

# Micobiota alcalino-tolerante descomponedora de restos de *Distichlis spicata* (Poaceae) en suelos alcalinos de la provincia de Buenos Aires: habilidad enzimática

Eliades, Lorena A.<sup>1\*</sup>; Natalia Ferreri<sup>1</sup>; Ana M. Bucsinszky<sup>1</sup>;  
Mario C. N. Saparrat<sup>1,3,4</sup>; Marta N. Cabello<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Botánica Carlos Spegazzini (FCN y M-UNLP) 53 #477, (1900), La Plata, Argentina.

<sup>2</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

<sup>3</sup> Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), CCT, La Plata. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Diag. 113 y 61, CC 327, (1900) La Plata, Argentina.

<sup>4</sup> Cátedra de Microbiología Agrícola, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, 60 y 119, (1900) La Plata, Argentina.

\* Autor corresponsal: lorenaeliades@yahoo.com.

---

► **Resumen** — Eliades, Lorena A.; Natalia Ferreri; Ana M. Bucsinszky; Mario C. N. Saparrat; Marta N. Cabello. 2014. "Micobiota alcalino-tolerante descomponedora de restos de *Distichlis spicata* (Poaceae) en suelos alcalinos de la Provincia de Buenos Aires: habilidad enzimática". *Lilloa* 51 (1). *Distichlis spicata* (L.) Greene (pasto salado; Poaceae) es la especie vegetal dominante que crece en la antigua albufera platense de suelos alcalino/sódicos en el distrito de Magdalena (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Se recolectaron plantas secas de *D. spicata* provenientes de la cobertura del suelo en dos muestreos (otoño y primavera 2009) y se procesaron para aislar y caracterizar la micobiota asociada. Se determinó la habilidad enzimática de aislamientos seleccionados para producir enzimas:  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa en cultivos líquidos y amilasas, proteasas, celulasas y quitinasas en cultivos sólidos. El objetivo de esta contribución es aportar conocimiento de la comunidad fúngica asociada a hojarasca de *D. spicata* (Poaceae) procedente de suelos salino/sódicos y de sus capacidades enzimáticas. En este trabajo se amplía en 8 el número de especies colonizadoras de hojas de *D. spicata*. Diez especies mostraron capacidades enzimáticas alcalinas con potencialidades de uso tecnológico.

**Palabras clave:** Habilidad enzimática, hongos de hojarasca, medio alcalino, suelos sódicos.

► **Abstract** — Eliades, Lorena A.; Natalia Ferreri; Ana M. Bucsinszky; Mario C. N. Saparrat; Marta N. Cabello. 2014. "Alkali-tolerant mycobiota of *Distichlis spicata* (Poaceae) litter in alkaline soils from Buenos Aires Province: enzymatic ability". *Lilloa* 51 (1). *Distichlis spicata* (L.) Greene (salt grass, Poaceae) is the dominant plant species growing in alkali/sodic soils in the district of Magdalena (Province of Buenos Aires, Argentina). Dried plants of *D. spicata* from land cover were collected in two sampling (autumn and spring 2009) and processed to isolate and characterize the associated mycobiota. A screening for  $\alpha$ -rhamnosidase,  $\beta$ -glucosidase, amylases, proteases, cellulases and chitinases in selected isolates was made. The aim of this contribution is to provide knowledge of the fungal community associated with *D. spicata* (Poaceae) litter, from saline/sodic soils and their enzymatic abilities. This paper expands on 8 the number of species colonizing leaves of *D. spicata*. Ten species showed alkaline enzymatic abilities with potential in several technological areas.

**Keywords:** Alkaline medium, enzymatic abilities, fungi, sodic soils.

## INTRODUCCIÓN

*Distichlis spicata* (L.) Greene (pasto salado; Poaceae) es la planta herbácea dominante de la antigua albufera platense de suelos alcalino/sódicos en el distrito de Magdalena (Provincia de Buenos Aires, Argentina). Es una especie perenne que crece a partir de extensos rizomas escamosos de color amarillento asociados a suelos alcalinos, caracterizados como Natracualf según FAO (1968) que posee un contenido de sodio entre 5.39 y 13.9 meq 100 g<sup>-1</sup> y pH de 6.8 a 9.6 (Sánchez *et al.*, 1976; Ungar, 1974; Hansen *et al.*, 1976). Aunque *D. spicata* tiene uso como forraje para el ganado vacuno principalmente durante los meses julio, enero y abril en respuesta a constituir un suplemento alternativo, es el reservorio principal de materia orgánica para este tipo de suelo alcalino (Somlo *et al.*, 1985). La actividad de estos hongos en este ambiente condicionado por la salinidad y/o pH sugiere la producción de enzimas que actúan a pH alcalino las cuales tiene potencial para el desarrollo de procedimientos biotecnológicos.

La acción descomponedora de los hongos de suelo es esencial para el aporte de materia orgánica en los ecosistemas de suelos salinos (Torzilli *et al.*, 2006). La microbiota de suelos alcalinos de la Argentina ha sido reportada por Cabello y Arambarri (2002); Eliades *et al.* (2004, 2006). Eliades *et al.* (2007) reportaron la microbiota de la hojarasca de *D. spicata* en este ambiente, no obstante no hay información sobre la habilidad de los representantes fúngicos asociados a este sustrato vegetal para producir enzimas alcalinas.

La presente contribución representa un aporte al conocimiento de la comunidad fúngica asociada a hojas de *D. spicata* en descomposición provenientes de suelos salino/sódicos y su habilidad, para producir enzimas relacionadas con la degradación de materia orgánica y de interés en biotecnología en condiciones de alcalinidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio corresponde a una pradera salada de relieve negativo, dentro del entorno llamado «antigua albufera platense» se encuentra en el distrito de Magdalena a 20 km al sureste de la ciudad de Magdalena (35°11'S, 57°17'O) en la Provincia de Buenos Aires (Argentina). El suelo de estas zonas se clasifica como Natracualf, caracterizado por un alto pH 9,6-10; baja cantidad de materia orgánica 2,90-1,14% y alto contenido de sodio 5,39 a 13,9 meq en 100 g de suelo (Sánchez *et al.*, 1976).

## RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se recolectaron plantas secas de *D. spicata* provenientes de la cobertura del suelo en dos muestreos (otoño y primavera 2009). Se separaron las hojas de las plantas y se procesaron empleando dos métodos: i) Incubación en cámara húmeda ii) fragmentación y lavado de hojas de *Distichlis* según Eliades *et al.* (2007). Las hojas enteras se incubaron sobre papel de filtro hidratado, mientras que las partículas de hojas lavadas se sembraron sobre medio de cultivo agar harina de maíz (CMA), ambos sistemas se incubaron a 25° C y se observaron con microscopio estereoscópico semanalmente. Se identificaron y aislaron las especies fúngicas y se depositaron en el Cepario del Instituto de Botánica Spezzini (LPSc). 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 biodiversidad ( $H'$ ) Shannon-Weiner; riqueza específica ( $S$ ) y equitabilidad ( $J'$ ) (Magurran, 1988).

Submuestras representativas de hojas del muestreo de primavera 2009 se procesaron para su análisis químico según Marano *et al.* (2013). El material foliar de *Distichlis* utilizado reveló la siguiente composición porcentual: materia orgánica, 84.8; materia

seca digestible, 44.8; hemicelulosa, 40.6; celulosa, 36.2; lignina, 10.0; proteína bruta, 5.9 y nutrientes K, 0.87; Ca, 0.3; P, 0.18.

*Cultivo en diferentes medios y análisis enzimáticos.*— Para determinar la habilidad enzimática se seleccionaron 10 cepas capaces de tolerar altos pH, las cuales presentaron altas frecuencias de aparición en los muestreos. Las especies fúngicas que producen abundante esporulación se sembraron en cajas de Petri (APG). Luego de 10 días de incubación se obtuvieron conidios que fueron resuspendidos en 10 ml de glicerol 20 % estéril y se congelaron a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

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

Los experimentos se realizaron en medio líquido para la determinación de actividades  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa y en medio sólido para las actividades amilolítica, proteolítica, celulolítica y quitinolítica.

*Determinaciones de actividad enzimática en medio líquido.*— Las cepas se cultivaron en Erlenmeyer bajo agitación a 200 rpm,  $28^{\circ}\text{C}$  en medio líquido a base de harina de soja (HS) el cual fue ajustado a pH 9.0 (Eliades, 2009). Transcurridos 15 días de cultivo los sobrenadantes obtenidos por filtrado y centrifugación se utilizaron como fuente de enzimas con actividad  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa las cuales fueron estimadas empleando sustratos cromogénicos p-nitrofenil- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (pnp-Rha) y p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (pnp-Glu) siguiendo la metodología descrita por Eliades *et al.* (2011). Estos compuestos al ser hidrolizados desarrollan en medio alcalino un color amarillo por la aparición del anión p-nitrofenolato. El screening se realizó en placas microtiter. En cada celda se mezclaron 80  $\mu\text{l}$  de Tris-HCL 20 mM, pH 9.0; 10  $\mu\text{l}$  de muestra, 10  $\mu\text{l}$  de sustrato y 1.0  $\mu\text{l}$  de azida de sodio 0,01%. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Se hicieron blancos de muestra en

todos los casos y blancos de sustrato para, en particular para el pnp-Glu el cual es más inestable en medio alcalino.

*Determinaciones de actividad enzimática en medio sólido.*— Se evaluó la habilidad de 10 aislamientos para degradar almidón (actividad amilolítica), caseína (actividad proteolítica), carboximetilcelulosa (actividad celulolítica) y ChitinAzure (actividad quitinolítica) en placa (Eliades, 2009).

Para determinar actividad amilolítica, las placas fueron reveladas con una solución de Iodo al 1% en solución de KI 0,2 % luego de 3 -4 días de incubación. La presencia de una zona amarilla alrededor de la colonia fue indicador de actividad. La actividad celulolítica se reveló con Rojo Congo 0.2 % luego de 5-7 días de incubación (Hankin y Anagnostakis, 1975). La producción de proteasas se detectó con solución de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. La presencia de un halo transparente alrededor de la colonia indicó actividad positiva (Koneman y Roberts, 1987).

Para verificar la actividad quitinolítica correspondiente a la depolimerización de Chitin Azure las placas se incubaron por 3 semanas a temperatura ambiente en un recipiente hermético con papel de filtro humedecido (cámara húmeda) de manera de evitar la deshidratación del medio de cultivo. Cuando ChitinAzure es depolimerizado se observan zonas claras alrededor de la colonia (Howard *et al.*, 2003). En todas las pruebas, la actividad se expresó semicuantitativamente midiendo el halo de degradación alrededor de la colonia y relacionándolo con su tamaño: radio de la colonia + radio del halo/ radio de la colonia.

Se realizaron tres replicas para cada especie y un control a pH 6.0. Cada placa se inoculó en su centro con un disco de 6 mm de diámetro conteniendo micelio en crecimiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como resultado de los muestreos de mayo y septiembre de 2009 se aislaron e identificaron un total de 32 taxa fúngicos. En

el primer muestreo (mayo) se aislaron 15 especies a partir de hojas enteras y 13 a partir de partículas lavadas, en el segundo muestreo se recuperaron 20 a partir de hojas enteras y 18 a partir de partículas lavadas (Tabla 1). *Alternaria alternariae* (Cooke)

Woudenberg & Crous, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G. A. de Vries, *Clonostachys rosea* (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams y *Epicoccum nigrum* Link, fueron aisladas a partir del material del primer muestreo empleando ambos sistemas de cul-

**Tabla 1.** Frecuencias porcentuales de las especies fúngicas aisladas a partir de hojas enteras y de partículas lavadas en dos muestreos y su contribución al índice de diversidad (H) Shannon-Weavner, riqueza específica (S) y equitabilidad (J').

Muestreo de mayo			
LPSC	HOJAS ENTERAS Especies	Frecuencia (%)	Contribución al H ( $-\pi \log^2 \pi$ )
sn	<i>Alternaria alternariae</i> (Cooke) Woudenberg & Crous	22.22	0.334
995	<i>Bipolaris cynodontis</i> (Marignoni) Shoemaker	10.13	0.231
1000	<i>Bipolaris sorokiniana</i> (Sacc.) Shoemaker	7.18	0.189
953	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	13.39	0.269
949	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	5.55	0.160
930	<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	0.32	0.018
sn	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove	6.86	0.183
940	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	11.43	0.248
sn	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	2.61	0.095
sn	<i>Myrothecium cinctum</i> (Corda) Sacc.	0.65	0.032
971	<i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds	1.30	0.056
sn	<i>Penicillium</i> sp.	0.32	0.018
943	<i>Periconia minutissima</i> Corda	11.43	0.248
sn	<i>Tetraplophaeria tetraploa</i> (Scheuer) Kaz. Tanaka & K. Hiray	0.98	0.045
946	<i>Volutella ciliata</i> (Alb. & Schwein.) Fr.	5.55	0.160
S= 15 J'= 0.84 H'= 2.29			
LPSC	PARTÍCULAS Especies	Frecuencia (%)	Contribución al H ( $-\pi \log^2 \pi$ )
sn	<i>Acremonium</i> sp.	7.14	0.188
sn	<i>Alternaria alternariae</i> (Cooke) Woudenberg & Crous	9.18	0.219
sn	<i>Aspergillus clavatus</i> Desm.	1.02	0.046
994	<i>Aspergillus terreus</i> Thom	4.08	0.130
953	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	20.40	0.324
930	<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	2.04	0.079
940	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	1.02	0.046
sn	<i>Setosphaeria rostrata</i> K.J. Leonard	11.22	0.245
961	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt	29.59	0.360
936	<i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman	3.06	0.106
sn	<i>Rhodotorula</i> sp.	2.04	0.079
sn	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	3.06	0.106
sn	<i>Trichoderma koningii</i> Oudem	6.12	0.171
S= 13 J'= 0.82 H'= 2.105			

**Tabla 1 (cont.).** Frecuencias porcentuales de las especies fúngicas aisladas a partir de hojas enteras y de partículas lavadas en dos muestreos y su contribución al índice de diversidad (H) Shannon-Weavner, riqueza específica (S) y equitabilidad (J').

Muestreo de septiembre			
LPSC	HOJAS ENTERAS Especies	Frecuencia (%)	Contribución al H (-pi log <sup>2</sup> pi)
sn	<i>Alternaria alternariae</i> (Cooke) Woudenberg & Crous	28.16	0.356
sn	<i>Apiospora montagnei</i> Sacc.	0.57	0.029
sn	<i>Arthrotrichum superba</i> Corda	4.02	0.129
953	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	10.34	0.234
949	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	4.59	0.141
sn	<i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove	4.59	0.141
975	<i>Curvularia protuberata</i> R.R. Nelson & Hodges	9.19	0.219
999	<i>Setosphaeria rostrata</i> K.J. Leonard	9.77	0.227
932	<i>Curvularia ravenelii</i> (M.A. Curtis ex Berk.) Manamgoda, L. Cai & K.D. Hyde	0.57	0.029
940	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	10.91	0.241
936	<i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman	3.44	0.116
sn	<i>Fusarium</i> sp1	0.57	0.029
sn	<i>Fusarium sulphureum</i> Schldt.	0.57	0.029
993	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	1.14	0.051
sn	<i>Rhizopusstolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.,	6.32	0.174
sn	<i>Myrothecium cinctum</i> (Corda) Sacc.	1.14	0.051
sn	Myxomycete <i>Licea</i> sp.	1.14	0.051
sn	<i>Periconia atra</i> Corda	1.14	0.051
sn	<i>Tetraplophaeria tetraploa</i> (Scheuer) Kaz. Tanaka & K. Hiray.	1.14	0.051
946	<i>Volutella ciliata</i> (Alb. & Schwein.) Fr.	0.57	0.029
S=20 J'= 0.79 H'= 2.38			
LPSC	PARTÍCULAS Especies	Frecuencia (%)	Contribución al H (-pi log <sup>2</sup> pi)
sn	<i>Alternaria alternariae</i> (Cooke) Woudenberg & Crous	8.98	0.216
sn	<i>Apiospora montagnei</i> Sacc.	1.79	0.072
953	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	1.19	0.052
949	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link	6.58	0.179
930	<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	0.59	0.030
940	<i>Epicoccum nigrum</i> Link	1.79	0.072
961	<i>Fusarium oxysporum</i> Schldt.	40.11	0.366
936	<i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman	1.79	0.072
993	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Metschn.) Sorokin	4.79	0.145
989	Micelio estéril	2.39	0.089
979	<i>Khuskia oryzae</i> H.J. Huds.	4.79	0.145
983	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson	0.59	0.030
sn	<i>Penicillium</i> sp.	0.59	0.030
sn	<i>Rhodotorula</i> sp.	1.19	0.052
339	<i>Sporormia fimetaria</i> (Rabenh.) De Not.	8.98	0.216
sn	<i>Sporormia</i> sp.	10.17	0.232
sn	<i>Trichoderma hamatum</i> (Bonord.) Bainier	1.79	0.072
sn	<i>Trichoderma koningii</i> Oudem.	1.79	0.072
S=18 J'= 0.74 H'= 2.15			

tivo, mientras que *Alternaria alternariae* (Cooke) Woudenberg & Crous, *Apiospora montagnei* Sacc., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G. A. de Vries, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Epicoccum nigrum* Link, *Haematonectria haematococca* (Berk. & Broome) Samuels & Rossman, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokín se aislaron a partir de ambos métodos de cultivo en septiembre. A base de la información obtenida por Eliádes *et al.* (2007) en hojas de *D. spicata* de suelos salinos de Magdalena, Buenos Aires, 8 nuevos registros se adicionaron a esta área de estudio (*Bipolaris sorokiniana* Sacc. Shoemaker, *Colletotrichum dematium* (Pers.) Grove, *Aspergillus clavatus* Desm., *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier, *Trichoderma koningii* Oudem, *Apiospora montagnei* Sacc, *Arthrobotrys superba* Corda, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. Aunque especies como *C. cladosporioides*, *C. herbarum*, *C. rosea*, *F. oxysporum*, *H. haematococca*, *Purpureocillium lavendulum* fueron encontrados también en estos suelos alcalinos (Eliádes *et al.*; 2006), la mayoría de los hongos aislados de *D. spicata* provenientes de hojas lavadas y de partículas no coinciden con la composición de la microbiota asociada a otros tipos de suelos en la misma área de estudio (Cabello y Arambarri, 2002; Eliádes *et al.*, 2004, 2006). Esta asociación de hongos en el material foliar de *D. spicata* con representantes característicos sugiere una microbiota condicionada por este tipo de sustrato colectado sobre un suelo salino de pH 10. En este sentido, este material foliar puede ser una fuente/reservorio clave de hongos fisiológicamente tolerantes y/o activos a pH alcalino en comparación con aislamientos de áreas con suelos neutros o ácidos. Fenice *et al.* (1997) sugiere que el crecimiento y actividad de los hongos y sus enzimas está estrechamente relacionado con la composición físico-química del hábitat, lo cual tiene significado adaptativo y ecológico.

De las especies probadas en medio líquido, *P. minutissima* y *S. fimetaria* mostraron actividad  $\alpha$ -ramnosidasa y *B. cynodontis*, *C. herbarum*, *C. protuberata*, *K. oryzae*, *P. mi-*

*nutissima*, mostraron actividad  $\beta$ -glucosidasa (Tabla 2). Eliádes *et al.* (2011) reportaron previamente altos niveles de enzimas con actividad de  $\alpha$ -ramnosidasa y  $\beta$ -glucosidasa en cultivos líquidos equivalentes de aislamientos de *Acrostalagmus luteo-albus*, *Acremonium murorum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Clonostachys rosea*, *Microphaeropsis olivacea*, *Sporormia fimetaria*, *Stachybotrys chartarum* y *Paecilomyces lilacinus* obtenidos a partir de suelos salino/sódico. Resultados similares obtuvo Rojas (2004) con *Acrostalagmus luteo-albus*, especie aislada a partir de suelos alcalinos de Magdalena, Buenos Aires. Sin embargo las especies probadas en la presente contribución no han sido citadas como productoras de estas enzimas previamente.

En medio sólido 4 especies (*E. nigrum*, *K. oryzae*, *P. minutissima*, *S. fimetaria*) mostraron actividad celulolítica alcalina. Saparrat *et al* (2008) determinaron actividad celulolítica moderada en *Periconia byssoides*.

Ocho especies mostraron actividad proteolítica (Tabla 2). Meenakshi (2004) determinó que de 27 especies fúngicas probadas en su capacidad de producir proteasas en placa a pH 9.4, 14 mostraron actividad positiva. Hankin y Anagnostakis (1975) señaló que las especies de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Mucor* produjeron proteasas en ensayos en placa a pH 6.0. Seis especies mostraron capacidad para degradar almidón, Saleem *et al.* (2014) demostraron la capacidad de diferentes especies fúngicas para producir amilasas a pH 6.0 detectando actividad moderada en una especie de *Cladosporium*. *Cladosporium herbarum* sin embargo en el presente trabajo no evidenció actividad a pH alcalino. Entre las especies probadas *B. sorokiniana* fue la única especie que presentó actividad quitinolítica bajo las condiciones del ensayo. La habilidad de este aislamiento para sintetizar quitinasas a pH alcalino, no reportado previamente, abre un interrogante a su posible rol como hongo entomopatógeno y potencial aplicación en el control de insectos asociados a ambientes alcalinos. Seidl (2008) señaló que especies como *Stachybotrys elegans* y *Metarhizium anisopliae* expresan quitinasas especí-

**Tabla 2.** Actividad enzimática extracelular de aislamientos fúngicos seleccionados bajo condiciones alcalinas de cultivo (pH 9.0).

Aislamiento LPSC <sup>a</sup>	Medio líquido		Medio sólido			
	$\beta$ -glucosidasa <sup>b</sup>	$\alpha$ -glucosidasa <sup>b</sup>	Celulolítica <sup>c</sup>	Proteolítica <sup>c</sup>	Amilolítica <sup>c</sup>	Quitinololítica <sup>c</sup>
<i>B. cynodontis</i> (995)	+	-	0	1,4 ( $\pm 0.13$ )	1,42 ( $\pm 0.11$ )	n
<i>B. sorokiniana</i> (1000)	n	n	0	2,13 ( $\pm 0.17$ )	0	2,23 ( $\pm 0.11$ )
<i>C. herbarum</i> (949)	++	-	0	0	0	n
<i>C. protuberata</i> (975)	+	-	0	1,26 ( $\pm 0.08$ )	0	0
<i>S. rostrata</i> (999)	-	-	0	n	0	n
<i>E. nigrum</i> (940)	-	-	1,23 ( $\pm 0.21$ )	1,18 ( $\pm 0.10$ )	1,5 ( $\pm 0.18$ )	0
<i>K. oryzae</i> (979)	++	-	1,35 ( $\pm 0.11$ )	1,35 ( $\pm 0.13$ )	1,82 ( $\pm 0.11$ )	0
<i>P. minutissima</i> (943)	++++	+	1,13 ( $\pm 0.18$ )	1,24 ( $\pm 0.15$ )	1,18 ( $\pm 0.16$ )	0
<i>S. fimetaria</i> (339)	-	+	1,33 ( $\pm 0.09$ )	1,32 ( $\pm 0.16$ )	1,26 ( $\pm 0.18$ )	n
<i>Sporormia</i> sp.	-	-	0	1,13 ( $\pm 0.07$ )	1,32 ( $\pm 0.08$ )	n

(<sup>a</sup>) Colección de cultivos del Instituto Spegazzini (LPSC).

(<sup>b</sup>) Siguiendo la escala relativa de Eliades *et al.* (2011).

(<sup>c</sup>) Relación halo/diámetro.

(n) No probada.

ficas donde la quitina fue suplementada en el medio de cultivo.

Todos los aislamientos excepto *Cladosporium herbarum* y *Setosphaeria rostrata*, presentaron actividad proteolítica a pH alcalino siendo *Bipolaris sorokiniana* la especie que mayor actividad proteolítica mostró (Tabla 2). No se detectaron diferencias en la habilidad de los aislamientos probados para producir las actividades enzimáticas ensayadas bajo cultivo a pH 6.0 y 9.0 (datos nos mostrados). En concordancia con los reportes de Eliades (2009), estos resultados sustentan el carácter halotolerante de estas especies con capacidades hidrolíticas, y el rol de estos microorganismos en la degradación de materiales orgánicos (como material vegetal de *D. spicata*) pelo y estiércol vacuno, entre otros). La degradación de restos vegetales tales como hojarasca de *Celtis tala* (tala) y *Scutia buxifolia* (coronillo) de la misma zona de muestreo fue reportada por Saparrat *et al.* (2008, 2010). Estos resultados, aunque preli-

minares, sustentan la existencia de hongos de hojarasca con sistemas enzimáticos adaptados a condiciones de salinidad/alcalinidad.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte del proyecto 11/N651 UNLP, se realizó con el apoyo financiero de la CIC, CONICET PIP 112 201101 0039, PIP 112 201101 00391, FONC y TPICT 501 2012.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Cabello M. N., Arambarri A. 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires province (Argentina). *Microbiological Research* 157: 115-125.
- Eliades L. A. 2009. Estudio de la micobiota alcalofílica y alcalino-tolerante del suelo de los bosques de *Celtis tala* Gill (ex Planch) y *Scutia buxifolia* Reiss en el Partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y

- Museo. UNLP. 192 pp
- Eliades L. A., Bucinszky A., Cabello M. 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.
- Eliades L. A., Cabello M., Voget C. 2006. Soil-microfungi diversity in *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in eastern Buenos Aires Province (Argentina). *Journal of Agricultural Technology* 2: 229-249.
- Eliades L. A., Voget C., Arambarri A., Cabello M. 2007. Fungal Communities on decaying saltgrass (*Distichlis spicata*) in Buenos Aires province (Argentina). *Sydowia* 59 (2): 227-234.
- Eliades L. A., Rojas N., Cabello M., Voget C., Saparrat M. 2011.  $\alpha$ -L-Rhamnosidase and  $\beta$ -D-glucosidase activities in fungal strains isolated from alkaline soils and their potential in naringin hydrolysis. *Journal of Basic Microbiology* 51 (6): 659-665.
- FAO Unesco. 1968. Definitions of soil units for the soil map for the World. Report N° 33 Roma, 108 pp.
- Fenice M., Selbmann L., Zucconi L., Onofri S. 1997. Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains. *Polar Biology* 17: 275-280.
- Godeas A. M. 1983. Estudios cuali-cuantitativos de los hongos del suelo de *Nothofagus dombeyi*. *Ciencia del suelo* 1: 21-31.
- Hankin L., Anagnostakis S. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia* 67: 597-607.
- Hansen D. J., Dayanandan P., Kaufman P., Brotherson J. 1976. Ecological adaptation of saltmarsh grass and environmental factors affecting its growth and distribution. *American Journal of Botany* 63: 635-650.
- Howard M., Ekborg N., Taylor L., Weiner Hutcheson R. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 30: 627-635.
- Koneman E., Roberts G. 1987. *Micología. Práctica de laboratorio*. Editorial Médica Panamericana S.A. Bs. As. ed. tercera. Pp 351.
- Magurran A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Croom Helm, London.
- Marano A. V., Saparrat M., Steciow M., Cabello M., Gleason F., Pires-Zottarelli C., de Souza J., Barrera M. 2013. Comparative analysis of leaf-litter decomposition from the native *Pouteria salicifolia* and the exotic invasive *Ligustrum lucidum* in a lowland stream (Buenos Aires, Argentina). *Fundamental and Applied Limnology* 183/4: 297-307.
- Meenakshi V. R. 2004. Biodiversity and germoplasm collection of alkalophilic fungi and actinomycetes for biotechnology application. Project Completion Report. National Chemical Laboratory. Pune pp 421.
- Rojas N. L. 2004. Hongos alcalofílicos como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico. Tesina de la Licenciatura en Biotecnología. Universidad Nacional de Quilmes.
- Saleem A., Mohsen K. H., Ebrahim H. 2014. Production of amylase by fungi isolated from legume seeds collected in Almadinah Almunawwarah. *Journal of Taibah University for Science* 8: 90-97.
- Sánchez R. O., Ferrer J., Duymovich O., Hurtado M. 1976. Estudio pedológico integral de los Partidos de Magdalena y Brandsen (Provincia de Buenos Aires). In: *Anales del LEMIT, serie II N° 310*. Ministerio de Obras Públicas de la provincia de Buenos Aires, Argentina, 1-123.
- Saparrat M. C. N., Rocca M., Aulicino M., Arambarri A., Balatti P. 2008. *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and the lignocellulolytic enzyme activity. *European Journal of Soil Biology* 44: 400-407.
- Saparrat M. C. N., Estevez J., Troncozo M., Arambarri A., Balatti P. 2010. In-vitro depolymerization of *Scutia buxifolia* leaf-litter by a dominant Ascomycota *Ciliochorella* sp. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64: 262-266.
- Seidl V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36- 42.
- Somlo R., Durañona C., Ortiz R. 1985. Valor nutritivo de especies forrajeras patagónicas. *Revista Argentina de Producción Animal* 25: 590-601.
- Torzilli A. P., Sikaroodi M., Chalkley D., Gillevet P. 2006. A comparison of fungal communities from four salt marsh plants using automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA). *Mycologia* 98: 690-698.
- Ungar I. 1974. Inland halophytes of the United States. In: *Ecology of Halophytes* (eds. Reimold R. J., Queen W. H.), Academic Press, Inc., New York: 235-305.