y hasta un máximo de 15 días de almacenamiento.

### Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa de suelo se determinó por reducción de TTC (2, 3, 5 cloruro de tetrazoilo) a TPF (Trifenil formazán) siguiendo el método de Thalma (1968) modificado. Se peso a partir de cada muestra, 2 g de suelo en tubos de plástico y se adicionó 2 ml de TTC al 5%. En paralelo se dispuso como control suelo con buffer tris. Las suspensiones se agitaron en vórtex y se incubaron a 30°C durante 24 hs en oscuridad. Para detener la reacción y extraer el TPF, se agregó 5 ml de alcohol etílico. Los tubos fueron envueltos con papel de aluminio y se agitaron en posición horizontal durante 30 min a 150 rpm. Luego se centrifugo a 350 rpm a 4°C y el sobrenadante obtenido se cuantifico por espectrometría a 546 nm. Los resultados fueron expresados en µg TPF/g (Figura 18)



Figura 18. Determinación de actividad deshidrogenasa

### *Actividad fosfatasa*

La actividad fosfatasa de suelo se determinó mediante p-nitrofenol liberado en la incubación del suelo con una solución buffer Hexahidrato de sal disódica de 4-nitrofenil fosfato, según la metodología de Eivazi y Tabatabai (1977) modificado (Figura 19). Se pesó a partir de cada muestra, 0,25 g de suelo húmedo, en tubos de plástico y se adiciono 1 ml de buffer MUB a pH11 (12,1g Tris, 11, 6 g Acido málico, 14 g ácido cítrico y 6,3 g ácido bórico en 488 ml de NaOH 1N, llevar 1L con agua destilada) y 0,25 ml de solución de pNPP 0,05 M. En paralelo se dispuso como control suelo con buffer. Las suspensiones se agitaron en vórtex y se incubaron a 37° C durante 1h en baño de agua estático. Para detener la reacción se agregó 0,25 ml  $\text{CaCl}_2$  y 15 minutos después se agregó NaOH y al blanco se le agrego 0,25 ml de solución de pNPP a 0,05M. Luego se centrifugó a 3500 rpm y el sobrenadante obtenido se cuantificó por espectro a 400 nm. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g}$  pNP/g.

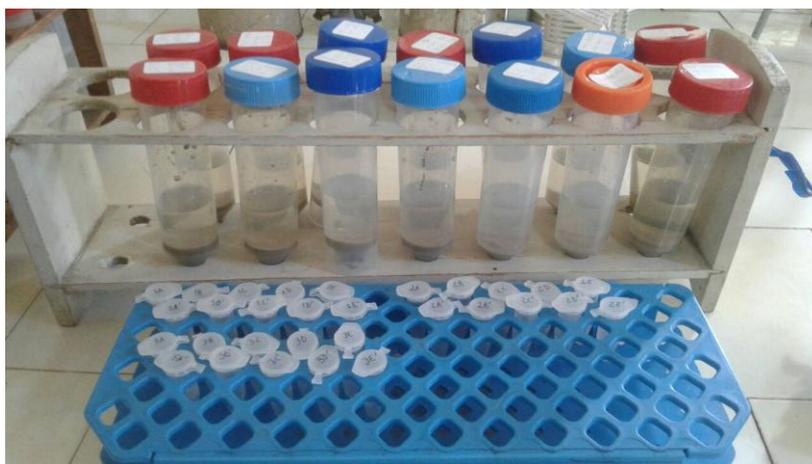


Figura 19. Determinación de la actividad fosfatasa.

### *Actividad ureasa*

La actividad ureasa se determinó el amonio liberado después de la incubación de suelo con una disolución de urea según Kandeler y Gerber (1988) modificado. Se pesó a partir de cada muestra, 2 g de suelo fresco en erlenmeyer con 8 ml de solución tampón y 2 ml de solución de urea al 6,4 %. En paralelo se dispuso como control suelo con solución tampón y agua destilada. Se taparon e incubaron a 37°C en agitación vaivén durante 90 minutos. Luego se agregaron 10 ml de CIK 2 M y se volvieron a tapar y agitar por 30 minutos. Se centrifugó a 11000 rpm durante 5 minutos. El contenido de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  se determinó por el método de King et al. (1990).

### *Actividad celulolítica*

La actividad celulolítica se determinó por reducción de azúcares luego de la incubación de suelo con CMC (carboximetilcelulosa) siguiendo el método de Schinner y Von Mersi (1990) modificado (Figura 20). A partir de cada muestra, se pesaron 10 g de suelo, se colocaron en Erlenmeyers y se adicionó 15 ml de buffer acetato y 15 ml de solución CMC, se tapó. Las suspensiones se filtraron y se incubaron a 50°C durante 24 hs. En paralelo se dispuso como control suelo con buffer acetato al que se le agregó el CMC luego de filtrado e incubado. Los azúcares reductores libres se determinaron por el método de Somogyi-Nelson

(Somogyi, 1945). La reacción colorimétrica se llevó a cabo en tubos de ensayo conteniendo 200  $\mu$ l de muestra y 200  $\mu$ l de reactivo Somogyi, los cuales fueron sumergidos en baño a 100 °C por 10 min. Se dejó enfriar y se adicionó 200  $\mu$ l del reactivo de Nelson y 2,4 ml de agua destilada. La lectura se realizó a 540 nm un espectrofotómetro (UV 160-A Shimadzu). Se empleó como estándar una solución 10 mM de glucosa.



Figura 20. Determinación actividad celulasa

## **Análisis de los datos**

Se analizó cada actividad enzimática estudiada en función de cada sitio de estudio realizando un ANOVA y test de Tukey para las variables significativas. InfoStat versión 2008.

## **Actividad enzimática de cepas fúngicas: Screening enzimático en medio sólido**

### ***Elección de cepas fúngicas y preparación de los inóculos***

Las cepas fúngicas aisladas de suelo fueron seleccionadas para la realización del screening enzimático en base a la frecuencia de aparición de las especies, siendo las más frecuentes las elegidas para la realización de dicho análisis. Para la obtención de los inóculos se sembraron las cepas seleccionadas en medio agarizado APG y se dejaron crecer en oscuridad a 26°C durante 7 días,

el inóculo consistió en discos de 7 mm de diámetro tomados de la zona de crecimiento activo de la colonia.

### *Preparación de medios agarizados específicos*

Las actividades lipolítica, proteolítica, amilolítica, celulolítica y quitinolítica fueron determinadas mediante test en placa, en medios agarizados con sustratos específicos: tween 20, caseína, almidón, carboximetilcelulosa y Chitin Azure respectivamente (Anexo 1). Para cada especie probada se sembró un disco de agar conteniendo el micelio en crecimiento activo (Figura 21). Este procedimiento se realizó en cada uno de los medios agarizados (sustratos específicos) y a tres pH (5, 8, 10) ajustados con distintos buffers (Anexo 3), según la metodología de Nagai et al. (1985). Se realizaron tres repeticiones para cada tratamiento. Las placas se incubaron en oscuridad a 26°C durante 8 días en todos los casos. Las placas con Chitin Azure como sustrato, se realizaron a pH 7, tres replicas por cada cepa fúngica, las cuales se incubaron a 26°C en oscuridad por 20 días. Se realizaron mediciones de las colonias cada 48 hs para determinar el crecimiento fúngico en los distintos medios y a los distintos pH.



Figura 21. Sembrado de discos de agar con micelio fúngico en medios específicos para determinar actividad enzimática a tres pH distintos.

Para determinar las actividades enzimáticas se visualizó la presencia o ausencia de un halo alrededor de la colonia fúngica. La actividad lipolítica positiva se visualizó como un halo opaco debido a la precipitación de la sal cálcica del ácido graso, alrededor de la colonia, la actividad proteolítica positiva se observó como un halo transparente, a consecuencia de la degradación de la caseína (Koneman y Roberts, 1987) y la actividad quitinolítica también mostró un

halo transparente cuando Chitin Azure fue depolimerizado por la actividad enzimática del hongo (Howard et al., 2003).

Las actividades amilolítica y celulolítica fueron reveladas para poder evidenciar el halo de degradación enzimática (Figura 22). Para determinar actividad amilolítica se utilizó una solución de Yodo al 1% en solución de KI 0,2 % (Iugol) (Hankin y Anagnostakis, 1975). La actividad celulolítica se reveló con Rojo Congo 0,2%, ácido acético 5% y cloruro de sodio 1M. En ambos casos la evidencia de un halo transparente indica actividad positiva.

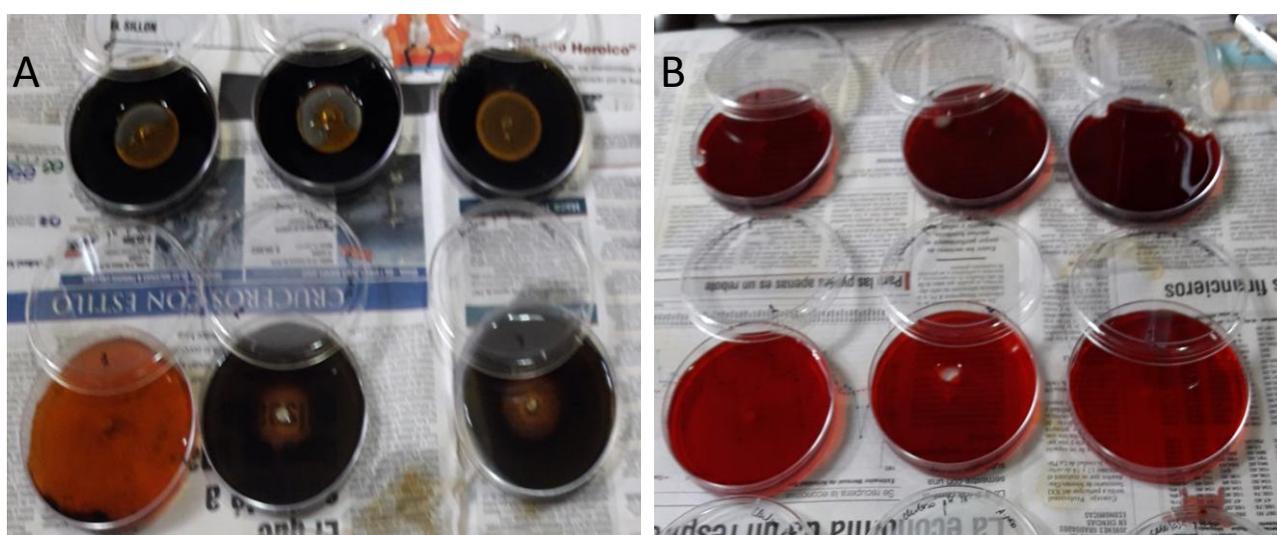


Figura 22. Técnica de revelado enzimático. A) Actividad amilolítica, revelado con Iugol. B) Actividad celulolítica, revelado con Rojo Congo.

## **Actividad enzimática de cepas fúngicas: Screening preliminar en medio líquido.**

### ***Preparación de medios líquidos específicos***

A partir de los aislados fúngicos, se sembraron cuatro discos (7 mm de diám.) de cada una de las cepas en 150 ml de caldo completo de dextrosa Sabouraud, compuesto de carne de peptona 0,5% (p/v), caseína peptona 0,5% (p/v) y glucosa 2% (p/v) según metodología de Mancillas-Paredes et al. (2019). Para inducir la actividad queratinolítica de las cepas inoculadas se agregó 1,5 g

de pelo bovino previamente esterilizado y desengrasado y 1,5 g de quitina coloidal para inducir la actividad quitinolítica. Se cultivaron durante 8 días a  $30 \pm 1^\circ \text{C}$  y oscuridad en agitación orbital a 180 rpm.

### ***Obtención de extractos enzimáticos***

Se realizó el proceso de obtención de cada uno de los extractos crudos producidos por las distintas cepas fúngicas para la medición de las enzimas quitinolítica, queratinolítica y caseinolítica.

Los extractos se filtraron por presión de vacío utilizando discos de fibra vidrio borosicato OSMONICS ( $0,45 \mu\text{m}$ ). Los extractos obtenidos se conservaron en frasco de vidrio a  $4^\circ\text{C}$ . La figura 23 muestra la secuencia de pasos hasta obtener los extractos enzimáticos.



Figura 23. Secuencia de pasos para la obtención de los extractos enzimáticos.

### ***Determinación de las actividades enzimáticas: quitinolítica, queratinolítica y caseinolítica a partir de los extractos enzimáticos***

Para realizar la actividad enzimática en medios de cultivos líquidos, se seleccionaron 20 cepas fúngicas que fueron previamente ensayadas en medio sólidos por las cepas que mostraron actividad positiva para actividad quitinolítica y actividad caseinolítica a pH alcalino.

### ***Actividad quitinolítica:***

Se determinó la actividad enzimática quitinolítica según metodología de Kuzu, S. et al. (2012) modificada. Se midió el delta de la absorbancia por unidad de tiempo. Para ello se utilizaron 0.003 g de Chitin Azure suspendido en 0.6 ml de buffer tri-HCl (0,1 M y pH 8) y 0,6 ml de EC; se incubaron a 28°C por 2 hs; la reacción se detuvo con baño frío, se centrifugó (5000 xg) durante 15 minutos a 5°C. El blanco se realizó por inactivación con calor del extracto enzimático crudo (EC). Luego se realizó la lectura a 595 nm de absorbancia en espectrofotómetro. Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para variar 0,01 de absorbancia por minuto bajo las condiciones del ensayo, 31°C y pH 8 (Figura 24).



Figura 24. Mezcla de reacción luego de la incubación.

### ***Actividad queratinolítica:***

La actividad queratinolítica se analizó utilizando 20 mg de residuos pelo como sustrato (Figura 25), previamente lavado con tensioactivos, secado a 45°C, molido, y esterilizado en autoclave a 121°C. La mezcla de reacción fue preparada con 150 µl de EC y 2 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 9 (Yamamura et al., 2002). Se incubaron a 37 °C en agitación (100 rpm) durante 60 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), se centrifugó (5000xg) durante 15 minutos y el sobrenadante se midió a 280 nm.

Los blancos de reacción se realizaron por el agregado de 1 ml de TCA al 10% (p/v) al principio de la incubación. La unidad de actividad queratinolítica (Uker) se definió como la cantidad de enzima que, bajo la condición de prueba, provoca un aumento de 0,01 de absorbancia a 280 nm por minuto (Galarza et al., 2014; Galarza et al., 2007).



Figura 25. Pesado del pelo vacuno.

### ***Actividad caseinolítica:***

Para medir la actividad proteolítica de las muestras enzimáticas se utilizó caseína como sustrato según metodología de López et al. (2000). Para ello, la caseína al 1% (p/v) en buffer TRIS - HCl 0,1 M de pH 8,0 fue calentada a baño María durante 20 min a 35 °C para lograr su disolución; una vez fría, se mantuvo en baño de hielo hasta el momento de la reacción. Para la mezcla de reacción se usaron 50 µl EC, luego se agregó 550 µl de caseína, el tiempo de reacción fue de 30 min y se detuvo con 90 µl de TCA 5% (p/v). Los blancos de reacción consistieron de la misma mezcla de reacción, pero cambiando el orden, el cual fue: 1) EC, 2) TCA 5% y 3) caseína. Después de 15 min a 4 °C para facilitar la precipitación de la caseína no degradada, los tubos de reacción fueron centrifugados a 4800 xg durante 20 min a 25 °C (Figura 26). Finalmente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Se definió una unidad caseinolítica (Ucas) como la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm por minuto.



Figura 26. Tubos de reacción centrifugados.

## Análisis de los datos

Para la medición de la actividad semicuantitativa, se relacionó la medición del halo de degradación alrededor de la colonia y el tamaño de la misma con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{Radio de la colonia} + \text{radio del halo}}{\text{radio colonia}}$$

La asociación entre las actividades enzimáticas y el pH del medio se analizó mediante una tabla de contingencia. Además, se realizó para cada actividad enzimática estudiada un ANOVA en función de las cepas seleccionadas y el pH estudiado. InfoStat versión 2008.

Se calculó la medición de la actividad cuantitativa, para cada cepa y para cada actividad enzimática estudiada con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(\text{Abs mtra} - \text{Abs bco})}{\text{Tiempo de reacción}}$$

Donde: Abs (mtra) = absorbancia de la muestra

Abs (bco) = absorbancia del blanco

Tiempo de reacción = 30 min

# Depilado enzimático sobre cueros bovinos con extractos enzimáticos provenientes de hongos aislados del cangrejal

Muchos de los extractos obtenidos de las cepas fúngicas aisladas de suelos alcalinos del cangrejal presentan la capacidad de producir enzimas capaces de degradar sustratos utilizados en la industria.

Una de las tantas aplicaciones de estas enzimas capaces de actuar en condiciones de alcalinidad (condiciones propicias para ciertos procesos industriales), es el depilado enzimático de cueros, el cual en los últimos años ha tenido gran auge por ser una alternativa amigable con el ambiente. El uso de enzimas en la industria del cuero comparado con el método tradicional produce una disminución del 50 % en el contenido de sulfuro en el efluente, así como de los sólidos en suspensión en un 40 % reduciendo la emisión de olores (Crispim et al., 2003).

Se trabajó en el centro de investigación de cuero CITEC, en donde se realizaron ensayos con los extractos enzimáticos crudos de las cepas fúngicas que mostraron mayor actividad en los screening enzimáticos realizados.

## Selección de los extractos crudos de enzimas

Tanto la actividad queratinolítica como la proteolítica son usadas para realizar depilados enzimáticos. La selección de los extractos crudos para el ensayo se realizó en base a la mayor producción enzimática por parte de las cepas fúngicas.

Los extractos crudos de enzimas (EE) de las cepas fúngicas de *Acremonium* sp. (A), *Gliocladium catenulatum* (GC), *Emericellopsis minima* (EM), *Purpureocillium lilacinum* (PL), *Penicillium* sp. (Psp), *Fusarium oxysporum* (FO) y un micelio hialino estéril (MHE) fueron seleccionados por mostrar la mayor actividad queratinolítica en el screening realizado entre otras veinte cepas estudiadas en el test en medio líquido.

## Ensayo de la actividad queratinolítica

La actividad queratinolítica se realizó utilizando residuos pelo como sustrato. La mezcla de reacción contenía 150 µl de EC y el sustrato al 1% (p/v) en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 9, Isogras AN 0,1% 50 µl, Baymol AZ 0,5% 50 µl y biocida TCMTB (relación biocida/enzima (p/p): 100 µg de biocida/1 µg de proteína EC) se incubó a 37°C con agitación (100 rpm) durante 60 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v), se centrifugó (5000 xg) durante 15 minutos y el sobrenadante se midió a 280 nm. Los blancos de reacción fueron realizados por incubación durante 60 minutos: sustrato, tensioactivos y buffer. Después del EC, se añadieron biocida y TCA al 10% (p/v), siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras (Galarza et al., 2016).

La unidad de actividad queratinolítica (Uker) se definió como la cantidad de enzima que, bajo la condición de prueba, causa un aumento de 0,01 absorbancia a 280 nm por minuto.

## Ensayo con piel bovina sumergida en extractos de hongos

Con el fin de determinar cuales de las cepas fungicas seleccionadas presentaron la mejor capacidad para depilar enzimáticamente los cueros bovinos, se realizó el siguiente ensayo.

Se colocaron trozos de piel bovina fresca de 1 X 1 cm en tubos de vidrio con 5 ml de diferentes soluciones y reactivos. En la etapa de remojo, se incubaron los extractos crudos de diferentes cultivos fúngicos con 0,1% de Isogras AN y el biocida TCMTB (0,2% p/p de piel húmeda) durante 4 horas a 25°C con agitación (40 rpm). Después del remojo, se añadió Baymol AZ al 0,5% en cada mezcla de reacción, se incubó durante 48 horas a 25°C con agitación (40 rpm). Controles: **a.** 5 ml de 0,1 M buffer Tris-HCl, biocida TCMTB (0,2% p/p de piel húmeda); **b.** 5 ml de buffer TrisHCl (0,1 M, pH 9), 0,1% p/v Isogras AN, 0,5% Baymol AZ y biocida (0,2% p/p de piel húmeda); la incubación de **a** y **b** se realizó durante 48 horas a 25°C con agitación (40 rpm); **c.** piel fresca sin tratamiento e incubación.

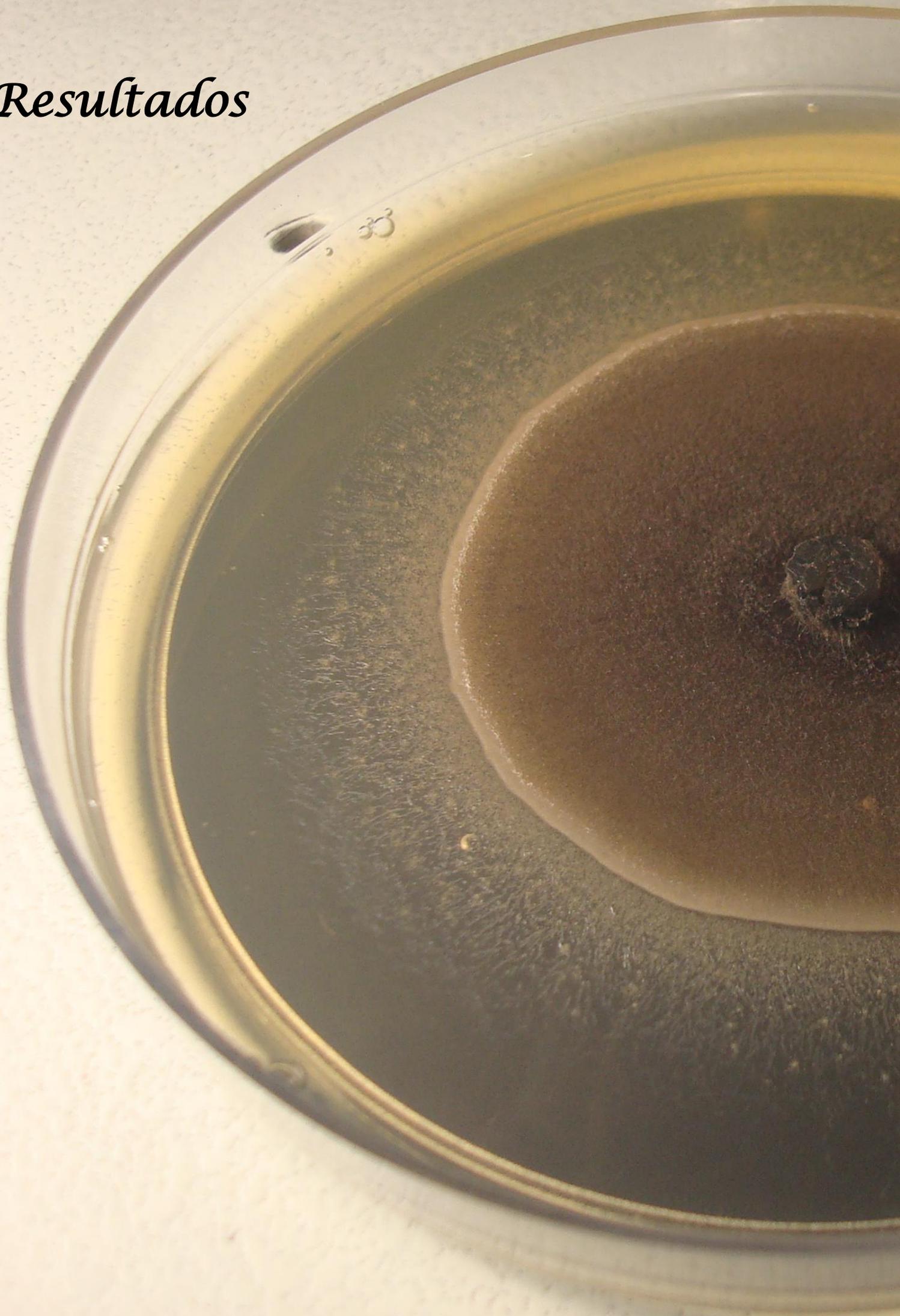
## **Observación al microscopio electrónico de barrido**

Después de completar los tratamientos, las muestras de piel se fijaron en formaldehído al 4% y se deshidrataron en etanol al 30%, 50%, 70% y 100% (Garro et al, 2019). Después de un punto crítico de secado y metalizado, las muestras se observaron con un microscopio electrónico de barrido (FEI-Quanta 200, laboratorio de investigación LIMF, Facultad de Ingeniería (UNLP)).

## **Análisis de los datos**

Los datos obtenidos se analizaron de manera descriptiva, al observar las imágenes obtenidas a partir del microscopio electrónico de barrido.

# *Resultados*



# Resultados

## Determinación de parámetros fisicoquímicos de los suelos salino-sódicos del cangrejal

En el estudio fisicoquímico de los suelos del cangrejal se determinó que los sitios 1 y 3 presentaron un contenido hídrico medio porcentual del 64 %, mientras que para el sitio 2 fue de un 66 %. Al comparar la clase textural del suelo en los tres sitios, se observó que el sitio 1 presenta 50,6 % de arena, 28 % de limo y 21% de arcilla, lo cual corresponde a un suelo Franco arcillo arenosa; el sitio 2 presentó 53,4% de arcilla, un 40 % de limo y 6,5 % de arena, perteneciendo a la clase Arcillo arenosa; y por último el sitio 3 mostró 53,4 % de arcilla, 32 % de limo y 14 % de arena que corresponde a la textural Arcillosa.

La tabla 2 muestra los resultados de los parámetros fisicoquímicos estudiados para los tres sitios en dos años consecutivos, año 1 (periodo 2015-2016) y año 2 (periodo 2016-2017). Al comparar los dos años de campaña, independientemente de los sitios estudiados, se encontraron diferencias significativas en el contenido de Fósforo total (PT;  $p=0,0001$ ), Sodio ( $\text{Na}^+$ ;  $p=0,0447$ ), Calcio y Magnesio ( $\text{Ca}^{+2}+\text{Mg}^{+2}$ ;  $p=0,019$ ) y Conductividad eléctrica (CE;  $p=0,0442$ ). Al comparar los sitios de estudio para cada año por separado, solo en el primer año se encontraron diferencias significativas para los parámetros Materia orgánica (MO;  $p=0,0453$ ), Carbono orgánico total (COT;  $p=0,0452$ ), Nitrógeno total (NT;  $p=0,0074$ ), potasio (K;  $p=0,0106$ ), sodio ( $\text{Na}^+$ ;  $p=0,0019$ ), Relación de la adsorción de Sodio (RAS;  $p=0,0030$ ) y Conductividad eléctrica (CE;  $p=0,0282$ ). Los valores obtenidos para NT, COT, MO (%) y PT clasifican los contenidos de estos nutrientes dentro del rango “bajo” para los suelos estudiados. Los valores promedio de pH para cada sitio oscilaron entre 8,0-8,3 lo que indica que los suelos son fuertemente alcalinos. La conductividad eléctrica arrojó valores superiores a 30 dS/m correspondientes a una salinidad muy alta, mientras que la RAS reveló altos valores de sodio para los tres sitios, siendo el valor más alto el hallado en el sitio 2 para el primer año de estudio.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos analizados para los tres sitios de muestreo durante dos años de campaña consecutivos.

Parámetro	1° año (periodo 2015-2016)				2° año (periodo 2016-2017)			
	S1	S2	S3	MA	S1	S2	S3	MA
MO %	1,9 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 ab	2,3 ± 0,3 b	2,2	2 ± 0,3 a	2,4 ± 0,2 a	2,5 ± 0,3 a	2,3
COT %	1,2 ± 0,1 a	1,4 ± 0,1 ab	1,3 ± 0,2 b	1,3	1,2 ± 0,1 a	1,4 ± 0,1 a	1,4 ± 0,2 a	1,3
NT %	0,11 ± 0 a	0,11 ± 0 a	0,12 ± 0 b	0,11	0,11 ± 0 a	0,11 ± 0 a	0,11 ± 0 a	0,11
C/N	10 ± 0,6 a	10 ± 2 a	10 ± 1 a	10	10 ± 1 a	11 ± 1 a	10 ± 1 a	10
PT (ppm)	551 ± 23 a	575 ± 47 a	549 ± 36 a	558	384 ± 15 a	390 ± 19 a	365 ± 50 a	380*
K (meq/l)	5 ± 1 a	7 ± 0 b	7 ± 1 b	6	3 ± 1 a	6 ± 3 a	5 ± 2 a	5
Na (meq/l)	568 ± 200 a	1051 ± 151 b	1134 ± 139 b	918	294 ± 88 a	469 ± 223 a	399 ± 165 a	390*
Ca+Mg (meq/l)	254 ± 105 a	379 ± 134 a	450 ± 34 a	361	121 ± 22 a	159 ± 31 a	145 ± 31 a	142*
RAS	50 ± 9 a	78 ± 9 b	76 ± 8 b	68	37 ± 8 a	51 ± 21 a	46 ± 14 a	45
pH	8 ± 0 a	8 ± 0 a	8 ± 0 a	8	8 ± 0,2 a	8 ± 0,3 a	8 ± 0,1 a	8
CE (dS/m)	41 ± 13 a	63 ± 13 ab	66 ± 6 b	57	26 ± 6 a	37 ± 14 a	33 ± 11 a	32*

MA, media anual. Letras distintas para cada parámetro indican diferencias significativas entre los sitios de estudio (Test deTukey,  $p < 0,05$ ). Los asteriscos indican diferencias entre el primer y segundo muestreo de los parámetros estudiados (Test  $-t$ ,  $p < 0,05$ ).

El análisis estacional de los parámetros fisicoquímicos realizado únicamente para el segundo año de muestreo, sin diferenciar entre sitios, dado que no se mostraron diferencias significativas entre ellos. Los resultados obtenidos al comparar los parámetros estudiados no mostraron diferencias significativas entre las estaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos para las cuatro estaciones de un año (periodo 2017-2018). Letras distintas muestran diferencias significativas entre las estaciones.

Parámetro	Estaciones			
	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
MO %	2,1 a	2,5 a	2,3 a	2,3 a
COT %	1,2 a	1,2 a	1,2 a	1,2 a
NT %	0,1 a	0,1 a	0,1 a	0,1 a
C/N	9 a	9 a	11 b	10 ab
PT (ppm)	402 a	378 a	315 a	390 a
K (meq/l)	4 a	6 a	6 a	3 a
Na (meq/l)	350 a	496 a	450 a	250 a
Ca+Mg (meq/l)	136 a	165 a	140 a	126 a
RAS	42 a	54 a	52 a	31 a
pH	8 a	8 a	8 a	8 a
CE (dS/m)	29 a	40 a	36 a	24 a

Letras distintas para cada parámetro indican diferencias significativas entre los sitios de estudio (Test deTukey,  $p < 0,05$ ).

Si bien no existen diferencias singificativas entre las estaciones, se muestra la variación estacional de los contenidos de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}+\text{Mg}^{+2}$  (expresados en meq/l en el eje principal) y de fósforo total PT (expresado en ppm en el eje secundario) (Figura 27). Las tendencias mostraron aumento de contenido de  $\text{Na}^+$  en primavera y PT en otoño.

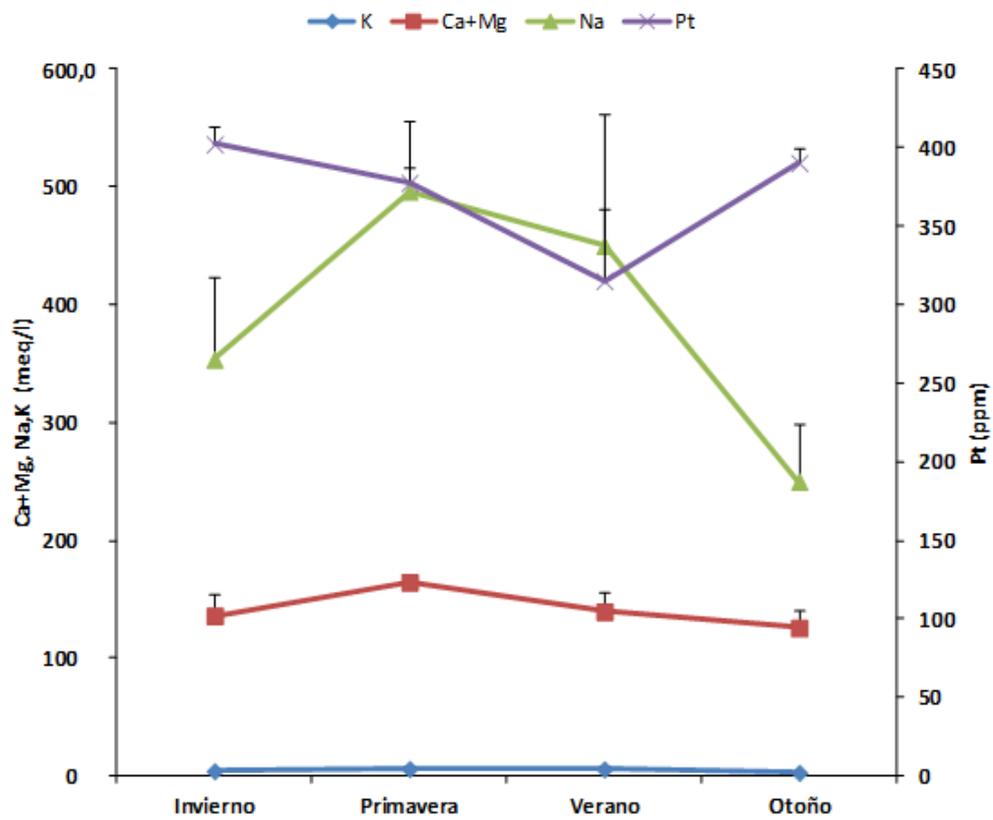


Figura 27. Resultados promedio de  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{k}^{+}$  y Pt de un muestreo estacional. Las barras corresponden al desvío estándar.

## Diversidad Fúngica de los suelos salino-sódicos

Como resultado de la siembra de 12 mil partículas de suelo provenientes de 120 muestras de tres cangrejales, se obtuvieron 3.448 partículas de suelo colonizadas con micelio fúngico. La figura 28 muestra el porcentaje de partículas de suelo colonizadas por micelio fúngico para el primer y segundo año de estudio. Las interacciones entre sitios, estaciones y años no mostraron diferencias significativas; sin embargo, se detectaron diferencias significativas para los sitios ( $P=0,0090$ ) y para las estaciones ( $P=0,0234$ ). En invierno, verano y otoño el sitio 3 registró el mayor número de partículas colonizadas por micelio fúngico, en primavera el mayor número de partículas colonizadas se registró en el sitio 2.

Se indentificaron un total de 89 especies a partir de los aislamientos obtenidos, de las cuales 77 fueron determinadas morfológicamente y 10 aislamientos se identificaron con análisis molecular (tabla 4). Dos aislamientos no pudieron ser identificados bajo ninguna de estas metodologías y se los denominó Micelio dematiaceo estéril y Micelio hialino estéril.

Tabla 4. Análisis de BLAST de las secuencias nucleotídicas obtenidas

<b>Cepas Analizadas</b>	<b>Secuencias</b>	<b>Organismo con mayor similitud</b>	<b>% de similitud</b>
ACR1	(NL1/NL4)	<i>Acremonium minutisporum</i>	94,41
ACR2	(NL1/NL4)	<i>Emericellopsis alkalina</i>	95,46
ACR3	(NL1/NL4)	<i>Emericellopsis alkalina</i>	97,45
MHE1	(ITS4/ITS5)	<i>Coprinellus micaceus</i>	95,35
MHC1	(ITS4/ITS5)	<i>Alternaria</i> sp.	94,52
MDE2	(ITS4/ITS5)	<i>Microsphaeropsis arundinis</i>	94,73
MDE3	(ITS4/ITS5)	<i>Trematosphaeria grisea</i>	95,39
MDE4	(ITS4/ITS5)	<i>Corollospora maritima</i>	91,91
ACSP	(ITS4/ITS5)	<i>Dactylella</i> sp.	80,92
ALSP	(ITS4/ITS5)	<i>Neocamarosporium</i> sp.	96,55

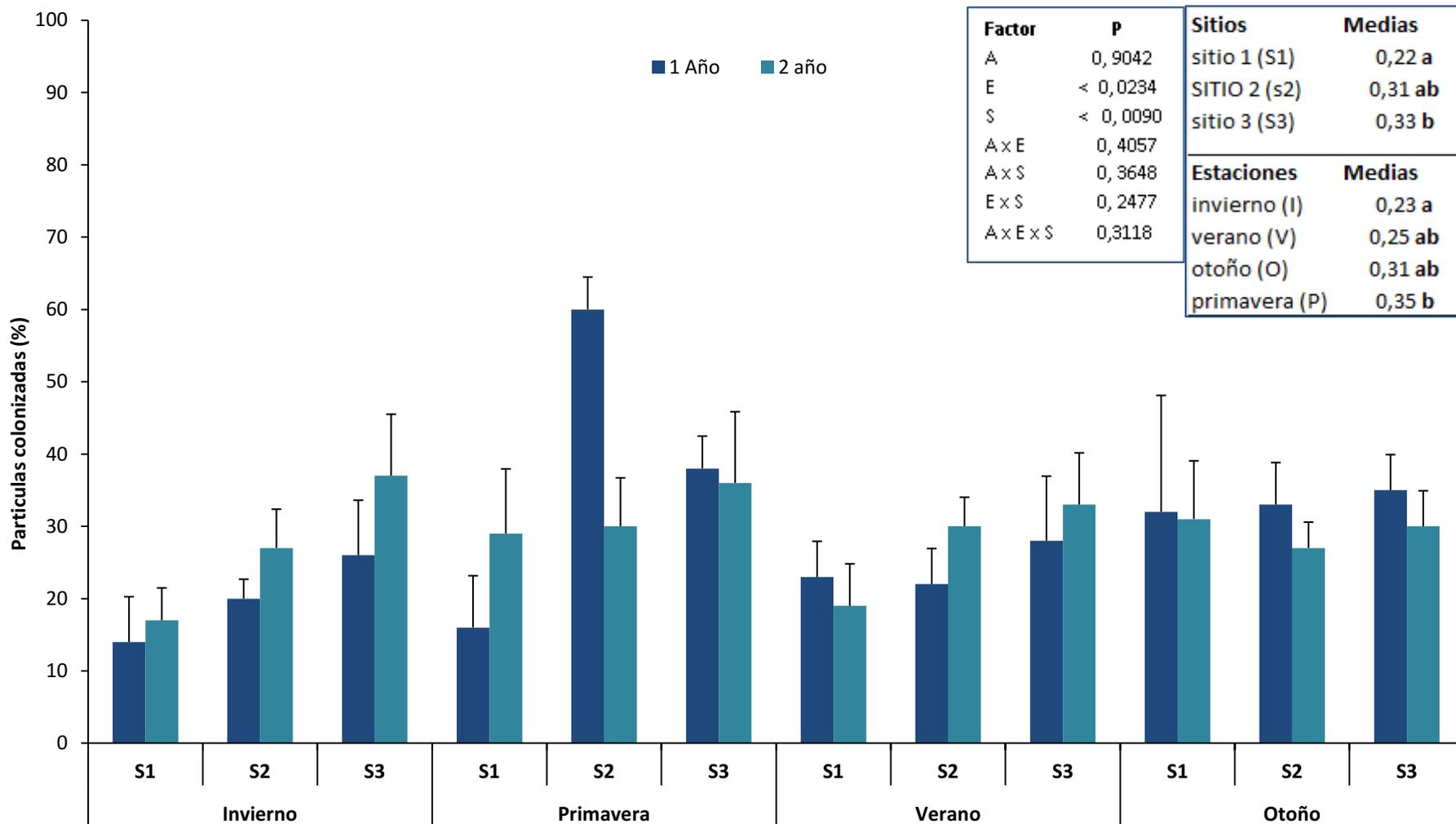


Figura 28. Porcentaje de partículas colonizadas para cada sitio de muestreo (S1, S2, S3) en los dos años de estudio. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ). La abreviaturas A y E se corresponden a año y estación, respectivamente.

Las tablas 5 y 6 listan las especies aisladas e identificadas para cada estación, en los tres sitios de estudio durante el primer y el segundo año de muestro, así como el aporte de cada una de ellas al Índice de Diversidad  $H'$  (las especies que contribuyen con un  $H' \geq 0,15$  se remarcan en negrita). Al finalizar la tabla se indican la Riqueza específica ( $S$ ), el Índice de Diversidad ( $H'$ ) y la Equitabilidad ( $J'$ ) para cada estación del año en los tres sitios. Además se indica a la derecha la familia y el orden al cual pertenecen las cepas aisladas.

La tabla 5 muestra los resultados de los aislamientos fúngicos, durante el primer año de muestreo. Se aislaron 83 especies fúngicas representantes de 33 familias distribuidas en 19 órdenes. Entre estos, tres agrupan la mayor cantidad de las especies aisladas 34,93 % pertenecen al orden Hypocreales, 10,84 % a Pleosporales y 8,48 % a Eurotiales, mientras que el resto de las especies (42,16 %) se encuentran distribuidas entre los 16 órdenes restantes y un 3,58 % de las especies corresponden a dos cepas *incertae sedis* y dos micelios estériles. El 89,15 % corresponde a Anamorfos de Ascomycota, el 6,04 % a Teleomorfos de Ascomycota, el 3,61 % a Mucoromycota y solo una especie a Basidiomycota (1,20 %). El sitio1 fue presentó el número más bajo de aislamientos fúngicos (451) siendo invierno y verano las estaciones que mostraron mayor tendencia para la Riqueza específica (24), mientras que los sitio 2 y 3 presentaron similar número de aislamientos (678 y 638) respectivamente, ambos mostraron una mayor tendencia de Riqueza específica en primavera para los sitios 2 (41) y sitio 3 (34). El análisis de Diversidad  $H'$  y la Equitabilidad  $J'$  para cada estación del año en cada sitio mostró una mayor tendencia de  $H'$  para el sitio 3 (3,11) en verano, el sitio 2 (3,03) en primavera y para el sitio 1 en invierno (2,84). La Equitabilidad más cercana a 1 corresponde al sitio1 para invierno (0,62); el sitio 2 presentó igual Equitabilidad para todas las estaciones (0,57) y el sitio 3 presentó en verano una Equitabilidad de 0,66. Las especies que mostraron un valor de  $(-p_i \log_2 p_i) \geq 0,15$  fueron utilizadas para caracterizar la comunidad fúngica de los cangrejales. En este sentido se encontró que 20 especies aisladas en el primer año de estudio mostraron la mayor contribución al total de la diversidad registrada. El valor máximo de contribución por especie individual en el primer año fue para *Dactylella* sp. (3,12).

Tabla 5. Contribución al índice de diversidad (H) de las especies aisladas de los tres sitios en cada estación del primer año de muestreo.

1 año	sitio1				Sitio2				Sitio3				Familia	Orden
	Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto		
<i>Achaetomium sp.</i>					0,05								Chaetomiaceae	Sordariales
<i>Acremonium butyri</i>					0,05				0,03	0,10	0,03		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium fusidioides</i>						0,02	0,04			0,03			Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium kiliense</i>	0,06		0,04	0,03	0,05	0,11	0,07	0,05	0,06		0,08	0,05	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium minutisporum</i>	0,10		0,12	<b>0,15</b>	<b>0,20</b>	0,12	0,14	<b>0,23</b>	<b>0,25</b>	<b>0,16</b>	0,06	<b>0,26</b>	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium sp1.</i>		0,09	0,07	0,03		<b>0,17</b>	<b>0,16</b>	0,12	0,06	0,08	0,03	<b>0,25</b>	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium strictum</i>	0,14				0,29	0,06			0,14	<b>0,28</b>	0,06	0,03	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Alternaria alternata</i>			0,04									0,03	Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Alternaria sp.</i>	0,10				<b>0,15</b>	0,03	0,04	0,03	<b>0,29</b>	0,10		0,05	Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Amorphotheca resinæ</i>							0,04						Amorphothecaceae	Incertae sedis
<i>Apiospora montagnei</i>						0,03							Apiosporaceae	Incertae sedis
<i>Puciola spinosa</i>					0,13								Xylariaceae	Xylariales
<i>Aspergillus carneus</i>			0,07								0,06		Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus flavus</i>						0,06			0,06				Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus fumigatus</i>									0,04				Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus niger</i>		0,05		0,08					0,04			0,03	Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus sp.</i>	0,06			0,03					0,04		0,03		Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus terreus</i>	0,10	0,12	0,04	0,06	0,08		0,04			0,03	0,06	0,05	Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus ustus</i>												0,03	Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Bahusakala olivaceanigra</i>													Dothideomycetes	Pezizomycotina
<i>Beauveria bassiana</i>	0,06		0,04		0,05					0,03		0,05	Cordycipitaceae	Hypocreales
<i>Beauveria brongniartii</i>					0,05			0,05					Cordycipitaceae	Hypocreales
<i>Beauveria sp.</i>							0,07						Cordycipitaceae	Hypocreales
<i>Chaetomium globusum</i>													Chaetomiaceae	Sordariales
<i>Chrysosporium asperatum</i>						0,03		0,05		0,05			Arthrodermataceae	Onygenales
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0,10	0,05	0,14	0,08								<b>0,24</b>	Cladosporiaceae	Capnodiales
<i>C. herbarum</i>		0,05	0,10			0,02	0,07	0,03	0,11	0,10		0,09	Cladosporiaceae	Capnodiales
<i>Clonostachys rosea</i>						0,02							Bionectriaceae	Hypocreales
<i>Coprinellus micaceus</i>	0,10		0,04	0,08	0,05	<b>0,22</b>	<b>0,26</b>	0,13		0,12	<b>0,22</b>	0,13	Psathyrellaceae	Agaricales
<i>Corollospora maritima</i>		<b>0,17</b>	0,07	0,03	0,05	0,03		0,09		0,05		0,05	Halosphaeriaceae	Microascales

Continuación	1 año	sitio1				Sitio2				Sitio3				Familia	Orden
		Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto		
<i>Curvularia lunata</i>										0,04				Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Dactylella sp.</i>		<b>0,17</b>	<b>0,31</b>	<b>0,35</b>	0,09	<b>0,31</b>	<b>0,20</b>	<b>0,31</b>	<b>0,29</b>	<b>0,24</b>	<b>0,29</b>	<b>0,32</b>	<b>0,24</b>	-----	-----
<i>Emericellopsis alkalina</i>			<b>0,15</b>	<b>0,25</b>		0,05	0,05	<b>0,17</b>	0,07	0,04	0,07	0,25	0,09	incertae sedis	Hypocreales
<i>Emericellopsis minima</i>				0,04				<b>0,21</b>		0,04		0,03		incertae sedis	Hypocreales
<i>Epicoccum nigrum</i>				0,04				0,02					0,03	Didymellaceae	Pleosporales
<i>Fusarium equiseti</i>											0,07		0,03	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium graminearum</i>											0,04			Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium heterosporum</i>		0,06								0,04				Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium Konzum</i>						0,08						0,10		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium oxysporum</i>		0,10								0,04	0,03			Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium solani</i>			<b>0,17</b>				0,03	0,04	<b>0,21</b>				0,10	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium sp1.</i>						0,05	0,03	0,04			0,03			Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium sp3.</i>		0,10												Nectriaceae	Hypocreales
<i>Geotrichum candidum</i>													0,03	Dipodascaceae	Saccharomycetales
<i>Gliocladium catenulatum</i>							0,02							Hypocreaceae	Hypocreales
<i>Gliomastix cerealis</i>		0,10					0,06					0,03		Hypocreaceae	Hypocreales
<i>Humicola grisea</i>				0,07	0,08							0,03		Chaetomiaceae	Sordariales
<i>Hystosplasma sp.</i>												0,03	0,03	Onygenaceae	Onygenales
<i>Lecanicillium lecanii</i>					0,03		0,02	0,04						Cordycipitaceae	Hypocreales
<i>Lecanicillium sp.</i>				0,10										Cordycipitaceae	Hypocreales
Levadura		<b>0,25</b>	0,09	<b>0,15</b>	0,30	0,13	0,07		<b>0,31</b>	<b>0,17</b>	0,11	0,03	<b>0,15</b>	-----	Saccharomycetales
<i>Metarhizium anisopliae</i>														Clavicipitaceae	Hypocreales
Micelio hialino estéril		0,10					0,02	0,04	0,07	0,04	0,05	0,06	0,12	-----	-----
Micelio dematiáceo estéril		0,14				0,11	0,06	0,07	0,09	<b>0,26</b>	0,05		0,13	-----	-----
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>			0,09	0,12	0,03	<b>0,15</b>	<b>0,27</b>	<b>0,20</b>	0,11	<b>0,16</b>	0,12	0,06	<b>0,17</b>	Montagnulaceae	Pleosporales
<i>Mortierella sp.</i>								0,03			0,03		0,03	Mortierellaceae	Mortierellales
<i>Mucor hiemalis</i>											0,03			Mucoraceae	Mucorales
<i>Myceliophthora vellerea</i>		0,06												Arthrodermataceae	Onygenales
<i>Myrothecium verrucaria</i>						0	0,06		0,03	0,04	0,05	0,06	0,05	Stachybotryaceae	Hypocreales
<i>Nectria radiculicola</i>												0,06		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Neocamarosporium sp.</i>			0,05			0,05	<b>0,21</b>		0,03		0,05	0,06	0,07	Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Ophiostoma minimun</i>														Ophiostomataceae	Ophiostomatales
<i>Paecilomyces carneus</i>								0,04				0,03		Ophiocordycipitaceae	Hypocreales

Continuación	1 año				Sitio2				Sitio3				Familia	Orden				
	sitio1				Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto			Inv	Pri	Ver	Oto
<i>Paecilomyces marquandii</i>									0,02								Ophiocordycipitaceae	Hypocreales
<i>Penicillium sp1.</i>	0,14		0,1	0,07					<b>0,18</b>	<b>0,23</b>	0,05			<b>0,21</b>	0,13	0,05	Aspergillaceae	Eurotiales
<i>Penicillium rubrum</i>	0,14		0,10				0,05				0,07		0,11		0,03		Aspergillaceae	Eurotiales
<i>Penicillium thomii</i>									0,03								Aspergillaceae	Eurotiales
<i>Phoma leveillei</i>													0,04				Didymellaceae	Pleosporales
<i>Phoma sp.</i>													0,04	0,06			Didymellaceae	Pleosporales
<i>Phomopsis sp.</i>									0,02								Diaporthaceae	Diaporthales
<i>Ramichloridium schulzeri</i>															0,34		Mycosphaerellaceae	Myrmecridiales
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<b>0,19</b>		0,04					0,03								0,03	Ophiocordycipitaceae	Hypocreales
<i>Rhizopus stolonifer</i>							<b>0,17</b>				0,07	0,05				0,07	Rhizopodaceae	Mucorales
<i>Rhodotorula sp.</i>			0,04	0,03				0,03					0,04	0,03		0,03	Sporidiobolaceae	Sporidiobolales
<i>Scolecobasidium constrictum</i>			0,04														-----	-----
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0,06																Microascaceae	Microascales
<i>Scytalidium natrassia</i>		0,05															incertae sedis	Helotiales
<i>Scytalidium sp.</i>						0,05	0,03					0,08					incertae sedis	Helotiales
<i>Sporothrix schenckii</i>							0,02									0,03	Ophiostomataceae	Ophiostomatales
<i>Stachybotrys chartarum</i>													0,04				Stachybotryaceae	Hypocreales
<i>Talaromyces stipitatus</i>						0,05	0,06	0,04									Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Torula herbarum</i>												0,03					Torulaceae	Pleosporales
<i>Trematosphaeria grisea</i>	0,06						<b>0,27</b>	<b>0,18</b>	<b>0,27</b>	<b>0,26</b>			<b>0,16</b>	<b>0,24</b>	<b>0,34</b>	<b>0,31</b>	Trematosphaeriaceae	Pleosporales
<i>Trichoderma harzianum</i>	<b>0,32</b>						0,05	0,09	0,07	0,12			<b>0,19</b>	<b>0,16</b>	<b>0,25</b>	0,05	Hypocreaceae	Hypocreales
<i>Verticillium sp.</i>							0,03										Plectosphaerellaceae	-----
<b>Índice de Diversidad (H)</b>	2,84	1,47	2,23	1,54	2,70	3,03	2,69	2,65	2,79	2,90	3,11	2,81						
<b>Riqueza de especies (S)</b>	24	13	24	18	26	41	26	27	28	34	26	32						
<b>Equitatividad (J)</b>	0,62	0,40	0,49	0,37	0,57	0,57	0,57	0,56	0,58	0,57	0,66	0,56						

Las abreviaturas inv, pri, ver y oto se corresponden a invierno, primavera, verano y otoño, respectivamente.

Para el año 2 (Tabla 6) se aislaron 62 especies fúngicas correspondientes a 28 familias de 14 órdenes y dos micelios estériles. Los órdenes que presentaron la mayor cantidad de especies aisladas fueron Hypocreales (41,93 %), Eurotiales (12,93 %) y Pleosporales (9,67 %), mientras que el resto de las especies (30,64 %) se encuentran distribuidas entre los 11 órdenes restantes y un 4,83 % correspondiente a dos cepas *incertae sedis* y a un micelio estéril. El 87,99 % corresponde a anamorfos de Ascomycota, el 6,45 % a Teleomorfos de Ascomycota y el 1,61 % a Mucoromycota y solo una especie a Basidiomycota (Agaricales). El sitio 1 presentó 447 aislamientos fúngicos, en primavera se registró una mayor tendencia de la Riqueza específica (30), mientras que el sitio 2 presentó 551 aislamientos fúngicos, la mayor tendencia de Riqueza específica fue registrada para invierno (28). El sitio 3 presentó 686 aislamientos fúngicos, la Riqueza específica con mayor tendencia fue en primavera (29). El análisis de diversidad  $H'$  y la Equitabilidad  $J'$  para cada estación del año en cada sitio, mostró que la mayor tendencia de  $H'$  se registró para el sitio 1 en primavera (2,83), el sitio 2 (2,68) en invierno y el sitio 3 en primavera (2,64). La Equitabilidad para el sitio 1 fue similar en las cuatro estaciones, para el sitio 2 la Equitabilidad con mayor tendencia corresponde a invierno (0,56) y el sitio 3 presentó en otoño una Equitabilidad de 0,56. Las especies que mostraron un valor de  $(-p_i \log_2 p_i) \geq 0,15$  para los tres sitios en todas las estaciones del segundo año de estudio fueron 15. El valor máximo de contribución por especie individual de las cepas fúngicas más características de los cangejales en el segundo año fueron: *Dactylella* sp. (2,79), *Microsphaeropsis arundinis* (2,20), *Acremonium minutisporum* (2,1), *Coprinellus micaceus* (2,09), *Trematosphaeria grisea* (2,09), una especie de levadura (2,06), *Corollospora maritima* (1,47), *Trichoderma harzianum* (1,22), *Fusarium solani* (1,19), *Acremonium kiliense* (1,09).

Tabla 6. Contribución al índice de diversidad (H) de las especies aisladas de los tres sitios en cada estación del segundo año de muestreo

2 año	sitio1				Sitio2				Sitio3				Familia	Orden
	Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto		
<i>Acremonium butyri</i>								0,03		0,03	0,03		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium fusidioides</i>		0,03		0,03	0,06	0,04	0,03			0,07	0,03	0,05	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium kiliense</i>	0,05	0,08	0,13	0,05	<b>0,15</b>	0,04	0,13	0,08	<b>0,18</b>		<b>0,17</b>	0,03	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium minutisporum</i>	<b>0,21</b>	0,10	<b>0,17</b>	<b>0,19</b>		0,12	<b>0,26</b>	<b>0,27</b>	0,08	0,07	<b>0,36</b>	<b>0,27</b>	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium sp1.</i>		0,10	0,08	0,05	0,06	0,14		0,03	<b>0,19</b>	0,08	0,03		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acremonium strictum</i>						0,04		0,06		0,03			Nectriaceae	Hypocreales
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>		0,06								0,03	0,03		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Alternaria alternata</i>		0,10	0,05							0,03			Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Alternaria sp.</i>		0,10	0,13		0,06		0,01	0,03	0,05				Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Apiospora montagnei</i>						0,04				0,07			Apiosporaceae	Incertae sedis
<i>Aspergillus flavus</i>						0,04		0,06					Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus sp.</i>								0,03					Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus terreus</i>	0,12	0,12		0,09	0,14	0,14	0,09	0,09		0,08	0,07		Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Aspergillus ustus</i>						0,04				0,07			Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Bahusakala olivaceanigra</i>		0,06											Dothideomycetes	Pezizomycotina
<i>Beauveria bassiana</i>			0,05		0,04		0,03		0,03	0,07	0,11	0,08	Cordycipitaceae	Hypocreales
<i>Chaetomium globusum</i>												0,03	Chaetomiaceae	Sordariales
<i>Chrysosporium asperatum</i>										0,03			Arthrodermataceae	Onygenales
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		0,08	0,05	0,15								<b>0,21</b>	Cladosporiaceae	Capnodiales
<i>Cladosporium herbarum</i>						0,06	0,03						Cladosporiaceae	Capnodiales
<i>Clonostachys rosea</i>		0,03									0,09	0,06	Bionectriaceae	Hypocreales
<i>Coprinellus micaceus</i>	0,09	<b>0,19</b>	<b>0,21</b>	<b>0,20</b>	0,11	<b>0,22</b>	0,03	<b>0,22</b>	0,12	0,14	0,09	<b>0,17</b>	Psathyrellaceae	Agaricales
<i>Corollospora maritima</i>	<b>0,15</b>	<b>0,21</b>	<b>0,17</b>	<b>0,17</b>	0,12	0,06	0,08	<b>0,21</b>	0,12	0,05	0,05	0,08	Halosphaeriaceae	Microascales
<i>Dactylella sp.</i>	<b>0,24</b>	<b>0,26</b>	<b>0,19</b>	<b>0,22</b>	<b>0,25</b>	<b>0,28</b>	<b>0,18</b>	0,08	<b>0,37</b>	<b>0,30</b>	<b>0,16</b>	<b>0,26</b>	-----	-----
<i>Doratomyces stemonitis</i>	0,05				0,06								Microascaceae	Microascales
<i>Emericellopsis alkalina</i>	0,09		0,05	0,03		0,04		0,03	0,03			0,03	incertae sedis	Hypocreales
<i>Emericellopsis minima</i>					0,06					0,05	0,03		incertae sedis	Hypocreales
<i>Epicoccum nigrum</i>					0,04								Didymellaceae	Pleosporales
<i>Fusarium equiseti</i>		0,03							0,10	0,11	0,05		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium graminearum</i>		0,03			0,06	0,09					0,03		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium heterosporum</i>													Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium konzum</i>	0,05	0,06					0,08	0,04			0,03		Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,12	0,06		0,06	0,11			0,04	0,08		0,03		Nectriaceae	Hypocreales

Continuación	2 año	sitio1				Sitio2				Sitio3				Familia	Orden
		Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto	Inv	Pri	Ver	Oto		
<i>Fusarium solani</i>		0,09	0,03	0,11	0,11	0,12	0,06		0,10	0,08	<b>0,15</b>	0,05	0,24	Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium sp1.</i>		0,05	0,08											Nectriaceae	Hypocreales
<i>Fusarium sp2</i>											0,03			Nectriaceae	Hypocreales
<i>Geotrichum candidum</i>										0,03	0,02			Dipodascaceae	Saccharomycetales
<i>Humicola grisea</i>								0,03					0,03	Chaetomiaceae	Sordariales
<i>Lecanicillium lecanii</i>								0,03						Cordycipitaceae	Hypocreales
Levadura		<b>0,32</b>	<b>0,24</b>	<b>0,26</b>	<b>0,27</b>	0,06		<b>0,36</b>	0,06	0,03	<b>0,24</b>	0,11	0,11	-----	Saccharomycetales
<i>Metarhizium anisopliae</i>						0,06					0,03			Clavicipitaceae	Hypocreales
Micelio hialino esteril		0,09			<b>0,17</b>	0,06	0,04	0,03	0,09	0,07	0,03	0,05	0,11	-----	-----
Micelio dematiáceo esteril		<b>0,17</b>	0,03	<b>0,15</b>		0,09		0,03	0,11	<b>0,20</b>				-----	-----
<i>Microsphaeropsis arundinis</i>		0,12	0,13	<b>0,17</b>	<b>0,17</b>	<b>0,31</b>	<b>0,20</b>	<b>0,15</b>	<b>0,20</b>	<b>0,18</b>	<b>0,19</b>	<b>0,20</b>	<b>0,18</b>	Montagnulaceae	Pleosporales
<i>Mortierella sp.</i>														Mortierellaceae	Mortierellales
<i>Myceliophthora vellerea</i>			0,04											Arthrodermataceae	Onygenales
<i>Myrothecium verrucaria</i>			0,03			0,08	0,04			0,03	0,03	0,03	0,05	Stachybotryaceae	Hypocreales
<i>Nectria radiccicola</i>								0,03						Nectriaceae	Hypocreales
<i>Neocamarosporium sp.</i>			0,06			0,04		0,03	0,06	0,03	0,13			Pleosporaceae	Pleosporales
<i>Paecilomyces carneus</i>			0,06						0,04					Ophiocordycipitaceae	Hypocreales
<i>Paecilomyces marquandii</i>		0,05				0,04		0,03	0,11					Ophiocordycipitaceae	Hypocreales
<i>Penicillium sp1.</i>		0,05	<b>0,21</b>			0,06	0,14			0,05	0,11	0,09	0,14	Aspergillaceae	Eurotiales
<i>Penicillium rubrum</i>		0,12	0,10	0,05	0,08	0,04		0,11	<b>0,17</b>					Aspergillaceae	Eurotiales
<i>Penicillium thomii</i>														Aspergillaceae	Eurotiales
<i>Purpureocillium lilacinum</i>			0,06				0,04		0,04		0,05	0,03	0,03	Ophiocordycipitaceae	Hypocreales
<i>Rhizopus stolonifer</i>													0,03	Rhizopodaceae	Mucorales
<i>Rhodotorula sp.</i>									0,06				0,03	Sporidiobolaceae	Sporidiobolales
<i>Scolecobasidium constrictum</i>									0,09					-----	-----
<i>Sporothrix schenckii</i>									0,04					Ophiostomataceae	Ophiostomatales
<i>Talaromyces stipitatus</i>			0,03											Trichocomaceae	Eurotiales
<i>Torula herbarum</i>										0,05				Torulaceae	Pleosporales
<i>Trematosphaeria grisea</i>		0,12	<b>0,17</b>		<b>0,21</b>	<b>0,33</b>		<b>0,32</b>	<b>0,31</b>		<b>0,30</b>	<b>0,30</b>	<b>0,33</b>	Trematosphaeriaceae	Pleosporales
<i>Trichoderma harzianum</i>		<b>0,28</b>	0,12		<b>0,20</b>		0,09	0,00	0,08	0,18	0,10		<b>0,17</b>	Hypocreaceae	Hypocreales
<b>Indice de Diversidad (H)</b>		2,30	2,83	2,01	2,27	2,68	1,93	2,23	2,54	2,35	2,64	2,30	2,44		
<b>Riqueza de especies (S)</b>		22	30	16	18	28	20	26	26	23	29	27	20		
<b>Equitatividad (J)</b>		0,52	0,58	0,50	0,54	0,56	0,45	0,47	0,54	0,52	0,54	0,48	0,56		

Se calcularon la Equitabilidad ( $J'$ ), la Riqueza específica ( $S$ ) y el Índice de Diversidad Shannon-Wiener ( $H'$ ) para los tres sitios y para ambos años de estudio. La figura 29 muestra la Equitabilidad ( $J'$ ) de cada sitio para el primer y segundo año de estudio, el análisis bifactorial indica que existen diferencias significativas para la interacción años x sitios, la diferencia esta dada entre el primer y segundo año para el sitio 1 y 2. Los valores de  $J'$  más cercanos a 1 se registraron para el sitio 1 en el segundo año. La Riqueza específica ( $S$ ) no mostró diferencias significativas entre los sitios de muestreo y los años de estudio (figura 30). El índice de Shannon-Weiner ( $H'$ ) mostró diferencias significativas entre la interacción sitios y años de estudio (Figura 31). El mayor  $H'$  registrado fue en el sitio 2 en ambos años de estudio.

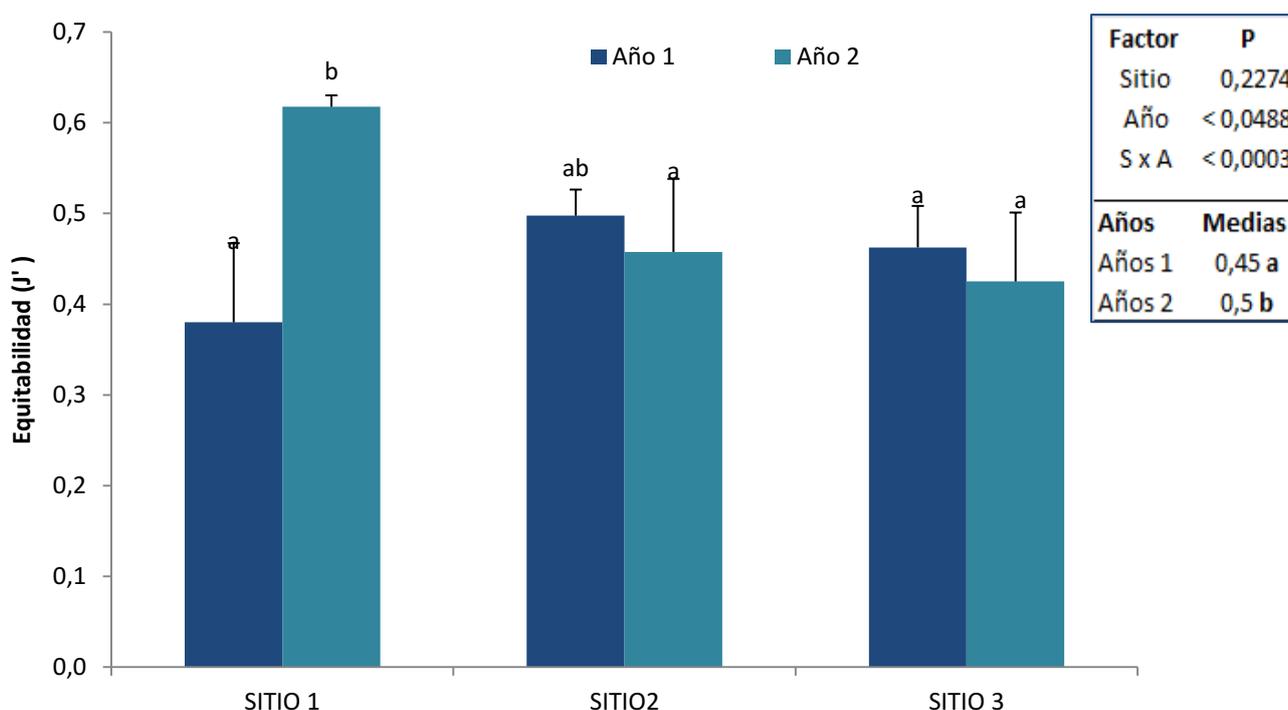


Figura 29. Valores de Equitabilidad ( $J'$ ) para los tres sitios de muestreo en las cuatro estaciones en los 2 años de muestreo. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de  $p$  derivado del ANOVA. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ). Las abreviaturas A y S se corresponden a año y sitio, respectivamente.

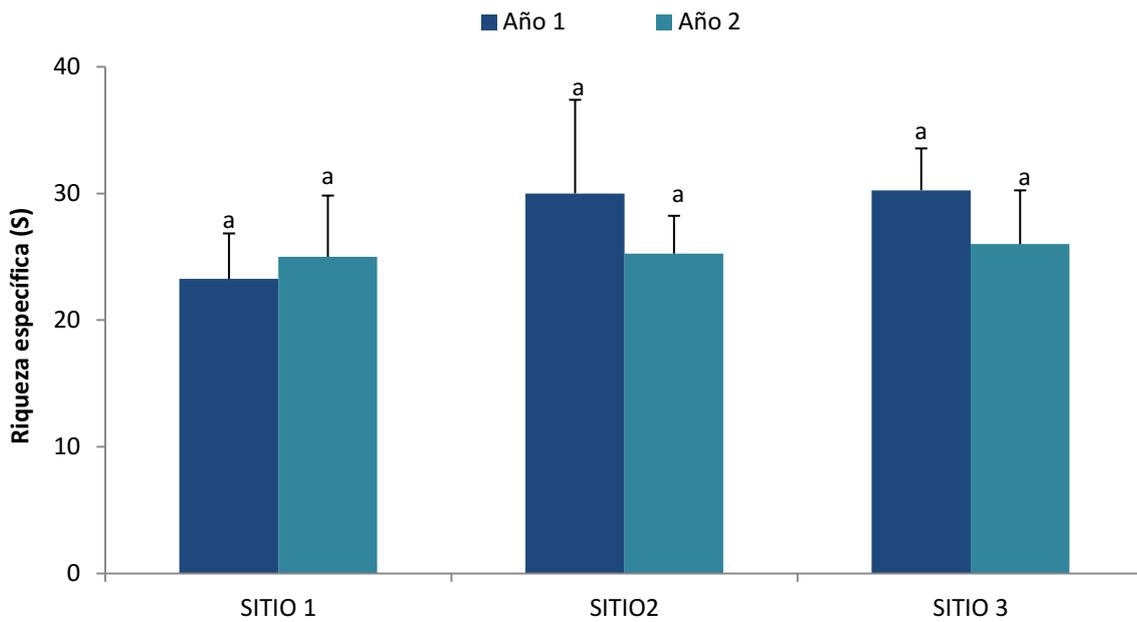


Figura 30. Valores de Riqueza específico (S) para los tres sitios de muestreo en las cuatro estaciones en los 2 años de muestreo. Letras distintas indican diferencias significativas ANOVA (Test deTukey,  $p < 0,05$ ).

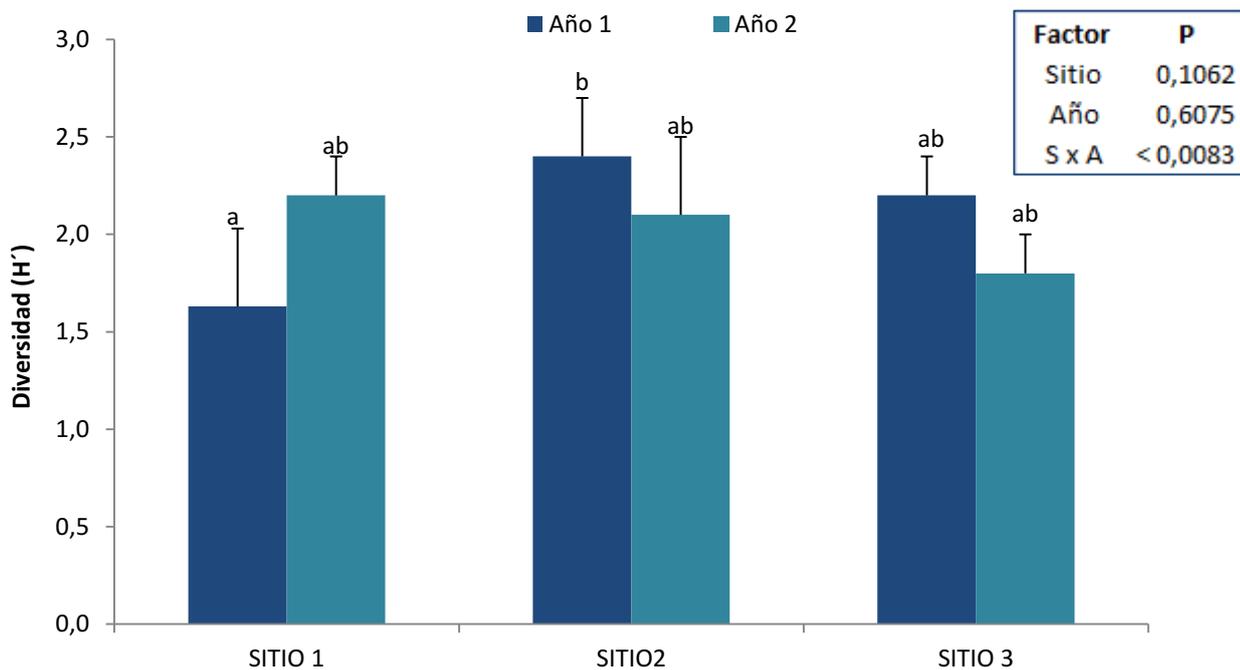


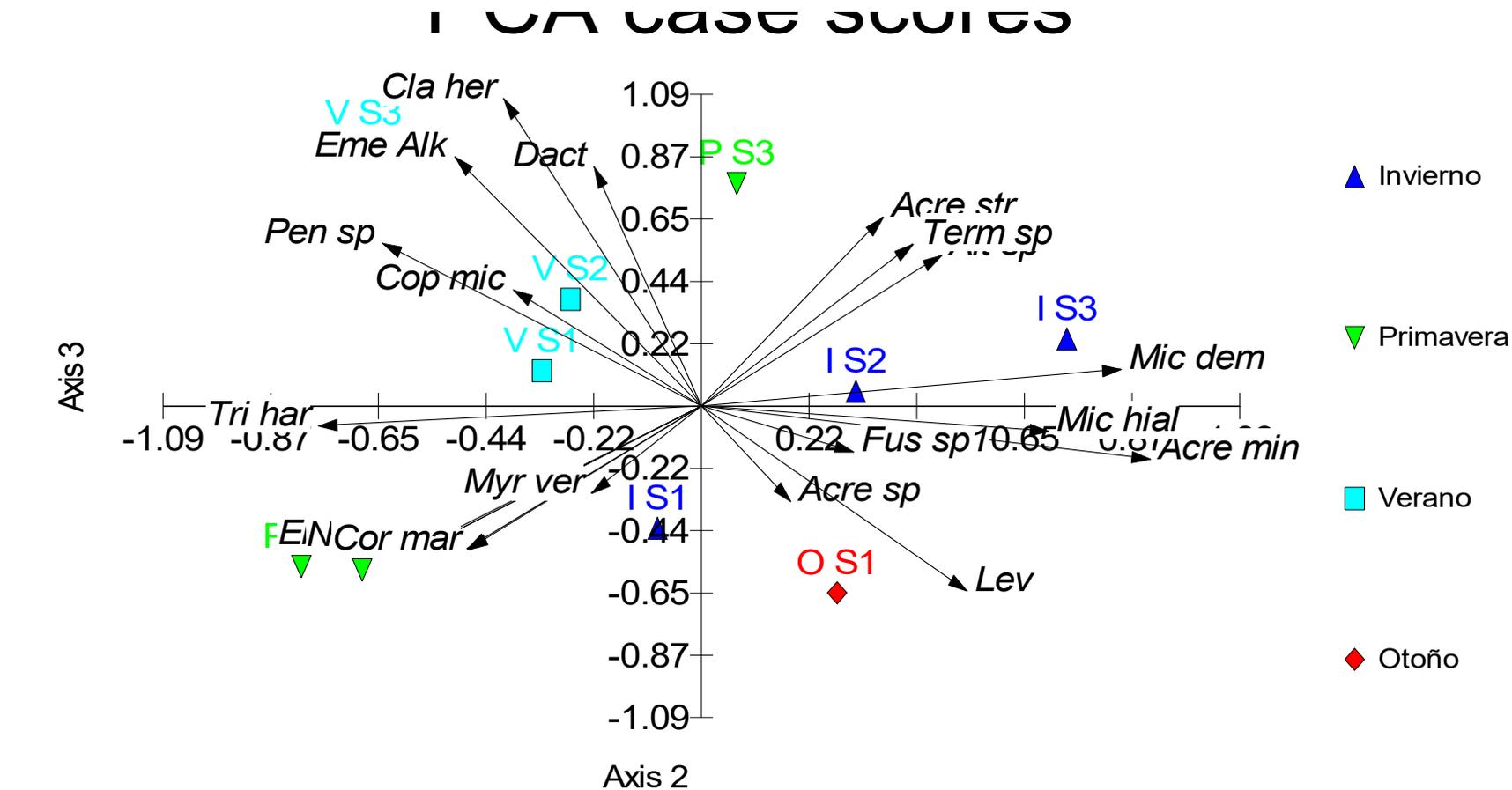
Figura 31. Valores de índice de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) para los tres sitios demuestreo en las cuatro estaciones en los 2 años de muestreo. Sobre el margen superior derecho se observa el valor de p derivado del ANOVA. Letras distintas indican diferencias significativas (Test deTukey,  $p < 0,05$ ). Las abreviaturas A y S se corresponden a año y sitio, respectivamente.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para cada año de estudio en el cual se utilizaron las frecuencias de aparición de las especies aisladas de tres sitios de muestreo y en las cuatro estaciones del año. Este diagrama bidireccional muestra la distribución de las muestras en dos ejes.

Para el primer año de estudio, los dos primeros ejes del PCA explicaron el 46,60 % de la varianza acumulado. El eje 2 con un 16,98 % y el eje 3 con un 13,40 % de la varianza acumulada. La figura 32 muestra una agrupación de especies fúngicas características de la estación verano y que son comunes a los tres sitios de estudio, las especies asociadas son *Cladosporium herbarum*, *Coprinellus micaceus*, *Dactylella* sp., *Emericellopsis alkalina* y *Penicillium* sp. En la agrupación correspondiente a primavera *Corollospora marítima*, *Emericellopsis minima* y *Myrothecium verrucaria* se encontraron asociadas al sitio 1 y al sitio 2. En invierno se observó una agrupación del sitio 2 y 3 asociada a dos micelios estériles. Para otoño no se registró una agrupación entre sitios, se observó que para el sitio 1 las cepas asociadas son *Acremonium* sp. y una especie de levadura.

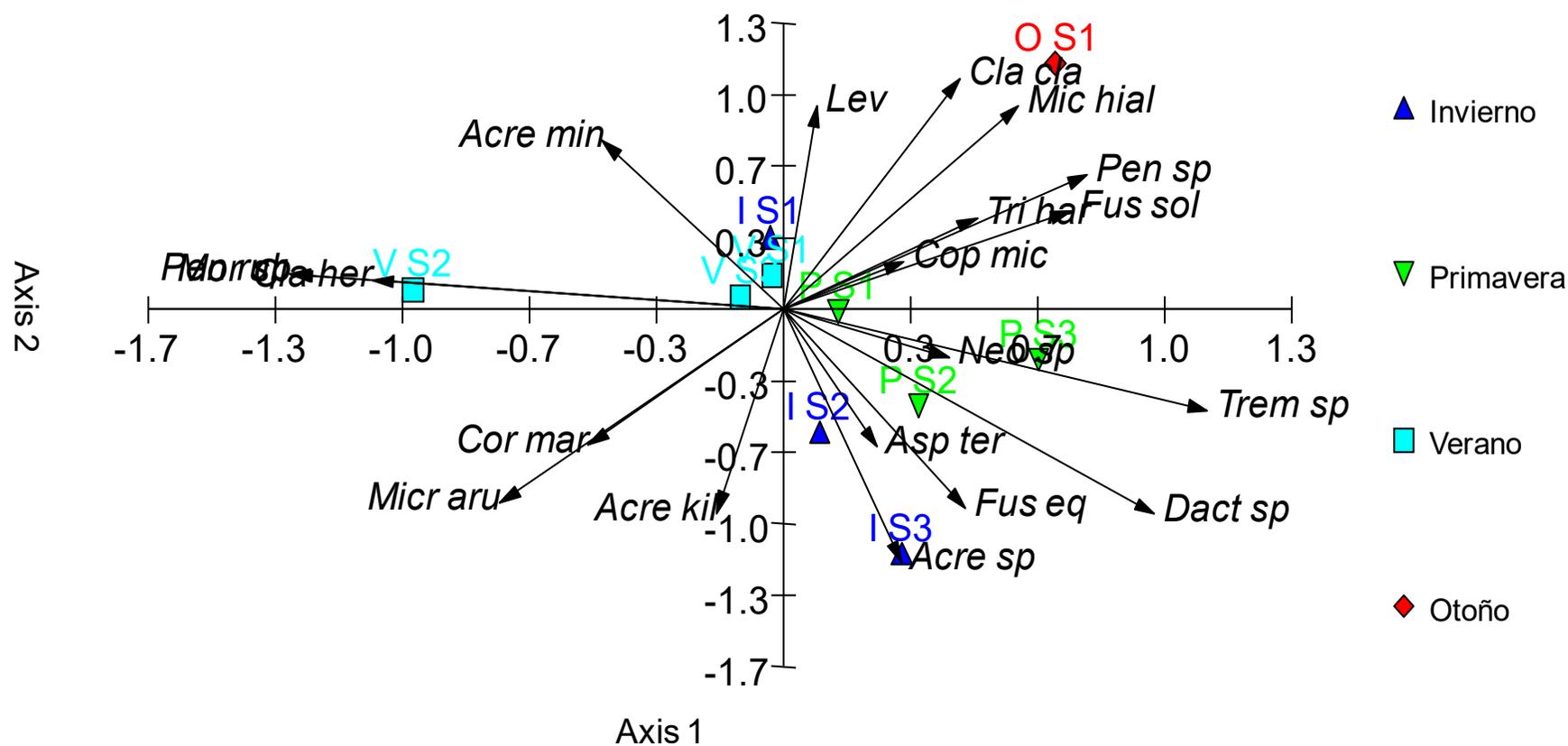
Para el segundo año de estudio los dos primeros ejes del ACP explicaron el 46,60 % de la varianza acumulado. El eje 1 con un 29,62 % y el eje 2 con un 16,98 % de la varianza acumulada. La figura 33 muestra una separación en dos grupos que corresponden a las estaciones de verano y primavera.

La agrupación de los tres sitios correspondiente a verano mostró asociación con *Acremonium minutisporum*, *Cladosporium herbarum* y *Penicillium rubrum* mientras que la agrupación de los tres sitios para primavera se encontró asociada a las especies *Coprinellus micaceus*, *Dactylella* sp., *Fusarium solani*, *Neocamarosorium* sp., *Penicillium* sp., *Trematosphaeria grisea* y *Trichoderma harzianum*. Los sitios 2 y 3 se encontraron agrupados para el invierno y asociados a *Acremonium* sp., *Aspergillus terreus* y *Fusarium equiseti*. Para otoño se observó agrupación de las especies *Cladosporium cladosporioides* y Micelio hialino asociadas al sitio 1.



	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4
<b>Eigenvalues</b>	6,517	3,737	2,950	2,198
<b>Percentage</b>	29,621	16,986	13,408	9,989
<b>Cum. Percentage</b>	29,621	46,606	60,014	70,003

Figura 32. Análisis de componentes principales (ACP) para las especies asociadas a las estaciones del primer año de estudio.



Vector scaling: 3,23

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4
<b>Eigenvalues</b>	5,215	3,582	2,547	2,246
<b>Percentage</b>	26,077	17,910	12,736	11,230
<b>Cum. Percentage</b>	26,077	43,987	56,723	67,953

Figura 33. Análisis de componentes principales (ACP) para las especies asociadas a las estaciones del segundo año de estudio.

## Determinación de la actividad enzimática de los suelos salino-sódicos de cangrejal

Se estudiaron las actividades enzimáticas fosfatasa, ureasa, deshidrogenasa y carboxilasa de los suelos de los tres sitios de estudio. La actividad carboxilasa no mostró actividad detectable por lo que no se presentarán los resultados para dicha actividad. Los valores registrados de las muestras de cada uno de los sitios analizados de actividad fosfatasa, ureasa y deshidrogenasa se muestran en la figura 34.

Las actividades fosfatasa y deshidrogenasa no mostraron diferencias significativas entre los sitios de estudio, sin embargo la actividad ureasa mostró diferencias significativas ( $p=0,0439$ ) en los tres sitios de estudio para dicha actividad.

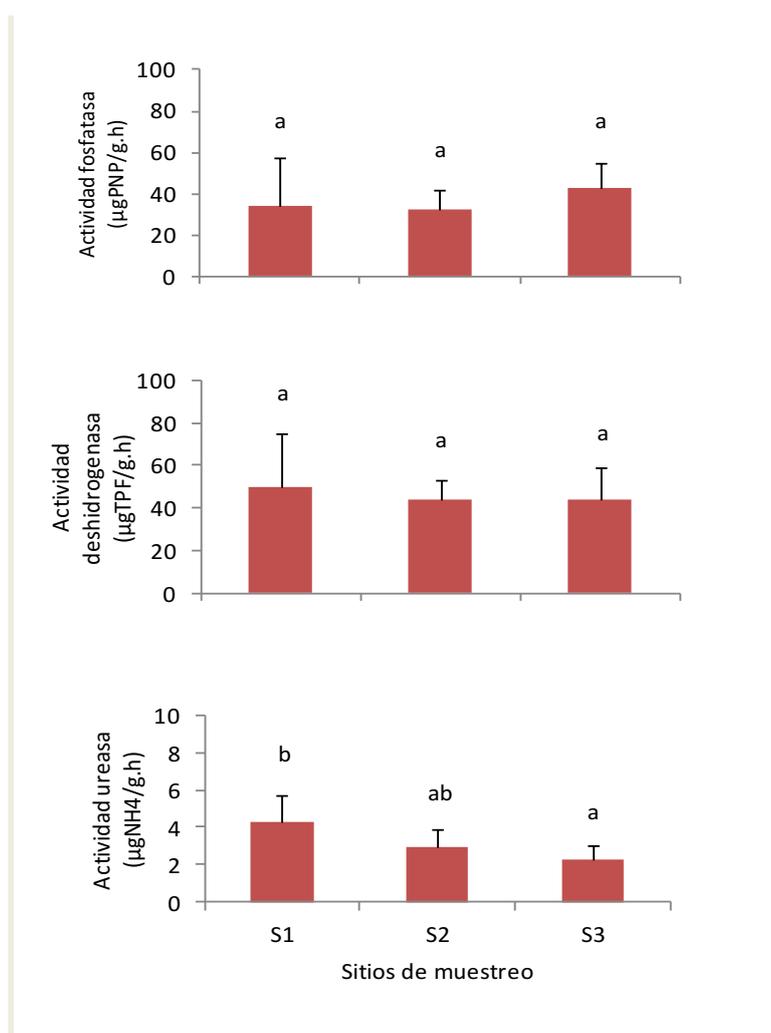


Figura 34. Valores promedio de las actividades enzimáticas del suelo. Letras distintas indican diferencias significativas ANOVA (Test deTukey,  $p < 0,05$ ).

## Actividad enzimática de cepas fúngicas: Screening enzimático en medio sólido

La actividad enzimática de los hongos aislados de este ambiente está condicionada por la salinidad y el pH, por lo tanto sugiere la producción de enzimas que actúan a pH alcalino. Estas enzimas tienen potencial aplicación en el desarrollo de procedimientos biotecnológicos. No obstante, no hay información sobre la habilidad de representantes fúngicos asociados a los suelos de los cangrejales para producir enzimas alcalinas. La presente contribución representa un aporte al conocimiento de la comunidad fúngica asociada a la descomposición en suelos salino-sódicos y su habilidad para producir enzimas relacionadas con la degradación de materia orgánica, los cuales son de gran interés en biotecnología en condiciones de alcalinidad.

Se estudió la capacidad lipolítica, amilolítica, caseinolítica, celulolítica y quitinolítica de 29 cepas fúngicas en medios agarizados, salvo para la actividad quitinolítica que se evaluó a pH 7 y 21 días de incubación, las otras actividades mencionadas se realizaron a tres pH (5, 8 y 10) durante 8 días de incubación. La Figura 35, muestra resultados de las actividades positivas del test en placa para *Acemonium* sp. en sustrato almidón, *Chaetomium globosum* en sustrato carboximetilcelulosa, *Gliocladium catenulatum* en sustrato caseína y *Aspergillus terreus* en sustrato Tween 20. La figura 36 muestra resultados del test en placa para actividad quitinolítica positiva para *Gliocladium catenulatum* y negativa para *Emericellopsis alkalina*.

La actividad enzimática quitinolítica fue positiva para 21 cepas: *Acremonium* sp., *Acremonium minutisporum*, *Acremonium kiliense*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Coprinellus micaceus*, *Cladosporium caladosporioides*, *Corollospora maritima*, *Dactylella* sp., *Emericellopsis minima*, *Fusarium equiseti*, *Gliocladium catenulatum*, Micelio demateaceo, Micelio hialino, *Neocamarosporium* sp., *Purpureocillium lilacinum*, *Penicillium* sp., *Trematosphaeria grisea*, *Trichoderma harzianum*, mientras que 8 cepas: *Chaetomium globosum*, *Emericellopsis alkalina*, *Fusarium konzum*, *Fusarium*

*oxysporum*, *Fusarium solani*, *Microsphaeropsis arundinis*, *Penicillium rubrum* y *Talaromyces stipitatus* no mostraron actividad bajo las condiciones de estudio mencionadas.

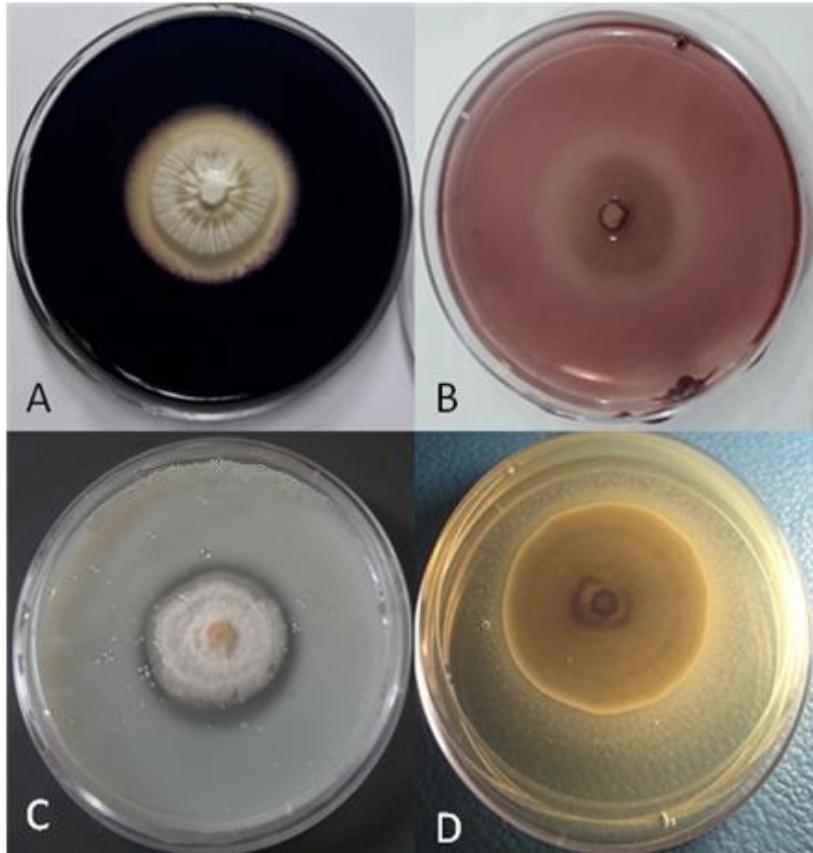


Figura 35. Actividad enzimática en placa positiva, presencia de halos en cuatro sustratos A) almidón, B) Carboximetilcelulosa, C) Caseína, D) Tween 20. Las dos primeras reveladas con lugol y Rojo Congo respectivamente.

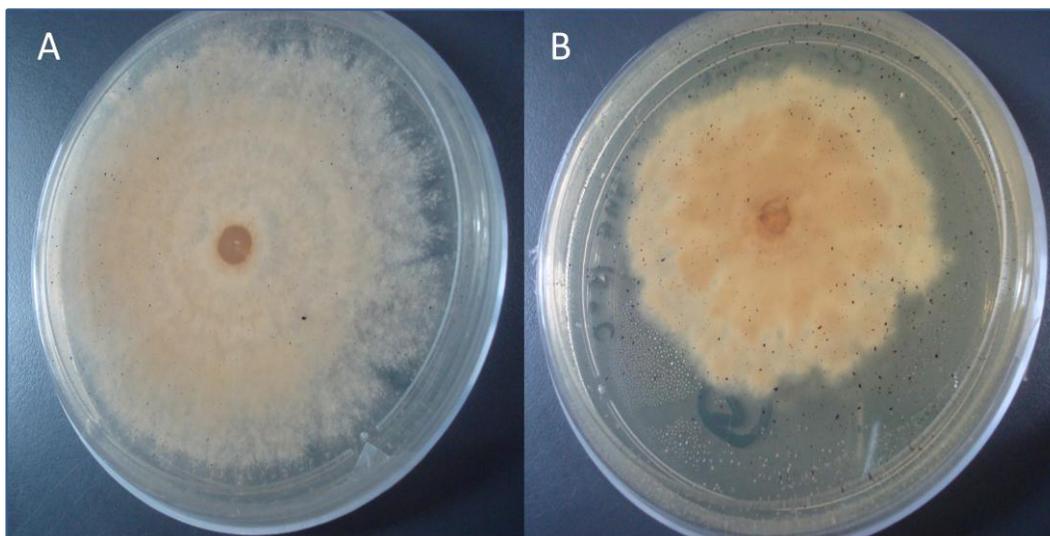


Figura 36. Actividad quitinolítica en placa. A) Actividad positiva, B) Actividad negativa.

La figura 37 muestra la actividad lipolítica positiva para 22 cepas que mostraron actividad en al menos uno de los tres pH estudiados. Las cepas fúngicas mostraron diferencias significativas entre ellas y su capacidad enzimática frente a los diferentes pH estudiados ( $p < 0,0001$ ). *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum* y *Neocamarosporium* sp. sólo mostraron actividad bajo pH 8. *Acremonium minutisporum*, *Aspergillus terreus*, *Beauveria bassiana*, *Emericellopsis alkalina*, *Emericellopsis minima*, *Gliocladium catenutatum* y *Penicillium rubrum* mostraron actividad a los tres pH estudiados, con su mayor actividad a pH 10, excepto para *Emericellopsis minima* y *Penicillium rubrum* con su mayor actividad a pH 8 y *Beauveria bassiana* a pH 5. Todas las cepas que mostraron actividad positiva, tuvieron mayor producción enzimática a pH alcalino, 16 de ellas a pH 10 y otras 5 cepas a pH 8. La máxima actividad lipolítica registrada entre todas las cepas estudiadas fue la de *Trichoderma harzianum* a pH 8.

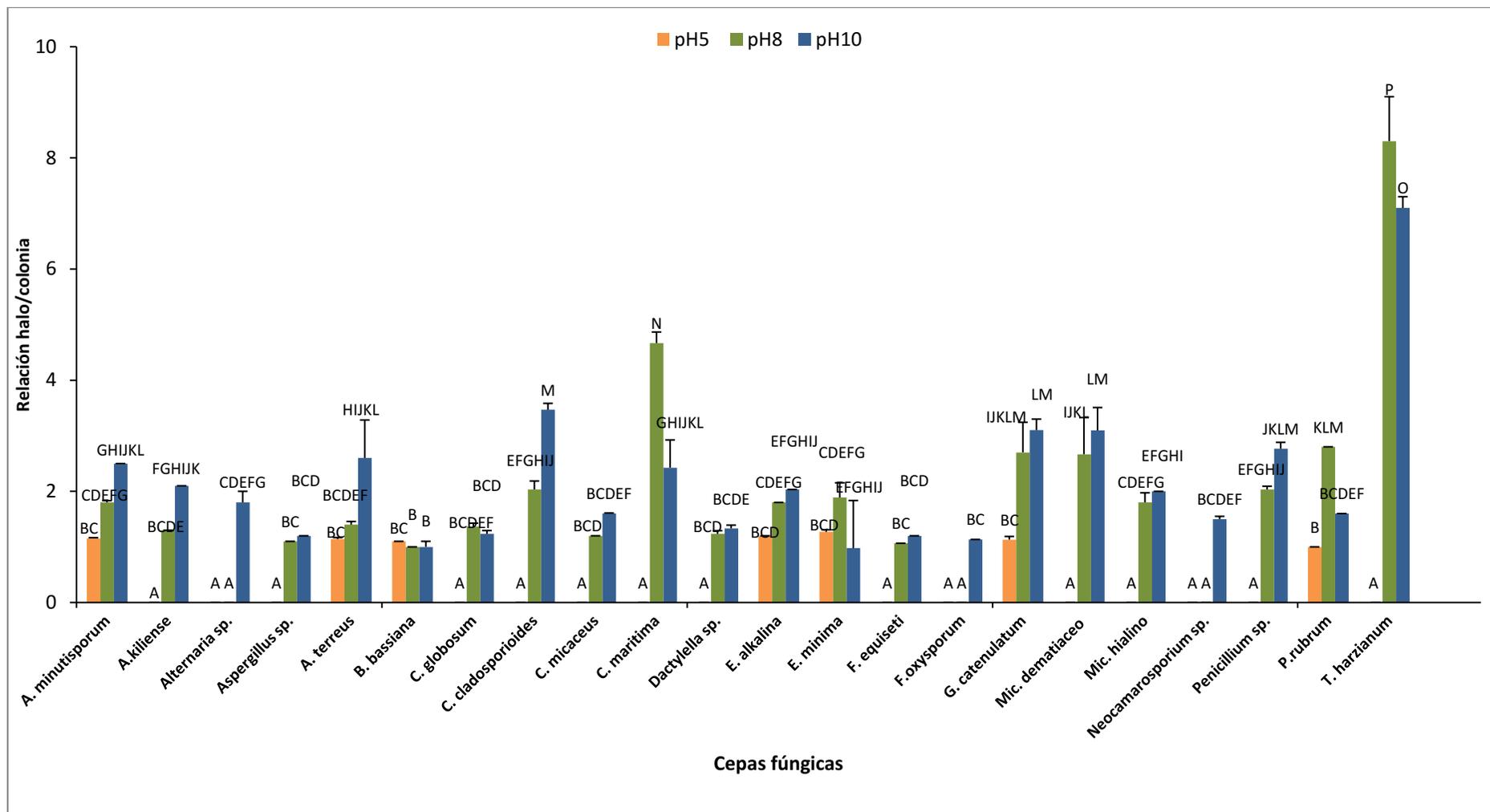


Figura 37. Actividad lipolítica a tres pH (5, 8,10) de 22 cepas fúngicas aisladas de suelo de tres sitios de muestreo (S1, S2, S3). \*cuantificación de la actividad enzimática observada calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm). Medias y desvíos de tres replicas. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, p < 0,05).

La figura 38 muestra 23 cepas fúngicas que registraron actividad proteolítica positiva en al menos a uno de los tres pH estudiados. Las cepas mostraron diferencias significativas entre ellas y los pH estudiados ( $p < 0,0001$ ). *Acremonium kiliense*, *Coprinellus micaceus*, *Fusarium equiseti* y *Gliocladium catenulatum* mostraron actividad proteolítica en todos los pH, mientras que *Acremonium minutisporum*, *Corollospora maritima*, *Fusarium solani*, *Talaromyces stipitatus* mostraron actividad solo a pH 5 y *Bauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* a pH 8. *Alternaria* sp. y *Purpureocillium lilacinum* solo a pH alcalino (8 y 10). Mientras que otras diez cepas mostraron actividad a pH 5 y 8. La mayor actividad registrada entre todas las especies fúngicas estudiadas fue a pH 8 para un micelio hialino estéril.

La figura 39 muestra 23 cepas con actividad amilolítica, todas las especies mostraron diferencias significativas entre ellas y para cada pH estudiado ( $p < 0,0001$ ). Doce cepas mostraron actividades para todos los pH, entre ellas *Aspergillus* sp. mostró la mayor actividad amilolítica. Siete cepas mostraron actividad tanto a pH 5 como a pH 8, solo *Fusarium solani* y *Talaromyces stipitatus* mostraron actividades a pH 5. *Microsphaeropsis arundinis* mostró actividad solo para pH 8 y *Gliocladium catenulatum* mostró actividad a pH 8 y 10.

En la figura 40 se muestra la actividad carboxilasa para los tres pH ( $p < 0,0001$ ). Todas las cepas tuvieron diferencias significativas entre ellas y entre los tres pH estudiados. *Acremonium* sp., *Acremonium kiliense*, *Coprinellus micaceus*, *Emericellopsis minima* y *Purpureocillium lilacinum* mostraron actividad a todos los pH. *Aspergillus terreus*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium oxysporum* y *Neocamarosporium* sp. mostraron actividad exclusivamente a pH alcalino (8 y 10), mientras que *Fusarium kunzum* evidenció actividad solo a pH 8. Por otro lado, seis cepas mostraron actividad solo a pH 5, entre ellas *Fusarium equiseti* y *Talaromyces stipitatus* fueron las que mayor actividad carboxilasa registraron, también *Acremonium kiliense* presentó mayor actividad a pH 5 a pesar de haber tenido actividad en los tres pH. Las cepas *Dactylella* sp., *Microesphaeropsis* sp. y *Penicillium* sp. fueron positivas tanto a pH 5 como a pH 8.

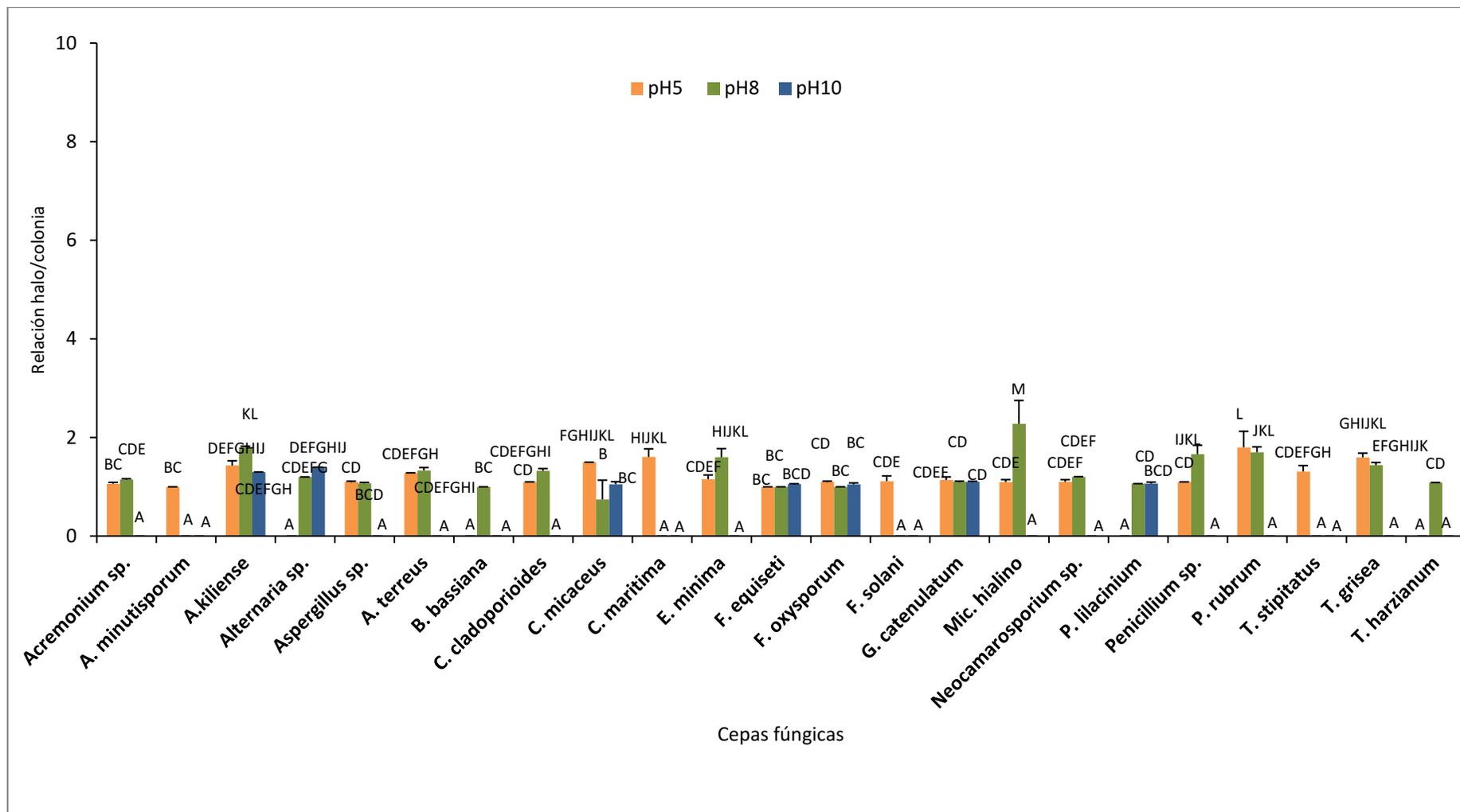


Figura 38. Actividad proteolítica a tres pH (5, 8, 10) de 23 cepas fúngicas aisladas de suelo de tres sitios de muestreo (S1, S2, S3). \*cuantificación de la actividad enzimática observada calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm). Medias y desvíos de tres replicas. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, p < 0,05).

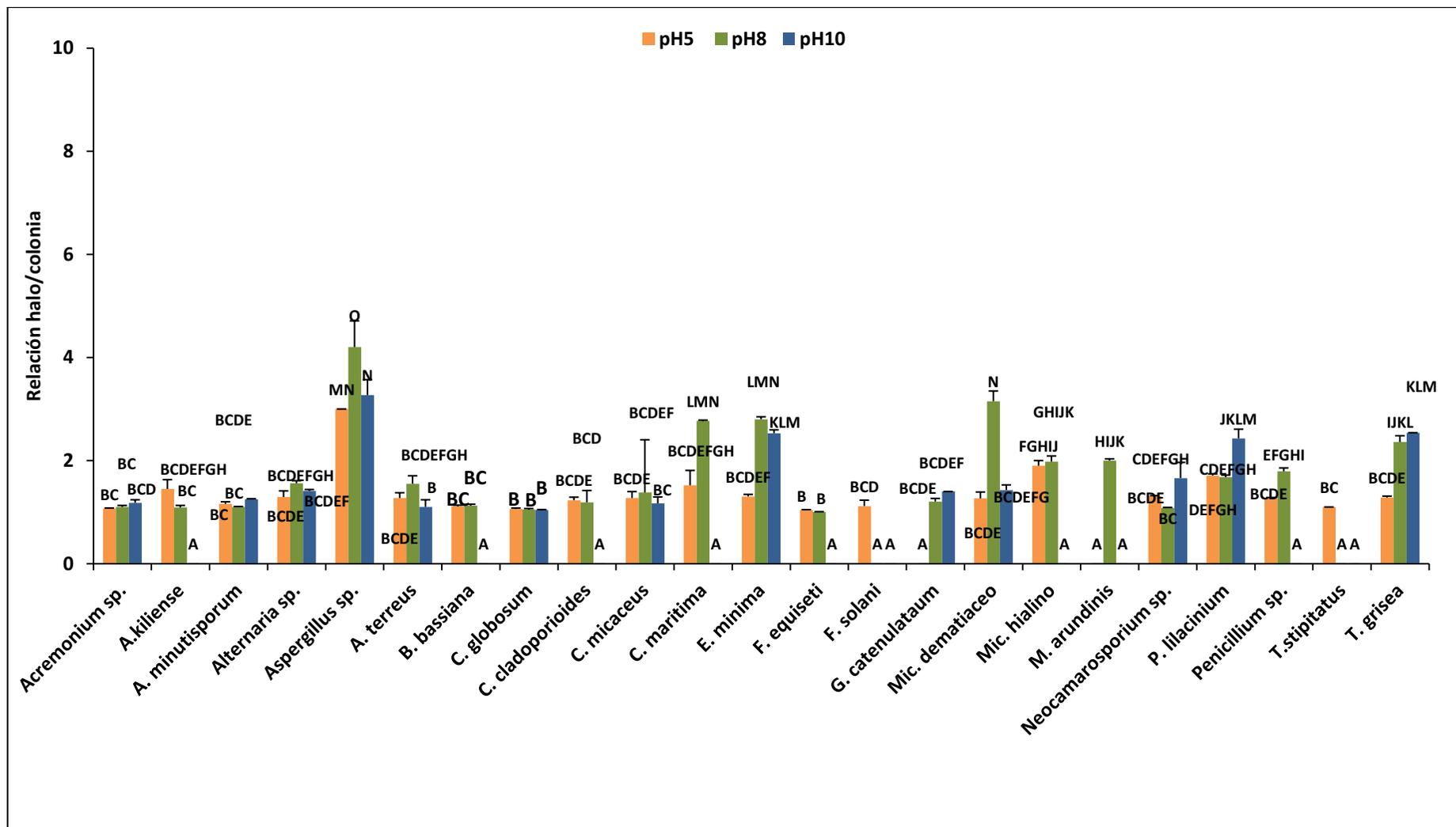


Tabla 39. Actividad amilolítica a tres pH (5, 8, 10) de 22 cepas fúngicas aisladas de suelo de tres sitios de muestreo (S1, S2, S3). \*cuantificación de la actividad enzimática observada calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm). Medias y desvíos de tres replicas. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, p < 0,05).

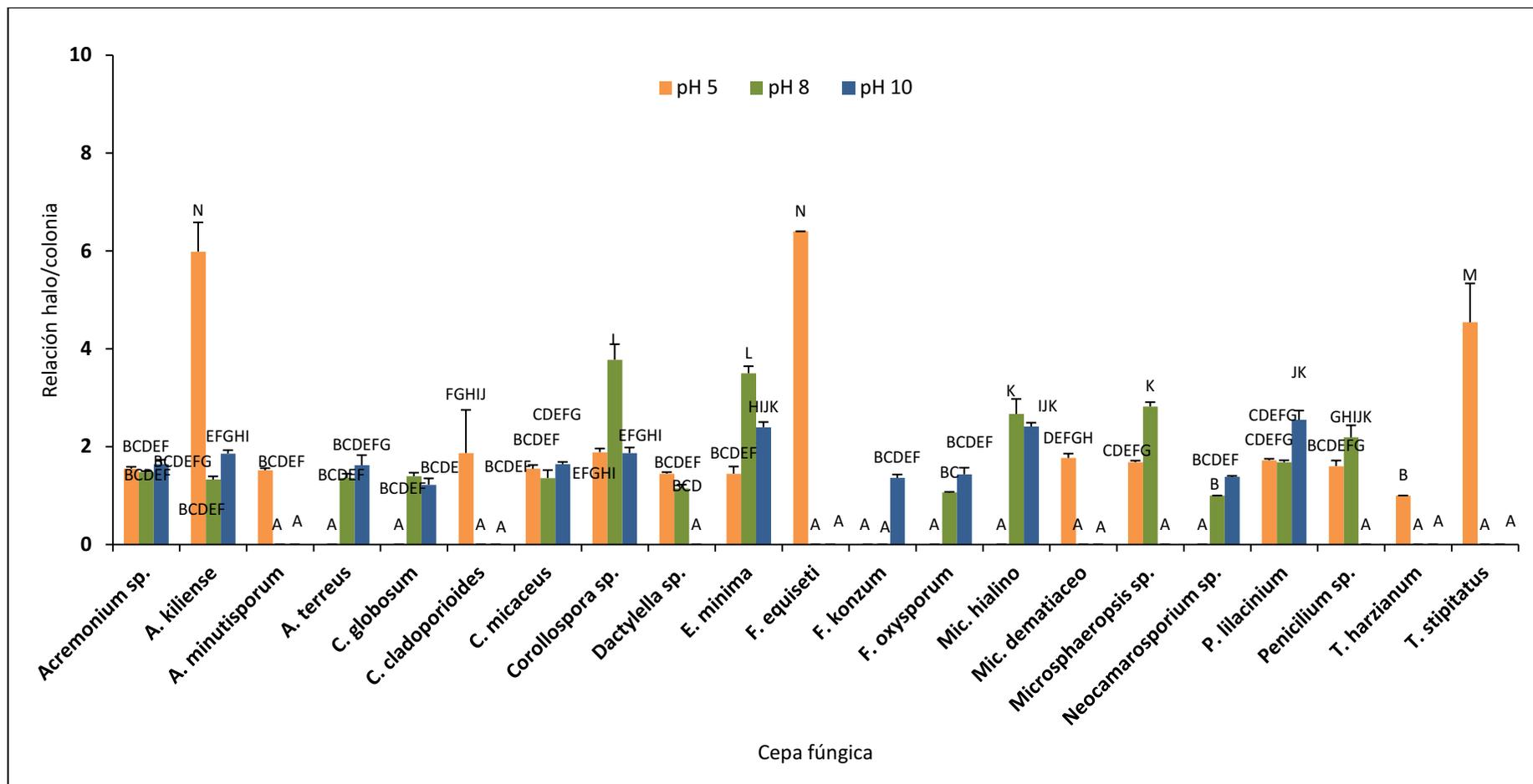


Tabla 40. Actividad carboxilasa a tres pH (5, 8,10) de 21 cepas fúngicas aisladas de suelo de tres sitios de muestreo (S1, S2, S3). \*cuantificación de la actividad enzimática observada calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm). Medias y desvíos de tres replicas. Letras distintas indican diferencias significativas (Test de Tukey, p < 0,05).

La producción de enzimas por las cepas fúngicas en los distintos tipos de sustratos fue dependiente de pH del medio de cultivo (Tabla 7). La mayoría de los hongos produjo actividad lipasa bajo condiciones alcalinas del medio (pH 8 y 10), mientras que se encontró una mayor actividad proteasa a pH 5.

Tabla 7. Tabla de contingencia para la asociación entre el pH y la actividad enzimática.

pH	Amilasa	Celulasa	Lipasa	Proteasa	Total
5	23 <sup>a</sup>	16	8	20	67
8	22	16	20	19	77
10	13	14	23	8	58
Total	58	46	51	47	202

<sup>a</sup> frecuencia observada.

$\chi^2(0,05; 6)=0,021$

Se registró la relación crecimiento/halo cada 48 hs de todas las cepas fúngicas para su actividad lipolítica, proteolítica y amilolítica bajo diferentes condiciones de pH.

La figura 41 muestra la evolución de la actividad lipolítica a pH 8 y 10. A pH 8, 15 cepas mostraron actividad a las 48 hs de incubación y solo 3 cepas después de las 48 hs, la cepa con mayor actividad fue *Trichoderma harzianum* que mostró actividad creciente desde el segundo día de incubación al último día de medición. El número de cepas que produjo actividad a pH 10 fue mayor que a pH 8, estas cepas mostraron, en su mayoría, actividad a partir de las 48 hs de incubación, cinco después de las 48 hs, tres cepas después del cuarto día y solo una después del sexto día de incubación. La cepa que mostró más actividad a pH 10 fue la de *Trichoderma harzianum* al octavo día de incubación, sin embargo a las 48 hs la cepa con mayor actividad fue *Gliocladium catenulatum*.

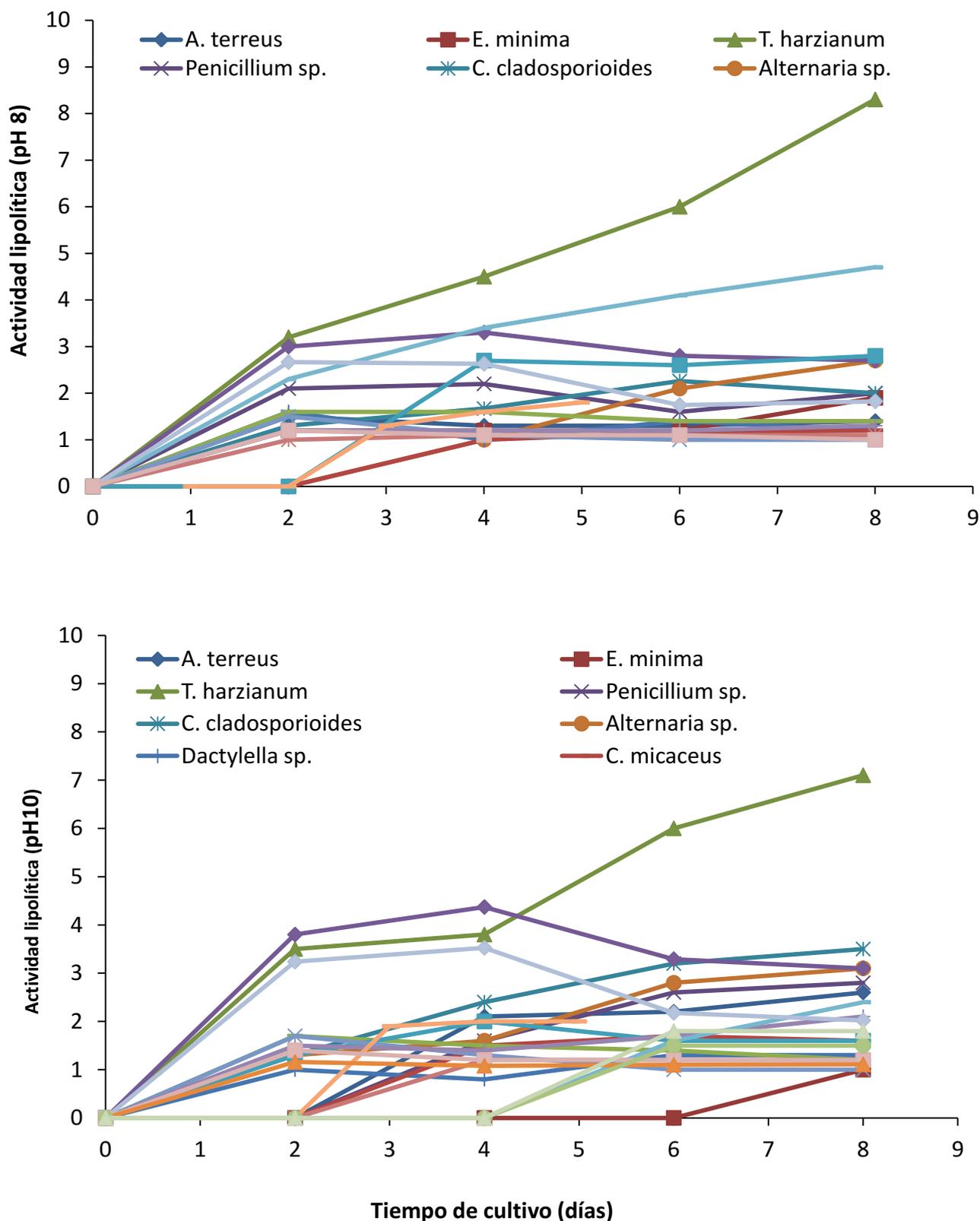


Figura 41. Actividad enzimática registrada cada 48 hs para cada cepa en sustratos Tween 20 a pH 8 y 10. Actividad enzimática calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm).

La figura 42 muestra la evolución de la actividad proteolítica a pH 8 y 10, la mayoría de las cepas mostraron actividad a pH 8, a partir de las 48 hs de incubación. *Penicillium* sp. fue la cepa que mostró mayor actividad al sexto día y continuó hasta el último día de medición. En pH 10 solo 6 cepas mostraron actividad proteolítica, la cepa con mayor actividad fue *Gliocladium catenulatum*, que mostró su pico máximo de actividad a las 48 horas de incubación.

La actividad amilolítica a pH 8 y 10 (Figura 43) mostró mayor cantidad de cepas productoras de esta actividad a pH 8, la mayor actividad registrada fue para *Aspergillus* sp. el cuarto día de incubación. A pH 10, la mayoría mostró actividad a las 48 hs de incubación, la cepa que registró mayor actividad *Emericellopsis minima* al sexto día de medición.

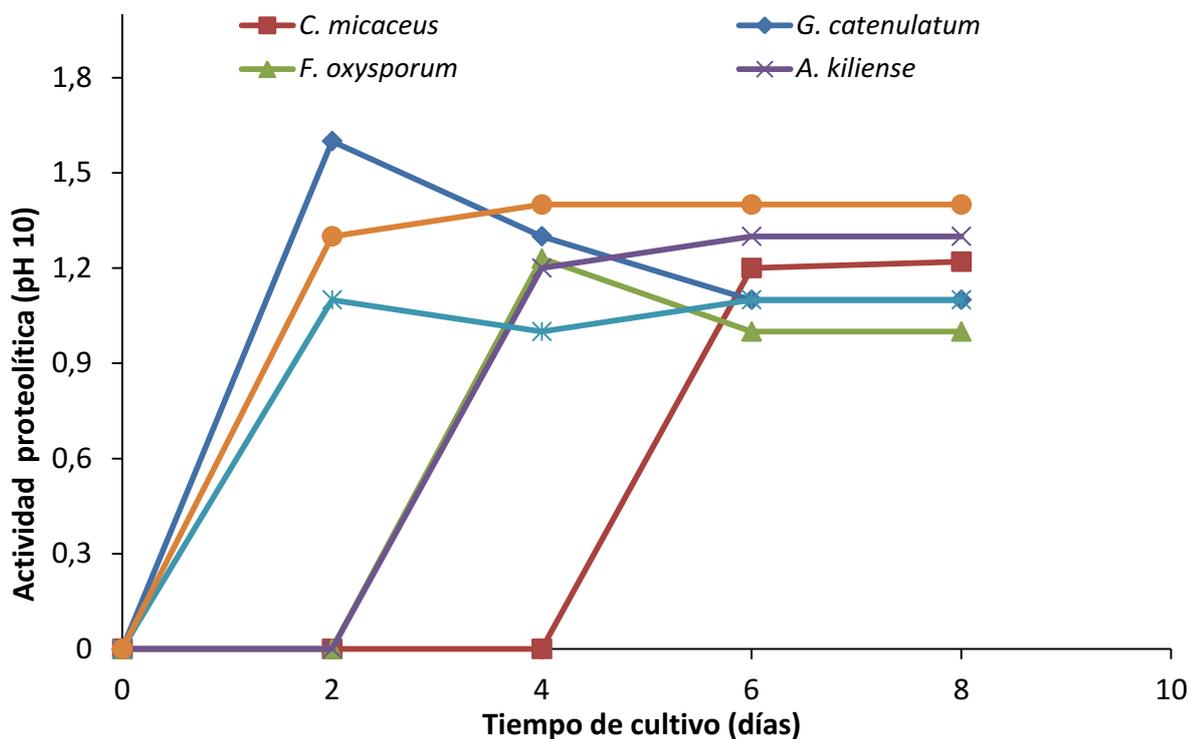
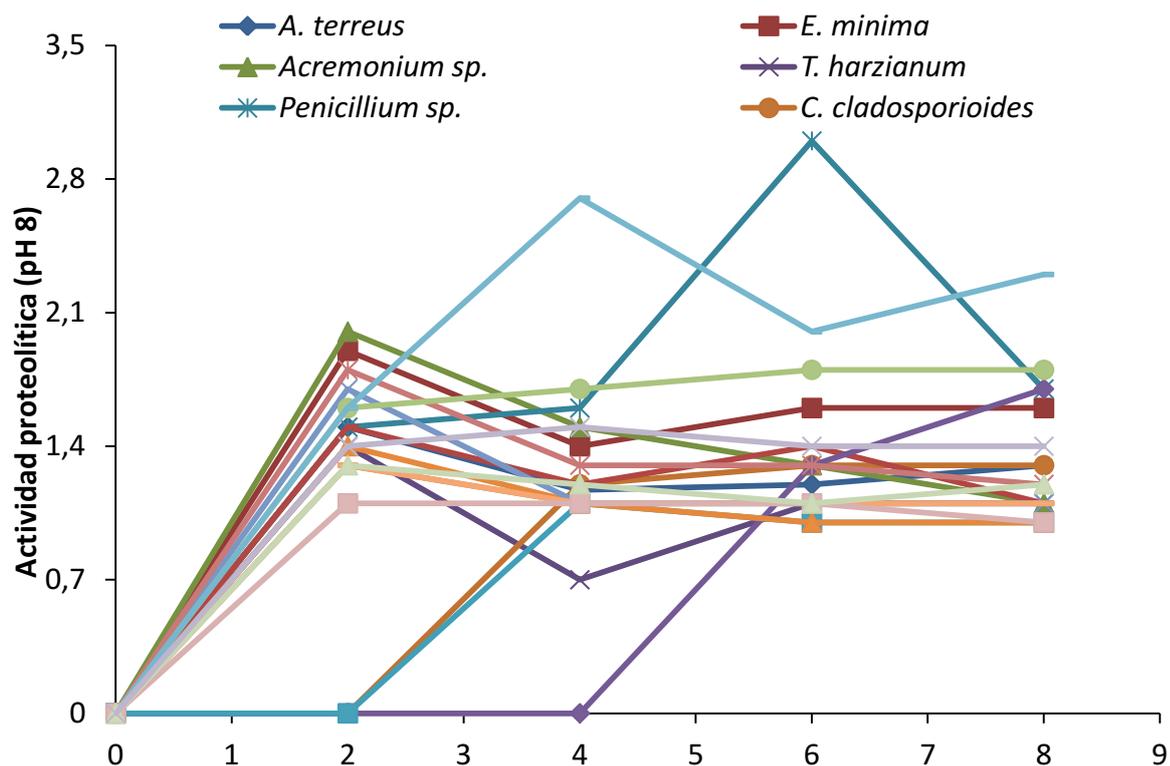


Figura 42. Actividad enzimática registrada cada 48 hs para cada cepa en sustratos Caseína a pH 8 y 10. Actividad enzimática calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm).

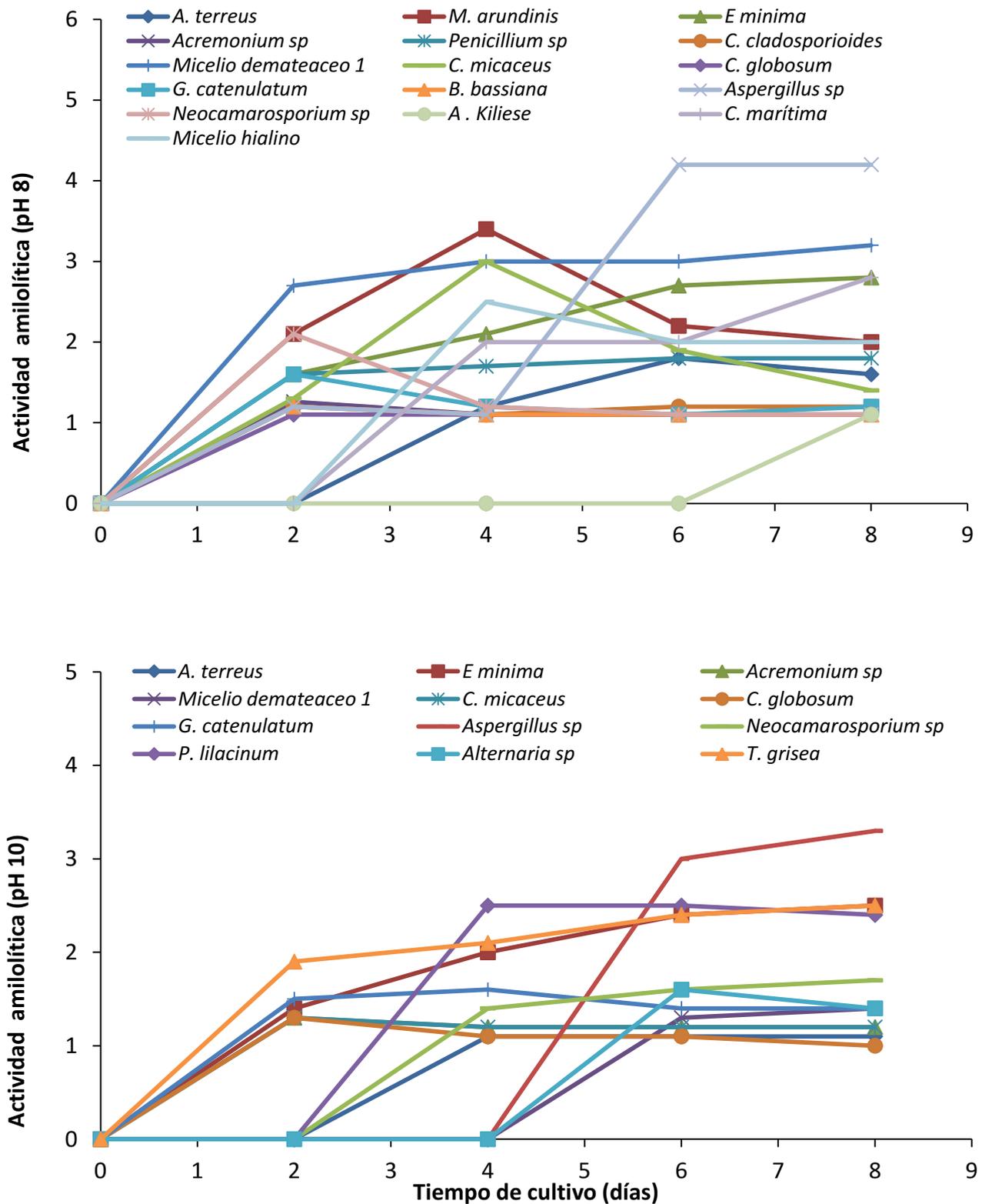


Figura 43. Actividad enzimática registrada cada 48 hs para cada cepa en sustratos almidón a pH 8 y 10. Actividad enzimática calculada como diámetro del halo de degradación (cm)/diám de crecimiento de la colonia (cm).

## Actividad enzimática de cepas fúngicas: Screening preliminar en extractos de cultivos líquidos

Para analizar la actividad enzimática en medio de cultivo líquido, se seleccionaron 20 cepas fúngicas que mostraron buena actividad enzimática en los tests en placa. Se testeó actividad quitinolítica (con Chitin Azure como sustrato) y actividad proteolítica (con caseína como sustrato). Se tuvo en cuenta que las cepas hubieran sido buenas productoras de actividad enzimática en condiciones de alcalinidad, lo que resulta de gran interés en futuras aplicaciones biotecnológicas e industriales. Además se realizó la medición de la actividad queratinolítica, enzima de interés en el depilado enzimático de cueros. La tabla 8 indica los valores de actividades quitinolítica, queratinolítica y caseinolítica estimadas para 20 cepas seleccionadas a partir de aislamientos de suelos salinos sódicos.

Tabla 8. Actividades quitinolítica, queratinolítica y caseinolítica (U/ml) de los extractos fúngicos

Especies fúngicas	Quitinolítica	Queratinolítica	Caseinolítica
	V.activ.quit (Am-AB)/2h.0,1	V.activ.quit (Am-AB)/2h.0,1	V.activ.quit (Am-AB)/30.10
<i>Acremonium kiliense</i>	<b>0,585</b>	<b>0,6</b>	0,039
<i>Acremonium minutisporum</i>	<b>0,71</b>	<b>0,66</b>	0,019
<i>Acremonium</i> sp.	<b>0,785</b>	<b>0,83</b>	0,006
<i>Alternaria</i> sp.	0,135	<b>0,51</b>	0,012
<i>Aspergillus</i> sp.	<b>0,37</b>	<b>0,56</b>	0,018
<i>Aspergillus terreus</i>	<b>0,685</b>	<b>0,63</b>	0,009
<i>Beauveria bassiana</i>	<b>1,11</b>	0,125	<b>0,06</b>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<b>1,63</b>	0,455	<b>0,046</b>
<i>Coprinellus micaceus</i>	<b>0,305</b>	<b>0,615</b>	0,008
<i>Dactylella</i> sp.	<b>0,445</b>	0,09	0,028
<i>Emericellopsis minima</i>	0,18	<b>0,75</b>	<b>0,108</b>
<i>Fusarium equiseti</i>	<b>0,545</b>	0,49	0,025
<i>Fusarium oxysporum</i>	<b>1,53</b>	<b>1,37</b>	<b>0,085</b>
<i>Gliocladium catenulatum</i>	0,065	<b>1,31</b>	0,017
Micelio hialino	0,14	<b>1,53</b>	0,017
<i>Neocamarosporium</i> sp.	<b>0,34</b>	<b>0,66</b>	0,004
<i>Penicillium</i> sp.	<b>1,005</b>	<b>1,01</b>	0,004
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	<b>0,34</b>	<b>0,9</b>	0,003
<i>Trematosphaeria grisea</i>	<b>1,015</b>	<b>0,81</b>	0,018
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,19	0,48	0,007

Valores en Azul y negrita indican la mayor actividad enzimática registrada.

De las 20 cepas probadas frente al sustrato Chitin Azure las cepas que mostraron mayor actividad quitinolítica en orden decreciente fueron: *Cladosporium cladosporoides*, *Fusarium oxysporum*, *Beauveria bassiana*, *Trematosphaeria grisea*, *Penicillium* sp., *Acremonium* sp., *Acremonium minutisporum*, *Aspergillus terreus*, *Acremonium killiense*, *Fusarium equiseti*, *Dactylella* sp., *Aspergillus* sp., *Neocamarosporium* sp., *Purpureocillium lilacinum* y *Coprinellus micaceus*.

Los extractos de cultivo de las mismas cepas fúngicas mostraron actividad positiva para la actividad queratinolítica frente al sustrato residuo pelo bovino (RP). Las cepas con mayor actividad en orden decreciente fueron: micelio hialino, *Fusarium oxysporum*, *Gliocladium catenulatum*, *Penicillium* sp., *Purpureocillium lilacinum*, *Acremonium* sp., *Trematosphaeria grisea*, *Emericellopsis minima*, *Acremonium minutisporum*, *Neocamarosporium* sp., *Aspergillus terreus*, *Coprinellus micaceus*, *Acremonium killiense*, *Aspergillus* sp. y *Alternaria* sp.

La actividad caseinolítica registrada para las 20 cepas estudiadas mostró actividad  $\geq 0,045$  para 4 cepas: *Emericellopsis minima*, *Fusarium oxysporum*, *Beauveria bassiana* y *Cladosporium cladosporioides*; el resto de las cepas estudiadas mostró valores  $\leq 0,045$ .

## **Depilado enzimático sobre cueros bovinos con extractos enzimáticos provenientes de hongos aislados del cangrejal**

Se seleccionaron seis cepas fúngicas que mostraron buena actividad enzimática queratinolítica a partir de medios líquidos y se probaron sobre cueros bovinos frescos para realizar depilado enzimático como una posible aplicación biotecnológica de la actividad queratinolítica producida por distintas cepas fúngicas.

Las cepas seleccionadas fueron *Fusarium oxysporum* (FO), *Gliocladium catenulatum* (GC), *Penicillium* sp. (Psp), *Purpureocillium lilacinum* (PL), *Acremonium* sp. (A), *Emericellopsis minima* (EM) y un Micelio hialino estéril (MHE)

El comportamiento de los extractos de hongos seleccionados en relación con su actividad queratinolítica se muestra en la Tabla 6. Las actividades enzimáticas disminuyeron en el siguiente orden: MHE > FO > GC > Psp > PL > A > EM. La cepa MHE produjo un extracto enzimático crudo (EE) con la actividad enzimática más alta: 9.06 Uker mientras que EM produjo la menor actividad registrada (1,5 Uker). Las otras cepas, FO, GC, Psp PL y A, presentaron actividades queratinolíticas intermedias, en un orden decreciente, respectivamente.

### Observación al microscopio electrónico de barrido (MEB)

Es importante recordar que el curtido es el proceso químico por el cual se convierten las pieles de animales en cuero. Existen tres etapas en el procesamiento del cuero, en la primera etapa se da el depilado, que consiste en la eliminación de la epidermis y los pelos de la piel, mientras que la dermis deberá permanecer intacta en cuanto a su contenido y calidad de colágeno. Dicho esto se podrá comprender mejor el efecto de los extractos enzimáticos fúngicos sobre la piel bovina.

En la Figura 44 se observa: A) El control, piel bovina con buffer y biocida, donde se observa que la epidermis y el cabello no presentan modificación y B) Depilado enzimático de la piel bovina con extracto enzimático de *Fusarium oxysporum* (FO). Esta cepa fue la que mostró el mayor efecto, provocando la ausencia de epidermis, las papilas dérmicas se hacen visibles y los folículos pilosos se encuentran vacíos.

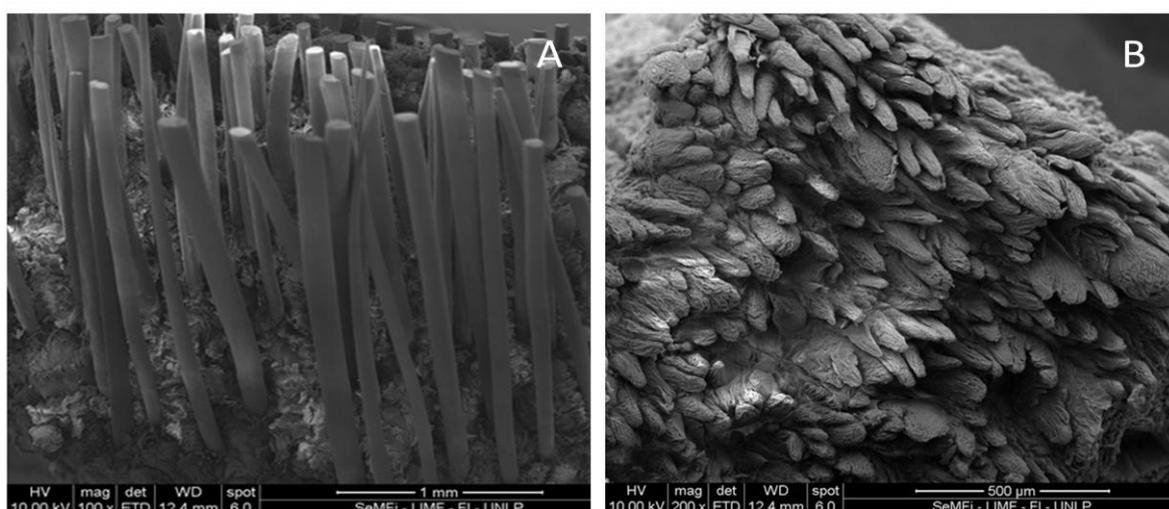


Figura 44. A) Piel bovina control. B) Piel bovina con EE de *Fusarium oxysporum*.

Se observaron cambios en la piel dependiendo del extracto enzimático producido por cada cepa fúngica. En la figura 45, el extracto enzimático de *Acremonium* sp. (A), causó fuertes cambios: remoción de la epidermis, capas papilares expuestas, folículos pilosos vacíos y otros con sus cutículas desprendidas, mientras que el extracto enzimático del Micelio hialino (MHE) provocó el desprendimiento del pelo y la epidermis. El extractos enzimático de *Emericellopsis minima* (EM) solo causó el desprendimiento de la vaina del folículo piloso.

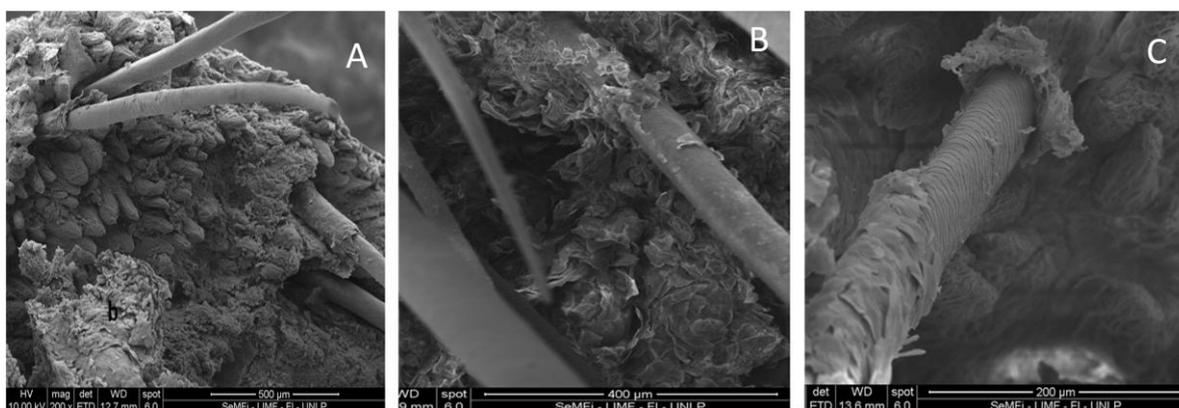


Figura 45. A) *Acremonium* sp, B) Micelio hialino (MHE) y C) *Emericellopsis minima* (EM).

En la figura 46, se observa que las cepas *Purpureocillium lilacinum* (PL), *Penicillium* sp. (Psp) y *Gliocladium catenulatum* (GC) no produjeron cambios en la piel: el pelo y la epidermis permanecieron intactos, presentando características normales.

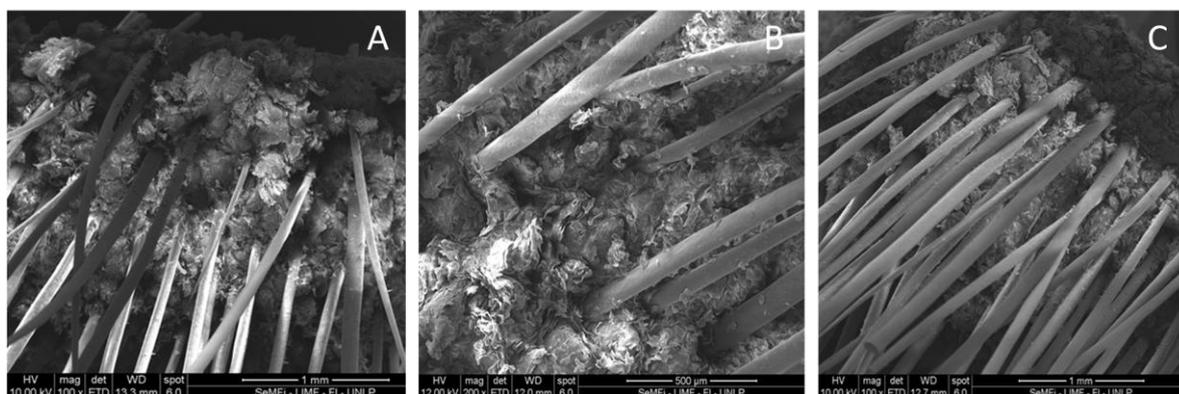


Figura 46. Los extractos enzimático crudos de A) *P. lilacinus*, B) *Penicillium* sp., C) *G. catenulatum*, no mostraron cambios.

# *Discusión*



# Discusión

---

## Suelos salino-sódicos de los cangrejales

El presente estudio de la micobiota de los suelos salino-sódicos de cangrejales del Parque Nacional Campos del Tuyú, incluyó la determinación de atributos físico-químicos de los suelos. Este ambiente es considerado extremo para muchos microorganismos, especialmente para los hongos filamentosos que habitan en él.

El análisis se realizó en los tres cangrejales que conformaron los sitios de estudio durante dos años. El contenido hídrico promedio fue mayor al 60%, el porcentaje de arcillas en los sitios analizados fue mayor al 50% en dos sitios de estudio, sin embargo, todos correspondieron a distintas clases texturales. Según Bertola y Morosi (1997) esta diferencia textural en la Bahía de Samborombón puede deberse a los efectos de descarga del Río de La Plata, el cual aporta un porcentaje de arcilla elevado respecto a las otras fracciones, mientras que la influencia del oleaje y las mareas provocan variaciones granulométricas de mayor tamaño.

Tradicionalmente se considera que un suelo es sódico cuando el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) es igual o superior a 15%, sin embargo, actualmente, el parámetro más utilizado para definir sodicidad es la relación de adsorción de sodio (RAS) del extracto de saturación de un suelo, valores de RAS mayor a 13 (Richards, 1954), se atribuyen a suelos sódicos. Según la clasificación de la Soil Science Society of America (2001), clasificación que toma en cuenta el pH, la C.E y PSI/ RAS, los suelos del cangrejal son salinos-sódicos.

La salinidad del suelo queda determinada por la conductividad eléctrica (CE). Este parámetro está estrechamente relacionado con el contenido de sodio ( $\text{Na}^+$ ) en el suelo. Los suelos de los Cangrejales analizados mostraron valores comprendidos entre 26-66 dS/m, correspondientes a suelos muy fuertemente salinos. Estos datos se corresponden a los resultados de Carol et al. (2015) quienes encontraron 30,4-35,8

dS/m de C.E del agua de las marismas activas de la Bahía Samborombón, observando que la mayor salinidad se encuentra cuando el agua mareal retenida luego de las inundaciones es más rápidamente evapotranspirada, aumentando la salinidad en los suelos. Esto coincide además con el contenido máximo de sodio que fue registrado en las épocas de mayor temperatura entre las estaciones de primavera y verano.

Cuando se analizó la relación C/N, esta fue menor a 20, lo cual se corresponde con suelos que presentan bajo contenido de carbono orgánico (CO) en relación al nitrógeno total (NT). En todos los sitios estudiados los registros de contenido de carbono orgánico (CO), materia orgánica (MO) y nitrógeno total (NT) fueron bajos. Bertola y Morosi (1997) coinciden en que estos suelos son pobres en nutrientes, con un contenido de MO constante debido a la particular distribución de la biota en el suelo.

## **La diversidad fúngica de los suelos salinos-sódicos**

Los ambientes salinos, que incluyen marismas, manglares y suelos salinos albergan una considerable diversidad de hongos con muchas especies nuevas descritas recientemente (Hyde y Jones 1998; Poon y Hyde 1998; Hyde y Pointing 2000; Sarma y Hyde 2001; Jones et al., 2015; Wijayawardene et al. 2017a; 2017b; Devadatha et al., 2018a; 2018b). Estos entornos también reciben hongos de fuentes terrestres que aquí encuentran nuevos nichos para la evolución (Azevedo et al., 2011). A pesar de esto, la biología y la ecología de los hongos en estos hábitats todavía están poco estudiadas (Kis-Papo et al., 2003; Gunde-Cimerman et al., 2004; Butinar et al., 2005a, b).

El estudio de la diversidad fúngica presente en el cangrejal se realizó estacionalmente durante dos años de campañas (2015/2016 y 2016/2017) en tres sitios de muestreo ubicados dentro del parque Nacional Campos del Tuyú.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias entre los sitios de muestreo y las estaciones para la abundancia, el número de especies aisladas y para los índices de diversidad estudiados para cada sitio y para cada año.

En cuanto a las diferencias entre sitios, estas podrían deberse a que los suelos estudiados poseen distintas clases texturales. La textura del suelo está correlacionada con la composición de la comunidad microbiana (Girvan et al., 2003; Johnson et al., 2003). La fracción de arcilla en el suelo también es un aspecto importante, ya que la retención de agua influye en la aireación, la temperatura y el drenaje (Puckett et al., 1985), cuanto mayor porcentaje posee un suelo también es mayor la adsorción de cationes (Thompson et al., 1989). Lemanceau (1988) señaló que la humedad y la aireación del suelo, en particular la presión parcial de oxígeno, influyen en el desarrollo de las poblaciones fúngicas y microbianas.

En el primer año de muestreo se encontraron diferencias significativas en el contenido de materia orgánica (MO) para los tres sitios de estudio, se sabe que la cantidad de MO presente en el suelo tiene una relación directa en el número de especies fúngicas que se encuentran en él (Subba-Roa, 1999) debido a que los hongos son organismos heterótrofos. También se encontraron diferencias significativas en el contenido de carbono orgánico (COT) y nitrógeno total (NT) las diferencias encontradas se podrían deber a un artefacto estadístico, puesto que la diferencia porcentual entre los sitios son insignificantes y no son relevante desde el punto de vista de la tabla de clasificación de los parámetros estudiados. El sodio ( $\text{Na}^+$ ), el potasio ( $\text{K}^+$ ), la conductividad eléctrica (CE) y la RAS son parámetros físicoquímicos con una menor tendencia en el sitio 1 respecto a los otros sitios. Al estar estas sales y los parámetros RAS y CE estrechamente relacionados a la salinidad del suelo, la causa de dicha tendencia podría ocasionarse a causa del anegamiento permanente del sitio 1 que diluye la concentración de estas sales.

Dentro de los parámetros físicoquímicos del suelo, el pH resulta ser un factor fuertemente asociado a funciones catalíticas del suelo y a la estructura de las comunidades biológicas. El tipo de suelo es considerado un factor primario en la determinación de la composición y función de las especies fúngicas (Bossio et al.,

1998; Buyer et al., 1999; Gelsomino et al., 1999; Girvan et al., 2003; Rasche et al., 2006). Si bien la mayoría de los geohongos se desarrollan preferentemente en ambientes ácidos, existen hongos que se desarrollan en condiciones de alcalinidad edáfica (Elíades et al., 2004). Los tres sitios estudiados presentaron pH alcalino y las especies aisladas con mayor frecuencia fueron compartidas por los tres sitios sin mostrar estacionalidad diferencial. Los generos más frecuentes fueron *Acremonium*, *Alternaria*, *Emericellopsis*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Penicillium*. Cepas de *Aspergillus terreus* y *Trichoderma harzianum*, también fueron aisladas en otros ambientes alcalinos estudiados para la provincia de Buenos Aires como es el caso de la micobiota alcalina y alcalino tolerante de los bosques de *Celtis tala* y *Scutia buxifolia* estudiados por Elíades et al. (2011) y en trabajos previos por Elíades et al. (2006) y Cabello y Arambarri (2002). La micobiota aquí registrada fue similar a la hallada por Grum-Grzhimaylo et al. (2014) en suelos alcalinos con diferente grado de salinidad recolectados de Rusia, Mongolia, Kazajstán, Kenia, Tanzania y Armenia. De acuerdo a los estudios morfológicos y moleculares de las más de 100 cepas fúngicas aisladas por dichos autores, queda claro que los hongos alcalinos evolucionaron independientemente en varios linajes de Ascomycota, con fuerte representación de especies pertenecientes a Hypocreomycetidae, Bionectriaceae y Plectophaerellaceae.

Varias de las especies fúngicas aisladas con alta frecuencia, no habían sido anteriormente reportadas para estos suelos con estas características alcalinas. Las especies de *Corollospora* y *Neocamarosporium* halladas, son típicamente hongos marinos, este término hace referencia al grupo de hongos saprótrofos o parásitos que se encuentran en medios marinos (Hyde, 1989). Este grupo heterogéneo esta integrado por representantes de diferentes grupos de hongos zoospóricos, Zigomycota, Ascomycota y algunos Basidiomycota (Hyde, 1997). A nivel mundial el número total de hongos marinos registrados no supera las 500 especies, y la diversidad estimada para el grupo ronda las 1500 especies, incluyendo a aquellas que forman líquenes (Hyde et al., 1989), la disparidad entre ambos números pone en evidencia que aún faltan muchas especies de este grupo por describir.

*Corollospora maritima* fue aislada con gran éxito en todas las estaciones estudiadas y en los tres cangrejales. Ninguna de las cepas recuperadas produjo estructuras reproductivas in vitro, por ello su caracterización taxonómica se llevó a cabo mediante análisis molecular. *Corollospora* es un género dematiáceo, miembro de Halosphaeriaceae. En un estudio de la micobiota marina del litoral sur de Guantánamo, Cuba, Samón-Legrá et al. (2010) aislaron 25 especies, de las cuales las más abundantes correspondieron a tres especies de *Corollospora*. *Corollospora maritima* es una especie frecuentemente recuperada de arena de playa. Ha sido registrada con frecuencia en trabajos realizados en el área del Caribe junto con otras especies arenícolas como: *Corollospora gracilis*, *C. cinnamomea*, *C. pulchella*, *C. pseudopulchella* y *C. quinquesepata* (Volkman-Kohlmeyer y Kohlmeyer, 1993; González et al., 2003; Enríquez, 2004; Nieves Rivera, 2005).

Una especie del género *Neocamarosporium* también mostró alta frecuencia de aparición. El género comprende en la actualidad unas 10 especies (Wanasinghe et al, 2017), varias son típicamente halotolerantes y son aisladas comúnmente de ambientes marinos y estuariales, como agua salina, suelos hipersalinos y especialmente en asociación con plantas marinas como *Zostera* sp. o halófitas, como *Atriplex*, *Beta*, *Chenopodium*, *Halimione*, *Mesembryanthemum*, *Phragmites*, *Salicornia* y *Salsola*, tanto como patógenas o como saprobias a partir de hojas y tallos moribundos (Crous et al., 2008; Ariyawansa et al., 2015; Wanasinghe et al., 2017). Papizadeh et al. (2017) informaron la presencia de especies de *Neocamarosporium* sp. en suelos de lagos hipersalinos en Irán, mostrando su capacidad de halotolerancia por la capacidad de crecer en medios que contienen diversas concentraciones de NaCl y MgCl<sub>2</sub>. De hecho, para estos autores, la halotolerancia parece ser una característica típica del género (Papizadeh et al., 2017). Si bien la cepa aislada del cangrejal se identificó sólo a nivel genérico, podría corresponder a *N. salicorniicola*, ya que *Salicornia ambigua* L. es la única cobertura vegetal en las zonas bajas del suelo de los cangrejales típicos de la Bahía de Samborombón.

Otras especies frecuentes, aisladas de los cangrejales y que fueron determinadas molecularmente corresponden a las cepas *Microsphaeropsis arundinis*, *Coprinellus micaceus*, *Dactylella* sp. y *Trematosphaeria grisea*.

*Microsphaeropsis arundinis* es endófito de *Arundo donax* L., llamada caña gigante, fue descrito por primera vez a partir de aislamientos de esta planta en el oeste de Pakistán (Ahmad et al., 1971). Esta especie es un hongo dematiáceo anamorfo muy ubicuo, ya que además de como endófito ha sido citado como saprófito y parásito, y ha sido recuperado también de suelo y agua (Wanderley et al. 2012; Luo et al. 2013). Por ejemplo, la especie ha sido registrada en ambientes marinos. De Olivieria et al., (2009) estudiaron la micobiota de las playas de Candeias Pernambuco en Brasil y aislaron especies de *Microsphaeropsis*, entre ellas *M. arundinis*. Cabral (1982) aisló *Microsphaeropsis arundinis* de la filosfera de *Eucalyptus viminalis* en una plantación en la localidad de Ramallo, provincia de Buenos Aires, Argentina. En este estudio, se infiere que las cepas recuperadas estarían asociadas a *Arundo donax*, ya que este hospedante es abundante en las inmediaciones de los cangrejales estudiados.

*Coprinellus micaceus*, fue aislado como un micelio hialino estéril que no mostró estructuras reproductivas para su determinación tradicional morfológica, por lo que se realizó su caracterización molecular. El género *Coprinellus* se ubica en el orden Agaricales (Basidiomycota, Agaricomycetidae), la mayoría de las especies son terrestres o coprófilas, comunes en campos y en bosques, *Coprinellus micaceus* es considerados saprófito, crece en tocones en descomposición y árboles caducifolios desde la primavera hasta las primeras heladas de invierno (Phillips, 1981). En Argentina, de Errasti et al. (2010) la aislaron como endofito de madera de la mora torca (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 1799) y *Celtis occidentalis* L. Esta especie, fue la única perteneciente Basidiomycota que se pudo recuperarse con el método de aislamiento usado en esta tesis.

Una de las especies más característica de los cangrejales en términos del gran número de aislamientos obtenidos de esta cepa fue, *Dactylella* sp. El género *Dactylella* fue establecido por Grove (1884) sobre la base de una especie, *Dactylella*

*minuta*. Morfológicamente se caracteriza por poseer escasos conidióforos erectos, simples, septados o no septados, lisos e hialinos, los conidios nacen individualmente en el ápice de los conidióforos, son elipsoidales, fusoides o cilíndricos, unicelulares al principio, luego de 2 a pluri-septados, hialinos. Algunas especies son saprotróficas, mientras que otras son parásitas de nematodos (Zhang et al., 2011). Esta cepa fúngica será determinada hasta nivel especie, ya que se trata de una de las especies más frecuentemente aislada de este suelo y por lo tanto caracteriza la comunidad fúngica del cangrejal.

La diversidad fue estimada utilizando el índice de Shannon-Weiner ( $H'$ ), este mide la cantidad de información (en bits) aportada para cada individuo en el total de la población observada. Además, tiene la ventaja de poder ser calculado utilizando datos de especies, géneros o familias. De tal manera que, al aislar y cuantificar géneros de hongos, utilizando condiciones similares, puede asociarse con variables del suelo, cultivos, etc. (Smaniego-Gaxiola y Chew-Medinaveitia, 2007). El uso de  $H'$  ofrece la posibilidad de asociar la diversidad con una amplia gama de variables en diferentes ecosistemas (Danielo, 1998). Las especies más frecuentes y que más contribuyeron al índice  $H'$  fueron las especies que caracterizaron las comunidades fúngicas de los cangrejales de la Bahía Samborombón.

La actividad microbiana es afectada por variables ecológicas primarias, tales como la densidad y composición de la flora, etapa sucesional y por variables secundarias, como las estaciones del año (Alvear et al. 2007). En cuanto a la estacionalidad, para la microbiota aislada durante los dos años, solo se registraron diferencias entre las estaciones primavera y otoño del primer año, siendo no significativas las diferencias entre estaciones en el segundo año. Si bien no se encontraron diferencias entre los nutrientes del suelo para las diferentes estaciones, otros autores encontraron diferencias entre estaciones que podrían deberse a la disponibilidad de carbono total (CO) y a las condiciones de humedad y temperatura del sitio (Alvear et al., 2007; Bardgett et al., 2005). Hillel (1982) señala que la agregación del suelo puede variar en las estaciones del año. En este estudio no se realizó una evaluación de la agregación, es decir de la estructura del suelo de

los cangrejales, que pudiera dar información respecto a la diferencia encontrada entre la primavera y el otoño.

El análisis de componentes principales (PCA) mostró agrupaciones de especies asociadas a los tres sitios de estudio. Las agrupaciones fueron diferentes para cada estación en los dos años de estudio, sin mostrar una agrupación que se mantuviera en el tiempo.

Conocer las condiciones ambientales del entorno en el que viven los hongos, es fundamental para comprender sus adaptaciones morfológicas y fisiológicas, en especial en estos ambientes con características hostiles para la mayoría de los seres vivos.

## Actividad enzimática del suelo

Las enzimas presentes en el suelo son esenciales para la transformación de energía y el ciclaje de los nutrientes. Debido a su naturaleza proteica pueden ser afectadas por factores ambientales tales como la temperatura y el pH (Alexander, 1980; Paul y Clark, 2007).

Las enzimas deshidrogenasa,  $\beta$ glucosidasa, fosfatasa y ureasa se han utilizado como indicadores para evaluar la calidad o el estado del suelo (Gajado y Mortyniuk, 2005; Blezentilne y Klimas, 2009) siendo ellas las responsables de la liberación de carbono, nitrógeno y fósforo.

La actividad deshidrogenasa está estrechamente relacionada con el contenido de agua en el suelo, un incremento en el agua del suelo reduce el estado de aireación por reducción del espacio de los poros llenos de aire disponible para la difusión de gases (Brezezinka et al., 1998) entonces la actividad deshidrogenasa es mayor en suelos inundados que en suelos no inundados (Ramos-Urquiza y Zuniga-Davila, 2008). Este incremento de actividad está acompañado por un descenso del potencial redox (Okazaki, 1983). El pH del suelo también influye sobre la actividad deshidrogenasa, cuando el pH es ácido ( $\text{pH} < 5$ ) la actividad deshidrogenasa tiende

a ser baja (Alef, 1995). Estudios realizados por Ramos-Urquiza y Zúñigas-Davila (2008) encontraron que a medida que el pH se acerca a la neutralidad (pH 7,8) aumenta la producción de formazan. Ambas situaciones son comunes en los suelos de los cangrejales, el suelo presentó alto contenido de agua y pH alcalino lo que explicaría los valores de actividad deshidrogenasa registrados.

Las fosfatasas detectadas en el suelo constituyen un grupo de enzimas de gran importancia en la dinámica del fósforo (P), ya que participan en la mineralización del P orgánico, cerca del 90% del P del suelo está presente en forma orgánica (Osorio y Pérez, 2001). La actividad fosfatasa no mostró diferencias significativas entre los sitios, los valores obtenidos en los cangrejales registraron valores promedio mínimos y máximos de actividad de 29,42 y 48,7  $\mu\text{g PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  y se corresponden con los obtenidos por Torres y Lizarazo (2006) quienes midieron fosfatasa en suelos con cultivos cebolla con valores mínimos y máximos de 27,2 y 36,1  $\mu\text{g PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Los datos reportados de otros autores muestran valores muy variados como son 69,5 a 850  $\mu\text{g PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Paz-Ferreiro et al., 2007), de 93,13 a 636,62  $\mu\text{g PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Gil-Sotres et al., 2005) y de 12,51 a 56295  $\mu\text{g PNP}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  (Paul y Clarck, 2007). Es importante tener en cuenta que todos ellos refieren a trabajos realizados en suelos cultivados y de interés agronómico, mientras que los suelos de los cangrejales son suelos con características edáficas particulares y que no son aptos para cultivos. Por otro lado la actividad fosfatasa puede ser afectada por factores edáficos, tales como la adición de fuentes de carbono al suelo, la presencia de cobertura vegetal y la macrofauna del suelo (Satchell y Martin 1984; Weiss y Tresendorfer, 1993), que impactan sobre la actividad microbiana del suelo. En los suelos del cangrejal el contenido de materia orgánica es bajo, así como la cobertura vegetal por tanto es probable que la actividad fosfatasa por parte de los microorganismos del suelo este afectada por otros factores. El contenido de fósforo, obtenido de los análisis fisicoquímicos del suelo del cangrejal, arrojó valores bajos por lo que era de esperar que la actividad fosfatasa también lo fuese.

La actividad ureasa mostró diferencia significativa entre los sitios de muestreo, los valores promedios mínimos y máximos obtenidos en los cangrejales fueron 2,24-

4,24  $\mu\text{g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivamente, al igual que Paul y Clarck (2007) quienes obtuvieron valores de 1,96  $\mu\text{g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  y a diferencia de Kandeler et al. (1999) quienes obtuvieron niveles de 8,6- 13,7  $\mu\text{g N-NH}_4 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  en suelos de diferentes cultivos. Podría existir una inmovilización abiótica relacionada, por ejemplo con la retención del  $\text{N-NH}_4^+$  por las arcillas y las reacciones químicas con la materia orgánica del suelo (Rivas et al., 2009). Los suelos de los cangrejales de la bahía de Samborombón poseen gran cantidad de arcillas en su composición textural y también estos suelos poseen bajo contenido de materia orgánica. Deng y Tabatabai (1996) señalaron que la distribución de las enzimas del suelo es reflejo de la distribución de la materia orgánica y de una mayor actividad de la biomasa microbiana. Esta biomasa microbiana es la responsable de llevar a cabo los procesos de descomposición y mineralización de la materia orgánica del suelo en presencia de humedad, generando mayor cantidad de sustratos y compuestos nitrogenados que favorecen el accionar de la ureasa y de todas las enzimas capaces de hidrolizar  $\text{NH}_3$  (Contreras et al., 1995).

## Evaluación enzimática de aislamientos fúngicos: Test en placa

Los hongos pueden ser fuente de muchos compuestos beneficiosos para la humanidad. Entre estos compuestos, las enzimas de origen fúngico son objeto de creciente interés. Una enzima industrial debe poseer alta estabilidad y alta actividad en un amplio rango de condiciones de reacción.

El descubrimiento de microorganismos capaces de vivir bajo condiciones extremas de temperatura, pH, presión, salinidad o radiación ha proporcionado herramientas invaluable para su aplicación en una amplia gama de procesos biotecnológicos, permitiendo el manejo racional de los recursos naturales (Reed et al., 2013). Las enzimas producidas por microorganismos existentes en ambientes

extremos son cada día más apreciadas (Nagai et al., 1998; Dalbøge y Heldt-Hansen, 1994).

Los microorganismos que pueden sobrevivir bajo condiciones de pH y salinidad extremas como las cepas aisladas de los suelos de los cangrejalos del Parque Nacional Campos del Tuyú son microorganismos extremófilos, considerados como una fuente de extremoenzimas.

La capacidad de producir enzimas extracelulares se testeó en las especies aisladas con mayor frecuencia, por ser estos hongos los que caracterizan la microbiota del cangrejal. Se seleccionaron las 29 cepas fúngicas que se estimaron las más prometedoras como productoras de extremoenzimas capaces de ser utilizadas en la industria sustentable. Se estimó la producción de lipasa, amilasa, proteasa, carboxilasa y quitinasa a tres valores de pH (5, 8 y 10).

La actividad lipolítica fue la que mostró la mejor relación crecimiento-halo en las placas con medio específico a pH alcalino. La utilización de Tween 20 como sustrato para detectar esta actividad han sido probados con sustrato para lipasas de diferentes microorganismos, siendo muy estables en diluciones alcalinas y soluciones ácidas minerales (Carissimi et al., 2017; Ertuğrul et al., 2009; Hassan et al., 2009); lo que demuestra que el agregado de buffers para ajustar el pH no altera los resultados a la hora de visualizar el halo de actividad producto de la degradación enzimática. De las 29 cepas probadas, 22 evidenciaron actividad enzimática positiva, este hecho es importante y de interés en biotecnología, dado que las lipasas de origen fúngico son más deseables que las bacterianas, por su capacidad de actuar en rangos más amplios de temperatura durante en el proceso catalítico y, sobre todo, debido a que su producción es extracelular. El uso de estas enzimas es económicamente más rentable, ya que permiten reducir los costos de producción (Reinehr, 2014). Las especies que mayor actividad mostraron en orden decreciente fueron *Trichoderma harzianum* > *Coprinellus micaceus* > *Gliocladium catenulatum* > *Aspergillus terreus* > Micelio estéril y 2 especies de *Penicillium* sp.

Cuando se evaluó la producción de actividad proteasa, específicamente caseína, a los tres pH ya mencionados y se observó que 21 de las especies mostraron

actividad por lo menos en alguno de los pH a los que fueron testeadas. Las proteasas extracelulares están involucradas en la degradación de proteínas exógenas a péptidos y aminoácidos, previo a su absorción por la célula. Generalmente tienen amplia especificidad de sustrato y pueden degradar la mayoría de las proteínas estructurales como albúmina, insulina, caseína o hemoglobina.

A diferencia de lo sucedido para la actividad lipolítica que mostró mayor actividad en medio alcalino, aquí solo 17 cepas mostraron actividad proteolítica a pH alcalino, siendo 7 de ellas activas a pH 10. Sin embargo, todas las relaciones halo-crecimiento detectadas a los distintos pH mostraron similar actividad. Según North (1982), muchas proteasas fúngicas son inestables por encima de pH neutro, las especies fúngicas que las producen acidifican frecuentemente el medio y dada la estabilidad de estas enzimas no son encontradas en cultivos creciendo a pH neutro o alcalino. El 23 % de las cepas testeadas mostraron actividad proteasa a pH 10, Meenakshi, (2004) encontró que el 52% de las cepas testeadas a pH 9,4 mostraron actividad *in vitro* positiva. Elíades et al. (2011) encontraron que el 54 % de las cepas probadas a pH 6 y 9 dieron resultados positivos para dicha actividad. Las cepas del cangrejal testeadas a pH 5, 8 y 10 mostraron actividad positiva para el 70 % de las especies probadas, porcentaje menor al observado por Söderström (1975) que registró un 85% de actividad proteolítica positiva a pH neutro.

Las cepas con actividad proteasa son de interés en aplicaciones industriales relacionadas con procesos que involucran la degradación de proteínas que generalmente se llevan a cabo de manera química y física que resultan agresivas para el ambiente. El uso de proteasas constituye una alternativa que proporciona ventajas ambientales (Löffler, 1986). Las proteasas extracelulares de tipo pepsina están presentes en hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Neurospora*, otras proteasas de interés son las de tipo reninas con capacidad de coagular la leche, que se encontraron en *Eurothium*, *Mucor* y *Aspergillus*.

El 70% de las cepas fúngicas mostró actividad amilolítica positiva en algunos de los pH estudiados. Las de mayor actividad fueron: *Alternaria* sp., *Emericellopsis*

*minima*, *Corollospora maritima*, *Trematosphaeria grisea* y *Purpurecillium lilacinum*. Las especies de *Aspergillus* sp. y *Rhizopus* sp. se consideran las fuentes más importantes de amilasa industrial. Elíades et al. (2011) encontraron que las cepas de *Aspergillus* sp. aisladas de suelos de los bosques de *Celtis tala* y *Scutia buxifolia* en Buenos Aires mostraban muy buena producción para esta actividad enzimática. Con respecto al pH, sólo *Gliocladium catenulatum* mostró actividad exclusivamente a pH alcalino, mientras que *Fusarium solani* y *Talaromyces stipitatus* mostraron actividad solo a pH 5, Elíades et al. (2011) tampoco registraron actividad positiva para una especie de *Fusarium* a pH alcalino. Las otras dos especies evaluadas, *F. equiseti* y *F. konzum*, no mostraron actividad a ningún pH para esta actividad.

La actividad celulolítica varió con las cepas y el pH del medio para la producción de actividad, el 70 % mostró actividad para alguno de los pH testeados, solo un 20% a pH alcalino. De las cepas estudiadas por Elíades et al. (2011) un 17% de cepas mostró actividad celulolítica a pH 6. *Fusarium* sp. es un hongo reportado ampliamente con actividad enzimática celulolítica (Valencia-Guerrero, 2011), de hecho las tres cepas de *Fusarium* aquí estudiadas mostraron actividad positiva para esta actividad enzimática.

La actividad quitinolítica en placa utilizando como sustrato cromogénico Chitin Azure resulta positiva cuando se detecta su depolimerización de Chitin Azure al formarse una zona clara alrededor de la colonia. Las placas se incubaron por un período de 20 días, hecho que dificultó relacionar la zona clara de actividad con el crecimiento fúngico por lo que se registró la presencia o ausencia de actividad para cada una de las cepas estudiadas. Estas cepas se estudiaron sólo a pH 7, ya que el rango óptimo de pH para la detección de la actividad de quitina usando Chitin Azure es de pH 5 - pH 8 (Shen et al., 2010). De las 30 especies estudiadas, 22 mostraron actividad positiva. Los suelos de los cangrejales se caracterizan por la presencia de gran cantidad de restos de exoesqueleto y mudas de cangrejos que contienen en su composición porcentajes elevados de quitina por lo que era esperable que muchas especies aisladas de estos suelos muestren capacidad de producir enzimas quitinolíticas y así utilizar la quitina como fuente de carbono.

Diversas especies de *Aspergillus* sp. y de *Penicillium* sp. han sido aisladas de suelos ricos en quitina (Patidar et al., 2005), entre las cepas aisladas de los cangrejales *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. y *Aspergillus terreus* mostraron actividad positiva, sin embargo, *Penicillium rubrum* no evidenció actividad. Con respecto a *Fusarium*, muchas especies han sido mencionadas como productoras de quitinasas, (Nuero, 1995; Mathivanan et al., 1998; Campuzano et al., 2017). Sin embargo, de las cuatro aisladas de los suelos de cangrejales, sólo *Fusarium equiseti* mostró actividad positiva.

De las 30 cepas testeadas se seleccionadas aquellas cepas fúngicas que mostraron actividad positiva en todos los medios y que permitieron medir la relación halo-crecimiento de la colonia cada 48 horas al cabo de 8 días, sin necesidad de revelarlos. De esta manera se registró en qué momento se detectó actividad y cuál fue su punto máximo de actividad en tres condiciones de pH (5, 8, 10) y medio de cultivo estudiado a 26 °C durante 8 días. Este análisis permitió observar que los hongos estudiados mostraron mayor actividad a pH 8 esto podría deberse a que estas cepas fueron aisladas de ambientes con pH 8-8,5. Las especies capaces de crecer en suelos altamente alcalinos, son capaces de secretar enzimas tolerantes a pH básico, lo que resulta fundamental para la degradación del sustrato presente en el suelo (Elíades et al., 2011). Para la mayoría de las cepas a partir de las 48 hs de incubación fue detectable la actividad enzimática, en algunos casos coincidiendo con el punto de máxima actividad registrada, pero en otros se registraron diferencias al variar el pH o el medio específico en el que crecieron. De Melos et al. (2018) mostraron que los microorganismos tienen el máximo de producción de enzimas proteolíticas a medida que crecen en el medio de cultivo entre los días 2 y 4. La presencia de máxima actividad lipolítica registrada por Alfonseca et al. (2018) a los 2 días de cultivo, podría deberse a una función trófica, ya que los medios de cultivos no tienen otra fuente de carbono alternativa. En el caso de la actividad amilasa la adición de una fuente de nitrógeno, además de la de carbono puede controlar la actividad amilasa (Facciotti et al., 1989).

## Evaluación enzimática de aislamientos fúngicos: Test en medio líquido

Se realizó un screening enzimático preliminar en medio líquido de las cepas fúngicas más frecuentes aisladas del suelo de los cangrejales, se seleccionaron tres actividades enzimáticas con importantes usos industriales y aplicaciones biotecnológicas. Dos de estas actividades enzimáticas la quitinolítica y la proteolítica también fueron testeadas en medio sólido, ya que están directamente ligadas a la descomposición de los exoesqueletos de cangrejos presentes en el suelo de los cangrejales. Por ello los microorganismos que las posean serían una fuente promisoría de enzimas quitinolíticas de gran importancia en futuras investigaciones. Por otro lado las enzimas queratinolíticas y proteolíticas son de gran importancia en aplicaciones industriales ligadas a depilados enzimáticos de cueros y a la reducción del del impacto ambiental que genera esta industria. Los datos obtenidos de la actividad queratinolítica fueron cruciales para la selección de cepas utilizadas para un ensayo sobre cuero bovino en la técnica de depilado enzimático.

En medio líquido a pH 8, *Fusarium oxysporum* mostró buena actividad quitinolítica. La misma cepa no había mostrado actividad en el test en placa a pH 7. Cepas como *Clonostachys rosea*, *Emericellopsis minima*, *Neocamarosporium* sp., *Trichoderma harzianum* y un micelio hialino, mostraron muy baja actividad enzimática, en medio líquido, habiendo registrado actividad positiva en placa. Cepas de *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Beauveria bassiana*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium* sp. mostraron buena actividad en medio líquido. En los ensayos realizados por Vallejos Sirpa et al. (2014), *Beauveria bassiana* y una especie de *Trichoderma*, presentaron actividad quitinolítica, con un pico de actividad a 14 días y valores promedio de 70,71 mU/mt/min para *B. bassiana*, mientras que para *Trichoderma*, la mejor actividad se observó a los 24 días con una actividad promedio de 13,78 mU/mt/min. Las especies del género *Trichoderma* son reconocidas por su capacidad micoparasítica, y muy valoradas como controlador biológico de fitopatógenos (Bara et al., 2003; Grün et al., 2006; Marcello et al., 2010). Durante el proceso de

micoparasitismo, *Trichoderma* secreta gran cantidad de enzimas degradadoras de pared celular las cuales actúan directamente sobre los hongos fitopatógenos facilitando la entrada del microorganismo antagonista (Almeida et al., 2007; Ramada et al., 2010). Se ha encontrado que las quitinasas y glucanasas están directamente relacionadas en los mecanismos de micoparasitismo de las especies de *Trichoderma* sp. (Kubicek et al., 2001; Harman et al., 2004; Silva et al., 2012).

Pocas cepas mostraron actividad caseinolítica apreciable a pH 8. Entre ellas *Cladosporium cladosporioides*, *Beauveria bassiana*, *Emericellopsis minima* y *Fusarium oxysporum* evidenciaron su mayor actividad en medio sólido a pH entre 5 y 8; a excepción de *B. bassiana* que sólo mostró actividad a pH 5. Sin embargo, las cepas con mayor actividad a pH 8 en medio sólido produjeron muy baja actividad en medio líquido a pH alcalino.

La actividad queratinolítica en medio líquido a pH 8 se ensayó para las mismas cepas que para las actividades quitinolítica y proteolítica, pero los extractos enzimáticos se obtuvieron a partir de medios inducidos con pelo bovino. Esta actividad arrojó buenos valores para la mayoría de las especies testeadas, siendo las más destacadas en la producción queratinolítica las cepas de *Acremonium* sp., *Clonostachys rosea*, *Emericellopsis minima*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Purpureocillium lilacinum* y un micelio hialino, razón por la cual fueron seleccionadas para el ensayo de depilado enzimático sobre cuero bovino. Elíades et al. (2010) estudiaron la capacidad enzimática de 32 cepas fúngicas aisladas de suelos alcalinos de Buenos Aires y encontraron que las cepas con mayor producción fueron las de *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* y *Metarhizium anisopliae*. En ese trabajo las actividades registradas fueron más altas que para la mayoría de las cepas aisladas del cangrejal, salvo para *Clonostachys rosea*, la cual mostró aquí mayor actividad y para *Purpureocillium lilacinum* y *Acremonium kiliense* para las cuales se detectó igual actividad queratinolítica.

Cavello (2013) también encontró buena producción de actividad queratinolítica para *Fusarium oxysporum*. Para Vazquez et al. (2008), utilizando pelo de cerdo como inductor de la actividad en medio líquido, la mayor producción

queratinolítica fue en *Aspergillus niger*, *Penicillium commune* y *Rhizopus oryzae*, Guiseppina et al. (2002) encontraron que los hongos mostraban mayor actividad queratinolítica cuando el medio de cultivo contenía glucosa, registrando la mayor actividad en *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., un micelio estéril y un telemorfo de Ascomycota y *Chaetomium* sp.

Kaul y Sumbali (1997) reportaron que la actividad queratinolítica en medios de cultivos líquidos estáticos conteniendo pelo se incrementaba a los 40 días incubación.

## **Depilado enzimático sobre cueros bovinos a partir de extractos crudos provenientes de aislamientos fúngicos de suelo**

Se realizó un ensayo de depilado enzimático sobre cuero bovino usando extractos enzimático crudos de las cepas que fueron seleccionadas a partir del screening enzimático en medio líquido. La selección de las cepas fúngicas se hizo en función de la buena producción de actividad queratinolítica, ya que la proteolítica mostró valores muchos más bajos en relación a los que se obtuvieron para la queratinolítica.

La etapa de depilado durante el procesamiento del cuero consiste en la eliminación de la epidermis y de los pelos de la piel, sin ocasionar daños en la dermis que debe permanecer intacta en cuanto a contenido y calidad de colágeno. Durante el curtido de los cueros, la etapa de depilado tradicional genera gran contaminación ambiental al emplearse sulfuro de sodio y cal (Errasti et al., 2017). El ion sulfuro es el agente oxidante y necesita de pH alcalino para realizar dicho proceso, por lo tanto, se utiliza óxido de calcio (cal) que además actúa como buffer regulando el pH entre 12-12,5 (Angelinetti et al., 1987). El uso de enzimas en el proceso de remojo y depilado resulta una alternativa amigable con el ambiente (Dettmer et al., 2011).

De las siete cepas seleccionadas, un micelio hialino (MH) mostró la mayor actividad queratinolítica, *Emericellopsis minima* mostró la menor actividad y el resto de las cepas mostraron valores intermedios. Si bien la cepa MH mostró mayor actividad queratinolítica, no fue la que mostró mayor efecto de depilado enzimático sobre el cuero bovino. Esto puede deberse a que las enzimas que se utilizan durante el proceso de remojo y depilado son las enzimas amilolíticas, lipolíticas y proteolíticas. Las proteasas y lipasas mejoran la absorción de agua al descomponer las proteínas solubles dentro de la matriz y eliminando sales, ácido hialurónico, grasas y aceites, además de mejorar la apertura de la estructura de la fibra (Altan et al., 2008) sin que se vea afectada la estructura del colágeno. El micelio hialino también mostrara buena actividad amilolítica y lipolítica a pH 8, cuando se realizaron los test en placa.

*Fusarium oxysporum* y *Acremonium* sp., mostraron el mayor efecto de depilado enzimático sobre el cuero bovino, aún cuando en medio líquido su actividad queratinolítica fue intermedia. Días-Merino (2019) indicó que las proteasas presentes en los extractos enzimáticos deben tener una actividad queratinolítica moderada, la suficiente como para que comiencen a degradar la queratina de la epidermis, así como a los folículos pilosos, sin embargo esta actividad no debe ser tan alta como para degradar por completo los pelos, ya que se liberaría gran cantidad de materia orgánica en los efluentes. Teniendo en cuenta que este residuo (pelo) posee alto contenido de proteínas tiene un gran potencial como biomaterial (Cavello et al., 2015).

La cepa de *Purpureocillium lilacinum* no produjo cambios en la epidermis ni en los pelos del cuero bovino, sin embargo, Errasti et al.(2017) encontraron que otra cepa de la misma especie produjo efecto de depilado enzimático. Se sabe que utilizando residuos de cabello como sustrato bajo fermentación sumergida *Purpureocillium lilacinum* es una buena fuente de enzimas proteasas, queratinasas, y quitinasas (Cavello et al., 2015). La cepa aquí estudiada mostró buena actividad cualitativa para amilasa, presentó actividad proteasa a pH alcalino y nula actividad lipolítica.

*Emericellloopsis minima* mostró menor actividad queratinolítica en medio líquido, y produjo un desprendimiento de la vaina del folículo piloso y pérdida en parte de la epidermis. Esta cepa mostró buena actividad amilolítica, lipolítica y proteolítica a pH alcalino.

# *Conclusiones y perspectivas*



## Conclusiones y perspectivas

---

El objetivo principal de esta tesis fue analizar la comunidad fúngica asociada al suelo salino-sódico de los cangrejales del Parque Nacional Campos del Tuyú y evaluar el potencial enzimático de las especies más representativas de este ambiente, así como sus posibles usos en biotecnología.

### **Como conclusiones finales se pueden destacar:**

- ❖ El elevado pH, la alta conductividad eléctrica y la salinidad de los suelos de los cangrejales del Parque Nacional Campos del Tuyú, convierten al área en un ambiente extremo.
- ❖ Existe una microbiota extremófila asociada a estos ambientes, capaces de soportar estas condiciones. Este estudio constituye el primer reporte de hongos de hongos de suelo para el Parque Nacional Campos del Tuyú, constituyendo un aporte de valor al conocimiento de la biodiversidad fúngica.
- ❖ Los géneros *Acremonium*, *Alternaria*, *Emericellopsis*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Trichoderma* presentan especies alcalofílicas y alcalino-tolerantes que caracterizan las comunidades fúngicas de los cangrejales.
- ❖ Especies de *Collospora* y *Neocamarosporium* típicamente asociadas a medios marinos o ambientes salinos completan la caracterización de la comunidad fúngica
- ❖ Los suelos de los cangrejales presentan actividad deshidrogenasa, fosfatasa y ureasa. Éste es el primer reporte del estado microbiano del suelo como así

también de indicadores bioquímicos de calidad y sanidad en ambientes de los cangrejales.

- ❖ Las cepas fúngicas más representativas de los cangrejales mostraron potencial enzimático lipolítico, amilolítico, caseinolítico, celulolítico, quitinolítico y queratinolítico, siendo muchas de estas cepas activas en condiciones de alcalinidad.
- ❖ Las cepas fúngicas de *Fusarium oxysporum* y *Acremonium* sp. mostraron resultados prometedores en el depilado enzimático sobre cueros bovinos.

**Las principales consideraciones a futuro que se desprenden de esta tesis son:**

- ❖ Es posible utilizar especies fúngicas aisladas de los suelos del Parque Nacional Campos del Tuyú, capaces de producir extremoenzimas, como agentes productores de enzimas de interés biotecnológico, para ser aplicados en procesos industriales, en la producción de alimentos y en la degradación de residuos industriales, permitiendo el manejo racional de los recursos naturales.
- ❖ La actividad biológica y bioquímica del suelo de los cangrejales, junto con los parámetros fisicoquímicos, podrían ser usadas como indicadores de calidad y sanidad del suelo, siendo clave en la protección ambiental de estos ecosistemas.
- ❖ Estudio y evaluación de enzimas provenientes de hongos involucrados en el proceso de degradación de restos de exoesqueletos de cangrejos.

# *Bibliografía*



# Bibliografía

---

Adams, M.W., Perler F.B., Kelly R.M. 1995. Extremozymes: Expanding the limits of biocatalysis. *Bio/technology* 13: 662-668.

Agriculture Handbook USSL 1954

Ahmad, S. 1971. Contribuciones a los hongos de Pakistán occidental. X. *Biologia (Lahore)* 17: 1-26.

Afsar, A. y Cetinkaya, F. 2008. Studies on the degreasing of skin by using enzyme in liming process. *Indian Journal of Chemical Technology*, 15: 507-510.

Aldazabal, V., Weiler, N. E. y Eugenio, E. 2005. Análisis geoarqueológico de la zona sur de la bahía Samborombón (Rincón de Ajo provincia de Buenos Aires-Argentina). *Estudios Geológicos*, 61: 221-232.

Alef, K. 1995. Estimation of microbial activities. Págs:193-270. En: K. Alef y P. Nannipieri (eds). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Londres.

Alef K. y Nannipieri, P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. 576 p.

Alexander, M. 1980. *Introduction to Soil Microbiology*. 2ª Ed. John Wiley and Sons, Inc. New York, USA. 467 p.

Almeida, F.B., Cerqueira, F.M., Silva, R.N., Ulhoa, C.J. y Lima A.L. 2007. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 29: 1189-1193.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403–410.

Alfonseca-Ladrón de Guevara y A.I. y Serrat-Díaz, M.D. 2018. Il Aislamiento y selección de hongos lipolíticos de materiales contaminadas con desechos de aceite vegetal *Rev. Cubana Quím.*30: 362-378.

Alvear, M., Reyes, F., Morales, A., Arrigada, C. y Reyes, M. 2007. Actividad biológica y agregados estables en dos tipos de formaciones vegetales de un bosque templado de Centro Sur Chile con perturbación antrópica. *Ecología Austral* 17: 113-122.

Angelinetti, A.R., y Cantera, C.S. 1987. Industria del cuero, remojo, depilado y sus aguas residuales; problemas y soluciones. In *Industria del cuero, remojo, depilado y sus aguas residuales; problemas y soluciones*. CITEC.

Anobom, C.D., Pinheiro, A.s., De-Andrade, R.A. Aguiéiras, E.C., Andrade, G.C., Moura, M.V., Almeida, R.V. y Freire, D.M. 2014. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *Biomed Res Int*. 1-11.

Antranikian, G., Vorgias, C.E. y Bertoldo, C. 2005. Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 96: 219-262.

APN Administración de Parques Nacionales. 2008. Plan de Manejo del Parque Nacional Campos del Tuyú. General Lavalle.

APN. Administración de Parques Nacionales. 2014. Estrategia para la conservación del venado de las pampas.

Ariyawansa, H.A., Thambugala, K.M., Manamgoda, D.S. y Jayawardena, R. 2015. Towards a natural classification and backbone tree for Pleosporaceae. *Fungal Diversity* 71: 85–139.

Ariyawansa, H.A., Phillips, A.J., Chuang, W.Y. y Tsai, I. 2018. Tzeananiaceae, a new pleosporalean family associated with *Ophiocordycepsmacroacicularis* fruiting bodies in Taiwan. *MycKeys* 37: 1–17.

Austin, P., Brine, C., Castle, J. y Zikakis, J. 1981. Chitin: New facets of research. *Science* 212: 749-753.

Azevedo, E., Caeiro, M.F., Rebelo, R. y Barata M. 2011. Biodiversity and characterization of marine mycota from Portuguese waters. *Animal Biodiversity and Conservation* 34: 205–215.

Baležentienė, L. y Klimas, E. 2009. Effect of organic and mineral fertilizers and land management on soil enzyme activities. Effect of organic and mineral fertilizers and land management on soil enzyme activities (Special issue I) 9:191-197

Bara, M.T., Lima, A.L. y Ulhoa, C.J. 2003. Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 219: 81-85.

Bardgett, R. 2005. *The Biology of Soil: A Community and Ecosystem Approach*. Oxford University Press, Oxford.

Barron, G.L. 1962. New species and new records of *Oidodendron*. *Can J Bot*, 48:589pp.

Beck, J., Wagener, J. y Ebel, F. 2013. The septal cell wall of filamentous fungi. In Mora-Montes, H.M. (Eds), *The fungal cell wall*. Nova Science Publishers, Inc. pp. 129-142.

Bértola, G.R. y M. Morosi. 1997. Caracterización textural de depósitos de ambientes de marea de la Bahía Samborombón (Buenos Aires, Argentina). *AAS Revista (Revista de la Asociación Argentina de Sedimentología)* 4: 1-13.

Bhat, S., Hutson, R., Owen, E. y Bhat, M. 1997. Determination of immunological homology between cellulosome subunits and cloned endoglucanases and xylanase of *Clostridium thermocellum*. *Anaerobe* 3: 347-352.

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

Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany*. 69:2357-2372

Blackwell, M. 2011. Los hongos: 1, 2, 3 ... 5.1 millones de especies? *American Journal of Botany* 98: 426-438

Boerema, G.H., de Gruyter, J., van Kesteren, H.A. 1994. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes). Section *Plenodomus*: Taxa often with a *Leptosphaeria* teleomorph. *Persoonia* 15: 431-487.

Booth C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers* 104: 1-56.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. 1-237.

Bossio D.A., Scow K.M., Gunapala N., Graham K.J., (1998). Determinants of soil microbial communities: effects agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology*, 36: 1-12.

Bouyocous, B.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agronomy Journal* 54:464-465.

Brabcová, J., Demianová, Z. y Vondrášek, J. 2013. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 98: 62-72.

Bray, R.H. y Kurtz, L.T. 1945. Determination of total organic and available forms of phosphorus in soil. *Soil Science* 59: 39-45.

Brayford, D. 1992. *Cylindrocarpum*. in: *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. pp 103-106. APS Press, St. Paul Minnesota.

Bridge, P. y Spooner, B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil*. 232: 147-154.

Brzezinska, M., Stepniewska, Z. y Stepniewski, W. 1998. Soil oxygen status and dehydrogenase activity. *Soil Biol. Biochem.* 13: 1783-1790.

Butimar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I, Oren, A. y Gunde-Cimerman, N. 2005a. Yeast diversity in hypersaline habitats. *FEMS Microbiol Lett* 244: 229-234.

Butimar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenita, A. y Gunde-Cimerman, N. 2005b. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Bot Mar* 1: 73-79.

Buyer, J.S., Roberts, D.P. y Russek-Cohen, E. 1999. Microbial community structure and function in the spermosphere as affected by soil and seed type. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 138-144.

Cabello, M.N. 1989. Deuteromycotina from Antarctica. New species of Hyphomycetes from Danco coast, Antarctic Peninsula. *Mycotaxon* 36(1): 91-94.

Cabello, M. N., Gaspar, M.L. y Pollero, R. 1994. *Glomus antarticum* sp-nov, a vesicular-arbuscularmicorrhizal fungus from Antartica. *Mycotaxon* 58:123-128.

Cabello, M.N. y Arambarri, A.M., 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* Gill ex Planch and *Scutia buxifolia* Reiss forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiological Research* 157: 115-125.

Cabral, D.1982.Contribución al estudio de la filósfera de *Eucalyptus viminalis*. Dinámica de las poblaciones fúngicas. Tesis Doctoral, UBA (inérita). 146 pp

Cabrera, A.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14:1-42.

Cabrera, A.L. y Zardini, E. 1978. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. ACME, Buenos Aires. 755 pp.

Cagnoni, M.A. y Faggi, A. 1993. La vegetación de la Reserva de Vida Silvestre Campos del Tuyú. *Parodiana* 8:101-112.

Caldwell, B.A. 2004. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. *Pedobiología*, 49: 637-644.

Campbell, R. 1987. Ecología microbiana. Méjico: Limusa y Paul EA, Clark FE. 1996. Soil microbiology and biochemistry. San Diego, CA: Academic Press.

Campuzano, F.S., Urquijo, T.L. y Valderrama, J. 2017. Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani*. NOVA. 15: 45-55.

Canganella, F. y Wiegel, J. 2011. Extremophiles: from abyssal to terrestrial ecosystems and possibly beyond. Naturwissenschaften. 98: 253-279.

Cano, J., Guarro, J. y Gene, J. 2004. Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. J Clin Microbiol 42:2450–2454.

Cardenas, G., Orlando, P. y Edelio, T. 2001. Syntesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. Int. J. Biol. Macromol. 28: 167- 174.

Carissimi, M. 2007. "Comparison of lipolytic activity of *Sporothrix schenckii* strains utilizing olive oil-rhodamine B and Tween 80". TECNO-LÓGICA. 11: 33-36.

Carmichael, J.W., Bryce Kendrick, W., Connors, I.L. y Sigler, L. 1980. Genera of Hyphomycetes. The University of Alberta Press, Edmonton, Alberta, Canadá. 386 pp.

Carol, E.S., Kruse, E.E. y Cellone, F.A. 2015. Salinización de suelos en marismas. Caso de estudio: Humedal de la Bahía Samborombón, Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, 47: 97-107.

Carpa, R. 2009. Enzymological research on soils from different environments. Annals of RSCB 16:44- 48.

Castillo, M. 2013. Efecto del tiempo de fermentación de residuos animales y vegetales en la elaboración de bokashi en la zona de Quevedo. Previo a la obtención del título de: Ingeniero Agropecuario. Quevedo. Los Ríos, Ecuador. 70 p.

Cavello, I. 2013. Queratinasas microbianas: microorganismos, producción y caracterización. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La plata.

Cavello, I.A., Crespo, J.M., García, S.S., Zapiola, J.M., Luna, M.F., Cavalitto, S.F. 2015. Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as hair waste. *Biotechnology Research International*; Lugar: El Cairo, 2015: 1-10.

Cerón, R.L. y Melgarejo, M.L. 2005. Enzimas del Suelo: Indicadores de Calidad y Salud. *Acta Biológica Colombiana*. 1, 5-18.

Chandrasekaran, S. y Dhar, S. 1986. "Multiple protease from *Streptomyces moderatus*. Isolation and purification of five extracellular protease". *Arch. Biochem. Biophys.* 257: 395-401.

Chapman, H.D. y Pratt, P.F., 1973. *Métodos de análisis para suelos, aguas y plantas*. Ed. Trillas. México. 195 pp.

Christensen, M. 1969. Soil microfungi of dry to mesic conifer-hardwood 2ll forest in northern Wisconsin. *Ecology* 50: 9-27.

Comerio, R. M. y Mac Cormack, W. 2004. Algunos micromicetes del suelo y de alimentos deteriorados en la Antártida Argentina. *Rev Iberoam Micol* 21: 128-134

Contreras, F., Crivero, C. y Paolini, J. 1995. Efecto de la Incorporación de Residuos Orgánicos y dos Tipos de Labranza sobre la Actividad de la Ureasa en un Alfisol. *Venezuelos*, 3:2-6.

Coyne, M. 2000. *Microbiología del suelo, un enfoque exploratorio*. Editorial Prainfo, España. 416 p.

Cremonesi, P. 2002. *L'uso degli enzimi nella pulitura di operer policrome*, Ed. Il prato, Padova, 15 pp.

Crispim, A. y Mota, M. 2003. Unhairing with enzymes, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 87: 198-202.

Crous, P.W., Summerell, B.A., Mostert, L. y Groenewald, J. Z. 2008. Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of Proteaceae. *Persoonia* 20: 59-86.

Crous, P.W. y Wingfield, M.J. 1994. A monograph of *Cylindrocladium*, including anamorphs of *Calonectria*. *Mycotaxon*, 51: 341-435.

Crous, P.W., Wingfield, M.J., Schumacher, R.K. y Summerell, B.A. 2014. Fungal Planet description sheets: 281–319. *Persoonia* 33: 212–289.

Cui, L., Meddeb-Mouelhi, F., Laframboise, F. y Beauregard, M. 2015. Effect of commercial cellulases and refining on kraft pulp properties: Correlations between treatment impacts and enzymatic activity components. *Carbohydr. Polym.* 115: 193-199.

Dalbøge, D. y Heldt-Hansen, H. 1994. A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. *243*: 253–260.

Danielo, O. 1998. Subsidios al uso del índice de diversidad de Shannon. In Congreso Latinoamericano.1998. Tema 3. CD-ROM. IUFRO 1, Valdivia.

De Boer, W., Forman, L.B., Summerbell, R.C. y Boddy, L. 2005. Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol Rev*, 29:795-811

Deacon, J. 2005. *Fungal Biology*. Edit. Blackwell. 366 pp.

De Errasti, A., Carmarán, C. C. y Novas, M. V. 2010. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Divers*. 41: 29–40.

Deng, S.P. y Tabatabai, M.A. 1996. Effect of tillage and residue management on enzyme activities in soils. II Glycosidases. *Biology and Fertility of Soils*. 22: 208-213.

De Melo, M., Araujo, V.A., Chogi, N.M. y Duarte, S.I. 2018. Cellulolytic and lipolytic fungi isolated from soil and leaf litter samples from the Cerrado (Brazilian Savanna). *Rev. biol. trop [online]* 66: 237-245.

De Oliveira E.L., Andrade L.A de B., de Faria M.A., y Custódio T.N. 2009. Vinhaça de alambique e nitrogênio na cana-de-açúcar, em ambiente irrigado e não irrigado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 13: 694-699.

Dettmer, A., Ayub, M. y Gutterres M. 2011. "Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture". *Braz. J. Chem. Eng.* vol.28 no.3 São Paulo.

Devadatha B, Sarma VV, Jeewon R, Wanasinghe DN et al. 2018a – *Thyridariella*, a novel marine fungal genus from India: morphological characterization and phylogeny inferred from multigene DNA sequence analyses. *Mycological progress* 17, 791–804.

Devadatha, B., Sarma, V.V., Jeewon,R. y Jones, E.G. 2018b – *Morosphaeria muthupetensis* sp. nov. (*Morosphaeriaceae*) from India: morphological characterization and multigene phylogenetic inference. *Botanica marina* 61: 395–405.

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.

Díaz-Merino, M.E. 2019. Enzimas vegetales para una producción de cuero eco-compatible. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata (UNLP). La plata.

Dick, R. P.; Thomas, D. R. y 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.

Dick, W.A. y Tabatabai, M.A. 1992. Potential uses of soil enzymes. In: Metting F Jr (ed) *Soil microbial ecology: application in agricultural and environmental management*. Soil Microbial Ecology. Marcel Dekker, New York, 95–127pp.

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

Digby, P.G.N. y R.A. Kempton. 1987 Multivariate analysis of ecological communities. Chapman and Hall. Londres, 106 p.

Domsch, K. H.; Gams, W. y Anderson, T. 1993. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Eching, Germany 859pp.

Dorenbosch, M.M. 1970. Key to nine ubiquitous soil-borne Phoma-like fungi. *Persoonia*, vol. 6, part 1: 1-14.

Doran JW y Zeiss M. 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Appl Soil Ecol* 15:3–11.

Douglas de França Passos, Nei Pereira Jr. y Aline Machado de Castro. 2018. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocelluloses deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14:60–66.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., Brown, A.H. y Grace, J.P. 1990. Multiple origins of polyploids in the *Glycine tabacina* complex inferred from chloroplast DNA polymorphism. *PNAS* 87: 714-717.

Dozie, I. N. S., Okeke, C. L. y Uneze, N. C. 1994. A thermostable, alkaline-active, keratinolytic proteinase from *Chrysosporium keratinophilum*. *World Journal of Biotechnology* 10: 563-567.

Drozd, N., Sher, A., Makarov, V., Galbraikh, L., Vikhoreva, G. y Gorbachiova, I. 2001. Comparison of antithrombin activity of the polysulphate chitosan derivatives *in vivo* and *in vitro* system. *Thrombosis Research* 102: 445-455.

Eivazi, F. y Tabatabai, M.A. 1988. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil. Biology and Biochemistry* 20: 601-606.

Elíades, L.A., Bucsinszky, A. M. y 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., Voget, C. y Cabello, M. N. 2006. Contribution to the study of alkalophilic and alkali-tolerant Ascomycota from Argentina *Darwiniana* 44: 64-73.

Elíades, L., Cabello, M., Voget, C., Galarza, B. y Saparrat, M. 2010. "Screening for Alkaline Keratinolytic Activity in Fungi Isolated from Soils of the Biosphere Reserve "Parque Costero del Sur" (Argentina)". *World Journal Microbiology Biotechnology*, 26: 2105-2111.

Elíades, L.A., Cabello, M.N., Saparrat, M.C.N. y Voget, C.E. 2011. Alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi from *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in eastern Buenos Aires province (Argentina). *Current Topics in Biotechnology*; 6: 1 – 11.

Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes* Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England 608 pp.

Enríquez, D. 2004. Hongos marinos en playas de la zona noroccidental de Cuba. Tesis de Maestría. Instituto de Oceanología. CITMA. La Habana, 62 pp.

Ettema, C. 2002. "Spatial soil ecology," *Trends Ecol. Evol.*, 17: 177–183.

Ewing, M., Ludwig, W.J. y Ewing, J.I. 1963. Geophysical investigations in the submerged Argentine Coastal Plain. *Geological Society of American Bulletin* 74:275-292.

Errasti, M. E., Cortizo, L., López, L. M. I., Garro, M. L., Ungaro, P., Aguyaro, M. y Galarza, B. 2017. Desarrollo de procesos destinados a minimizar el impacto ambiental de las curtiembres de la provincia de Buenos Aires. Cuarto Congreso Internacional Científico y Tecnológico. 69-82 pp.

Ertuğrul, S., Dönmez, G. y Takaç, S. 2009. "Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity". *Journal of Hazardous Materials*. 149: 720–724.

Facciotti, M.C.R., Kilikian, B.V., Schmidell Netto, W. y Facchini, E. R. 1989. Processo descontínuo de síntese de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori*: influência do pH e da concentração inicial do polissacarídeo. *Revista de Microbiologia*, 1: 108-114.

Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., and Golyshin, P.N. 2007. Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*. 10: 207–214

Fidalgo, F., Colado, U.R. y De Francesco, F.O. 1973. Sobre ingresiones marinas cuaternarias en los Partidos de Castelli, Chascomús y Magdalena (Pcia de Buenos Aires). *Actas del V Congreso Geológico Argentino* 3: 227–240.

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. 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.

Fogarty, M.W. y Kelly, C.T. 1979. Starch-degrading enzymes of microbial origin. *Prog. Ind. Microbiol.* 15 87-150.

Fogarty, M.W. y Kelly, C.T. 1980. Amylases. Amyloglucosidase and related glucanases. *Economic Microbiology* Vol.5 A.H.Rose (ed) Academic Press London.

Fung, K., Zhao, K., He, Z. y Schye, M. 2002. Tobacco-expressed *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 shows antifungal activity in vitro. *Plant Molecular Biology* 50: 283-294.

Gajda, A. y Martyniuk, S. 2005. Microbial Biomass C and N and Activity of Enzymes in Soil under Winter Wheat Grown in Different Crop Management Systems. *Polish Journal of Environmental Studies* 14:159-163.

Galarza, B.C., Goya, L.M., Cantera, C.S. y 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. y Lopez, L.M.I. 2004. Fungal transformation of bovine hair. Part 1: isolation of fungus with keratinolytic activity. *J Soc Leather Technol Chem* 88:93–98

Galarza, B.C., Garro, M.L., Cavello, I., Cazau, M.C., Hours, R. y Cantera, C.S. 2007. Fungal biotransformation of bovine hair: assessment of structural changes. *J Soc Leather Technol Chem* 91:229–232.

Galarza, B., Garro, M., Gortari, C., Bonfranceschi, A., Hours, R. y Cantera, C. 2014. From a problem of solid waste to an useful product in beamhouse process. *Journal of AQEIC*, 65: 49-55.

Galarza, B., Garro, L., Martegani, J. y Hours, R. 2016. Characterization and Evaluation of Fungal Enzymatic Pool with Unhairing Activity. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 100: 257-262.

Gams, W. 1971. *Cephalosporium*-Artige Schimmelpilze (Hyphomycetes) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. 261 pp.

Gams, W. 1977. A key to the species of *Mortierella*. Persoonia 9: 381-391.

Gams, W. y van Zaayen, A. 1982. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I. Taxonomy. Netherlands Journal of Plant Pathology. 88:57-78.

Gams, W. y O'Donnell, K., Schroers, H.J., Christensen, M. 1998. Generic classification of some more hyphomycetes with solitary conidia borne on phialides. Canadian Journal of Botany 76: 1570-1583

Gams, W. 1992. The analysis of communities of saprophytic microbiology with special reference to soil fungi. En: W. Winterhoff (ed.). *Fungi in Vegetation Science*. Kluwer Academic Publishers. 183-223 pp.

Gomes J., Steiner W. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food technology and Biotechnology*, 42: 223-235.

Garzón-Obando, D. 2013. Tesis: *Determinación De La Biodiversidad Bacteriana En Ecosistemas Glaciares De La Antártida*. Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A., Cacco, G. y Van Elsas, J.D., 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* 38: 1-15.

Gerlach, W. y Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium*-a pictorial atlas. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. 209:1-406.

Gianfreda, L. y Ruggiero, P. 2006. Enzyme Activities in Soil. In: Nannipieri P., Smalla K. (eds) *Nucleic Acids and Proteins in Soil. Soil Biology*, vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg.

Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S. 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* 37:877-887

Gimenez Dixon, M. 1991. Estimación de parámetros poblacionales del venado de las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus celer*, Cabrera 1943 –Cervidae-) en la costa de la Bahía Samborombón (Provincia de Buenos Aires) a partir de datos obtenidos mediante censos aéreos. Tesis Doctoral Universidad Nac. de La Plata. 116 pp.

Gilgado, F., Cano, J., Gene, J. y Guarro, J. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 43: 4930–4942.

Girvan M.S., Bullimore J., Pretty J.N., Osborn A.M. y Ball A.S. 2003. Soil type or the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 1800-1809.

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

Goddard, D.R. y Michaelis, L. 1934. A study of keratin. *The Journal Biological Chemistry* 106: 604-614.

González, M.C., Enríquez, D., Ulloa, M. y Hanlin, R.T. 2003. A preliminary survey of marine fungi from Cuba. *Mycotaxon*, 87: 457-465.

Gopinath, K., Gowri, S., Karthika, V. y Arumugam, A. 2014. Green synthesis of gold nanoparticles from fruit extract of *Terminalia arjuna*, for the enhanced seed germination activity of *Gloriosa superba*. *J Nanostruct Chem* 4: 1-11.

Grant, W.D. y Tindall, B.J. 1980. The isolation of alkaliphilic bacteria. In *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment*, (Eds. G.W. Gould and J.G.L. Corry), Academic Press. London. 27-36pp.

Grant, W.D. 1993. Alkaliphiles, Diversity and Applications. In *Microbial Utilization of Renewable Resources*, (Eds. P. Matangkasambut and Y. Oshima), pp 29-31. Bangkok. Thailand.

Grove, W.B. 1884. New or noteworthy fungi. *J. Bot. Lond.* 22: 195-201.

Grum-Grzhimaylo, A.A., Debets, A., van Diepeningen, J.M., Georgieva, A.D., Bilanenko M.L. 2013. EN *Sodiomyces alkalinus*, a new holomorphic alkaliphilic ascomycete within the *Plectosphaerellaceae*. *Persoonia* 31: 147-158.

Grum-Grzhimaylo, A.A., Georgieva, M.L., Bondarenko, S.A., Debets, A., Bilanenko, J.M. 2015. EN On the diversity of fungi from soda soils. *Fungal Diversity*.

Grun, C.H., Dekkerb, N., Nieuwland, A.A., Klisc, F.M., Kamerlinga, J.P., Vliegentharta, J.F.G. y Hochstenbach, F. 2006. Mechanism of action of the endo-(1-3) $\beta$ -glucanase MutAp from the myco-parasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *FEBS Letters* 580: 3780-3786.

Gurde-Cimerman, N. y Salazar, P. 2014. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technol Biotechnol* 52: 170-179.

Gruyter, J. y Noordeloos, M.E. 1992. Contributions towards a monograph of Phoma (Coelomycetes) 1-1. Section Phoma: Taxa with very small conidia in vitro. *Persoonia* 15: 71-92.

Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P. y Camacho, F. 2000. "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas". *Arspharmaceutica*. 41: 79-89.

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

Haki, G.D. y Rakshit, S.K. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89: 17-34.

Hankin, L. y Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, a virulent plant symbiont. *Nature Reviews: Microbiology* 2: 43-56.

Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S. y Hameed, A. 2010. Enzymes used in detergents: lipases. *African Journal of Biotechnology*. 9: 4836-4844

Hassan, F., Shah, A.A. y Hameed, A. 2009. "Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review". *Biotechnology Advances*. 27: 782-798.

Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El Reino de los Hongos, micología básica y aplicada. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México, D. f. 552 pp.

Hillel, D. 1982. Introduction to soil physics. San Diego (U.S.A.), Academic Press, 364 pp.

Howard, M., Ekborg, N., Taylor, L., Weiner, R. y Hutcheson, S. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 30: 627-635.

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

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

Hyde, K.D. 1989. Ecology of tropical marine fungi. *Hydrobiologia* 178: 199-208

Hyde, K.D., Jones, E., Leaño, S. B., Pointing, A. D., Poonyth, y Vrijmoed, P. 1998. Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7 : 1147-1161 .

Hyde, K.D., Wong, S.W. y Jones, E.B.G. 1997. Freshwater ascomycetes. In: Hyde KD (ed) *Biodiversity of tropical microfungi*. Hong Kong University Press, Hong Kong, 179-187pp.

Hyde, K.D. y Pointing, S.B. 2000. *Marine mycology: a practical approach*. Fungal Diversity Press, Hong Kong.

InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina.

Introcaso, A. y Gerster, R. 1985. Análisis de la evolución de las cuencas sedimentarias del Salado y Colorado en Argentina. *Rev. Geofísica*, 41: 3-22.

Jia, Z., Luo, W., Xie, J., Pan, Y., Chen, Y., Tang, S. y Liu, W. 2011. Salinity dynamics of wetland ditches receiving drainage from irrigated agricultural land in arid and semi-arid regions. *Agricultural Water Management*. 100: 9-17.

Jones, B.E., Grant, W.D., Collins, N.C. y Mwatha, W.E. 1994. Alkaliphiles: Diversity y Identification. In *Bacterial Diversity and Systematics*, (Ed. F.G. Priest), pp 195-230. Plenum Press. New York.

Jones, B.E., Grant, W.D., Duckworth, A.W. y Owenson, G.G. 1998. Microbial diversity of soda lakes. *Extremophiles* 2: 191–200.

Johnson, M., Lee, K. y Scow, K. 2003. DNA fingerprinting reveals links among Agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. *Geoderma*. 114:279-303.

Jones, E.B.G., Suetrong, S., Sakayaro, J.J., Bahkali, A.H. 2015. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity* 73: 1-72.

Jungebloud, A., Bohle, K., Göcke, Y., Cordes, C., Horn, H. y Hempel, D.C. 2007. Quantification of product-specific gene expression in biopellets of *Aspergillus niger* with real-time PCR. *Enzyme Microb. Technol.* 40:653-660.

Kandeler, E. y H. Gerber. 1988. Short-Term assay of soil urease activity using colorimetric determination ammonium. *Biol Fertil Soil* 6:68-72.

- Kaul, S. y Sumbali, G. 2000. Keratinophilic fungi from feathers of Indian poultry birds. *Mycologist* 14:148-150.
- Kembhavi, A., Kulkarni, A. y A. Pant. 1993. "Salt Tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis*". *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 83- 92.
- Keyhani, N. y Roseman, S. 1996. Molecular cloning, isolation, and characterization of a periplasmic chitodextrinase. *Journal of Biology and Chemistry* 271: 33414- 33424
- Kieft, T. L., Soroker, E. y Firestone, M. K. 1987. "Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted," *Soil Biol. Biochem.*, 19: 119–126.
- King, G. A., Wollard, D.C., Irving, D.E. y Borst, W.M., 1990. Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Physiol. Plant.* 80: 393-400.
- Kis-Papo, T., Grishkan, I., Oren, A. y Wasser, S.P. 2001 – Spatiotemporal diversity of filamentous fungi in the hypersaline Dead Sea. *Mycology Research* 105: 749–756.
- Kis-Papo, t., Oren, A., Wasser, S.p. y Nevo, E. 2003. Survival of filamentous fungi in hypersaline Dead Sea water, *FEMS Microbiol Ecol* 45: 183-190.
- Kladwang, W., Bhumirattana, A., Hywel-Jones, N. 2003. Alkaline-tolerant fungi from Thailand. *Fungal diversity* 13:69-83
- Klich, M.A., Pitt, J.I. 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde, CSIRO Division of Food Processing.
- Klis, F.M., De Groot, P. y Hellingwerf, k. 2001. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*, *Med Mycol*, 39: 1-8.

Koneman, E. y Roberts, G. 1987. *Micología. Practica de laboratorio*. Editorial Médica Panamericana S.A. Bs. As. ed. tercera. 351Pp.

Kovach, W.L., 2007. *MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows*, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.

Kozakiewicz Z. 1989. *Aspergillus species on stored products*. Mycol. Pap. 161, Wallingford, CAB International.

Kroll, R.G. 1991. Alkalophiles. In *Microbiology of Extreme Environments*, (Ed. C. Edwards), pp 55-92. McGraw-Hill. New York.

Kuzu, S., Güvenmez, H. y Denizci, A. 2012. Production of a thermostable and Alkaline Chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* Strain HBK-51. *Biotechnology Research International*.

Kubicek, C.P., R.L. Mach, C.K. Peterbauer y M. Lorito, 2001. *Trichoderma: from genes to biocontrol*. *Journal of Plant Pathology* 83: 11-23.

Latgé, J.P. y Beauvais, A. 2014. Functional duality of the cell wall. *Curr Opin Microbiol*, 20:111-117.

Leloup, V.M., Colonna, P. y Ring S.G. 1991.  $\alpha$ -Amylase adsorption on starch crystallites. *Biotechnology and Bioengineering*. 38: 127-134.

Lemanceau, P. 1988. *Receptivité des sols aux fusarioses vasculaires: étude critique des theories proposées*. Thèse Doct. Uni. Claude Bernard, Lyon I, Lyon 99 pp.

Linnemann, G. 1941. Die Mucorineen-gattung *Mortiereüa* Coemans. G. Fischer, Jena. (Pflforsch, H. 23).

Liporace, F., Conde, D., Molina, Odobez, N. y Quevedo, C. 2019. Aislamiento de microorganismos a partir de áreas crónicamente contaminadas con hidrocarburos cercanas a zonas urbanizadas, para la aplicación de estrategias de biorremediación / Isolation of microorganisms from areas contaminated with hydrocarbons close to urbanized areas, for the application of biorremediation strategies. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba. 5: 4660-4674.

Löffler, A. 1986. Proteolytic Enzymes: sources and applications. *Food Technology*, January, 63-70 pp.

López, L. M., Sequeiros, C., Natalucci, C. L., Brullo, A., Maras, B., Barra, D. y Caffini, N. O. 2000. "Purification and characterization of macrodontan I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (Bromeliaceae)". *Journal of Food Biochemistry*, 19: 443-454.

Iqbal, H.M.N., Ahmed, I., Zia, M.A. y Irfan, M., 2011. Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 2: 149-156.

Luo, J., Liu, X., Li, E., GUO, L. y CHE, Y. 2013. Arundinols A-C and arundinones A and B from the plant endophytic fungus *Microsphaeropsis arundinis*. *Journal of Natural Products* 76: 107-12.

MacElroy, R.D. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems*, 6: 74-75.

Madigan, M.T. y Mairs, B.L. 1997. Extremophiles. *Scientific American*. 276: 82-87.

Magurran, A. E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Croom Helm, London.

Mancillas-Paredes, J.M., Hernández-Sánchez, H., Jarillo-Flores, M.E. y García-Gutiérrez, C. 2019. Proteases and Chitinases Induced in *Beauveria bassiana* during Infection by *Zabrotes subfasciatus*. *Southwestern Entomologist* 44: 125-137.

Malik, S.K., Mukhtar, H., Farooqi, A.A. y Haq, I.U., 2010. Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulose by *Trichoderma viride*. *Pak. J. Bot.*, 42: 4243- 4251.

Marcello, C.M., Steindorff, A.S., Silva, S.P., Silva, R.N., Bataus, L.A.M. y Ulhoa, C.J. 2010. Expression analysis of the exo- $\beta$ -1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. *Microbiological Research* 165: 75-81.

Mark, N. Bikales, M., Overberger, C. y Menges, G. 1988. Eds., *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. 2: 286-287.

Martinez, A.J., Trucksess, M.W., Park, D.L. 1987. Analysis of Venezuelan Corn for Aflatoxin and *Aspergillus Flavus* or *Aspergillus Parasiticus* Contamination. *Biodeterioration Research*. 1:111-118.

Mathivanan, N., Kabilan, V., y Murugesan, K. 1998. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 646-651.

Miller, G.T. 1994. *Ecología y medio ambiente*. Grupo editorial Iberoamérica. México, D.F. 867 pp.

Mitchell, D.A. 1992. Growth patterns growth kinetics and the modelling of growth in solidstate-cultivation Chapter 6 87-112 in *Solid Substrate Cultivation* ed H.W. Doelle D.A.Mitchell and C.E.Rolz Elsevier Science Publishers.

Meenakshi, V.R. 2004. Biodiversity and germoplasm collection of alkalophilic fungi and actinomycetes for biotechnology application. ed. National Chemical Laboratory. Project Completion Report, 421 pp.

Moscatelli, N.G. y Scoppa, O.C. 1996. Características hidroedáficas de la Pampa Deprimida. Coloquio internacional sobre hidrología de grandes llanuras. Instituto Nacional de tecnología Agropecuaria. Departamento de suelos. Castellar, Buenos Aires (Republica Argentina).

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

Murkerji, K.G. 1965. Ecological studies on the microorganic population of usar soil. *Mycopathology and Mycology Applied*. 29: 339-341.

Muzzarelli, R., Mattioli-Belmonte, R., Pugnali, A. y 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. y Okada, G. 1995. Studies on the distribution of alkalophilic and alkali-tolerant soil fungi I. *Mycoscience* 36: 247-256.

Nagai, K., Suzuki, K. y Okada, G. 1998. Studies on the distribution of alkalophilic an alkali-tolerant soil fungi II: Fungal flora in two limestone caves in Japan. *Mycoscience* 39: 293-298.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. y Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species: An illustrated manual for identification*. Pennsylvania, USA: Pennsylvania State University Press.

Nieves Rivera, Á.M. y C.J. Santos Flores. 2005. Aquatic fungi from estuaries in Puerto Rico: Mouth of the Manatí River. *The Journal of Agriculture of University of Puerto Rico* 89:97- 105.

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.

North, M. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganism. *Microbiological Reviews* 46: 309-340.

Ochoa, V., Hinojosa, B., Gómez-Muñoz, B. y García-Ruiz, R. 2007. Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. *Revista electrónica Iniciación a la investigación*. Universidad de Jaén. Andalucía, España.

Okazaki M., Hirata E. y Tensho K. 1983. TTC reduction in submerged soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 29: 489-497.

Osorio, N.W. y J.C. Pérez. 2001. Microbial solubilization of phosphates in soil. A review. X Congreso de la Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo, Medellín (Colombia).

Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T. y Patil, S. 2005. Optimization of process parameters for chitinase production by soil isolates of *Penicillium chrysogenum* under solid substrate fermentation. *Process Biochem*, 40:2962-7.

Papizadeh, M., Wijayawardene, N.N., Amoozegar, M.A., Saba, F. 2017. *Neocamarosporium jorjanensis*, *N. persepolisi* and *N. solicola* spp. nov.

(*Neocamarosporiaceae*, *Pleosporales*) isolated from saline lakes of Iran indicate the possible halotolerant nature for the genus. *Mycological Progress* 17: 661–679.

Paul, E.A. y Clark, F.E. 2007. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. 275 pp.

Parkinson, D. y Williams, S.T. 1961. A method for isolating fungi from soil microhabitats. *Plant and Soil* 13: 347-355.

Poon, M. y Hyde, K.D. 1998. Biodiversity of intertidal estuarine fungi on *Phragmites* at Mai Po marshes, Hong Kong. *Botanica Marina* 4: 141-155.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J. , Hirano, S. (Eds), *Microbial Ecology of Leaves*. Springer Verlag, New York. 125-197pp.

Phillips, R. 1981. Les champignons. France, Solar. Prajapati, J. B., Neelakantan, S.: Bioconversion of supplemented wheat straw by lignocellulolytic fungi. *J. Dair. Foods Home Sci.* 13: 21-30.

Pitt, J.I. 1979. The Genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London: *Academic Press*. 634 pp.

Pilnik, W. y Rombouts, F.M. 1979. Utilization of pectic enzymes in food production in *Food Science and Technology* (eds. Chiba, H., Fujimaki, M., Iwai, K., Mitsuda, H. & Morita, Y.) 269-277 pp.

Puckett, W.E, Dane, J.H. y Hajek, B.F. 1985. Physical and mineralogical data to determine soil hydraulic properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49: 831-836

Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A. y Amorim, D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol.*

PROMAR-AACS. 1991. Programa de Métodos Analíticos de Referencia. pH, Carbono, Materia orgánica, Nitrógeno total, Fósforo extraíble. Ed. Asociación Argentina de la Ciencia del Suelo, Comité de Química. Argentina.

Pugh, G.J.F. 1969. Some problems in the classification of soil fungi. *In The Soil Ecosystem, A Symposium*. Ed. J G Sheals. pp 119–130. Systematics Association Publication No. 8, Academic Press, London.

Pugh, G.J.F. y Dickinson, C.H. 1965. Studies on fungi in coastal soils. VI. *Gliocladium rosea* Bainier. *Transactions of the British Mycological Society* 48: 279-285.

Ramírez, C. 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam. The Netherlands. 874 pp.

Ramada, M.H.S., Lopes, F.A.C., Ulhoa, C.J. y Silva, R.N. 2010. Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods* 81: 6 -10.

Rabbani, M., Bagherinejad, M., Sadeghi H. 2013. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:1113-1119.

Ramos, E.; Zuñiga, D. 2008. Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*. 7: 123-130.

Raper y Fennell 1977. *The genus Aspergillus* Robert and Krieger, Malabar.

Rai, J.N., Agarwal, S.C. y Twari, J.P. 1971. Fungal microflora of usar soils of India. *Journal of the Indian Botanical Society*. 50: 63-74.

Reed, C.J., Lewis, H., Trejo, E., Winston, V., and Evilia, C. 2013. Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea*. 2013: 1-14.

Reinehr. 2014. "Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* a través de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise". *Quim. Nova*. 37: 454-460.

Rasche F., Hödl V., Poll C., Kandeler E., Gerzabek M.H., Van Elsas J.D.y Sessitsch A. 2006. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared to the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. *FEMS Microbiology Ecology* 56: 219-235.

Richards, L. A. 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils, U. S. Salinity Laboratory Staff, USDA Handbook, 60: 160 pp.

Ritz, K. y Young, I.M. 2004. Interactions between soil structure and fungi. *Mycologist* 18: 52-59 pp.

Rifai, M. A. 1969. A revision of genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56.

Rivas, Y., Oyarzún C., Godoy, R. y Valenzuela, E. 2009. Mineralización del nitrógeno, carbono y actividad enzimática del suelo en un bosque de *Nothofagus obliqua* (Mirb) Oerst y una plantación de *Pinus radiata* D. Don. del CentroSur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 119-134

Robe, P., Nalin, R., Capellano, C., Vogel, T., Simonet, P. 2003. Extracción de DNA from soil. *European Journal of Soil Biology* 39 : 183-190.

Rodriguez-Valera, F. 1993. Introduction to saline environments. In *The Biology of Halophilic Bacteria*, (Eds. R.H. Vreeland and L.I. Hochstein), pp 1-20. CRC Press Inc. Boca Raton.

Rojas, N.L., Cavallito, S.F., Cabello, M.N., Hours, R.A. y Voget, C.E. 2009. Alkaline polysaccharidases produced in solid state cultures by alkalophilic fungi isolated from Argentina. *J Pure Appl Micro* 2:1–10.

Rothschild, L. J. y Mancinelli, R. L. 2001. Life in extreme environments. *Nature*. 409: 1092-1101.

Sakai, T., Sakamoto, T., Hallaert, J., y Vandamme, E.J. 1993. Pectin, pectinase, protopectinase: production, properties, and applications. *Adv Appl Microbiol* 39: 213-294 .

Samaniego–Gaxiola, J. A. y Chew–Madinaveitia, Y. 2007. Diversidad de géneros de hongos del suelo en 3 campos con diferente condición agrícola en La Laguna, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78:383–390.

SAMLA. 2004. Sistema de apoyo metodológico a los laboratorios de suelos, agua, vegetales y enmiendas orgánicas. ISBN 987–9184–40-8. Dirección de Agricultura SAGPyA Argentina.

Samón-Legrá, E. y Enríquez-Lavandera, D. 2010. Nuevos registros de hongos marinos en el litoral sur de Guantánamo, Cuba New records of marine fungi from the south coast of Guantánamo, Cuba *Serie Oceanológica*. No. 7, ISSN 2072-800x.

Samuels G.J. y Chaverri P. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. *Stud. Mycol.* 48: 1-116.

Sanchez, R.O., Ferrer, J.A., Duymovich, O.A. y Hurtado, M.A. 1976. Estudio podológico 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.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 40: 2689–2694.

Sarmiento, F., Peralta, R., Blamey, J. 2015. Cold and hot extremozymes: industrial relevance and current trends. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 3: 148.

Satchell, J. E. y K. Martin. 1984. Phosphatase activity in earthworm faeces. *Soil Biol. Biochem.* 16: 191-194.

Schinner, F. y Von Mersi, W. 1990. Xylanase-, CM-cellulase- and invertase activity in soil: an improved method. *Soil Biol. Biochem.* 22: 511–515

Schipper, M.A.A. 1978. On certain species of *Mucor* with a key to all accepted species. *Studies Mycol. (Baarn)* 17:1-52.

Schmit, J.P. y Müller, G. M. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* 16:99-111.

Shigenesa, Y. y Minami, S. 1996. Applications of chitin and chitosan for Biomaterials. *Biotechnological Genetic Engineering Reviews* 13: 313-320.

Shen, C., Chen, Y.S., Yang, C.J., Chen, J.K. y Liu, C.L. 2010. Colloid chitin azure is a dispersible, low-cost substrate for chitinase measurements in a sensitive, fast, reproducible assay. *Journal of Biomolecular Screening* 15:213-217.

Silva, R., Steindorff, A.S., Soller, M.H., Linhares de Siqueira, S.J. y Ulhoa, C.J. 2012. Biochemical characterization of a 27 kDa 1,3  $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. *Carbohydrate Polymers* 87: 1219-1223.

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

Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Patel, A.K., Larroche, C. y Pandey, A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solidstate and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 541–549.

Smith, D. y Brekke, C. 1984. Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. *J. Food Sci.* 49: 1525-1528.

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: 419-25.

Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*. 160, 61.

Stchigel, A.M., Caldich, M., Guarro, J., Ruberto, L. y Mac Cormack, W. 2009. Isolation of *Papulaspora halima* and a new morphological variety of *Halosphaeria tubulifera* from seawater of Potter Cove (King George Island, South Shetland Island, Antarctica). *Boletín Micológico* 24: 21-25.

Stenglein, S. A. y Balatti, P. A. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68: 158–167.

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

Stolk, A. y Samson, R. A. 1972. The genus *Talaromyces*. *Studies on Talaromyces and related genera*. 2. *Stud. Mycol. Baarn* 2: 1-65.

Subba Rao, N.S. 1999. Organic matter decomposition. In: N. S. Subba Rao. (4th ed.) *Soil microbiology*, science Publishers, USA, 320 pp.

Sukumaran, R.K., Singhania, R.R. y Pandey, A., 2005. Microbial cellulases – production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* 64: 832–844.

Tarbut, E.J. y Lutgens, F.K., *Ciencias de la Tierra*. Edit. Prentice Hall, edición 2005, trad. De 8ª ed. España

Taylor, T.N., Hass, H., Kerp, H., Krings, M. y Hanlin, R.T. 2005. Perithecial ascomycetes from the 400 million year old Rhynie chert: an example of ancestral polymorphism (Vol. 96, p 1403, 2004). *Mycologia*, 97:269–285.

Tedersoo, L., Mohammad, B., Sergei, P., Urmas, K., Nourou, Y. 2014. Global diversity and geography of soil fungi; *American Association For The Advancement Of Science; Science*, 346: 1078-1089.

Thalman, A. 1968. Zur Methodik der Bestimmung der deshidrogenasa actividad im Boden mittels Triphenyltetrazoliumchlorid [TTC]. *Landwirtsch. Forsch.* 21: 249-258.

Thompson, M.L., H. Zhang, M. Kazemi y J.A. Sandor. 1989. Contribution of organic matter to cation exchange capacity and specific surface area of fractionated soil materials. *J. Soil Sci* 148: 250-257.

Thrower, L.B. 1966. Terminology for plant parasites. *Phytopath. Z.* 56: 258-259.

Tiessen, H. y Moir, J.O. 1993. Total organic carbon. In: Carter ME (ed) *Soil sampling and methods of analysis*. Lewis, Ann Arbor, 187–211 pp.

Topp, E., Hanson, R. S., Ringelberg, D. B., White, D. C., y Wheatcroft, R., 1993, Isolation and characterization on an n-methylcarbamate insecticide-degrading methylotrophic bacterium, *Appl. Environ. Microbiol* 59: 3339–3349.

Torres, M. y Lizarazo, L. 2006. Evaluación de grupos funcionales del ciclo del C, N y P y actividad de la fosfatasa ácida en dos suelos agrícolas del departamento de Boyacá. *Agronomía Colombiana*, 24: 317-325.

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., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. y Bourriotis, V. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology* 18: 305-312.

Tulloch, M. 1972. The genus *Myrothecium*. *Mycological Papers*. 130: 1-42.

Ulfig, K. y Korcz, M. 1995. Isolation of keratinolytic fungi from a coal mine dump. *Mycopathology* 129: 83-86.

USSLS (United States Salinity Laboratory Staff). 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. Handbook 60. Riverside, CA. 160 pp.

Valencia-Cantero, E. y Peña -Cabriales, J.J. 2001. El suelo y sus habitantes microbianos: consideraciones ecológicas. *Avance y Perspectivas* 20: 410-406.

Valencia-Guerrero, M.F., Franco-Correa, M., Parra, C., Rodríguez-Bocanegra, M. X., Diez, H. y Quevedo-Hidalgo, B. 2011. Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum* 16:147-.

Van-Den-Burg, B. 2003. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current opinion in microbiology*. 6: 213-218.

Vázquez I., Aguilera A., Prado-Barragán L. y Aguilar C. 2008. "Producción fúngica de proteasas inducidas con pelo de cerdo". *Información tecnológica*. 19: 33-40.

Vervoost, F. 1967. Las comunidades vegetales de la Depresión del Salado (Provincia de Buenos Aires). INTA, Serie Fitogeografica 7: 1-262.

Volkman-Kohlmeyer, B. y J. Kohlmeyer. 1993. Biogeographic observations on pacific marine fungi. *Mycologia*, 85: 337- 346.

Volpedo, A.V., Yunes, T. y Fernández Cierelli, A. 2005. El humedal mixohalino de Bahía Samborombón: conservación y perspectivas. En: *Humedales Fluviales de America del Sur. Hacia un manejo sustentable*. Ediciones Proteger-UICN 1-18.

Walker, G.M y White, N.A. 2011. Introduction to fungal physiology, Carter1. In: Kavanagh, K. (Eds), *Fungi: Biology and Application*, 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley and Sons, Ltd. 1-35pp.

Walkley, A. y Black, I.A. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-37.

Wanderley-Costa, I., Costa, L., Cavalcanti, M.A. 2012. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 1165-1173 pp.

Wanasinghe, D.N., Hyde, K.D., Jeewon. R. y Crous, P.W. 2017. Phylogenetic revision of *Camarosporium* (Pleosporineae, Dothideomycetes) and allied genera. *Studies in Mycology* 87: 207–256.

Warcup, J. H. 1951. The Ecology of soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society* 34: 376-399.

Wardle, A. y Lindahl, B. 2014. Disentangling the global mycobiome. *Science* 346: 1052-1053.

Weiss B. y Tresendorfer I. 1993. Einfluss von Regenwürmern auf mikrobielle Aktivitäten - Labor - und Freilandexperimente. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft* 69: 155-158.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee y J.W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. Academic Press, Inc., New York.

Widden, P. y Parkinson, D. 1973. Fungi from Canadian coniferous forest soils. *Canad. J. Bot.* 51: 2275-2290.

Wijayawardene, N.N., Papizadeh, M., Phillips, A.J.L., Wanasinghe, D.N. 2017a – Mycosphere Essays 19: recent advances and future challenges in taxonomy of coelomycetous fungi. *Mycosphere* 8: 934–950.

Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Rajeshkumar, K.C. y Hawksworth, D.L. 2017b – Notes for genera: Ascomycota. *Fungal Diversity* 86: 1–594.

Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Yokohama, K. y Tamiya E. 2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 1138-1143.

Yano J.K. y Poulos T.L. 2003. New understandings of thermostable and piezostable enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 14: 360-365.

Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wolijoki, E., Ylitalo, P. y Lehtimäki, T. 2002. Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittelforschung* 52:1-7.

Zhang, Y., Li, G.H., y Zhang, K. Q. 2011. A review on the research of nematophagous fungal species (In Chinese). *Mycosystema*, 30: 836–845.

*Anexo*



# Anexo

## Anexo 1:

Tabla 1- Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH. Etceverre 1976.

Categoría	Valor de pH
Muy fuertemente ácido	$\leq 4,6$
Fuertemente ácido	4,7-5,2
Ácidos	5,3-5,8
Debilmente ácido	5,9-6,7
Neutro	6,8-7,2
Debilmente alcalino	7,3-7,6
Fuertemente alcalino	8,0-8,5
Muy fuertemente alcalino	$\geq 9$

Tabla 2- Criterios para poder evaluar la salinidad de un suelo, con base a su conductividad eléctrica (C.E) Vázquez y Bautista (1993).

Categoría del suelo	Valores (mmhos/cm o dS/m)
No salino	0-2,0
Poco salino	2,1-4,0
Moderadamente salino	4,1-8,0
Muy salino	8,0-16,0
Extremadamente salino	> 16,0

Tabla 3- Interpretación del contenido del carbono orgánico (C.O) y materia orgánica (M.O). Cátedra de Edafología, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP)

Clase	% K/S	
	C.O	M.O
Muy baja	0,01-0,87	0,01-1,5
Bajo	0,88-1,45	1,51-2,50
Medio	1,46-2,61	2,51-4,5
Alto	2,62-3,77	4,51-6,5
Muy alto	> 3,78	> 6,51

Tabla 4- Criterios para evaluar un suelo con base en su contenido de nitrógeno (Moreno, 1978)

Categoría	Valor (%) de N.t en suelo
Extremadamente pobre	< 0,032
Pobre	0,032-0,063
Medianamente pobre	0,064-0,095
Mediano	0,096-0,126
Medianamente rico	0,127-0,158
Rico	0,159-0,221
Extremadamente rico	> 0,221

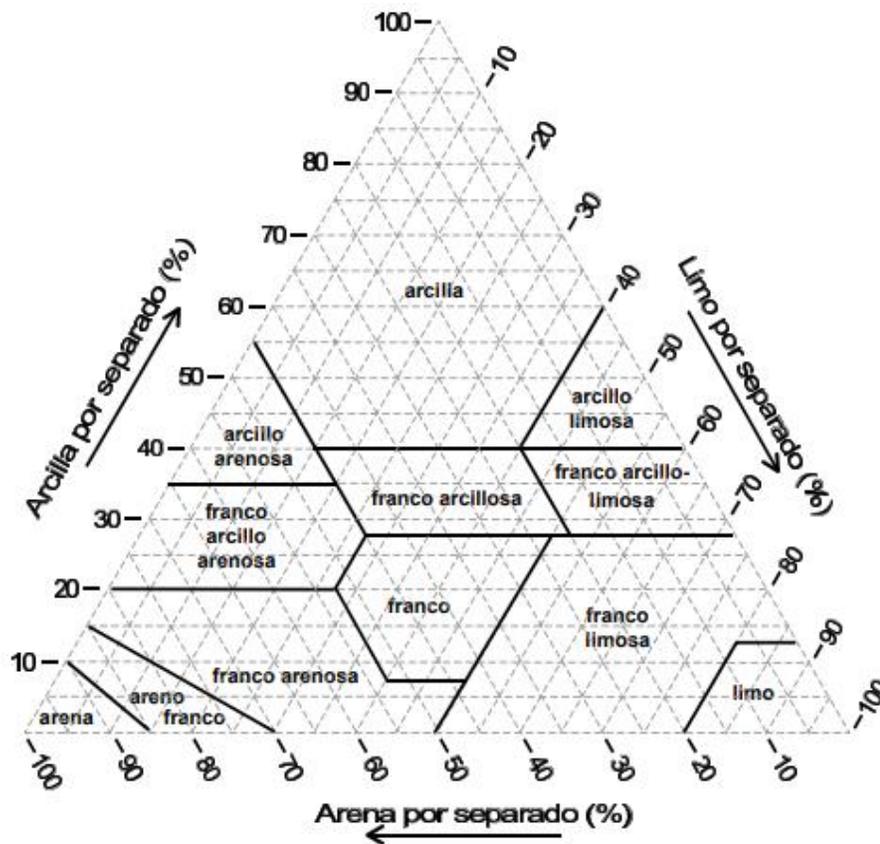
Tabla 5- Clasificación de los suelos según los valores de CE, RAS y pH, según AgricultureHandbook, USSLS, 1954

Clasificación	C.E (dS/m)	RAS	pH
Salino	> 4	< 13	< 8,5
Salino-sódico	> 4	> 13	< 8,5
Sódico	< 4	> 13	> 8,5

Tabla 6- Niveles de Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, K<sup>+1</sup> y Na<sup>+1</sup>. Extraído de: Manual técnicas de análisis de suelo.

Clase	CmolC/ kg			
	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>
Muy bajo	< 2	< 0,5	< 0,2	0,01
Bajo	2-5	0,5-1,3	0,2-0,3	0,01-0,10
Medio	5-10	1,3-3	0,3-0,6	0,10-0,3
Alto	> 10	> 3	> 0,6	> 0,3

Figura 1 -Determinación de la clase textural del suelo, de acuerdo al porcentaje de arena, limo y arcilla. Triangulo de textura del sistema de clasificación de la USDA.



## Anexo 2:

### **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

20 g de agar

1000 ml de agua deionizada

pH 6.5

### **Agar corn meal (CMAyG)**

40 g de harina de maíz

16 g de agar

1 g de extracto de levadura

2 g de glucosa

1000 ml de agua deionizada

pH 6.5

### **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

### **Méδιο agarizado actividad lipasa**

10 g de peptona  
5 g de NaCl  
0.1g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
20g de agar  
1000 ml de agua destilada  
1 ml de Tween 20 estéril por cada 100 ml de medio.

### **Méδιο agarizado actividad quitinasa**

0.08 g de Chitin Azure  
100 ml de medio agarizado (APG)

### **Sabouraud completo**

5g de caseína al 5%  
5g de peptona al 5%  
1000 ml de água

## **Anexo 3:**

### **Soluciones buffer Nagai *et al.* 1985**

Composición de las soluciones buffer mmol/100ml

<b>pH final</b>	<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O</b>
<b>11</b>	50			
<b>10</b>	27,5	22,5		
<b>9</b>	3	47		
<b>8</b>			49	1
<b>7</b>			27,5	22,5
<b>6</b>			0,5	45
<b>5</b>				50