

## COMPARACIÓN DE CONDICIONES DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO Y RECUENTO SIMULTÁNEO DE LEVADURAS DE SUELOS DE BOSQUES NATIVOS DE *NOTHOFAGUS* SPP. (FAGACEAE) DE LA PATAGONIA ARGENTINA

MARÍA CECILIA MESTRE<sup>1</sup>, DIEGO LIBKIND<sup>1</sup> y SONIA FONTENLA<sup>1</sup>

**Summary:** Comparison of culture conditions for isolation and count of soil yeasts from *Nothofagus* spp. (Fagaceae) native forest of Argentinean Patagonia. This research proposes the use of culture medium added with 25 µg/mL of Rose Bengal and 200 µg/mL of Chloramphenicol. Under these culture conditions the yeast counts were about 10<sup>3</sup> CFU/g of soil (approximately 4% of detected microflora). Isolation with and without a previous enrichment step was compared. Isolated yeasts were classified into 7 groups based on morphological and physiological characteristics. 10 different banding patterns were observed using MSP-PCR technique, which indicate the presences of at least 10 species. Different banding pattern was observed between cultures with and without enrichment, this revealed the need of using both isolation techniques in a complementary way to recover strains inhibited or underestimated by direct non-enrichment methods.

**Key words:** yeast, soil, forest, *Nothofagus*, culture media, isolation medium.

**Resumen:** Se compararon las condiciones de cultivo para aislar y contar levaduras del suelo de los bosques nativos de *Nothofagus* spp. en la Patagonia de Argentina. En este trabajo se propone la utilización de medios de cultivo adicionados con Rosa de Bengala 25 µg/mL y 200 µg/mL de Cloranfenicol. En estas condiciones se obtuvieron recuentos de levaduras que rondan 10<sup>3</sup> UFC/g de suelo (aproximadamente 4% de la flora microbiana detectada). Se compararon los resultados de aislamientos por el método *enriquecimiento-remoción* utilizando las condiciones sin-enriquecimiento y con-enriquecimiento. Las levaduras aisladas fueron clasificadas en 7 grupos por características morfológicas y fisiológicas. Utilizando la técnica de MSP-PCR se obtuvieron 10 perfiles de bandas diferentes, que indicarían la presencia de al menos 10 especies en el suelo. La obtención de perfiles de bandas diferentes en los ensayos sin-enriquecimiento y con-enriquecimiento revelan la necesidad de utilizar estas dos formas de cultivo de manera complementaria para la recuperación de otras cepas, inhibidas o subestimadas por el cultivo directo sin-enriquecimiento.

**Palabras clave:** levaduras, suelo, bosque, *Nothofagus*, medios de cultivo medios de aislamiento

### INTRODUCCIÓN

A lo largo de la Cordillera de Los Andes y situados en la porción más occidental de la Región Andino-Patagónica se encuentran los bosques

Andino-patagónicos. Muchos de ellos están dominados por especies del género *Nothofagus* (Cabrera, 1976). Los bosques Andino-patagónicos se caracterizan por el bajo impacto antrópico, una mínima contaminación atmosférica (Perakis & Hedin, 2002; Perez *et al.*, 2003) y suelos de origen volcánico poco desarrollados (Satti *et al.*, 2007) con alta capacidad para almacenar agua, amortiguar cambios de pH y baja disponibilidad de P (Diehl *et al.*, 2003).

1: Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología, INIBIOMA: Universidad Nacional del Comahue – CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, República Argentina), Bariloche, Río Negro, Argentina.

Los suelos constituyen un importante reservorio de diversidad biológica y metabólica; siendo un hábitat favorable para la proliferación de distintos grupos de microorganismos, como virus, bacterias, actino-micetes, hongos, algas y protozoos (Moreira & Siquiera, 2006) Las bacterias representan, en general, el mayor número, y los hongos, el mayor porcentaje de la biomasa microbiana de los suelos. Las bacterias y hongos filamentosos son los integrantes de la comunidad del suelo más estudiados *per se* y en cuanto a su relación con otros microorganismos. En particular los suelos de bosques suelen ser considerados “puntos calientes” de diversidad, con una gran riqueza de especies, representando ambientes estables (Slavikova & Vadkertiova, 2000).

Las levaduras son hongos de los Phyla Ascomycota o Basidiomycota, con un ciclo de vida predominantemente unicelular, capaces de reproducirse vegetativamente por fisión o gemación, y cuyas estructuras reproductivas no se encuentran incluidas en cuerpos fructíferos (Spencer & Spencer, 1997; Kurtzman & Fell, 1998). Las levaduras son un grupo frecuente en el suelo, aunque en menor número que las bacterias y otros hongos. Se distribuyen en forma desigual tanto en número como en composición de especies con valores que oscilan entre 1 y  $10^6$  células viables por gramo de suelo (Botha, 2006). Los métodos para el recuento y aislamiento simultáneo de levaduras son laboriosos, ya que la presencia de otros microorganismos puede inhibir y/o enmascarar el crecimiento de las levaduras en el medio de cultivo. Esto es particularmente importante en el caso de los hongos filamentosos que por tener un crecimiento rápido cubren la superficie de las placas de cultivo, haciendo difícil tanto el recuento como el aislamiento de levaduras. La utilización de compuestos antifúngicos, muchas veces imprescindibles, está condicionada al efecto de estos compuestos sobre las levaduras, ya que por ser hongos pueden ser susceptibles a los mismos componentes (Phaff & Stamer, 1987). Por otra parte la presencia de bacterias puede ser un factor de incertidumbre en el recuento dado que algunas colonias de levaduras y bacterias presentan morfologías similares.

En líneas generales son pocos los trabajos ten-

dientes a estudiar la diversidad de levaduras en suelos como objetivo central. En la Argentina, se aislaron levaduras en suelos de zonas desérticas en la provincia de San Juan (Toro *et al.*, 2005) y a partir de suelo rizosférico y raíces de maíz en la provincia de Buenos Aires (Fraccia *et al.*, 2003). Sin embargo, estos estudios sobre levaduras en suelo apuntan más a la identificación de las levaduras que al número presente. Libkind *et al.* (2004), estudiaron levaduras pigmentadas de suelos de bosques de *Austrocedrus chilensis* en el Parque Nacional Nahuel Huapi. En dicho trabajo se utilizaron métodos directos de aislamiento en los que se obtuvo un número reducido de aislamientos y no se realizaron recuentos. Es poco lo que se conoce de la abundancia y diversidad microbológica de los suelos de los bosques Andino-patagónicos, en particular de las poblaciones de levaduras.

En este contexto se plantean como objetivos de este trabajo formular un medio de cultivo para cuantificar y aislar en forma eficiente y rápida levaduras en suelos de bosques Andino-patagónicos, de forma tal que permita conocer la abundancia y diversidad de levaduras en suelos de bosques nativos de *Nothofagus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Sitio de muestreo y toma de muestras*

Para realizar este trabajo se utilizó suelo de 2 procedencias diferentes: el Cerro Otto (San Carlos de Bariloche, Provincia de Río Negro, Argentina), con un bosque dominado por la especie *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser, conocida comúnmente como Lengua, y la zona de Pampa de Trompul (San Martín de los Andes, Neuquén, Argentina), cuyo bosque está dominado por individuos de la especie *Nothofagus antarctica* (G. Forster) Oerst, conocida comúnmente como Ñire.

Se tomaron 3 sub-muestras de suelo por cada árbol del género *Nothofagus*, sobre un total de 6 árboles por sitio, para conformar una muestra conjunta por árbol. Cada sub-muestra se colectó a una distancia de 60 cm del tronco y equidistantes

entre si. Para ello se utilizó un sacabocado de 10 cm de diámetro, tomando los primeros 40 cm de profundidad, previa remoción de la hojarasca y capa superficial (primeros 2 cm). En cada toma de suelo, el sacabocado fue desinfectado con alcohol etílico y calor.

Las muestras fueron transportadas en bolsas plásticas individuales y conservadas a 4° C hasta su procesamiento en el término de 10 días. Cada una de las muestras fue tamizada a través de una malla de 2 mm, recogiendo así la fracción tamizada de suelo, sin raíces u otros componentes particulados.

### **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo poseen la siguiente formulación: MYP agar (% p/v): extracto de malta 0,7; extracto de levadura 0,05; peptona de soja 0,25; agar 1,5; pH = 4,5; MYP líquido con la misma composición y pH, sin agar. YM agar (% p/v): extracto de malta 0,3; extracto de levadura 0,3; peptona de soja 0,5; glucosa 1; agar 1,5; pH = 4,5. MEA (% p/v): extracto de malta 2; agar 1,5; pH = 4,5. Agar Mosto (AM, Merk®; % p/v): extracto de malta 1,5; peptona 0,075; maltosa 1,275; dextrosa 0,275; glicerina 0,235; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,04; CINH<sub>4</sub> 0,1; agar 2 (Yarrow, 1998). Se adicionaron en los distintos ensayos distintas combinaciones y concentraciones de antimicrobianos. Como antibióticos de uso frecuente se usaron cloranfenicol (Clo; Anedra®), estreptomycin (Str; Richet®) y/o ampicilina (Amp; Sigma®) (Yarrow, 1998), y como fungistáticos Rosa de Bengala (RB, Cicarelli®) y Benomil (Ben; Fungicap®) (King *et al.*, 1979).

### **Ensayos cualitativos**

En éste ensayo se utilizaron YM o MYP, y se probaron diversas combinaciones de antimicrobianos a fin de seleccionar las condiciones necesarias para realizar el recuento y aislamientos de levaduras en forma simultánea. Los tratamientos sin fungistáticos tenían Clo 0,1 y 0,4 µg/mL sólo o en conjunto con Amp 0,1 µg/mL. Los tratamientos con fungistáticos presentaban Cl 0,1 y 0,4 µg/mL sólo o en conjunto con RB 25 µg/mL o YM agar con

Clo 0,4 µg/mL sólo o conjunto con Str 0,2 µg/mL. Se probó Ben en distintas concentraciones: 0,1, 0,15 y 0,20 µg/mL.

Se realizaron diluciones decimales del suelo proveniente de Cerro Otto en solución fisiológica (NaCl 0,9%), con inóculo de 1 gr de suelo y diluciones partir de 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-3</sup>. Las mismas se agitaron a 250 rpm por 30 min para liberar los microorganismos de las partículas de suelo. En todos los casos se sembraron por agotamiento en superficie 100 µL de la suspensión del suelo en placas de Petri conteniendo medio sólido, que se incubaron 72 hs a 20° C y hasta 120 hs a 4° C. A las 72 hs de cultivo se realizó el recuento aproximado de unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo, utilizando microscopio estereoscópico Olympus SZX9.

### **Ensayos de recuento**

Se suspendieron 4 g de suelo de Cerro Otto, en solución fisiológica (NaCl 0,9%) alcanzando una concentración final de 1:25 (p/v). La misma se agitó a 250 rpm por 30 min para liberar los microorganismos de las partículas de suelo. Se sembraron por agotamiento en superficie 100 µL de la suspensión del suelo, en placas de Petri conteniendo medio sólido (YM, MEA, MYP o AM), por triplicado. Se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) por placa, utilizando microscopio estereoscópico Olympus SZX9, a las 72 hs de incubación a 20° C. Las placas de recuento contenían Clo 200 µg/mL y/o Str 100 µg/mL. Los fungistáticos utilizados fueron 25 µg/mL de RB o 100 µg/mL de Ben. Los resultados se registraron como UFC/g de suelo para cada medio de cultivo, que se presentaron como valores porcentuales promedio respecto del total de microorganismos.

### **Ensayo de enriquecimiento-remoción**

Se inocularon 4 g de suelo de Pampa del Trompul, en caldo MYP con Str 100µg/mL alcanzando una concentración final de 1:25 (p/v), que se incubó durante 72 hs a temperatura ambiente en agitador a 200 rpm. Se centrifugó a baja

velocidad por 10 min a fin de facilitar la remoción de los hongos filamentosos en el precipitado y se recuperó el sobrenadante (= con-enriquecimiento). Se utilizó como control del ensayo, la misma dilución de suelo en solución fisiológica sin-enriquecimiento. A partir de ambas suspensiones, con-enriquecimiento y sin-enriquecimiento, se sembró una alícuota de 100  $\mu$ L en placas de Petri conteniendo medio MYP agar con Clo 200  $\mu$ g/mL, con o sin RB 25  $\mu$ g/mL, por triplicado. Se incubaron 72 hs a 20° C y hasta 120 hs a 4° C. En estas placas se realizó el recuento de UFC a las 72hs de cultivo y los resultados se registraron como UFC/g de suelo.

Se picaron 3 colonias de levaduras de cada morfotipo observado en ambas condiciones. Se realizó el aislamiento y purificación de dichas colonias en medio MYP agar sin agregado de antibiótico, ni antifúngico. Se registraron las características macro y micromorfológicas (color, aspecto, textura, tipo de crecimiento y morfología celular) utilizando una microscopio óptico Olympus BX40 y la producción de compuestos amiláceos (PCA, Yarrow, 1998) de todos los aislamientos, con las que se conformaron grupos preliminares según similitud. Todos los aislamientos se criopreservaron en caldo MYP con 12% glicerina a -20° y los representantes de los grupos se depositaron en la colección de cultivos de levaduras del Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Argentina.

#### PCR *fingerprinting*.

A fin de estudiar la posible existencia de diferencias entre las poblaciones de levaduras obtenidas con o sin enriquecimiento (condiciones del ensayo de enriquecimiento-remoción y su control) se seleccionaron 16 aislamientos del total, representantes de los diferentes grupos preliminares (entre 2 y 4 por grupo, si era posible y en correspondencia con el número de aislamientos por grupo) (Tabla 3). Sobre estos 16 aislamientos se estudió el patrón de “huellas moleculares” del ADN por el método de “Mini/Microsatellite primed PCR”(MSP-PCR), con los iniciadores (GTG)<sub>5</sub> y M13 por separado, según Libkind *et al.* (2003) y Libkind (2007). La visualización se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE 0,5 X. El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio (5  $\mu$ g/mL) y el patrón de bandas se

registró con un sistema de captura de imágenes Vilber Lourmat.

## RESULTADOS

### *Ensayos cualitativos y de recuento (cuantitativo)*

Para la formulación de los medios de cultivo, se realizaron ensayos cualitativos sobre suelo del Cerro Otto, correspondiente al bosque de “lenga” (*Nothofagus pumilio*). En estos ensayos sin fungistáticos se observó que el recuento de microorganismos totales del suelo estudiado rondan entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> UFC/g de suelo. En estas placas se observó un desarrollo fúngico elevado, con micelio denso y de rápido crecimiento que dificultó la individualización de los otros grupos de microorganismos, que crecieron por debajo del micelio, y el aislamiento de levaduras. En general la morfología de las colonias de bacterias y levaduras fue similar (blancas a beige, cremosas, de borde liso o mucoso) resultando difícil distinguir entre ambos grupos en una observación directa a las 72 hs de cultivo a 20° C.

Al incluir Rosa de Bengala en los medios de cultivo se observó la reducción del tamaño de las colonias de hongos filamentosos y de la formación de micelio aéreo. Los recuentos de microorganismos totales, tras 72 hs de cultivo a 20° C, alcanzaron valores de 10<sup>5</sup> UFC/g de suelo. A las 120 hs de cultivo mejoró el reconocimiento diferencial entre bacterias y levaduras y los hongos filamentosos permanecen relativamente inhibidos con un crecimiento limitado, siendo los recuentos de levaduras entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>4</sup> UFC/g de suelo, según la concentración de antibiótico.

Al utilizar Benomil en bajas concentraciones (0,1  $\mu$ g/mL) se observó un número menor de hongos filamentosos que en presencia de Rosa de Bengala, pero las colonias presentaron mayor diámetro y micelio más denso. Tras 120 hs de cultivo, luego del cambio de temperatura de incubación, las colonias no filamentosas quedan cubiertas por el denso micelio. El recuento promedio de microorganismos totales en suelo fue de 10<sup>4</sup> UFC/g de suelo, inferior que en los cultivos con Rosa de Bengala (10<sup>5</sup> UFC/g de

suelo). La concentración de antibióticos (0,4 µg/mL) en este medio, al igual que cuando se usó Rosa de Bengala, fue insuficiente para controlar el crecimiento bacteriano, dificultando el reconocimiento diferencial de levaduras y bacterias. El recuento aproximado de levaduras fue de  $10^2$  UFC/gr de suelo.

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos cualitativos, permiten establecer las bases para realizar los ensayos cuantitativos sobre suelo de Cerro Otto. En los ensayos de recuento la utilización de concentraciones mayores (unas 1000 veces) de antibióticos que en el ensayo cualitativo preliminar, fue efectiva para controlar el crecimiento de bacterias y facilitar el aislamiento de levaduras y su posterior purificación. En general se obtuvo una mejor inhibición del crecimiento bacteriano cuando se usó Cloranfenicol (Tabla 1). En las placas con Rosa de Bengala se pudo realizar el recuento y aislamiento de levaduras. La utilización de Benomil en mayor concentración (100 µg/mL) fue efectiva en el control de los hongos filamentosos, observando colonias más pequeñas. En presencia de Rosa de Bengala el recuento de hongos filamentosos fue mayor que con Benomil, ya que crecieron colonias pequeñas y diseminadas que no se solapan unas con otras permitiendo su individualización. Cuando se utilizó en forma combinada el Benomil con los antibióticos se observó inhibición del crecimiento de las levaduras, hecho no observado con Rosa de Bengala (Tabla 1).

#### **Ensayo de enriquecimiento-remoción.**

En la Tabla 2 se observan los valores de recuento de microorganismos del suelo proveniente de Pampa del Trompul, correspondientes al ensayo de enriquecimiento-remoción. El número de hongos filamentosos es de 2 órdenes de magnitud menor que el del control sin enriquecimiento, producto de la remoción por centrifugación posterior al enriquecimiento. Como resultado del tratamiento *con-enriquecimiento* las levaduras alcanzaron valores superiores en uno o dos órdenes de magnitud y se obtuvieron 18 aislamientos. En el control sin enriquecimiento los valores de levaduras fueron de  $10^2 - 10^3$  UFC/gr de suelo y fue posible obtener 20 aislamientos de levaduras. El total de los aislamientos (38) se

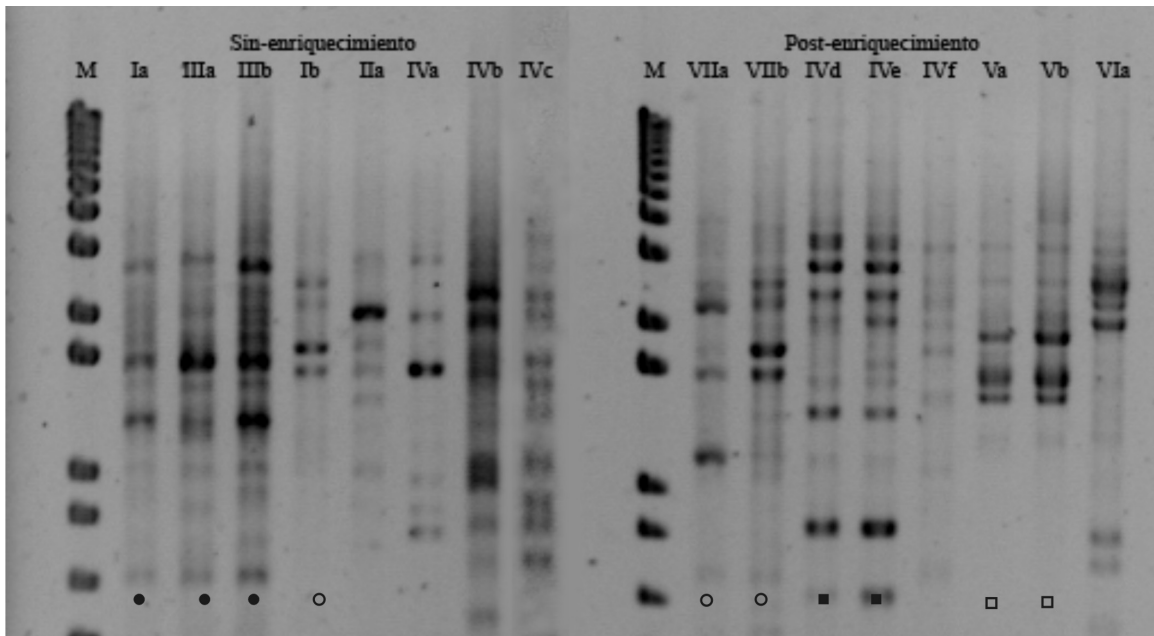
reunieron en siete grupo preliminares: tres exclusivos del cultivo sin-enriquecimiento (I a III), tres exclusivos del tratamiento *con-enriquecimiento* (V a VII) y un grupo con representantes de ambos tipos de cultivo (IV) (Tabla 3).

A partir del análisis de PCR *fingerprinting* (con el iniciador GTG5) realizado sobre los aislamientos representantes de los grupos preliminares se observaron 5 perfiles de bandas diferentes entre los provenientes del cultivo post-enriquecimiento y 6 de los aislamientos sin-enriquecimiento. Los aislamientos Ib, VIIa y VIIIb son el único caso que presenta perfiles de bandas similares entre el cultivo con y sin enriquecimiento (Fig. 1).

En la condición *sin-enriquecimiento*, solo el grupo III es homogéneo en cuanto a perfiles de banda y macro-micromorfología. Este perfil de bandas es compartido con el aislamiento Ia que pertenece al grupo I de macro-micromorfología. Los integrantes de los grupos I y IV presentan perfiles de bandas diferentes. Los grupos conformados por los aislamientos provenientes del cultivo *con-enriquecimiento* presentaron perfiles homogéneos y los representantes de un mismo grupo de macro-micromorfología coinciden en sus perfiles de bandas. El grupo IV reúne aproximadamente el 40% de los aislamientos obtenidos, incluyendo aislamientos de ambas condiciones de cultivo, y resulta heterogéneo en cuanto a los perfiles de bandas incluidos en él (Fig. 1, Tabla 3). Resultados similares se observaron utilizando el cebador M13 en experimentos de MSP-PCR (datos no mostrados).

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN**

Luego de 72 hs de cultivo a 20° C la distinción entre colonias de bacterias y de levaduras resulta difícil dado su pequeño tamaño. Ante esta dificultad una alternativa es prolongar el tiempo de incubación (hasta que el tamaño de las colonias permita diferenciarlas) y bajar la temperatura a 4C, para disminuir la velocidad de crecimiento de los hongos filamentosos. Cuando el cultivo alcanzó las 120 hs (luego del cambio de temperatura) los hongos filamentosos cubrieron completamente las placas de cultivo y esto impide realizar un recuento diferencial y exac-



**Fig. 1.:** Perfil molecular obtenidos por MSP-PCR *fingerprinting* con el cebador (GTG)5, del *Ensayo de enriquecimiento-remoción*. Aislamientos representantes de los grupos preliminares formados por macro-micromorfología y compuestos amiláceos. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder Invitrogen®. I a VII: grupos preliminares. Diferentes aislamientos pertenecientes al mismo grupo preliminar se identifican con letras correlativas. ■, □, ○ y ● marcan perfiles de bandas similares.

to de cualquiera de los grupos de microorganismos. Por ello la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias es fundamental para el recuento y aislamiento de levaduras a partir de suelo. Los medios de cultivo con Rosa de Bengala y Benomil se proponen en la bibliografía (King *et al.*, 1979) como una opción para el aislamiento y recuento de mohos de crecimiento rápido, ya que tienen la capacidad de limitar su crecimiento. En este mismo sentido, el Benomil se ha utilizado en los bosques andino-patagónicos para limitar el crecimiento de hongos filamentosos a partir de muestras naturales de madera de *Nothofagus* (Pozzi, comunicación personal). En este trabajo estos compuestos también mostraron la capacidad de restringir el crecimiento de los hongos filamentosos de las muestras de suelo, generando colonias más pequeñas. Sin embargo el uso conjunto de Benomil con antibióticos inhibió totalmente el crecimiento de levaduras y dada la carga bacteriana

de los suelos (aproximadamente  $10^4$  UFC/g) es imprescindible el uso de antibacterianos. Por otro lado, en el cultivo con Rosa de Bengala, el micelio puede ser retirado fácilmente con ansa estéril, facilitando así el recuento y el aislamiento simultáneo de levaduras, aún cuando las colonias se encuentren por debajo del micelio fúngico. Es por esto que en las condiciones de este trabajo se selecciona al Rosa de Bengala y se desestima el uso de Benomil para el aislamiento de levaduras en suelo. Un aspecto poco ventajoso a tener en cuenta al incluir Rosa de Bengala, es que este compuesto dificulta la visualización de colonias pigmentadas, ya que tiñe el medio y la mayoría de las colonias de color rosa.

En el ensayo de enriquecimiento-remoción, se observó una remoción eficaz de los hongos filamentosos por centrifugación. Al comparar los resultados de los cultivos *con-enriquecimiento* y *sin-enriquecimiento* se desprende que las diferentes condiciones

**Tabla 1:** Recuento de levaduras (UFC/g de suelo de Cerro Otto) y proporción de colonias de bacterias, levaduras y hongos filamentosos respecto del total de microorganismos del suelo (%) en el *Ensayo de Recuento*

Medio de Cultivo	Antibiótico	Fungistático	Levaduras (UFC/g)	Levaduras (%)	Bacterias (%)	Hongos Filamentosos (%)
YM		RB	1,17 x 10 <sup>3</sup>	1,56	23,58	74,86
YM	Clo	RB	3,33 x 10 <sup>2</sup>	1,02	1,79	97,19
YM	Str	RB	2,50 x 10 <sup>2</sup>	1,08	3,23	95,69
YM	Clo Str	RB	5,83 x 10 <sup>2</sup>	2,01	1,72	96,27
YM		Ben	1,67 x 10 <sup>2</sup>	0,34	74,53	25,13
YM	Clo	Ben	0	0	0	100
YM	Str	Ben	0	0	3,96	96,04
YM	Clo Str	Ben	0	0	0	100
MEA		RB	1,17 x 10 <sup>3</sup>	1,12	26,76	72,12
MEA	Clo	RB	6,67 x 10 <sup>2</sup>	1,9	0	98,1
MEA	Str	RB	7,50 x 10 <sup>2</sup>	2,22	0,74	97,04
MEA	Clo Str	RB	6,67 x 10 <sup>3</sup>	2,23	2,23	95,53
MEA		Ben	2,67 x 10 <sup>3</sup>	3,17	82,29	14,54
MEA	Clo	Ben	0	0	0	100
MEA	Str	Ben	0	0	2,06	97,94
MEA	Clo Str	Ben	0	0	0	100
MYP		RB	1,47 x 10 <sup>1</sup>	3,97	2,71	93,32
MYP	Clo	RB	1,50 x 10 <sup>1</sup>	4,59	0,41	95,01
MYP	Str	RB	7,67 x 10 <sup>0</sup>	2,37	0	97,63
MYP	Clo Str	RB	7 x 10 <sup>0</sup>	2,56	0	97,44
MYP		Ben	6 x 10 <sup>0</sup>	5,41	4,5	90,09
MYP	Clo	Ben	0	0	0	100
MYP	Str	Ben	3,33 x 10 <sup>1</sup>	0,39	0	99,61
MYP	Clo Str	Ben	0	0	0	100
AM		RB	1,23 x 10 <sup>1</sup>	3,02	1,39	95,6
AM	Clo	RB	1,57 x 10 <sup>1</sup>	3,93	0	96,07
AM	Str	RB	1,33 x 10 <sup>1</sup>	3,93	0	96,07
AM	Clo Str	RB	4,33 x 10 <sup>0</sup>	1,67	0	98,33

**Tabla 2:** Recuento de microorganismos del suelo de Pampa del Trompul (UFC/g de suelo) en el *Ensayo de enriquecimiento-remoción*.

Cultivo en medio sólido	Hongos filamentosos	Bacterias	Levaduras
<i>Con enriquecimiento</i>			
Con RB	5,00 x 10 <sup>2</sup>	MNPC *	1,41 x 10 <sup>5</sup>
Sin RB	1,50 x 10 <sup>3</sup>	MNPC	7,03 x 10 <sup>4</sup>
<i>Sin enriquecimiento</i>			
Con RB	5,32 x 10 <sup>4</sup>	8,33 x 10 <sup>1</sup>	2,17 x 10 <sup>3</sup>
Sin RB	2,72 x 10 <sup>4</sup>	8,33 x 10 <sup>1</sup>	6,67 x 10 <sup>2</sup>

Condiciones de cultivo: temperatura 20° C, 72 hs. de cultivo, medio de cultivo MYP con Cloranfenicol 200µg/mL, RB: Rosa de Bengala 25µg/mL. \*MNPC: muy numeroso para contar.

**Tabla 3:** Características de los aislamientos obtenidos a partir del *Ensayo de Enriquecimiento-Remoción* y grupos preliminares formados por macro-micromorfología y producción de compuestos amiláceos.

Condición	Grupo	Número de aislamientos	Características de las colonias	Morfología de las células	PCA
<i>Sin-enriquecimiento</i>	I	6	beige a blanca c/halo	esféricas	-
	II	1	beige brillante c/centro oscuro	oval alongada	-
	III	2	blanca opaca	esféricas	+/-
	IV *	11	beige a blanca brillante	esféricas / ovaladas	-
<i>Con-enriquecimiento</i>	IV *	5	beige a blanca brillante	esféricas / ovaladas	-
	V	7	blanca opaca	esféricas	+
	VI	4	beige filamentososa	filamentososa	-
	VII	2	beige brillante	ovalada	+/-
<b>Total</b>		<b>38</b>			

PCA: producción de compuestos amiláceos. \* Grupo IV posee representantes de ambas condiciones.

de cultivo favorecen el desarrollo de diferentes poblaciones de levaduras y excluyen otras. La utilización de uno solo de ellos para aislar levaduras, subestimaría la diversidad presente en el suelo. Las levaduras aisladas con y sin enriquecimiento fueron clasificadas en 7 grupos por su macro-micromorfología y la producción de compuestos amiláceos; y el análisis de los patrones de banda obtenidos por la técnica de MSP-PCR reveló la presencia de al menos 10 especies de levaduras. De esta forma la técnica de MSP-PCR se percibe como una forma complementaria y más potente para observar diferencias en las poblaciones de levaduras. La identificación a nivel de especie de los aislamientos, se encuentra en progreso, y permitirá ampliar los estudios de diversidad de levaduras en los suelos en estudio.

Como conclusión de este trabajo se puede afirmar que la elección del compuesto antimicrobiano a utilizar en la formulación del medio de cultivo es clave y su efectividad no puede medirse únicamente en el valor obtenido en el recuento, ya que muchas veces los efectos sobre los microorganismos también se reflejan en su aspecto y velocidad de crecimiento. Un aspecto a tener en cuenta es la factibilidad de realizar simultáneamente el recuento y el aislamiento de levaduras con relativa celeridad y practicidad. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se propone el uso de Rosa de Bengala 25 µg/mL en combinación con Cloranfenicol 200 µg/mL, para realizar recuentos y aislamientos simultáneos, si el objetivo del trabajo es estudiar la abundancia y diversidad de levaduras en suelos.

Así mismo la obtención de perfiles de bandas diferentes en los ensayos post-enriquecimiento y sin-enriquecimiento revelan la necesidad de utilizar además éstas dos formas de cultivo de manera complementaria para la recuperación de otras cepas, inhibidas o subestimadas por el cultivo directo sin-enriquecimiento. La remoción de los hongos filamentosos con centrifugación post-enriquecimiento es un método fácil y potencialmente permite recuperar aislamientos de levaduras que estén inhibidos por los fungistáticos.

En los suelos estudiados se obtuvieron recuentos de levaduras que rondan  $10^2$  -  $10^1$  UFC/g de suelo en suelo asociados a *N. pumilio* (Cerro Otto) y  $10^3$  en suelo asociados a *N. antártica* (Pampa el

Trompul). En ambos casos, las levaduras constituyen aproximadamente el 4% de la flora microbiana total detectada en estas condiciones de cultivo (MYP+Clo+RB). Estos datos constituyen la primera prospección de levaduras de suelos Andino-patagónicos.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional del Comahue (proyecto B143), y la ANPCyT (proyecto PICT04-22200, PMT – BID 1728/OC-AR). Se agradece el permiso de muestreo a la administración de Parques Nacionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- BOTHA, A., 2006. Yeast in Soil. *In: ROSA C. & P. GÁBOR* (eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeast*. pp. 221-240. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- CABRERA, A. L. 1976. Regiones fitogeográficas de la República Argentina. *In: Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería* 2 (1). pp. 1-85 Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires.
- DIEHL P., M. J. MAZZARINO, F. FUNES, S. FONTENLA, M GOBBI & J. FERRARI. 2003. Nutrient conservation strategies in native Andean-Patagonian forests. *J. Veg. Sci.* 14: 63-70.
- FRACCHIA S., A. GODEAS, J. M. SCERVINO, I. SAMPEDRO, J. A. OCAMPO & I. GARCÍA-ROMERA. 2003. Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Soil Biol. Biochem.* 35: 701-707.
- KING A.D., HOCKING A.D. & J.I. PITT. 1979. Dichloran-Rose Bengal Medium for Enumeration and Isolation of Molds from Foods. *Appl. Environm. Microbiol.* 37(5): 959-964.
- KURTZMAN, C.P. & J.W. FELL. 1998. Definition, Clasificación and Nomenclature of the Yeast. *In: KURTZMAN, CP. & JW. FELL* (eds.). *The yeast. A taxonomic study*, pp. 3-5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- LIBKIND D., A. RUFFINI & M. R. VAN-BROOCK. 2004. Levaduras teleomórficas pigmentadas de ambientes naturales de la Patagonia nor-occidental. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 39(1-2): 5-12.

- LIBKIND D., S. BRIZZIO, A. RUFFINI, M. GADANHO, M. R. VAN BROOCK & J.P. SAMPAIO. 2003. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuw. Int. J. G.* 84(4): 313-322.
- LIBKIND, D. 2007. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rodhotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Revista Argent. de Microbiol.* 39(3): 133-137.
- MOREIRA F. M. S. & J. O. SIQUIERA. 2006 Os organismos do solo. In: *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2nd ed. Lavras. pp.17-82. UFLA
- PERAKIS S. S. & L. O. HEDIN. 2002. Nitrogen loss from unpolluted South American forests mainly via dissolved organic compounds. *Nature* 415(24): 416-419.
- PEREZ C. A., J. J. ARMESTO, C. TORREALBA & M. R. CARMONA. 2003. Litterfall dynamics and nitrogen use efficiency in two evergreen temperate rainforests of southern Chile. *Austral Ecol.* 28: 591-600.
- PHAFF, H. J. & W. T. STAMER. 1987. Yeasts associated with plants, insects and soil. In: ROSE A. H. & J. S. HARRISON (eds.). *The Yeasts*. Volume 1, pp. 123-180. Academic Press, London.
- SAMPAIO J. P., M. GADANHO, S. SANTOS, F. DUARTE, C. PAIS, A. FONSECA & J. W. FELL. 2001. Polyphasic taxonomy of the genus *Rhodospidium*: *R. kratochvilovae* and related anamorphic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 687-697.
- SATTI P., M.J. MAZZARINO, L. ROSELLI & P. CREGO. 2007. Factors affecting soil P dynamics in temperate volcanic soils of southern Argentina. *Geoderma* 139: 229-240.
- SLAVIKOVÁ E., VADKERTIOVÁ R. 2000. The occurrence of yeast in Forest soils. *J. Basic Microbiol.* 40(3): 207-212.
- SPENCER JFT. & DM. SPENCER. 1997. Yeast as lining objects: Yeast Nutrition. In: SPENCER JFT. & DM. SPENCER (eds.). *Yeast in natural and artificial habitats*, pp.67-79. Springer, Berlin.
- TORO M. E., N. P. ORO, A. D. VEGA, Y. P. MATURANO, M. C. NALLY, E. FERNANDEZ, E. PUCHETA & F. VAZQUEZ. 2005. Diversidad de levaduras en canopias y suelos asociados a *Bulnesia retama* y *Larrea divaricata*. *Revista Argent. Microbiol.* 37: 209-213.
- YARROW D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, CP. & JW. FELL (eds.). *The yeast. A taxonomic study*, pp.77-100. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Recibido el 17 de noviembre de 2008, aceptado el 25 de junio de 2009.