



**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS**

**PROFESOR PATROCINANTE: DR. EDUARDO VALENZUELA F.
INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA.
FACULTAD DE CIENCIAS**

"Perfil bioquímico de cepas fúngicas rizosféricas"

**Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al Grado de
Licenciado en Ciencias Biológicas**

**VIVIANA CECILIA TORO ZÚÑIGA
VALDIVIA-CHILE**

2004

Con cariño, para mi Familia y mi hija.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dirección de Investigación y Desarrollo DID de la Universidad Austral de Chile, que permitió realizar éste trabajo. También al Profesor Dr. Eduardo Valenzuela que confió y me apoyó en realizar esta investigación, entregando todo su tiempo y paciencia, sin dejar de lado su buen sentido del humor, que tantas veces me dio ánimo en momentos que el cansancio me agobiaba, gracias por compartir su tiempo y por sus consejos que trataré de seguir.

A mis padres Teresa y Eugenio, mis hermanos Claudia, Victor y Eduardo que estuvieron a la distancia apoyándome, dándome fuerza y ánimo para continuar, durante el transcurso de mi carrera y ver realizado nuestro sueño, a mi pequeña hijita Cecilia, que me dio toda la fuerza espiritual para llegar al final. A mi mamita, tía Juana y su familia. A mi pareja Cristian que siempre estuvo conmigo, dándome su tiempo, paciencia y ayuda durante mi tesis, gracias por tu compañía y dedicación.

Como olvidar a la tía Patty, tío Ivan y Barbara que me acogieron con tanto cariño el día que llegué a la “U” y han estado acompañándome y apoyándome hasta ahora, gracias por su paciencia, cariño y regalóarme todo este tiempo. A mis amigos Nirmia, Rodrigo, Paulito, Cristóbal que siempre estuvieron dándome ánimo a la distancia, y a todos a aquellos que pusieron su confianza en mi, ahora con mucho orgullo puedo decirles que he terminado.

Al personal del Instituto de Microbiología, Sra. Mónica del Instituto de Botánica y al Oscar que me ayudaron a realizar mi trabajo.

He realizado un gran anhelo y estoy feliz a todos MUCHAS GRACIAS.

Viviana Toro Zúñiga.

INDICE

	Pág.
1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	11
2.2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. MATERIALES	13
3.1.1. Biológico.	13
3.1.2. Reactivos.	14
3.1.3. Equipos.	15
3.1.4. Otros.	15
3.2. MÉTODOS	16
3.2.1. Masificación de cepas fúngicas.	16
3.2.2. Determinación de la actividad enzimática.	17
3.2.2.1. Determinación de amilasas.	17
3.2.2.2. Determinación de celulasas.	18
3.2.2.3. Determinación de ureasas.	19
3.2.2.4. Determinación de fosfatasas ácida y alcalina.	21
3.2.2.5. Determinación de proteasas.	22
3.2.3. Análisis de datos.	23
4. RESULTADOS	25

4.1.	Perfiles enzimáticos de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>Lolium perenne</i> L. (ballica inglesa).	27
4.1.1.	Amilasas.	27
4.1.2.	Celulasas.	28
4.1.3.	Ureasas.	29
4.1.4.	Fosfatasas (ácida y alcalina).	31
4.1.4.1.	Fosfatasa ácida.	32
4.1.4.2.	Fosfatasa alcalina.	33
4.1.5.	Proteasas.	34
4.2.	Perfil enzimático de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>Trifolium repens</i> L. (trébol blanco)	35
4.2.1.	Amilasas.	35
4.2.2.	Celulasas.	36
4.2.3.	Ureasas.	37
4.2.4.	Fosfatasa (ácida y alcalina).	39
4.2.4.1.	Fosfatasa ácida.	40
4.2.4.2.	Fosfatasa alcalina.	41
4.2.5.	Proteasas.	42
4.3.	Perfil enzimático de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>Dactylis glomerata</i> L. (pasto ovillo)	43
4.3.1.	Amilasas.	43
4.3.2.	Celulasas.	45
4.3.3.	Ureasas.	46

4.3.4.	Fosfatasa (ácida y alcalina).	47
4.3.4.1.	Fosfatasa ácida.	48
4.3.4.2.	Fosfatasa alcalina.	49
4.3.5.	Proteasas.	50
5.	DISCUSIÓN	52
5.1.	Actividad amilolítica, celulolítica, ureolítica, fosfatásica (ácida y alcalina) y proteolítica de cepas fúngicas aisladas de <i>L. perenne</i> , <i>T. repens</i> y <i>D. glomerata</i> .	52
6.	CONCLUSIONES	61
7.	BIBLIOGRAFÍA	63
8.	ANEXOS	70

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Actividad amilolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>L.olium perenne</i> L. de pradera en rotación y permanente.	27
Figura 2. Actividad celulolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>L. perenne</i> de pradera en rotación y permanente.	29
Figura 3. Actividad ureolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>L. perenne</i> de pradera en rotación y permanente.	30
Figura 4. Actividad fosfatasa ácida de cepas fúngicas rizosféricas de <i>L. perenne</i> de pradera en rotación y permanente.	32
Figura 5. Actividad fosfatasa alcalina de cepas fúngicas rizosféricas de <i>L. perenne</i> de pradera en rotación y permanente.	33
Figura 6. Actividad proteolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>L. perenne</i> de pradera en rotación y permanente.	35
Figura 7. Actividad amilolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>Trifolium repens</i> L. de pradera en rotación y permanente.	36
Figura 8. Actividad celulolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>T. repens</i> de pradera en rotación y permanente.	37
Figura 9. Actividad ureolítica de cepas fúngicas rizosféricas de <i>T. repens</i> de pradera en rotación y permanente.	38
Figura 10. Actividad fosfatasa ácida de cepas fúngicas rizosféricas de <i>T. repens</i> de pradera en rotación y permanente.	40
Figura 11. Actividad fosfatasa alcalina de cepas fúngicas rizosféricas	42

de *T. repens* de pradera en rotación y permanente.

- Figura 12.** Actividad proteolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens* de pradera en rotación y permanente. 43
- Figura 13.** Actividad amilolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *Dactylis glomerata* L. de pradera en rotación y permanente. 44
- Figura 14.** Actividad celulolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente. 45
- Figura 15.** Actividad ureolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente. 46
- Figura 16.** Actividad fosfatasa ácida de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente. 48
- Figura 17.** Actividad fosfatasa alcalina de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente. 50
- Figura 18.** Actividad proteolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente. 51

TABLAS Y ANEXOS

		Pág.
Tabla 1.	Número total de cepas ensayadas y su taxa correspondiente.	25
Tabla 2.	Actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de las mejores cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>Lolium perenne</i> L.	31
Tabla 3.	Actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de las mejores cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>Trifolium repens</i> L.	39
Tabla 4.	Actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de las mejores cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>Dactylis glomerata</i> L.	47
ANEXO 1.	CURVAS DE CALIBRACIÓN	70
Gráfico 1.	Curva de calibración amilasa.	70
Gráfico 2.	Curva de calibración celulasa.	70
Gráfico 3.	Curva de calibración ureasa	71
Gráfico 4.	Curva de calibración fosfatasa ácida	71
Gráfico 5.	Curva de calibración fosfatasa alcalina	71
Gráfico 6.	Curva de calibración proteasa	72
ANEXO 2.		73
Tabla 5.	Código asignado a taxas de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i>	73
Tabla 6.	Código asignado a taxas de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>T. repens</i> .	74
Tabla 7.	Código asignado a taxas de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> .	75

ANEXO 3.		76
Tabla 8.	Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivado en pradera permanente.	76
Tabla 9.	Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivado en pradera en rotación	79
Tabla 10.	Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de <i>T. repens</i> cultivado en pradera permanente.	82
Tabla 11.	Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de <i>T. repens</i> cultivado en pradera en rotación	85
Tabla 12.	Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivado en pradera permanente.	88
Tabla 13.	Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivado en pradera en rotación.	91
ANEXO 4.		95
Cuadro 1.	Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivada en pradera en rotación.	95
Cuadro 2.	Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde	96

	la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivada en pradera permanente.	
Cuadro 3.	Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de <i>T. repens</i> cultivada en pradera en rotación.	98
Cuadro 4.	Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de <i>T. repens</i> cultivada en pradera permanente.	99
Cuadro 5.	Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivada en pradera en rotación.	101
Cuadro 6.	Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivada en pradera permanente.	106
ANEXO 5.		104
Tabla 14.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Penicillium</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivadas en pradera en rotación .	104
Tabla 15.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Absidia</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivadas en pradera en rotación .	105
Tabla 16.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Aspergillus</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivadas en pradera en rotación .	105
Tabla 17.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Penicillium</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>L. perenne</i> cultivadas en pradera permanente.	106
Tabla 18.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de	106

cepas fúngicas de *Absidia* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente.

- Tabla 19.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Acremonium* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente. 107
- Tabla 20.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Aspergillus* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente. 107
- Tabla 21.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Epicoccum* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente. 107
- Tabla 22.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera en rotación . 108
- Tabla 23.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Absidia* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera en rotación . 108
- Tabla 24.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente. 109
- Tabla 25.** Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Bauveria* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente. 109

Tabla 26.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Trichoderma</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>T. repens</i> cultivadas en pradera permanente.	110
Tabla 27.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Penicillium</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivadas en pradera en rotación .	110
Tabla 28.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Absidia</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivadas en pradera en rotación .	111
Tabla 29.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Chaetomium</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivadas en pradera en rotación .	111
Tabla 30.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Mucor</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivadas en pradera en rotación .	111
Tabla 31.	Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de <i>Penicillium</i> sp. aisladas desde la rizósfera de <i>D. glomerata</i> cultivadas en pradera permanente.	112

1. RESUMEN

Se estudiaron cuantitativamente por métodos colorimétricos, 6 enzimas producidas por un total de 180 cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L. (trébol blanco), *Lolium perenne* L. (ballica inglesa) y *Dactylis glomerata* L. (pasto ovilla) recolectadas desde pradera en rotación y permanente en Pelchuquín (562.5 N 673.4 E.) Valdivia, Chile. Las cepas fúngicas fueron obtenidas por el método de las diluciones y posterior siembra en agar malta al 2%. Luego fueron sembradas en caldo malta al 1 %, e incubadas por 10 días a 1500 r. p.m. obteniéndose los filtrados respectivos y el micelio. Por espectrofotometría en los filtrados se determinó la actividad para 6 enzimas, amilasas, celulasas, ureasas, fosfatasa (ácida y alcalina) y proteasas.

Todas las cepas fúngicas presentaron actividad para las enzimas amilasa, celulasa, fosfatasa (ácida y alcalina) y proteasa. Sólo tres no presentaron actividad ureolítica: *Absidia glauca* 1SR aislada desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* (pradera en rotación), *Aspergillus niger* 2SR y *Penicillium restrictum* 1R aisladas desde *Lolium perenne* (pradera en rotación)

Una cepa de *Penicillium chrysogenum*, aislado desde *L. perenne* (pradera permanente), se determinaron las mayores actividades enzimáticas para amilasa, celulasa, fosfatasa (alcalina y ácida), proteasas y ureasas (1055.56; 6.149; 127.12 y 139.68; 81.186; 1.055 mg/mL·gr micelio, respectivamente)

SUMMARY

From the rizosphere of *Trifolium repens* L. (white clover), *Lolium perenne* L. (raygrass) and *Dactylis glomerata* L. (orchardgrass) under rotational and permanent pastures located in Pelchuquín (56.5 N, 67.34 E) Valdivia, Chile. 180 fungal strains were isolated. The methodology was serial dilution culturing aerobically in 1% Malta agar dishes at 23 ± 2 °C for 7 days. The developed colonies were subcultured in 1% Malta broth tubes at 22 °C for 10 days at 1500 r.p.m.

The following step was to take off the mycelium and from the filtrated the activities of six enzymes werw colorimetrically studies by spectrophotometry. For all the fungal strains the enzymes amilase, celulase, fosphatase acid and alkaline showed activity. Ureasa activity was not detected in three strains isolated from rotational pasture: *Absidia glauca* 1SR the *D. glomerata*, *Aspergillus niger* 2SR and *Penicillium restrictum* 1R isolated from *L. perenne*

The higher enzyme activity was from *Penicillium chrysogenum* 2R in permanent pasture of *L. perenne* . The values were amylase 1055.56; celulase 6.149; fosphatase (acid and alkaline) 139.68 and 127.12; proteases 81.19 and ureases 0.01852 mg/mL·gr mycelium.

2. INTRODUCCIÓN

La rizósfera por definición, es la porción de suelo directamente influenciada por las raíces de las plantas, siendo el rizoplano la superficie de la raíz y que incluye además el área que comprende las partículas de suelo adheridas a las raíces (Tate III, 2000). La rizósfera es una zona de interacción única y dinámica entre las raíces de los vegetales y los microorganismos del suelo, corresponde a un sitio de máxima actividad biológica caracterizada por el aumento de la biomasa microbiana, controlado predominantemente por las propiedades de la planta, esta situación es debido a que la planta abastece de nutrientes y energía al crecimiento de la microflora (Tate III, 2000). Las poblaciones más altas de microorganismos han sido encontradas al nivel de la rizósfera, en comparación con la no-rizósfera. Los microorganismos de la rizósfera obtienen sus nutrientes desde los exudados de las raíces (azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos provenientes de las células de las raíces), mucigel y raíces lisadas (compuestos relacionados con la autólisis de las células corticales de las raíces, células epidérmicas viejas y pelos radicales). Los microorganismos de la rizósfera son normalmente heterótrofos; sin embargo, viven en un medio ambiente con altos niveles de nutrientes donde tienden a adaptarse rápidamente, con frecuencia también se encuentran simbioses, que tienen un rol clave en el ciclaje de nutrientes. La comunidad de la rizósfera está constituida por la micro y mesofauna, las cuales participan de los procesos de descomposición de la materia vegetal y animal muerta en los ecosistemas, contribuyendo significativamente con el catabolismo de sustancias nocivas en la rizósfera (Tate III, 2000).

Los organismos que prevalecen en la rizósfera son característicos de la comunidad microbiana, las dimensiones físicas y la actividad microbiana en la rizósfera depende de factores específicos al sitio y de la planta, como por ejemplo los referidos a las especies, edad y vigor de los vegetales.

Así mismo, la fracción biótica de la materia orgánica, formada por los microorganismos vivos, desempeña un papel básico en la rizósfera al ser la última responsable del estado de la materia orgánica, y en general, del desarrollo y funcionalidad del ecosistema (Smith *et al.*, 1993). Los microorganismos, por consiguiente, influyen sobre los ecosistemas y su fertilidad, interviniendo tanto en el abastecimiento de los ciclos biogeoquímicos como en la formación de la estructura de los suelos (Harrish & Birch, 1989). De esta forma, el desarrollo de una comunidad rizosférica activa, tiene una variedad de impactos indirectos y directos en la producción de la biomasa de las plantas. Quizás el beneficio principal de una comunidad rizosférica activa para las plantas es la mineralización de estas mismas, donde, el nitrógeno orgánico, fósforo y compuestos sulfurados son oxidados liberándose amonio, fósforo y sulfatos, nutrientes esenciales que la planta puede absorber en sus formas solubles (Tate III, 2000).

La biomasa microbiana es la responsable principal de la descomposición de los residuos orgánicos, ciclo de nutrientes y flujo de energía dentro del ecosistema del suelo, y tiene por tanto, en general, un efecto beneficioso sobre el desarrollo del vegetal. El potencial amonificante del suelo y la velocidad de descomposición de los restos vegetales están estrechamente ligados con la masa microbiana del mismo (Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIS, 2001).

Además, la comunidad microbiana confiere resistencia a los agentes patógenos, por la competencia generada, destruyéndolos potencialmente.

Por su parte, los ciclos de los nutrientes en el suelo implican una serie de reacciones bioquímicas, físicas y fisicoquímicas. Los procesos bioquímicos están mediados por enzimas, proteínas que poseen propiedades catalíticas, debido a su poder de activación específica. Las enzimas son específicas para el tipo de reacción en las que participan y para un determinado sustrato (Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIS, 2001).

La mayor parte de la actividad biológica del suelo provienen de los microorganismos que viven en él (Ladd, 1978). Así la biomasa del suelo juega un papel muy importante en su fertilidad, no solo debido a su capacidad para llevar a cabo transformaciones bioquímicas, sino además como fuente y destino final de los minerales (Jenkinson & Ladd, 1981). Por lo tanto, el número de microorganismos y el potencial de actividad en la rizósfera está relacionado con la adición de materiales orgánicos (Benitez *et al.*, 2000).

De las poblaciones de microorganismos que habitan en la rizósfera, las especies fúngicas son capaces de descomponer ciertos compuestos orgánicos como celulosa, quitina, lignina, proteínas, hidrocarburos, etc., desempeñando un papel fundamental en los ciclos de los elementos tan importantes como el nitrógeno (ureasa y proteasas), el fósforo (fosfatasas) o el carbono (amilasas y celulasas), de ahí la importancia del estudio de este tipo de enzimas, por una parte el material orgánico puede incorporar directamente enzimas, y por otra, la materia orgánica

adicionada potencia la actividad microbiana y en definitiva aumentará la actividad enzimática (Hattori, 1998; Martens *et al.*, 1992; Goyal *et al.*, 1993).

Los polisacáridos son la principal fuente de energía para la comunidad biótica del suelo, y la fuente predominante de polisacáridos del suelo son los tejidos de las plantas, los cuales son originados como producto de la acción microbiana (Tate III, 2000). Los principales polímeros vegetales sujetos a degradación microbiana en los hábitat del suelo incluyen a celulosa, hemicelulosa y lignina (Ladisch *et al.*, 1983) siendo la celulosa el carbohidrato mas abundante disponible en la biomasa vegetal, correspondiendo al menos en un tercio de toda la materia vegetal de la tierra (Han *et al.*, 1971) y del 40% al 60% del material de la pared celular de madera y plantas herbáceas (Fan *et al.*, 1982). La celulosa en conjunto con el almidón, han sido clasificadas como glucopiranosas. El almidón es usualmente descompuesto en horas, está constituido por unidades de α -D glucosa enlazados por enlaces glucosídicos de α -1,6 ó α -1,4 D glucosa, además está constituido por dos componentes de alto peso molecular, la amilosa (15-25%) un polímero lineal consistente en residuos de glucopiranososa enlazados por uniones α -1,4 , y la amilopectina (75-85%) un polímero ramificado que contiene además de los enlaces glucosídicos α -1,4, puntos de ramificación debido a las uniones α -1,6 que forman cada 17-26 unidades de glucosa (Gevara, R. & Muñoz, J., 2004). Las amilasas son un conjunto de enzimas (α -amilasas, β -amilasas, glucosamilasas y enzimas desramificadoras) hidrolíticas que catalizan la degradación del almidón. La actividad de la α -amilasa es más termoestable que la actividad de la glucosamilasa. El óptimo pH y temperatura son a 6 y 50 °C, respectivamente, para ambas enzimas. Se ha identificado que *Aspergillus fumigatus* F. ha mostrado una alta actividad enzimática de α -amilasa y glucosamilasa (Domínguez & Peralta, 1993).

La celulosa es un hidrato de carbono consistente en su forma nativa de una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos β -1,4, que es equivalente de 300 a 15000 residuos de glucosa. El análisis de difracción de rayos X, indica que la celulosa presenta una estructura cristalina altamente ordenada, constituyendo fibras elementales o microfibrillas. Aunque la celulosa posee alta afinidad con el agua, es completamente insoluble en ella (Vilches,2002).

Todos los microorganismos que pueden degradar celulosa cristalina producen un sistema complejo de enzimas que es denominado en forma general celulasa, cada sistema está compuesto de una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para hidrolizar la celulosa (Vilches, 2002). Pocos microorganismos poseen el grupo de enzimas necesario para la degradación de celulosa cristalina, los hongos son los organismos mas estudiados con respecto a la degradación de celulosa y producción de celulasas. Los hongos son los responsables de la mayor proporción de celulosis en la naturaleza y su primacía no es solamente consecuencia de la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, sino que también, tienen ventajas adaptativas (Ramos & Forshiassin, 1996).

Las especies de hongos celulolíticos mas frecuentemente estudiados pertenecen al género *Trichoderma sp.* por ser los mejores productores de celulasas; sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Neurospora crassa*, también han mostrado producción de celulasa. El estudio de organismos celulolíticos nos permite contar con una fuente fácilmente disponible de enzimas celulolíticas

para ser utilizadas en la hidrólisis de residuos lignocelulolíticos, lo que constituye una constante de contaminación ambiental, el uso de celulasas o la degradación por hongos celulolíticos es una alternativa para convertir estos residuos de tal forma que podamos obtener provecho de ellos (Vilches, 2002).

La actividad de la proteasa, cataliza reacciones que degradan proteínas y péptidos, por lo que está involucrada al igual que la ureasa en el ciclo del nitrógeno (Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIS, 2001).

La ureasa es una enzima que participa en el ciclo del nitrógeno; cataliza la reacción de hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono, presente en plantas superiores y en microorganismos. Largamente estudiada, puesto que afecta a reacciones de pérdida de fertilizantes nitrogenados en forma de urea, ha cobrado importancia agrotecnológico. Su presencia en los suelos tiene origen microbiano. La existencia de esta enzima en forma libre, debe ser en asociación con el humus o coloides (Dick & Tabatabai, 1993).

El fósforo (P), es un elemento primordial para el metabolismo de los seres vivos, encontrándose presente en todas sus células, siendo esencial en sus procesos fisiológicos y bioquímicos, formando parte del ADN y ARN, a menudo, aparece como un nutriente limitante en los suelos agrícolas, cualquiera sea su forma de manejo. No es posible capturarlo biológicamente desde el aire y su ciclo natural involucra larguísimos periodos, lo que en términos de manejo agrícola equivale a decir que no podemos depender del ciclo del P, sino de la posibilidad de generar determinados flujos y sub-ciclos de él al interior de los sistemas suelo-agua-organismos vivos. Las plantas absorben P en estado soluble, pero cuando se introduce P al suelo, más del

90% de él pasa rápidamente a formas insolubles, no disponibles. Un manejo de fertilidad de suelos racional y sustentable, hace indispensable aumentar la eficiencia de utilización, que no depende de mayores tasas de aplicación de fertilizantes, sino de fomentar procesos de reciclaje y de solubilización de P en el suelo. (Montecinos, 1997).

El ciclo del P se ve negativamente afectado por la falta de vegetación del suelo (García *et al.*, 1997). La mineralización del P orgánico, es catalizado por enzimas extracelulares (fosfatasas) de bacterias, hongos, protozoos o exudados radiculares (Nannipieri *et al.*, 1990). Grandes alteraciones en los materiales orgánicos induce a cambios en la estabilidad de la enzima (García *et al.*, 1997). Las fosfatasas producidas son mas abundantes en el área de la rizósfera y constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico: Fueron clasificadas de acuerdo al pH óptimo para su actividad, en fosfatasa ácida o fosfomonoestereasa y fosfatasa alcalina (Schmidt & Laskowski, 1961). Las fosfatasas son ácidas o alcalinas, de acuerdo a su pH óptimo de acción (Tarafdar *et al.*, 2001), ya que su máxima actividad ocurre a rango de pH bajo (pH 6,5) y pH alto (pH 11) respectivamente. La fosfatasa ácida es producida por microorganismos y plantas superiores, pero la fosfatasa alcalina es producida sólo por microorganismos (Gehl, 2002). Si bien la relativa contribución de fosfatasa ácida para la hidrólisis del fosfato orgánico desde las plantas y hongos, ha sido demostrado, los resultados sugieren que la fosfatasa ácida de los hongos es más eficiente que las secretadas por las plantas (Tarafdar *et al.*, 2001), donde, el efecto de la rizósfera sobre la incidencia cuantitativa de la micoflora se ha determinado por la variación cualitativa durante el crecimiento del vegetal, en que la edad de la planta tiene un efecto determinante en el número de microorganismos y la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina. El efecto mas pronunciado es durante el florecimiento

del vegetal. Los análisis de regresión demuestran correlaciones positivas entre la incidencia de microorganismos y la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina, indicando que la micoflora asociada a la rizósfera desempeña un importante papel en las transformaciones del fósforo (Gomez de Guinan & Nageswara, 1996).

La acción de esta enzima se ve afectada por factores físicos, como lo es el incremento de la temperatura. Por ejemplo si se aumenta de 36,8 °C a 43,9 °C, decrece la actividad de la fosfatasa ácida y la alcalina, y así mismo, la población de hongos del suelo. La solarización del suelo sobre la población y actividad de los microorganismos ha mostrado que éste puede aumentar su temperatura hasta unos 9°C aproximadamente, decreciendo significativamente la población de hongos y con ello la actividad de la fosfatasa ácida y alcalina (Shukla *et al.*, 2000). Además, son inhibidas por el producto final de su reacción enzimática, el fósforo inorgánico, ya que presenta una retroinhibición. Esto quiere decir que sólo se producirá la activación de la fosfatasa si existen deficiencias de fósforo disponible (Nannipieri *et al.*, 1979).

La fosfatasa ácida está fuertemente implicada en el control bioquímico de la ramificación de las hifas y la secreción de la exoenzimas desde los hongos (Jones *et al.*, 1995).

Las fosfatasas producidas por los hongos rizosféricos, tienen un efecto significativo en el crecimiento y la adquisición de los nutrientes de las plantas, demostrando la importancia de estos hongos en el suelo para la producción agrícola (Tarafdar *et al.*, 1995).

Se han aislado desde la rizósfera hongos solubilizadores de fósforo de hasta 27 especies de *Aspergillus* , 7 especies de *Penicillium* y 1 especie de *Rhizopus* . De estas especies, 8 mostraron una alta actividad de solubilización de fósforo (7 de *Aspergillus* y 1 de *Penicillium*) (Varsha-Narsian *et al.*, 1994). Se comprobó que *Aspergillus niger* y el posiblemente *Botrytis sp.* producen una solubilización importante de fosfatos (Borie *et al.*, 1983).

Estos parámetros bioquímicos que son capaces de diagnosticar la calidad del suelo, son sumamente sensibles, útiles para monitorear los cambios que puedan darse en los suelos, sometidos a procesos de contaminación o recuperación, permitiendo evaluar la incidencia de acciones diversas sobre el suelo y su influencia en la calidad biológica y bioquímica.

En base a lo anteriormente señalado se propone la siguiente hipótesis de trabajo:

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Todas las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de 3 especies vegetales forrajeras de una pradera permanente presentan cuantitativamente diferencias en sus perfiles enzimáticos, con cepas fúngicas aisladas desde las rizósfera de las mismas especies vegetales forrajeras de una pradera en rotación.

2.2. OBJETIVOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar la actividad enzimática amilolítica, celulolítica, ureolítica, fosfatásica (ácida y alcalina) y proteolítica de 180 cepas fúngicas, de las cuales: 60 cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* L. ; 60 cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L. y 60 cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L., recolectadas de un suelo trumao de una pradera en rotación y una pradera permanente.
2. Relacionar la actividad enzimática con la masa fúngica de las cepas.
3. Relacionar los parámetros antes mencionados de acuerdo al tipo de pradera.
4. Aplicar análisis estadístico para verificar las diferencias significativas de la actividad enzimática entre las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de plantas de una pradera permanente y en rotación.
5. Determinar cuantitativamente las taxas fúngicas de la rizósfera con máxima actividad enzimática para las 6 enzimas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Biológicos

Se utilizaron en total 180 cepas fúngicas mantenidas en el cepario del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, las que fueron aisladas desde la rizósfera de tres especies de plantas forrajeras: *Lolium perenne* L., *Dactylis glomerata* L. y *Trifolium repens* L. de cada una se seleccionó 30 cepas fúngicas de pradera permanente y 30 cepas fúngicas desde una pradera en rotación.

Las 3 especies vegetales mencionadas pertenecientes a parcelas, de cuya rizósfera se aislaron las cepas fúngicas, están ubicadas en la localidad de Pelchuquín, comuna de Mariquina (562.5 N 673.4 E. Sistema UTM), X región Valdivia, Chile.

La pradera permanente data de 1955 y está compuesta por 26 especies vegetales de origen Europeo, pertenecientes a la Asociación Hypero-Agrostideum capillariae, con una alta proporción de leguminosas. Se encuentra sometida a pastoreo bovino rotacional .

La pradera en rotación data de 1872 y está compuesta por 21 especies vegetales de origen Europeo, pertenecientes a la Asociación Hypero-Agrostideum capillariae, priman las especies de gramíneas y una moderada proporción de leguminosas.

3.1.2. Reactivos.

Los reactivos utilizados en la fase experimental se indican a continuación en orden alfabético: agar-agar, agar malta al 2% (AEM al 2%); alcohol 97°; antibióticos (penicilina G. sódica al 0.5%; sulfato de estreptomicina al 0.25 %), caldo malta al 1% (CM), extracto de malta;

Soluciones para determinación de amilasas: almidón tamponado 10 mg/mL: Acetato de Sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M; Solución Reveladora: 0.006% de Yodo I₂, 0.06% de Ioduro de Potasio KI en HCl 0.02 M; **Soluciones para determinación de Celulasas:** buffer Acetato 2 M pH 5.5 : Acetato de Sodio anhidro, Ácido Acético. Reactivo A: Carbonato de Sodio anhidro, Cianuro de Potasio. Reactivo B: Hexacianoferrato III de Potasio. Reactivo C: Dodecilsulfato de Sodio (SDS), H₂SO₄ concentrado, Sulfato de Amonio-Fierro III. Solución Madre: glucosa anhidra 25 µg/mL. Solución Sustrato: Carboximetilcelulosa sal sódica (CMC); **Soluciones para determinación de fosfatasa ácida y alcalina:** Buffer Universal Modificado (MUB): Ácido Bórico, Ácido Cítrico, Ácido Málico, NaOH 1N, Tris; CaCl₂ 0.5 M, MUB pH 11 NaOH 1N. MUB pH 6.5, HCl 1N; NaOH 0.5 M; p-nitrofenol 25 mM; Solución Sustrato: p-nitrofenil 8.4 µg/mL (disodium p-nitrophenyl phosphate); **Soluciones para determinación de proteasas:** albúmina de bovino 10 mg/mL; Reactivo de Biuret: Ioduro de Potasio, NaOH 2.5 N, Sulfato de Cobre (CuSO₄ • 5 H₂O), Tartrato de Sodio y Potasio; Solución Sustrato: gelatina 10 mg/mL; **Soluciones para determinación de ureasas:** Ácido Dicloriosocianuro-sodio dihidratado, Cloruro de Amonio; NaOH 0.3 M, Nitroprusiato de Sodio; Salicilato de sodio (C₇H₅NaNO₃); Solución de extracción de KCl 1M: KCl, HCl 1M; Solución Sustrato: Urea (CO(NH₂)₂) 4.8 mg/mL.

3.1.3. Equipos

Agitador orbital Lab. Line Orbil Environ-shaker, autoclave Orsa, balanza analítica Sartorius 2462, balanza Precisa 2200C, baño termorregulado Rost frei Edelstahl; cámara de incubación Kotterman GMB type S430, cámara fría Eurofrigo; espectrofotómetro UV-visible Uvmini 1240 Shimadzu, mezclador magnético Heidolph type mr 1000 (220/240V y 50 Hz 2200 1/min.), mezclador magnético termorregulado Thermolyne Nuova Stir Plate modelo SP18420-26, microondas Mademsa Memo-900; pHmetro Hi 9321 microprocessor pH meter, refrigerador Trotter, vortex manual Lab. Line modelo 1291 (220V y 50/60 Hz).

3.1.4. Otros

Aguja de siembra, algodón, botellas de vidrio de 200 mL, cubeta de cuarzo 1 cm, embudos, espátula, filtros swinnex-25 millipore, gradillas, jeringas 10 mL, lápiz marcador, matraces Erlenmeyer y aforados 100, 250, 500, 1000 mL.; mecheros, micropipetas P-200, P-1000, P-5000 μ L, papel de aluminio, papel filtro, parafilms, pinzas, pipeta Pasteur, pipeta volumétrica, pipetas graduadas de 1.5, 10, 25 mL, piseta, placas Petri, probetas de 100, 500, 1000 mL, propipeta, rejilla, tips 200, 1000 y 5000 μ L, trípode, tubos ensayo de 10 y 20 mL, vaso precipitado.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Masificación de las cepas fúngicas:

La masificación de las cepas fúngicas se realizó extrayendo desde los tubos de cepario un inóculo de agar con micelio de la cepa fúngica respectiva la que se sembró independientemente y por duplicado en placas Petri que contenían 15 mL de AEM al 2% y 0.3 mL de mezcla de antibiótico. Todas las placas se incubaron durante 7 días a 23 ± 2 °C. Luego de lo cual, desde cada placa y mediante un sacabocados de 1.4 cm de diámetro, se cortaron 3 círculos de agar con micelio que fueron depositadas asépticamente con ayuda de una aguja de siembra en botellas de 200 mL, que contenían 100 mL de CM al 1%. Las que se dispusieron en un agitador orbital a 1500 r.p.m. por 10 días y a temperatura ambiente. Tras el período de incubación, el contenido de cada botella fue filtrado independientemente en forma aséptica, usando filtros con papel filtro estéril ensamblado a una jeringa de 10 mL también estéril. El filtrado obtenido fue depositado en tubos de ensayos estériles, que se sellaron con parafilms y se conservaron en cámara fría a 4°C. La fracción retenida en cada filtro (micelios del hongo) fue depositada separada y asépticamente en placas Petri previamente taradas, las que se depositaron en una cámara de secado hasta peso constante (48 hrs aprox.), tras lo cual se pesó cada placa con su micelio, calculando la diferencia con el peso conocido de la placa Petri, determinándose así el peso seco (PS) del micelio.

3.2.2 Determinación de la actividad enzimática:

De los filtrados obtenidos se determinó cuantitativamente las siguientes enzimas extracelulares: amilasas, celulasas, fosfatasas ácida y alcalina, proteasas y ureasas, por los métodos colorimétricos que se señalan a continuación.

3.2.2.1 Determinación de amilasas: Se realizó por el protocolo modificado descrito según Guía de Práctico de Conceptos y Técnicas de Biotecnología I (Haim, 2000), de la Universidad de Buenos Aires (UBA), para la medición de la actividad enzimática amilolítica fúngica.

Antes de determinar las amilasas de los filtrados fúngicos obtenidos, se realizó una curva de calibración. Como patrón se utilizó una solución del sustrato de almidón tamponado (10 mg/mL a pH 5.0). Se dispuso de 6 tubos, de los cuales 5 contenían 2, 4, 6, 8 y 10 mg de almidón tamponado respectivamente, el sexto tubo fue usado como blanco con 1 mL de agua destilada. Luego a cada tubo se le adicionó 4.5 mL de solución reveladora, donde el I₂ de la solución I₂/IK se acompleja con la estructura tridimensional intacta del almidón nativo. El complejo iodo-almidón se cuantificó midiendo la A° (absorbancia) a la longitud de onda de 640 nm contra el blanco. Los datos obtenidos se graficaron como A° versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración (ver Anexo 1 gráfico 1).

Para determinar las amilasas extracelulares de los filtrados de las cepas fúngicas, 1mL del filtrado respectivo se extrajo asépticamente con una micropipeta y se depositó en un tubo de ensayo estéril, a continuación se agregó 1 mL de sustrato para la enzima, que correspondió a la solución de almidón tamponado (10 mg/mL a pH 5.0), se preparó un tubo control que llevaba sólo el sustrato. Los tubos se incubaron a 37 °C por 1 hora en un baño termorregulado. La

reacción se detuvo agregando a cada tubo 4.5 mL de la solución reveladora del almidón remanente y luego se midió la A° contra el tubo control, al igual que en la curva de calibración. Si hubo acción enzimática, el almidón fue hidrolizado y la reacción con la solución reveladora dará negativa. En una hidrólisis enzimática parcial, la solución reveladora cuantificará el almidón remanente. La diferencia de los datos obtenidos en los tubos de muestra con respecto a los tubos control, dió el valor de absorbancia que fue interpolado en la curva de calibración, utilizando la relación: $Absorbancia (A^\circ) = Factor\ de\ Calibración \cdot Concentración$. Despejando, se obtuvo la concentración de almidón que fue hidrolizado por las amilasas en mg/mL, equivalente a la cantidad de enzimas que actuó sobre el sustrato. La concentración final está dada en función del peso seco de la cepa fúngica.

3.2.2.2 Determinación de celulasas: Se realizó por el método modificado Actividad de CM-celulasa, descrito por W. von Mersi und F. Shinner (1990),

Antes de determinar las celulasas de los filtrados obtenidos, se realizó una curva de calibración. Como solución patrón se utilizó glucosa anhidra 25 $\mu\text{g/mL}$, de esta solución se depositaron 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 mL independientemente en tubos, luego cada tubo se completó hasta 1 mL con agua destilada, un 7º tubo fue usado como blanco con 1 mL de agua destilada. Luego a cada tubo se adicionó 1 mL de reactivo A y 1 mL de reactivo B, los tubos fueron tapados, agitados e incubados a 100 °C por 15 min. en baño María. Se dejaron enfriar durante 5 min. a temperatura ambiente. Finalmente, a cada tubo se agregaron 5 mL de solución C y se esperó 1 hr. hasta el desarrollo de un color Azul de Berdines, tras lo cual se leyó la A° a 690 nm. Los datos obtenidos se graficaron, A° versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración (ver Anexo 1 gráfico 2).

Para determinar las celulasas extracelulares de los filtrados, se extrajo asépticamente 1 mL del filtrado de la cepa fúngica respectiva y se depositó en un tubo de ensayo estéril, a continuación se agregó 1mL de buffer acetato 2 M pH 5.5 al tubo control y 1 mL de solución de sustrato para la enzima (CMC pH 5.5) al tubo que contenía la muestra. Los tubos se agitaron en un vortex, luego se taparon con tapón de goma y se incubaron a 50 °C por 24 hrs. en un baño termostático. Pasado este período, se agitó el contenido de los tubos y se extrajo una alícuota de 0.5 mL que fue depositada en un tubo de ensayo y se diluyó hasta 20 mL con agua destilada. Se agitó el tubo y se extrajo 1mL del diluido en un tubo de ensayo, se agregó 1 mL del reactivo A y 1 mL de reactivo B. Se agitó y tapó con tapón de goma, a continuación el tubo se incubó a 100 °C por 15 min. en baño María. Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente por 5 min. y se agregaron 5 mL de reactivo C, finalmente, se esperó 1 hr. hasta el desarrollo de color y se midió la A° a 690 nm. Para obtener la concentración de celulasas de cada muestra, el valor obtenido por espectrofotometría (hecho previamente el cálculo de la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra), fue interpolado en la curva de calibración y multiplicado por 40, que corresponde al factor de dilución, utilizando la relación: Absorbancia (A°) = Factor de Calibración • Concentración. El dato final de concentración de enzimas se expresó en las unidades de mg/mL, que corresponde a la concentración de glucosa producida por la acción del complejo enzimático celulasa sobre el sustrato CMC, equivalente a la concentración de enzimas que actuó sobre el sustrato. La concentración final está dada en función del peso seco de la cepa fúngica.

3.2.2.3 Determinación de ureasas: Se realizó por el método modificado descrito en “Métodos de Ecología Vegetal” (Steubing *et al.*, 2002).

Antes de determinar las ureasas de los filtrados obtenidos, se realizó una curva de calibración. Como solución patrón se utilizó Cloruro de Amonio NH_4Cl 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se dispuso de 5 matraces de 100 mL, de los cuales 4 contenían 1, 1.5, 2 y 2.5 mL respectivamente de la solución patrón, y un 5º matraz como blanco. Cada matraz se completó a 100 mL con la solución de extracción. A continuación, de cada matraz se extrajo 1 mL y se depositó en tubos de ensayo, a los cuales se agregó 5 mL de solución mixta y 2 mL de solución de oxidación. Los tubos se agitaron durante 30 min. y luego se leyó la A° a 660 nm. Los datos obtenidos se graficaron, A° versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración (ver Anexo 1 gráfico 3).

Para determinar las ureasas extracelulares de los filtrados en estudio, se extrajo asépticamente 1 mL del filtrado respectivo y se depositó en un tubo de ensayo estéril, a continuación al tubo se agregó 0.5 mL de sustrato de urea e incubó a 37°C durante 2 hrs. Para el blanco se utilizó 1 mL del filtrado y se agregó 0.5 mL de agua destilada e incubó a la misma temperatura y tiempo. Luego de enfriar a temperatura ambiente, se adicionó nuevamente 0.5 mL de solución de urea al tubo que contenía la muestra y 0.5 mL de agua destilada al tubo control. Luego se agregaron 9.5 mL de solución de extracción a cada tubo. Los tubos se agitaron por 30 min. A continuación, se extrajo 1 mL y se depositó en un tubo de ensayo, se agregaron 5 mL de solución mixta y 2 mL de solución de oxidación, la mezcla se agitó durante 30 min. Finalmente se midió la A° a 660 nm. Después de obtener el dato final de la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra, este fue interpolado en la curva de calibración, utilizando la relación: $\text{Absorbancia } (A^\circ) = \text{Factor de Calibración} \cdot \text{Concentración}$. Las unidades de concentración de enzimas ureasa fueron $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración final está dada en función del peso seco de la cepa fúngica y expresada en mg/mL .

3.2.2.4 Determinación de fosfatasas ácida y alcalina: Se realizó por el método modificado desarrollado por Gehl (2002).

Antes de determinar las fosfatasas ácida y alcalina de los filtrados obtenidos, se realizó una curva de calibración. Como patrón se utilizó una solución patrón p-nitrofenol (25mM), 1 mL de solución patrón se diluyó en 100 mL de buffer universal modificado (BUM) para pH 6.5 y 11 (respectivamente). De esta solución se tomaron 0, 1, 2,3, 4 y 5 mL que fueron depositados independientemente en tubos de ensayo y se ajustaron a un volumen de 5 mL con agua destilada. A cada tubo se agregó 1 mL de CaCl_2 y 4 mL de NaOH. Los tubos se agitaron en un vortex y su contenido se filtró independientemente a través de papel filtro común. A los filtrados obtenidos se leyó la A° a 400 nm. Los datos obtenidos se graficaron, A° versus concentración y la pendiente formada correspondió al factor de calibración (ver Anexo N°1 gráfico 4 y 5).

Para determinar las fosfatasas ácidas y alcalinas extracelulares de los filtrados en ensayo, en 2 de 4 tubos de ensayo de 20 mL estériles se depositó 1 mL del filtrado respectivo, dos de los tubos se utilizaron para determinar fosfatasa alcalina (pH 11, tubo muestra y tubo control), y 2 tubos para determinar fosfatasa ácida (pH 6.5). Luego a cada tubo se agregó 4 mL de BUM (pH 11 ó pH 6.5) y se agitó en un vortex. A continuación, a cada tubo se agregó 1 mL de sustrato p-nitrofenil (previamente preparado con BUM pH 11 ó pH 6.5 en una concentración 8.4 $\mu\text{g/mL}$) y se agitó por algunos minutos. Los tubos se taparon e incubaron a 37°C por 1 hr. en un baño termoregulado. Pasado este período, a cada tubo se agregó 1 mL de CaCl_2 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M, y se agitó en vortex. Por último el contenido de cada tubo se filtró independientemente a través de papel filtro común, y el filtrado obtenido se traspasó a un tubo de ensayo, tras lo cual se leyó la A° (intensidad del color amarillo) a 400 nm.

Paralelamente, los dos tubos control (pH 6.5 y pH 11), fueron incubados, sin agregar el sustrato, junto con los tubos que contenían las muestras. Terminado el período de incubación se agregó 1 mL de CaCl_2 0.5 M y 4 mL de NaOH 0.5 M, y 1 mL de sustrato p-nitrofenil, y se agitó en vortex. Se filtró a través de papel filtro común y el filtrado se depositó en tubos de ensayo, finalmente, se leyó en el espectrofotómetro a 400 nm correspondiendo al blanco de la muestra. Para la obtención de los datos de concentración de fosfatasa ácida y alcalina de cada muestra, se calculó la diferencia entre el tubo control y el tubo de muestra, el resultado obtenido se interpoló en la curva de calibración utilizando la siguiente relación: Absorbancia (A°) = Factor de Calibración • Concentración. El valor final correspondió a la concentración de la enzima y se expresó en las unidades de mg/mL. La concentración final está dada en función del peso seco de la cepa fúngica.

3.2.2.5 Determinación de proteasas: Se realizó por el método de Biuret según la Guía de Práctico de Bioquímica 160, UACH (2001), para proteínas totales.

Antes de determinar las proteasas a los filtrados obtenidos, se realizó una curva de calibración. Como proteína patrón se utilizó albúmina de bovino (10 mg/mL). Se dispuso de 6 tubos, los cuales 5 contenían 2, 4, 6, 8 y 10 mg de albúmina respectivamente, el sexto tubo fue usado como blanco con 1 mL de agua destilada. Luego se adicionó a cada tubo 4 mL de reactivo de Biuret, y se dejó desarrollar la formación del complejo coloreado azul-púrpura durante 30 min., finalmente, se leyó la absorbancia (A°) a una longitud de onda de 540 nm contra el blanco. Los datos obtenidos se graficaron, A° versus la concentración y la pendiente formada corresponde al factor de calibración (ver Anexo 1 gráfico 6).

Para determinar las proteasas extracelulares de los filtrados fúngicos obtenidos, con una micropipeta se extrajo asépticamente 1 mL del filtrado respectivo y se depositó en un tubo de ensayo estéril. A continuación, se agregó 1 mL de sustrato para la enzima (gelatina 10 mg/mL). Un tubo llevaba sólo el sustrato (tubo control). Los tubos se incubaron durante 1 hr. a 23 ± 2 °C. Pasado este período, se agregó a cada tubo 4 ml de reactivo de Biuret y se esperó 30 min. hasta la aparición del color azul púrpura, luego, se leyó la absorbancia contra el tubo control a una longitud de onda de 540 nm . Si hubo acción enzimática, las proteínas que constituían la gelatina fueron hidrolizadas y la reacción de Biuret dará negativa. En una hidrólisis enzimática parcial, el reactivo de Biuret cuantificará las proteínas remanentes. Los datos obtenidos correspondieron a las proteínas totales y su diferencia con respecto al tubo control dió el valor de absorbancia que fue interpolado en la curva de calibración, utilizando la relación: Absorbancia (A°) = Factor de Calibración • Concentración. Despejando, se obtuvo la concentración de proteínas que fueron hidrolizadas por las proteasas en mg/mL, equivalente a la cantidad de enzimas que actuó sobre el sustrato. La concentración final está dada en función del peso seco de la cepa fúngica.

3.2.3 Análisis de datos

A las cepas fúngicas aisladas desde las distintas rizósferas se les asignó un código del 1 al 30 en orden alfabético por cada cepa fúngica (ver Anexo 2).

Para fosfatasa (ácida y alcalina) y proteasas, su absorbancia fue medida con tres repeticiones por cepa, obteniéndose la media y desviación estándar para cada una. Para seleccionar las mejores cepas fúngicas (máxima actividad enzimática), se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) del programa estadístico Statgraphics plus 2, aplicándose test de Tukey

HSD ($p < 0.05$). De las 30 cepas fúngicas aisladas desde cada una de las 3 rizósferas y ambas prácticas de manejo (pradera permanente y en rotación), fueron analizadas en forma independiente, seleccionando la cepa fúngica con mayor actividad enzimática por género, tipo de rizósfera y práctica de manejo (ver Anexo 4 y 5).

4. RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta el listado de las taxas ensayadas, se utilizaron un total de 180 cepas fúngicas correspondientes a 35 taxas.

Total de cepas ensayadas y taxa fúngica correspondiente.

Taxa	Práctica de manejo											
	Pradera permanente						Pradera en rotación					
	A		B		C		A		B		C	
	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R
<i>Absidia cilindrospora</i>	0	2	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1
<i>Absidia glauca</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
<i>Absidia spinosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Acremonium breve</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acremonium strictum</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	0	2	0	1	1	0	2	1	0	1	0	0
<i>Aspergillus subsessilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Aspergillus terreus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Epicoccum purpurascens</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fusarium oxysporum</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>Geotrichum candidum</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gliocladium roseum</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Humicola grisea</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Microsporium gypseum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Mortierella vinacea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Mucor hiemalis</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
<i>Paecilomyces marquandii</i>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2	3	5	1	1	1	0	1	1	1	1	0
<i>Penicillium commune</i>	3	2	0	2	1	0	1	0	1	0	1	0
<i>Penicillium expansum</i>	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Penicillium frequentans</i>	3	0	2	0	4	5	0	1	3	1	0	3
<i>Penicillium purpurascens</i>	0	0	0	2	1	1	5	0	3	0	0	0
Totales parciales de las cepas	23		21		20		20		20		12	

Tabla 1. Número total de cepas ensayadas y su taxa correspondiente.

A = *Lolium perenne* L.; B = *Dactylis glomerata* L.; C = *Trifolium repens* L.; SR = suelo rizosférico R = rizósfera

(Continuación Tabla 1)

Taxa	Práctica de manejo											
	Pradera permanente						Pradera en rotación					
	A		B		C		A		B		C	
	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R	SR	R
<i>Penicillium restrictum</i>	1	4	4	1	0	6	3	5	7	1	10	5
<i>Penicillium serie raistricke</i>	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>Phialophora mutabilis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Phytium debarryanum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Trichoderma koningii</i>	0	0	1	0	1	2	0	1	0	0	0	1
<i>Zygorhynchus moelleri</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Micelio esteril "A"	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril "B"	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Micelio estéril dematiaceous "e"	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total de cepas	30		30		30		30		30		30	

Tabla 1. Número total de cepas ensayadas y su taxa correspondiente.

A = *L. perenne*; B = *D. glomerata* ; C = *T. repens*; SR = suelo rizosférico ; R = rizósfera

En la Tabla 1, se observa el total de taxas ensayadas, de cada una de las cuales fueron sometidas a los distintos métodos para medir su perfil enzimático, las enzimas: amilasas, celulasas, ureasas, fosfatasa (ácida y alcalina) y proteasas.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada una de las taxas ensayadas de las seis enzimas correspondientes aisladas desde la rizósfera de *L. perenne*, *D. glomerata* y *T. repens*, cultivadas en pradera en rotación y permanente.

4.1 Perfiles enzimáticos de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L. (ballica inglesa).

4.1.1 Amilasas

En la Figura 1, se observa la actividad amilolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *L. perenne* cultivado en pradera permanente y en rotación.

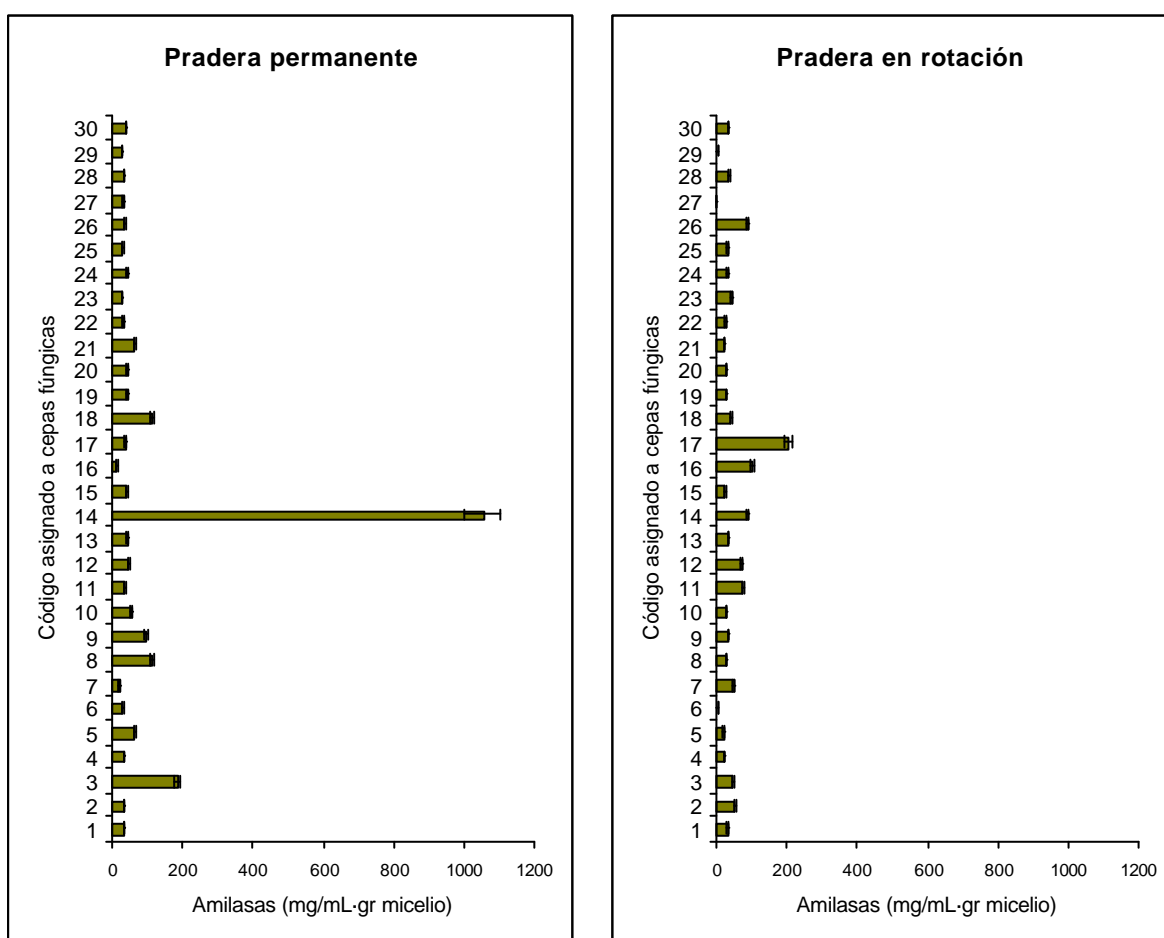


Figura 1. Actividad amilolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *L. perenne* de pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 1, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera en rotación la máxima actividad se presentó en la cepa 17 (*Penicillium purpurascens* 2SR) con

203.70 mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 27 (*Penicillium restrictum* 7SR) con 0.66 mg/mL·gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R) con 1055.56 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 16 (*P. chrysogenum* 4SR) con 13.34 mg/mL·gr micelio.

4.1.2 Celulasas

En la Figura 2, se observa la actividad celulolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *L. perenne* cultivado en pradera permanente y en rotación.

Como se aprecia en la Fig. 2, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera en rotación la máxima actividad se presentó en la cepa 2 (*Absidia cilindrospora* 2R) con 0.541 mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 29 (*Trichoderma konningii* 1R) con 0.00075 mg/mL·gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas desde *L. perenne* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R) con 6.149 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 7 (*Cladosporium cladosporoides* 1R) con 0.0062 mg/mL·gr micelio.

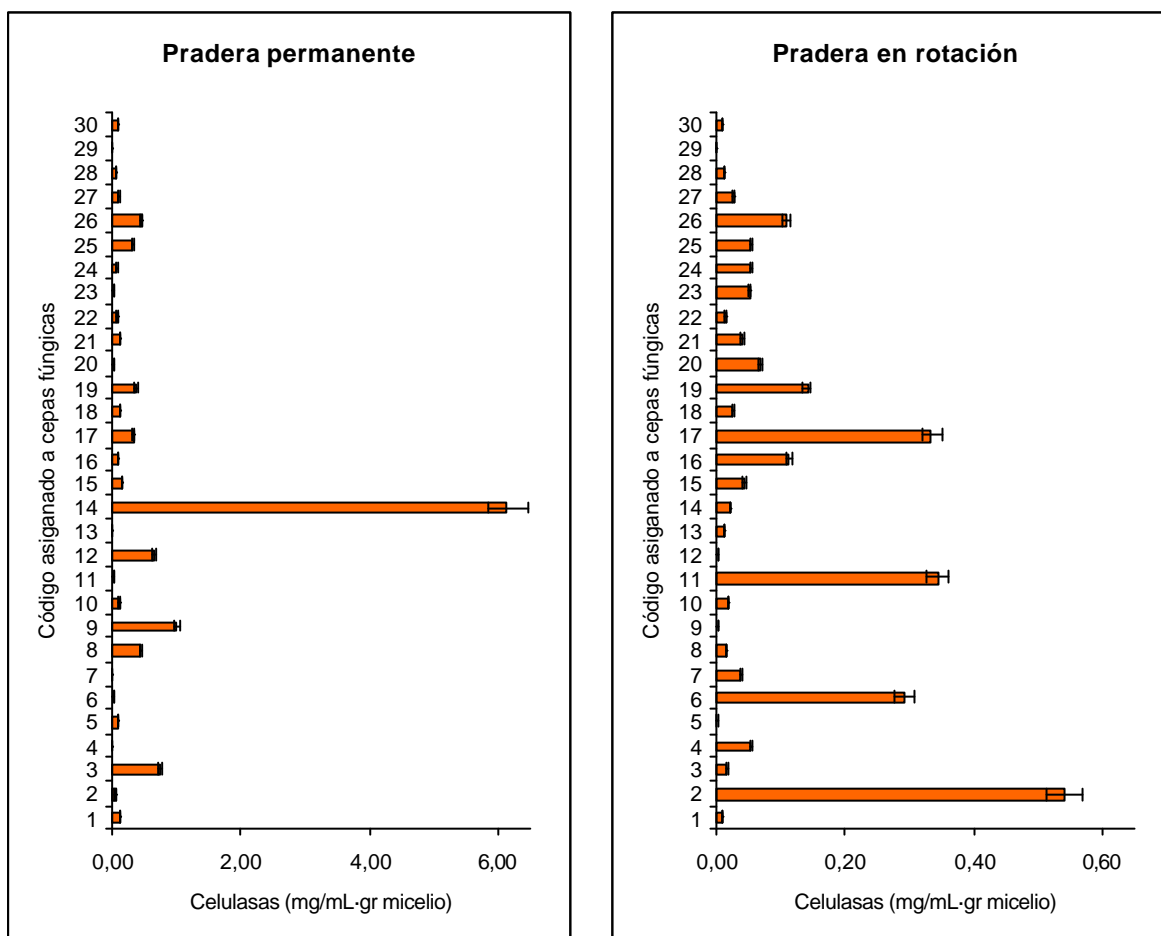


Figura 2. Actividad celulolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *L. perenne* de pradera en rotación y permanente.

4.1.3 Ureasas

En la Figura 3, se observa la actividad ureolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *L. perenne* cultivado en pradera permanente y en rotación.

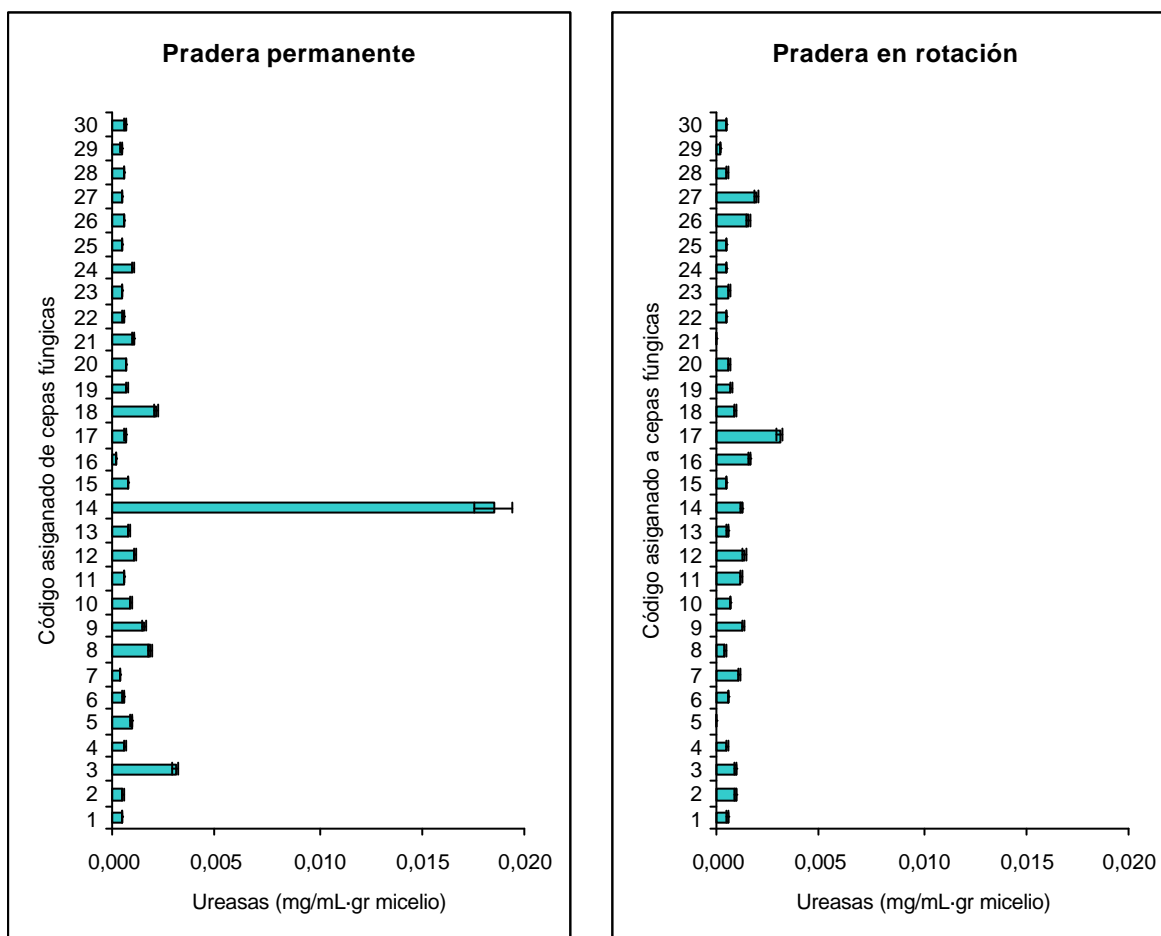


Figura 3. Actividad ureolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *L. perenne* de pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 3, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 17 (*Penicillium purpurascens* 2SR) con 0.00308 mg/mL-gr micelio, las cepas 5 y 21 no presentaron actividad ureolítica (*Aspergillus niger* 2SR y *Penicillium restrictum* 1R, respectivamente) y la mínima actividad en la cepa 29 (*Trichoderma konningii* 1R) con 0.00019 mg/mL-gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R) con 0.0185 mg/mL-gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 16 (*P. chrysogenum* 4SR) con 0.00024 mg/mL-gr micelio.

4.1.4 Fosfatasas (ácida y alcalina)

En la Tabla 2, se muestra las mejores cepas fúngicas, que luego del análisis de varianza (ANDEVA) presentaron los valores más altos para fosfatasa ácida y alcalina. Se deja constancia que todas las cepas fúngicas ensayadas presentaron actividad enzimática para ambas enzimas.

Código cepa fúngica	Actividad Fosfatásica de las mejores cepas fúngicas rizosféricas aisladas desde <i>L. Perenne</i>			
	Pradera en rotación		Pradera permanente	
	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina
3	-----	-----	29.19 ± 3.5	31.09 ± 2.3
7	10.49 ± 3.9	3.43 ± 1.0	-----	-----
9	18.70 ± 0.6	1.57 ± 1.1	-----	-----
14	-----	-----	139.68 ± 5.4	127.12 ± 4.5

Tabla 2. Actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de las mejores cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *L. perenne*.

En la Tabla 2, se aprecia a la cepa fúngica n° 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R), aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en una pradera permanente, presentó el máximo de actividad fosfatásica para ambas enzimas (ácida y alcalina). Las otras cepas fúngicas presentaron actividad fosfatásica ácida y alcalina, pero no necesariamente los valores para ambas enzimas fueron altos, así por ejemplo la cepa n° 9 presenta los valores de 18.70 ± 0.6 para fosfatasa ácida, pero un bajo valor (1.57 ± 1.1) para fosfatasa alcalina.

A continuación, se presentan el resultado de la ANDEVA a la cual fueron sometidas las 60 cepas aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente y en rotación, que presentaron actividad para fosfatasa ácida y alcalina, luego de ser agrupadas en géneros.

4.1.4.1 Fosfatasa ácida

En la Figura 4, se observa la actividad de fosfatasa ácida de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *L. perenne* cultivado en pradera permanente y en rotación, tras ser agrupadas en géneros y aplicar una ANDEVA con test de Tukey ($p < 0.05$).

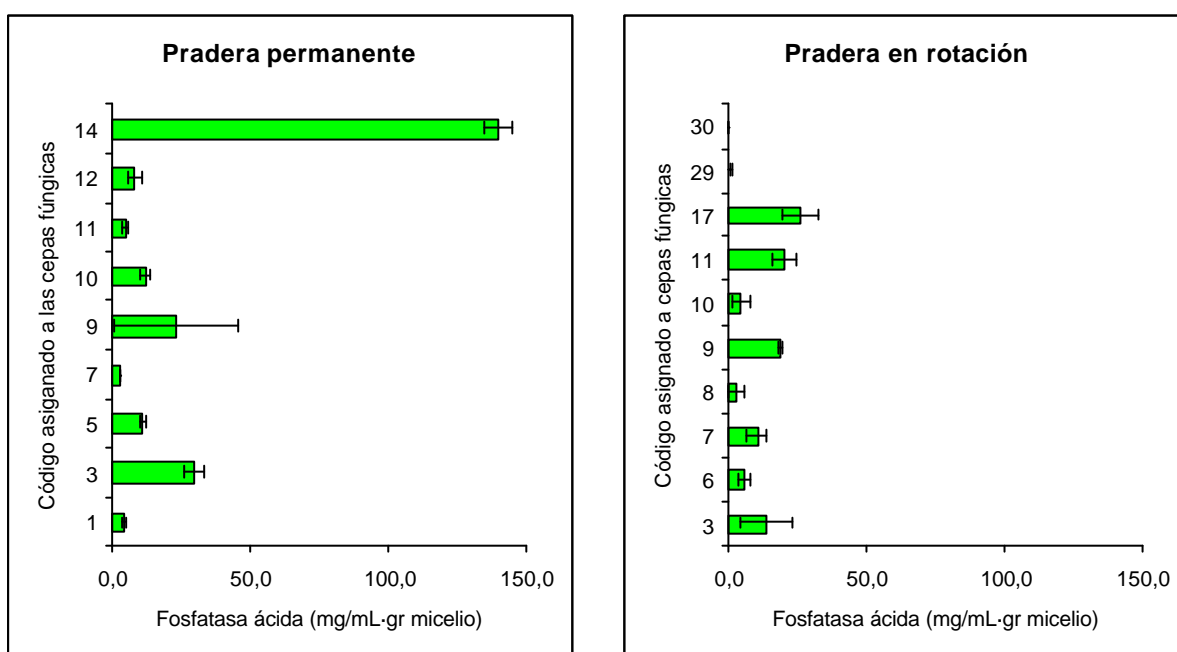


Figura 4. Actividad de fosfatasa ácida de cepas fúngicas rizosféricas de *L. perenne*, pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 4 de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera en rotación, la máxima actividad las presentaron las cepas 3 (13.78 mg/mL·gr micelio, *Absidia glauca* 1SR), 7 (10.49 mg/mL·gr micelio, *Chaetomium globosum* 1SR), 9 (18.70 mg/mL·gr micelio, *Gliocadium roseum* 1SR), 11 (20.20 mg/mL·gr micelio, *Paecilomyces marquandii* 1SR) y 17 (26.11 mg/mL·gr micelio *Penicillium purpurascens* 2SR) no existe diferencia significativa entre ellas, la mínima actividad la presentó la cepa 30 (*Zygorhynchus moelleri* 1SR) con 0.06

mg/mL· gr micelio, difiriendo significativamente a las otras cepas fúngicas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R) con 139.68 mg/mL· gr micelio, la cual presenta una diferencia significativa con respecto a las otras cepas fúngicas. La mínima la presentaron las cepas 7 (2.79 mg/mL·gr micelio, *Cladosporium cladosporoides* 1R) y 9 (23.16 mg/mL·gr micelio *Epicoccum purpurascens* 2SR) no presentan diferencia significativa entre ambas.

4.1.4.2 Fosfatasa alcalina

En la Figura 5, se observa la actividad de fosfatasa alcalina de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *L. perenne* cultivado en pradera permanente y en rotación, tras ser agrupadas en géneros y aplicar una ANDEVA con test de Tukey ($p < 0.05$).

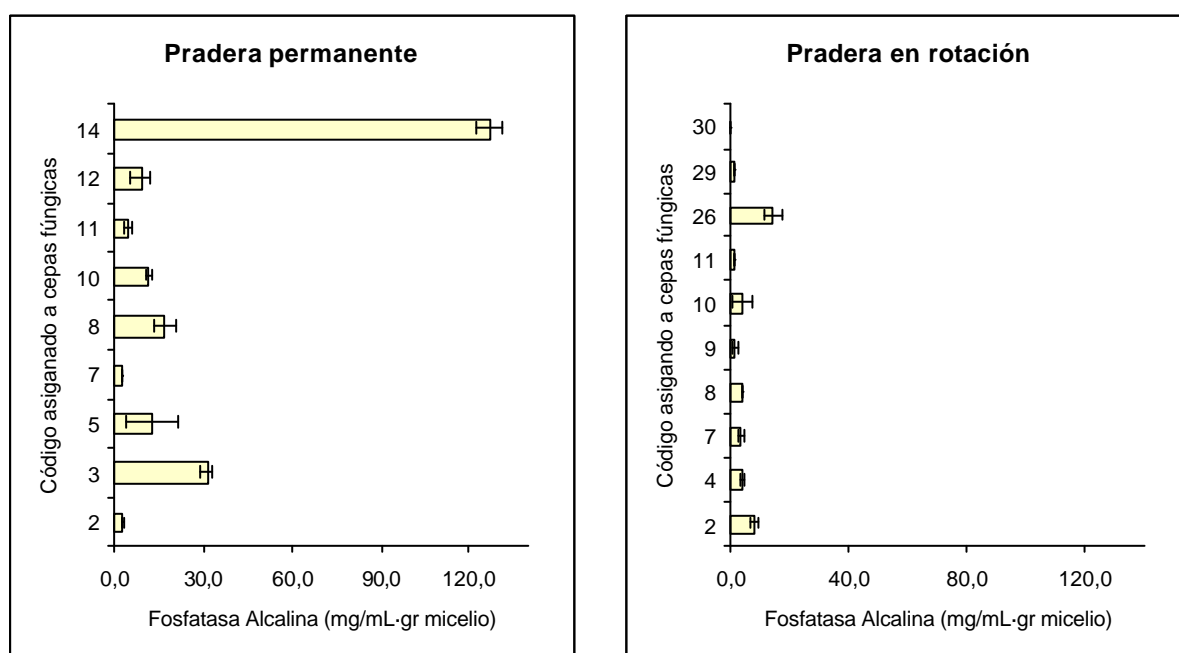


Figura 5. Actividad de fosfatasa alcalina de cepas fúngicas rizosféricas de *L. perenne*, pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 5 de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 26 (*Penicillium restrictum* 6SR) con 14.48 mg/mL· gr micelio, la mínima actividad la presentó la cepa 30 (*Zygorhynchus moelleri* 1SR) con 0.07 mg/mL· gr micelio, ambas presentaron diferencias significativas con respecto a las otras cepas fúngicas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera permanente, la máxima actividad se observó en la cepa 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R) con 127.12 mg/mL· gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 7 (*Cladosporium cladosporoides* 1R) con 1.31 mg/mL·gr micelio, ambos datos difieren en forma significativa con respecto a los valores obtenidos por la otras cepas fúngicas.

4.1.5 Proteasas

En la Figura 6, se observa la actividad de proteolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *L. perenne* cultivado en pradera permanente y en rotación, tras ser agrupadas en géneros y aplicar una ANDEVA con test de Tukey ($p < 0.05$).

Como se aprecia en la Fig. 6 ,de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 17 (*Penicillium purpurascens* 2SR) con 45.07 mg/mL· gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 30 (*Zygorhynchus moelleri* 1SR) con 0.07 mg/mL· gr micelio, ambas difieren en forma significativa a los valores obtenidos de las otras cepas fúngicas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *L. perenne* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 14 (*Penicillium chrysogenum* 2R) con 81.19 mg/mL· gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 7 (*Cladosporium cladosporoides* 1R) con 1.31

mg/mL·gr micelio, ambas difieren en forma significativa a los valores obtenidos de las otras cepas fúngicas.

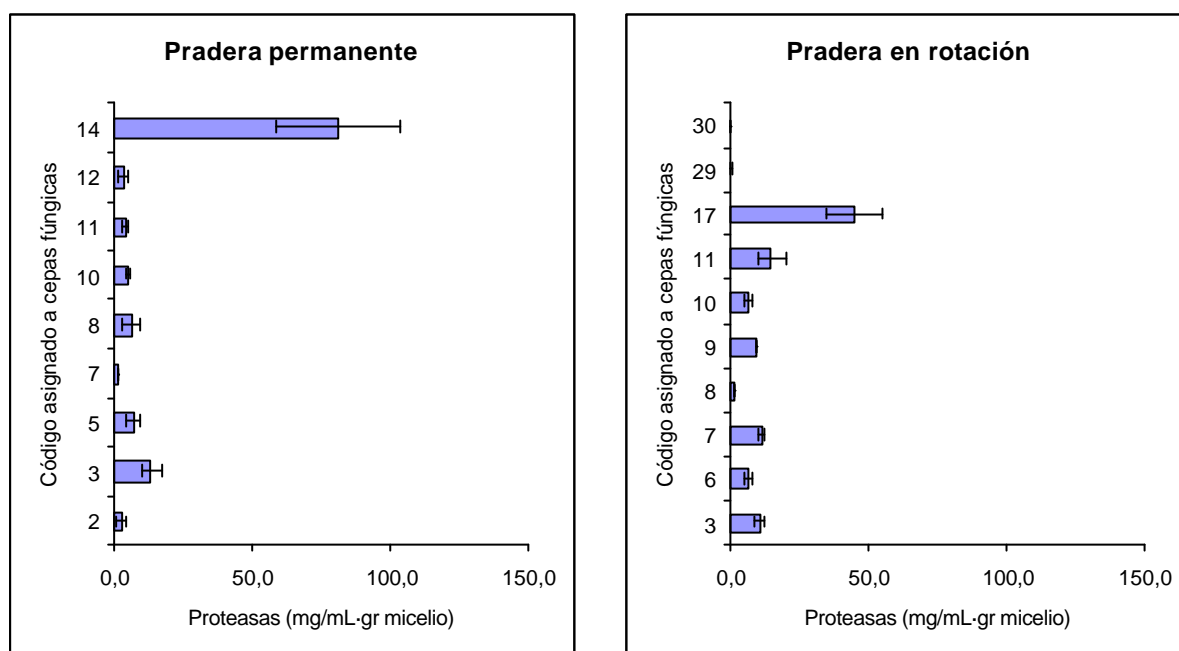


Figura 6. Actividad proteolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *L. perenne*, pradera en rotación y permanente.

4.2. Perfiles enzimáticos de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L. (trébol blanco).

4.2.1. Amilasas

En la Figura 7, se observa la actividad amilolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *T. repens* cultivado en pradera permanente y en rotación.

Como se aprecia en la Fig. 7, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 19 (*Penicillium restrictum* 7SR) con 263.89 mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 7 (*Mucor hiemalis* 1SR) con 4.69 mg/mL·gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera permanente la

máxima actividad se observó en la cepa 26 (*Penicillium restrictum* 5R) con 224.07 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 20 (*Penicillium purpurascens* 1R) con 25.75 mg/mL·gr micelio.

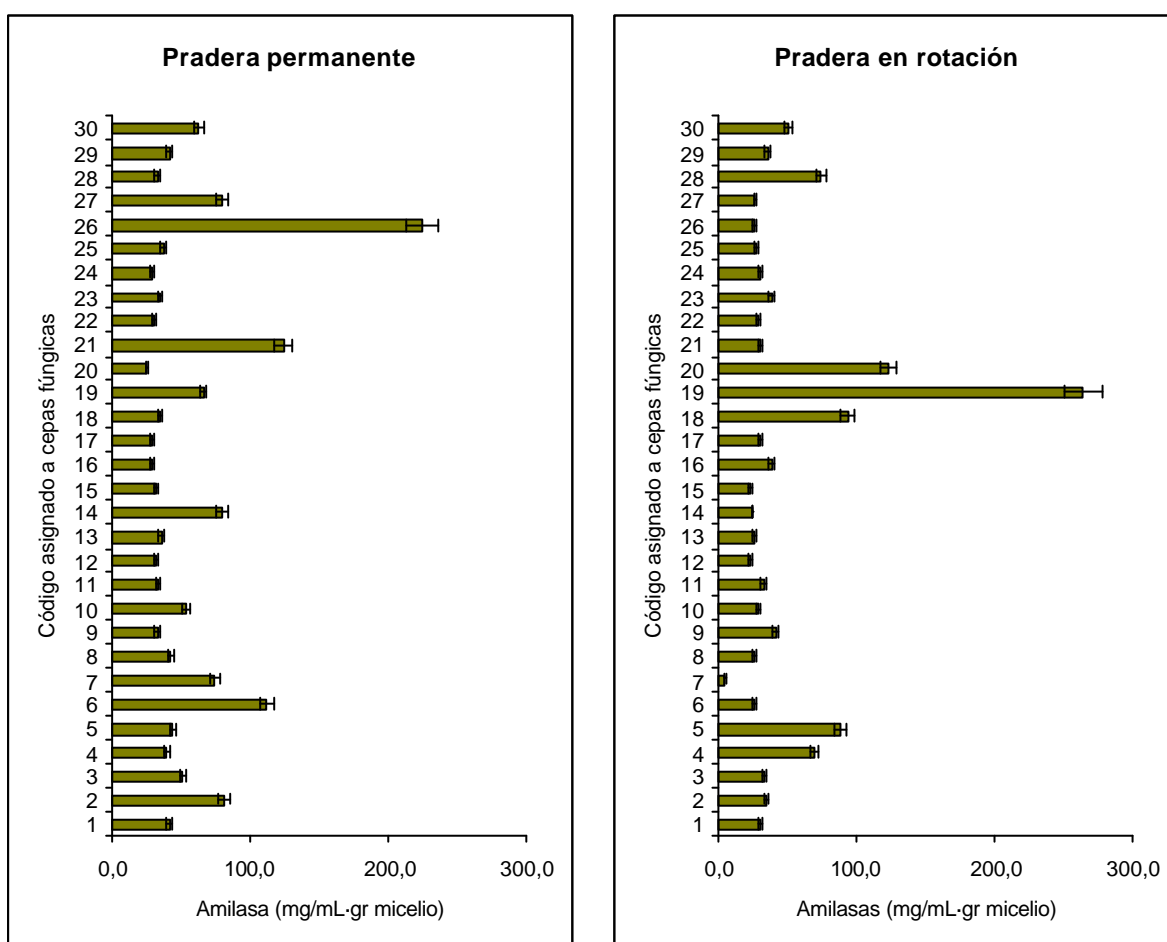


Figura 7. Actividad amilolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens* de pradera en rotación y permanente.

4.2.2. Celulasas

En la Figura 8, se observa la actividad celulolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *T. repens* cultivado en pradera permanente y en rotación.

Como se aprecia en la Fig. 8, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 18 (*Penicillium restrictum* 6SR) con 0.793

mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 7 (*Mucor hiemalis* 1SR) con 0.00046 mg/mL·gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 6 (*Geotrichum candidum* 1SR) con 1.06537 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 10 (*Penicillium commune* 1SR) con 0.00763 mg/mL·gr micelio.

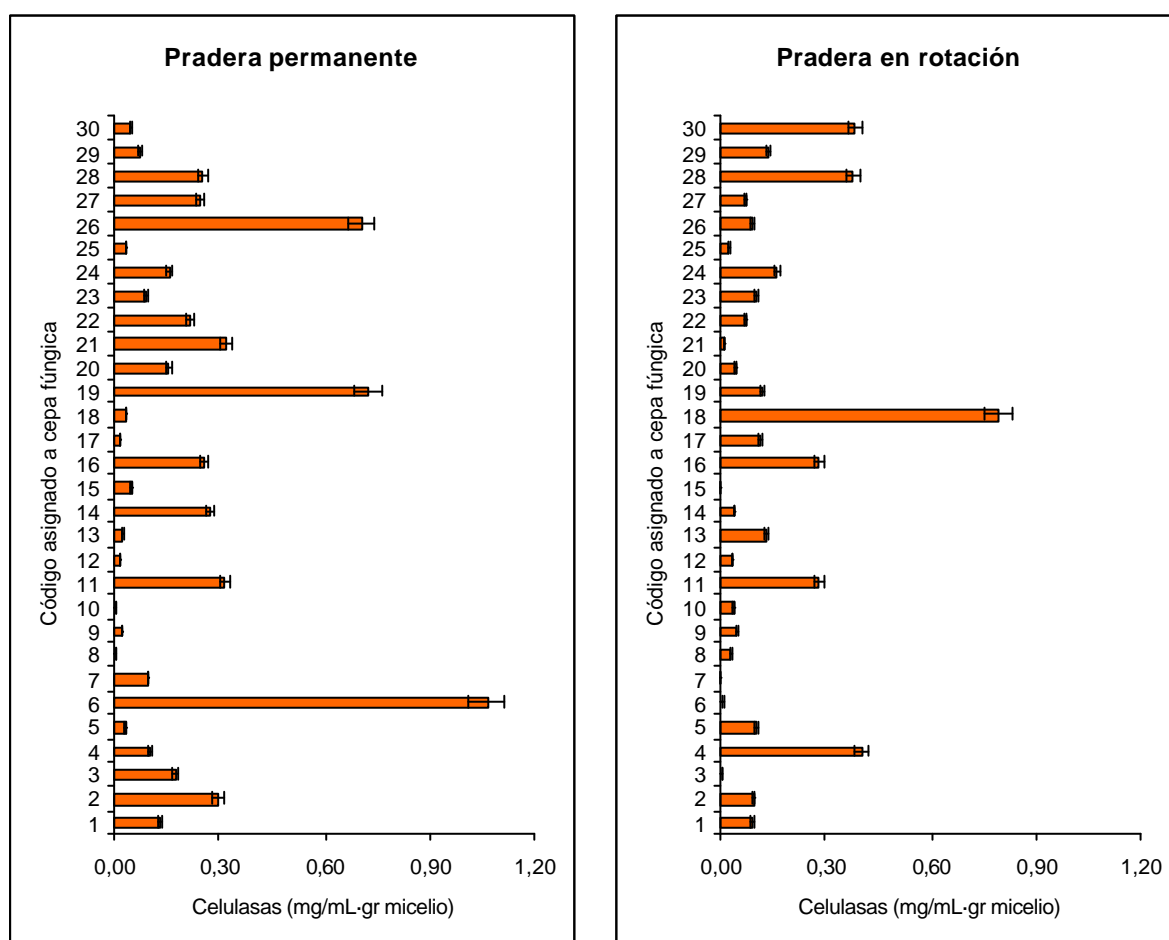


Figura 8. Actividad celulolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens* de pradera en rotación y permanente.

4.2.3 Ureasas

En la Figura 9, se observa la actividad ureolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *T. repens* cultivado en pradera permanente y en rotación.

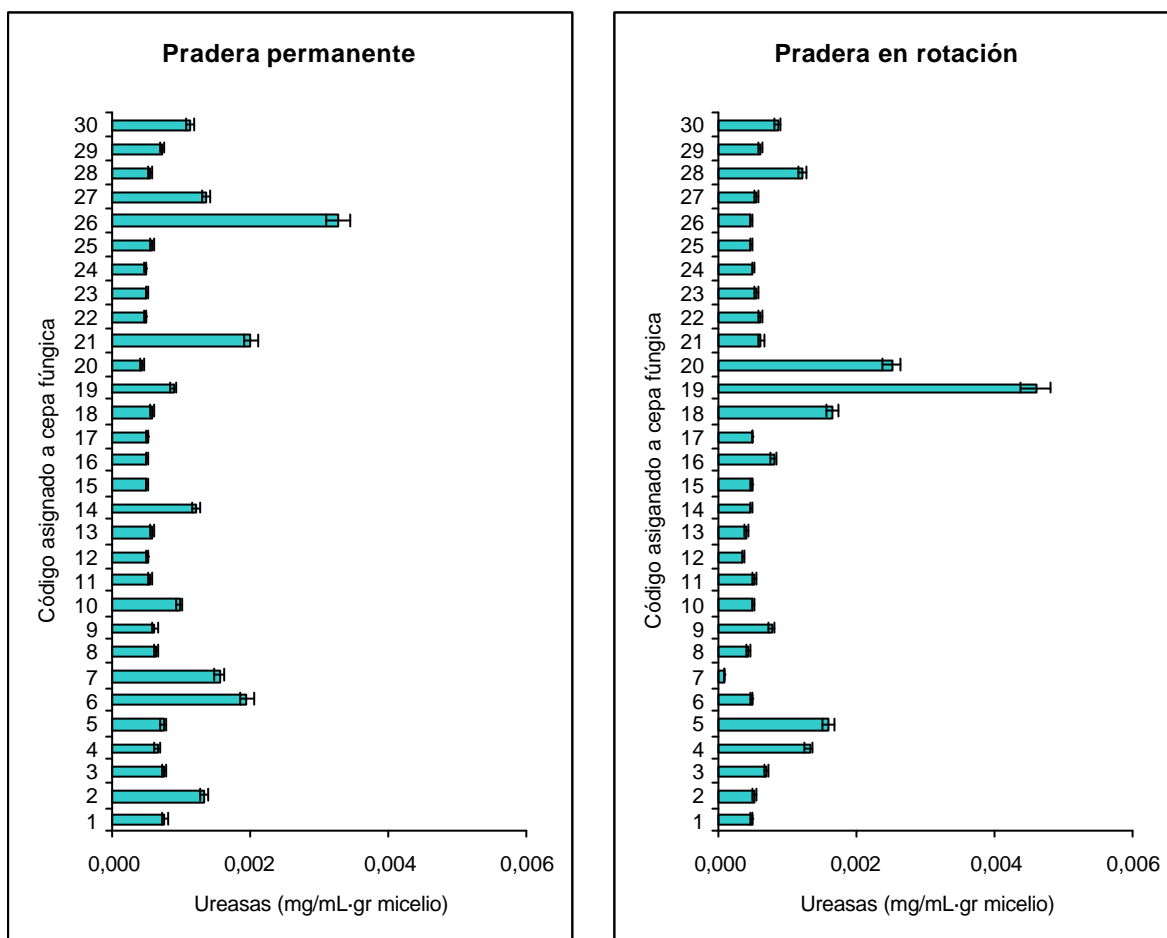


Figura 9. Actividad ureásica de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens* de pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 9, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 19 (*Penicillium restrictum* 7SR) con 0.00459 mg/mL-gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 7 (*Mucor hiemalis* 1SR) con 0.00008 mg/mL-gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 26 (*P. restrictum* 5R) con 0.00328 mg/mL-gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 20 (*Penicillium purpurascens* 1R) con 0.00042 mg/mL-gr micelio.

4.2.4 Fosfatasa (ácida y alcalina).

En la Tabla 3, se muestra las mejores cepas fúngicas, que luego del análisis de varianza (ANDEVA) presentaron los valores más altos para fosfatasa ácida y alcalina. Se deja constancia que todas las cepas fúngicas ensayadas presentaron actividad enzimática para ambas enzimas.

Código cepa fúngica	Actividad Fosfatásica las mejores cepas fúngicas rizosféricas aisladas desde <i>T. repens</i>			
	Pradera en rotación		Pradera permanente	
	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina
2	-----	-----	16.73 ± 3.2	14.55 ± 1.7
5	5.11 ± 2.0	4.34 ± 12.2	-----	-----
6	-----	-----	22.08 ± 5.0	19.59 ± 9.7
26	-----	-----	25.16 ± 23.6	22.81 ± 34.9
30	18.73 ± 9.6	4.37 ± 0.7	-----	-----

Tabla 3. Actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *T. repens*.

En la Tabla 3, se aprecia a la cepa fúngica n° 26 (*Penicillium restrictum* 5R), aislada desde la rizósfera de *T. repens* cultivada en una pradera permanente, presentó el máximo de actividad fosfatásica para ambas enzimas (ácida y alcalina). Las otras cepas fúngicas presentaron actividad fosfatásica ácida y alcalina, pero no necesariamente los valores para ambas enzimas fueron altos, así por ejemplo la cepa n° 30 presenta los valores de 18.73 ± 9.6 mg/mL·gr micelio para fosfatasa ácida, pero un bajo valor (4.37 ± 0.7 mg/mL·gr micelio) para fosfatasa alcalina.

A continuación, se presentan el resultado de la ANDEVA a cual fueron sometidas las 60 cepas aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente y en rotación, que presentaron actividad para fosfatasa ácida y alcalina, luego de ser agrupadas en géneros.

4.2.4.1 Fosfatasa ácida

En la figura 10, se observa la actividad de fosfatasa ácida de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *T. repens* cultivado en pradera permanente y en rotación.

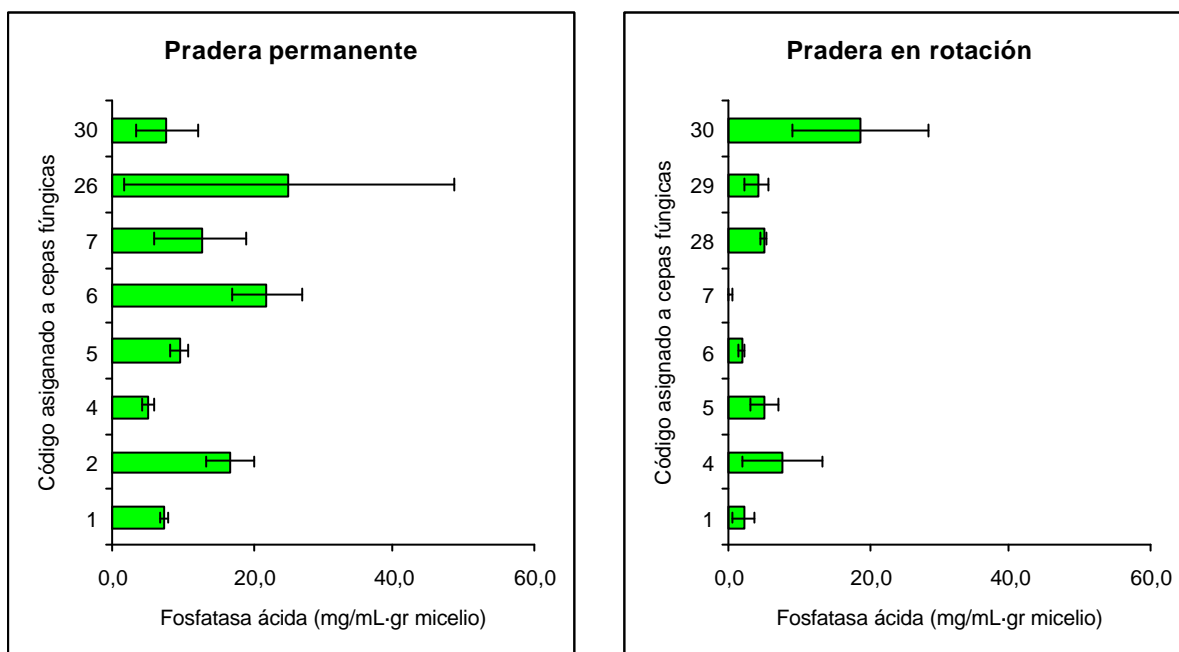


Figura 10. Actividad de fosfatasa ácida de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens*, pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 10, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera en rotación, la máxima actividad la presentaron en las cepas 4 (7.61 mg/mL·gr micelio *Aspergillus subsessilis* 1SR) y 30 (18.73 mg/mL·gr micelio *Trichoderma koningii* 1R) no existe diferencias significativas entre ambas cepas. La mínima actividad la presentaron las cepas 1 (2.13 mg/mL·gr micelio *Absidia cylindrospora* 1R) y 7 (0.24 mg/mL·gr micelio *Mucor hiemalis* 1SR) difieren en forma significativa con respecto a las otras cepas fúngicas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 26 (*Penicillium restrictum* 5R) con 25.16 mg/mL·gr micelio, la mínima se observó en la cepa 4

(*Eurotium amstelodami* 1SR) con 5.05 mg/mL·gr micelio. Sin embargo, estadísticamente no hay diferencia significativa entre las cepas seleccionadas.

4.2.4.2 Fosfatasa alcalina

En la Figura 11, se observa la actividad de fosfatasa ácida de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *T. repens* cultivado en pradera permanente y en rotación.

Como se aprecia en la Fig. 11, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 5 (*Cladosporium cladosporoides* 1R) con 7.34 mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 7 (*Mucor hiemalis* 1SR) con 0.03 mg/mL·gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 26 (*Penicillium restrictum* 5R) con 22.81 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 4 (*Eurotium amstelodami* 1SR) con 5.09 mg/mL·gr micelio. Sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa entre las cepas seleccionadas, tanto como para las cepas fúngicas aisladas desde la pradera en rotación como para las aisladas de la pradera permanente.

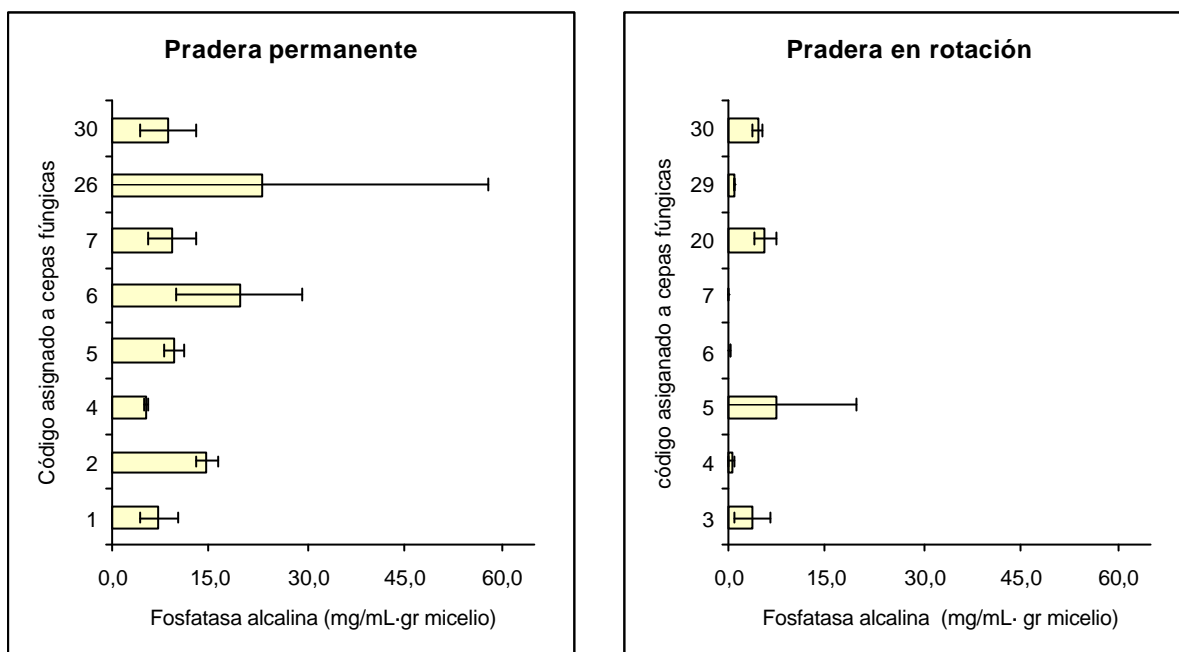


Figura 11. Actividad de fosfatasa alcalina de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens*, pradera en rotación y permanente.

4.2.5 Proteasas

En la Figura 12, se observa la actividad proteolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *T. repens* cultivado en pradera permanente y en rotación.

Como se aprecia en la Fig. 12, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 19 (*Penicillium restrictum* 7SR) con 34.45 mg/mL-gr micelio, la mínima actividad en la cepa 7 (*Mucor hiemalis* 1SR) con 0.38 mg/mL-gr micelio. Ambas, presentan diferencias significativas con respecto a las otras cepas fúngicas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *T. repens* de pradera permanente la máxima actividad la presentaron las cepas 2

(14.29 mg/mL·gr micelio, *Bauveria bassiana* 1SR), 7 (18.02 mg/mL·gr micelio, micelio estéril “B” 1SR) y 27 (20.08 mg/mL·gr micelio, *P. restrictum* 6R) no se presentó diferencia significativa entre las cepas fúngicas nombradas anteriormente. La mínima actividad se presentó en las cepas 5 (5.40 mg/mL·gr micelio *Fusarium oxysporum* 1R) y 6 (7.11 mg/mL·gr micelio *Geotrichum candidum* 1SR). no existe diferencia significativa entre ellas.

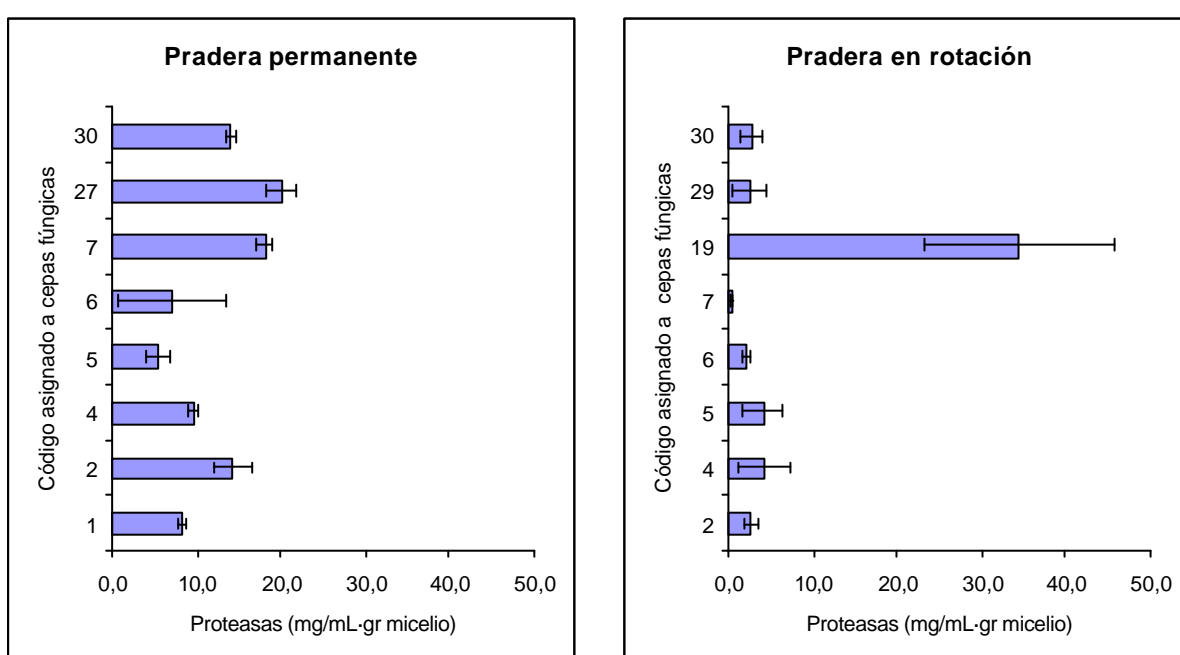


Figura 12. Actividad proteolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *T. repens*, pradera en rotación y permanente.

4.3 Perfiles enzimáticos de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* L. (Pasto Ovillo).

4.3.1 Amilasas

En la Figura 13, se observa la actividad amilolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *D. glomerata* cultivado en pradera permanente y en rotación.

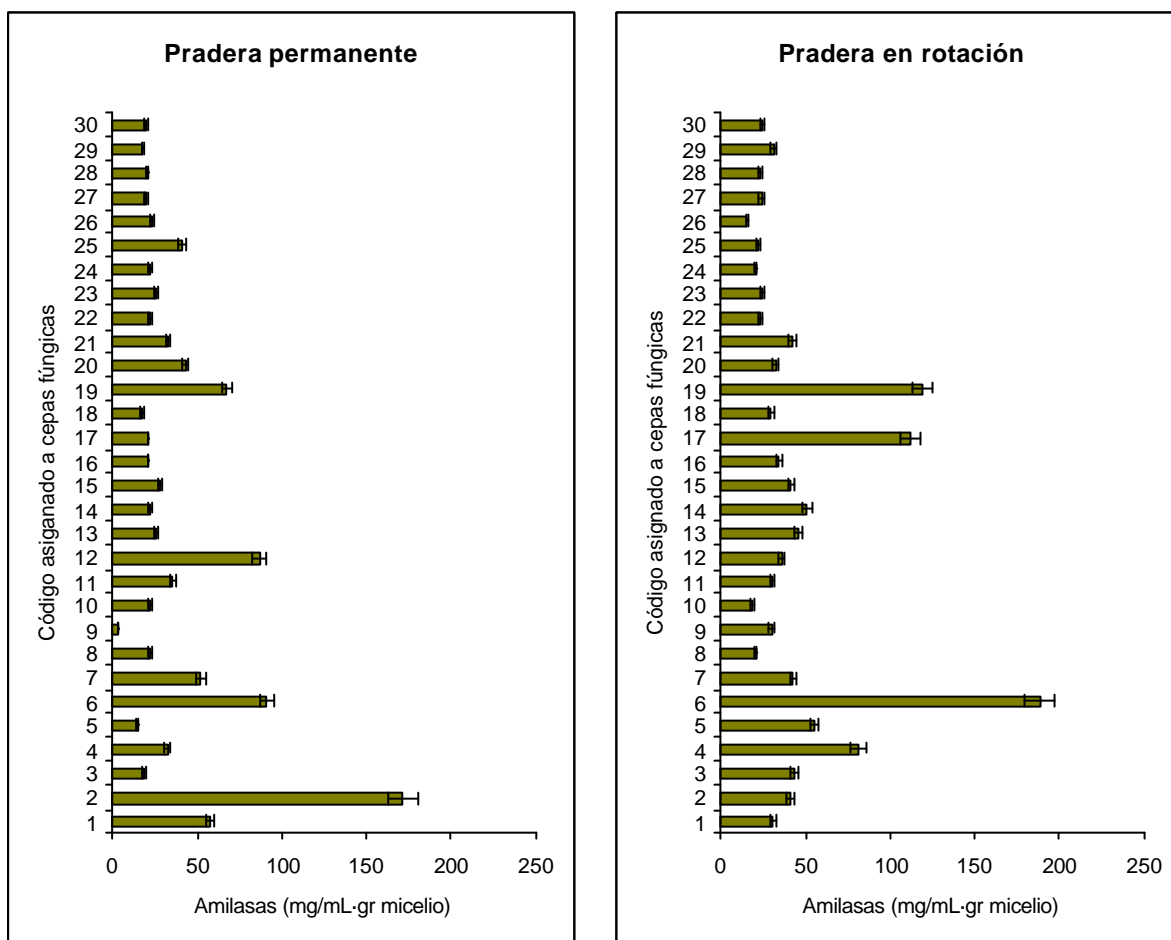


Figura 13. Actividad amilolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 13, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 6 (*Fusarium oxysporum* 1R) con 188.27 mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 26 (*Penicillium restrictum* 6SR) con 15.13 mg/mL·gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 2 (*Acremonium breve* 1SR) con 171.30 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 9 (*Phialophora mutabilis* 1R) con 3.38 mg/mL·gr micelio.

4.3.2 Celulasas

En la Figura 14, se observa la actividad celulolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *D. glomerata* cultivado en pradera permanente y en rotación.

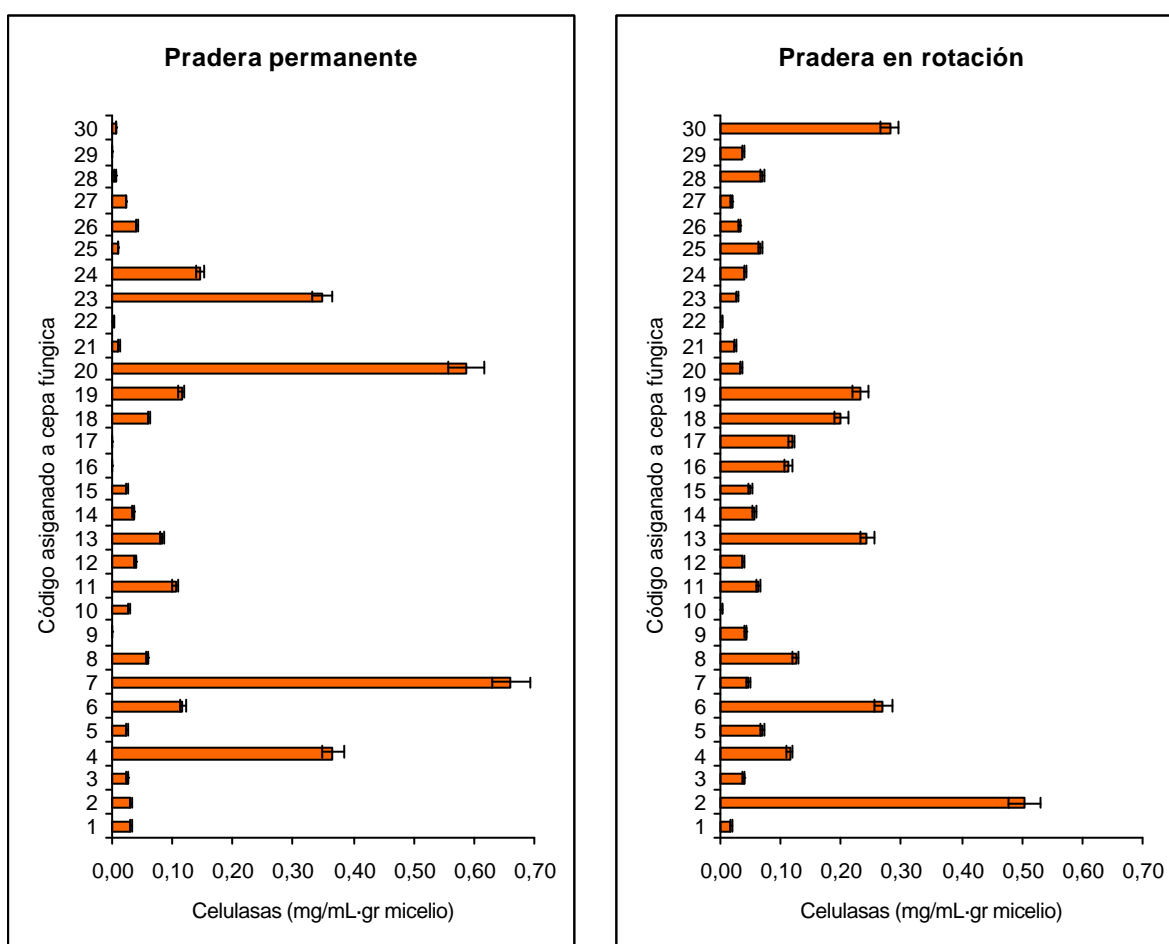


Figura 14. Actividad celulolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 14, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 2 (*Absidia glauca* 1SR) con 0.503 mg/mL-gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 10 (*Mucor hiemalis* 2SR) con 0.00267 mg/mL-gr micelio. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 7 (*M. hiemalis* 1SR) con 0.6609 mg/mL-gr

micelio, y la mínima se observó en la cepa 9 (*Phialophora mutabilis* 1R) con 0.00019 mg/mL·gr micelio.

4.3.3 Ureasas

En la Figura 15, se observa la actividad ureolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *D. glomerata* cultivado en pradera permanente y en rotación.

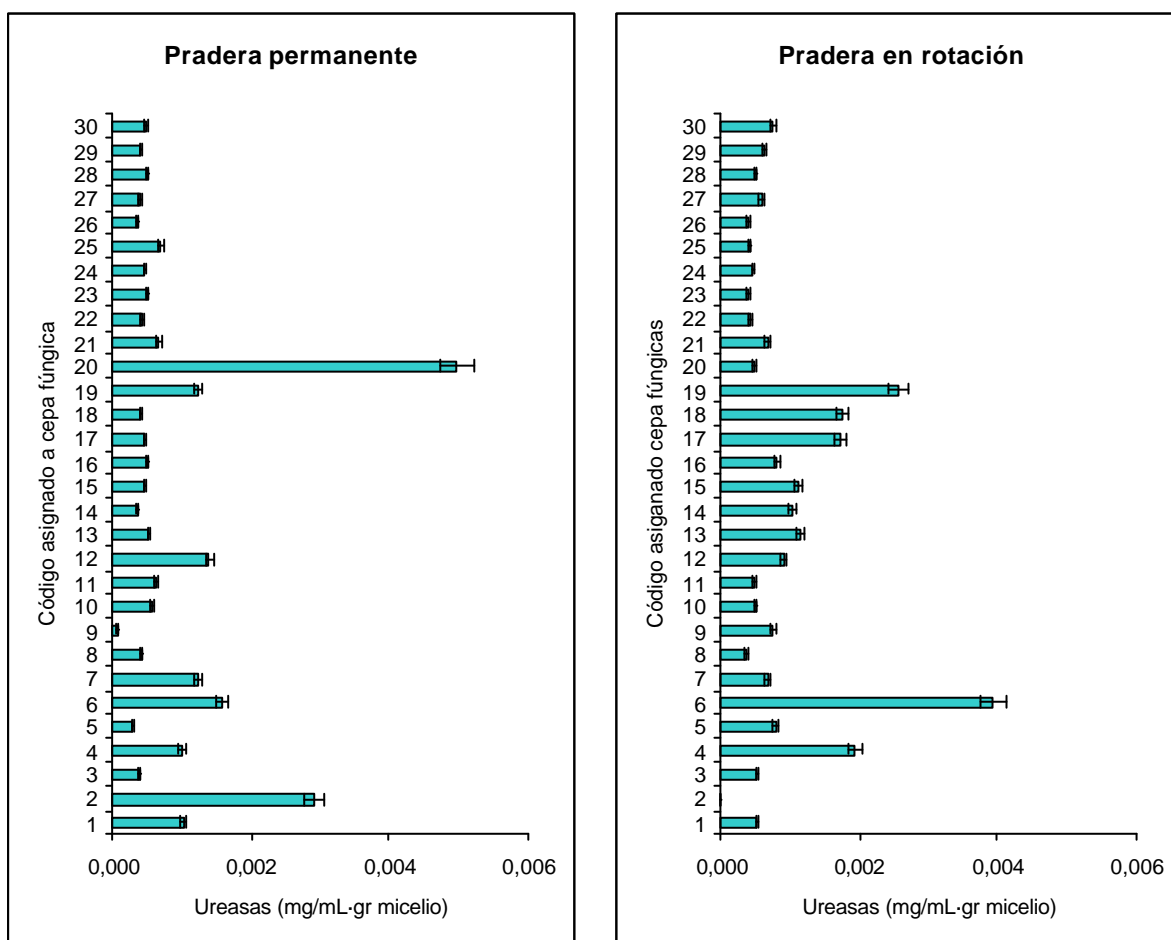


Figura 15. Actividad ureolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata* de pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 15, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 6 (*Fusarium oxysporum* 1R) con 0.00394 mg/mL·gr micelio, y la mínima actividad en la cepa 8 (*Mortierella vinacea* 1SR) con 0.00036

mg/mL·gr micelio. Por su parte la cepa 2 no presentó actividad ureolítica (*Absidia glauca* 1SR). De las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 20 (*Penicillium frequentans* 2SR) con 0.00497 mg/mL·gr micelio, y la mínima se observó en la cepa 9 (*Phialophora mutabilis* 1R) con 0.00007 mg/mL·gr micelio.

4.3.4 Fosfatasa (ácida y alcalina)

En la Tabla 4, se muestra las mejores cepas fúngicas, que luego del análisis de varianza (ANDEVA) presentaron los valores más altos para fosfatasa ácida y alcalina. Se deja constancia que todas las cepas fúngicas ensayadas presentaron actividad enzimática para ambas enzimas.

Código cepa fúngica	Actividad Fosfatásica de las mejores cepas fúngicas rizosféricas aisladas desde <i>D. glomerata</i> .			
	Pradera en rotación		Pradera permanente	
	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina
1	-----	-----	18.72 ± 1.0	13.51 ± 1.3
2	-----	-----	69.33 ± 3.5	44.32 ± 1.3
4	19.38 ± 1.3	19.88 ± 0.2	-----	-----
6	30.43 ± 3.0	6.09 ± 5.9	-----	-----
6	-----	-----	33.14 ± 3.8	21.50 ± 1.9

Tabla 4. Actividad fosfatásica (ácida y alcalina) de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata*.

En la Tabla 4, se aprecia a la cepa fúngica nº 2 (*Absidia glauca* 1SR), aislada desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivada en una pradera permanente, presentó el máximo de actividad fosfatásica para ambas enzimas (ácida y alcalina). Las otras cepas fúngicas presentaron actividad fosfatásica ácida y alcalina, pero no necesariamente los valores para ambas enzimas fueron altos,

así por ejemplo la cepa n° 6 presenta los valores de 30.43 ± 3.0 mg/mL·gr micelio para fosfatasa ácida, pero un bajo valor (6.09 ± 5.9 mg/mL·gr micelio) para fosfatasa alcalina.

A continuación, se presentan el resultado de la ANDEVA a cual fueron sometidas las 60 cepas aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivadas en pradera permanente y en rotación, que presentaron actividad para fosfatasa ácida y alcalina, luego de ser agrupadas en géneros.

4.3.4.1 Fosfatasa ácida

En la Figura 16, se observa la actividad de fosfatasa ácida de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *D. glomerata* cultivado en pradera permanente y en rotación.

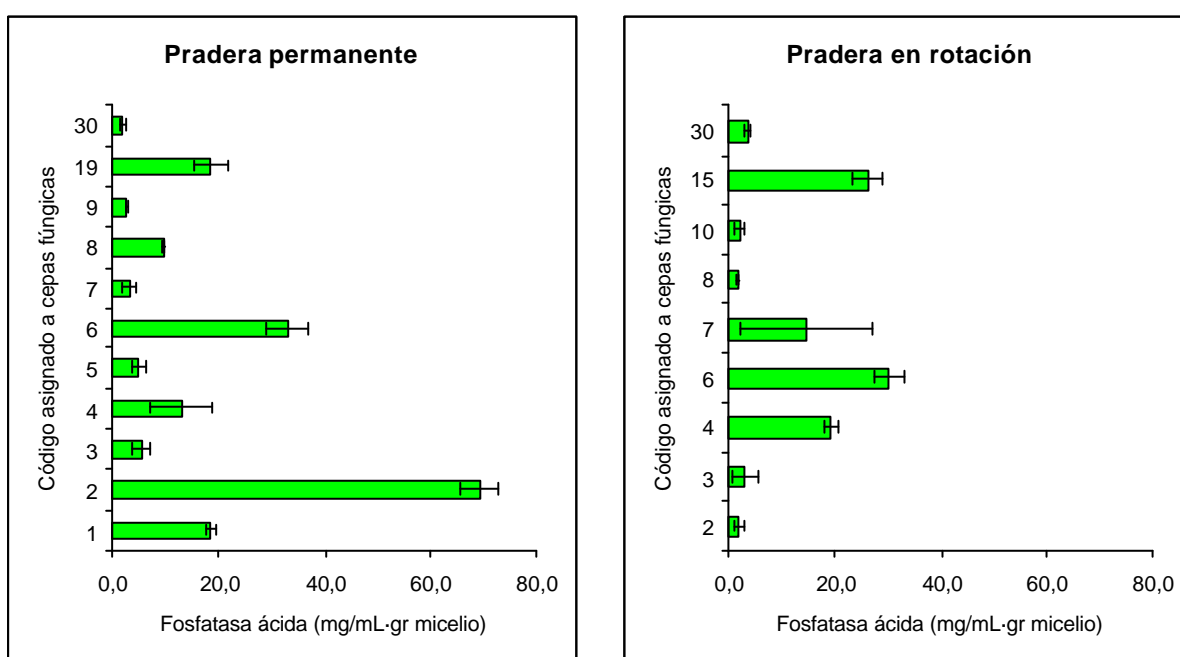


Figura 16. Actividad de fosfatasa ácida de cepas fúngicas rizósfericas de *D. glomerata*, pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 16, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera en rotación, la máxima actividad las presentaron las cepas 6 (30.43 mg/mL·gr micelio *Fusarium oxysporum* 1R) y 15 (26.19 mg/mL·gr micelio *Penicillium frequentans* 2SR), no existe diferencias significativas entre ellas, y la mínima actividad la presentaron las cepas 2 (1.94 mg/mL·gr micelio, *Absidia glauca* 1SR), 3 (3.03 mg/mL·gr micelio *Aspergillus niger* 1R), 8 (1.72 mg/mL·gr micelio *Mortierella vinacea* 1SR) y 10 (2.11 mg/mL·gr micelio *Mucor hiemalis* 2SR), no hay diferencias significativas entre ellas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 2 (*Acremonium breve* 1SR) con 69.33 mg/mL·gr micelio difiriendo estadísticamente con respecto a las otras cepas fúngicas. La mínima se observó en las cepas 7 (3.17 mg/mL·gr micelio *Mucor hiemalis* 1SR) y 30 (1.83 mg/mL·gr micelio *Trichoderma konningii* 1SR) las cuales no difieren significativamente entre sí.

4.3.4.2 Fosfatasa alcalina

En la Figura 17, se observa la actividad de fosfatasa alcalina de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *D. glomerata* cultivado en pradera permanente y en rotación.

Como se aprecia en la Fig. 17, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 4 (*Chaetomium globosum* 1R) con 19.88 mg/mL·gr micelio, la cual difiere en forma significativa de las otras cepas fúngicas seleccionadas, la mínima actividad la presentaron las cepas 3 (2.05 mg/mL·gr micelio *Aspergillus niger* 1R), 6 (6.09 mg/mL·gr micelio *Fusarium oxysporum* 1R), 8 (1.48 mg/mL·gr micelio *Mortierella vinacea* 1SR) y 30 (0.58 mg/mL·gr micelio *Zygorhynchus moelleri* 1SR) las cuales no presentaron diferencias significativas entre si. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *D.*

glomerata de pradera permanente la máxima actividad se observó en la cepa 2 (*Acremonium breve* 1SR) con 44.32 mg/mL·gr micelio, presentando una diferencia significativa con respecto a las otras cepas fúngicas. La mínima actividad se observó en la cepas 3 (2.62 mg/mL·gr micelio *Aspergillus niger* 1R), 7 (0.73 mg/mL·gr micelio *Mucor hiemalis* 1SR) y 30 (0.86 mg/mL·gr micelio *Trichoderma koningii* 1SR) las cuales no presentan diferencias significativas entre si.

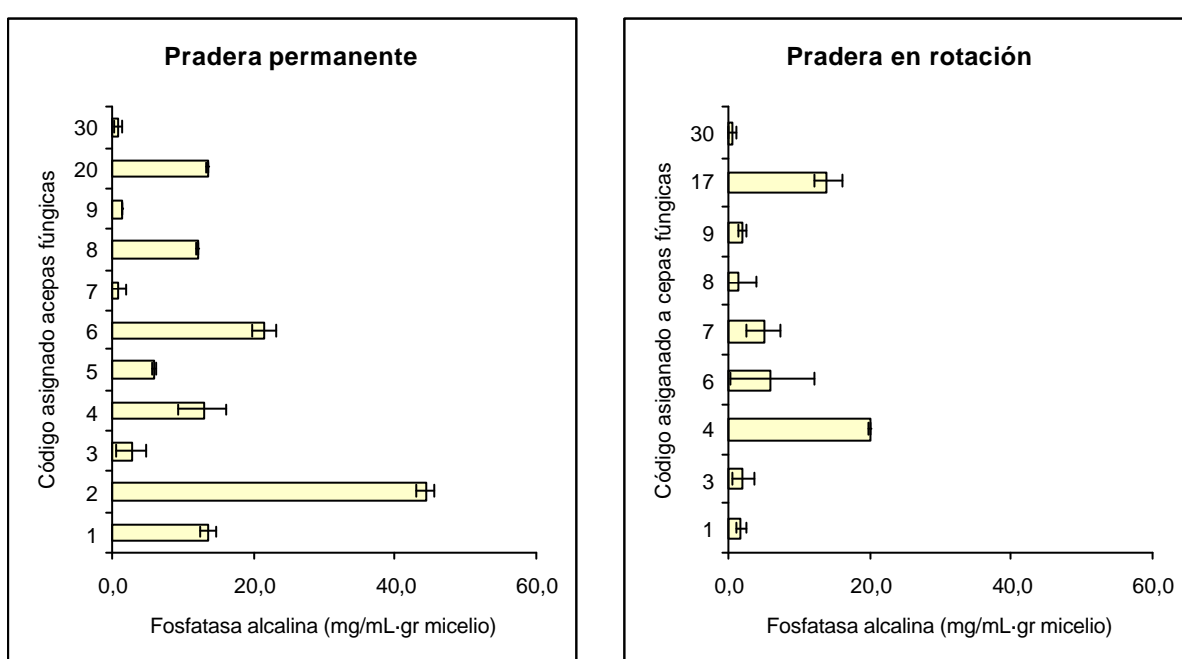


Figura 17. Actividad de fosfatasa alcalina de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata*, pradera en rotación y permanente.

4.3.5 Proteasas

En la Figura 18, se observa la actividad proteolítica de las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera *D. glomerata* cultivado en pradera permanente y en rotación.

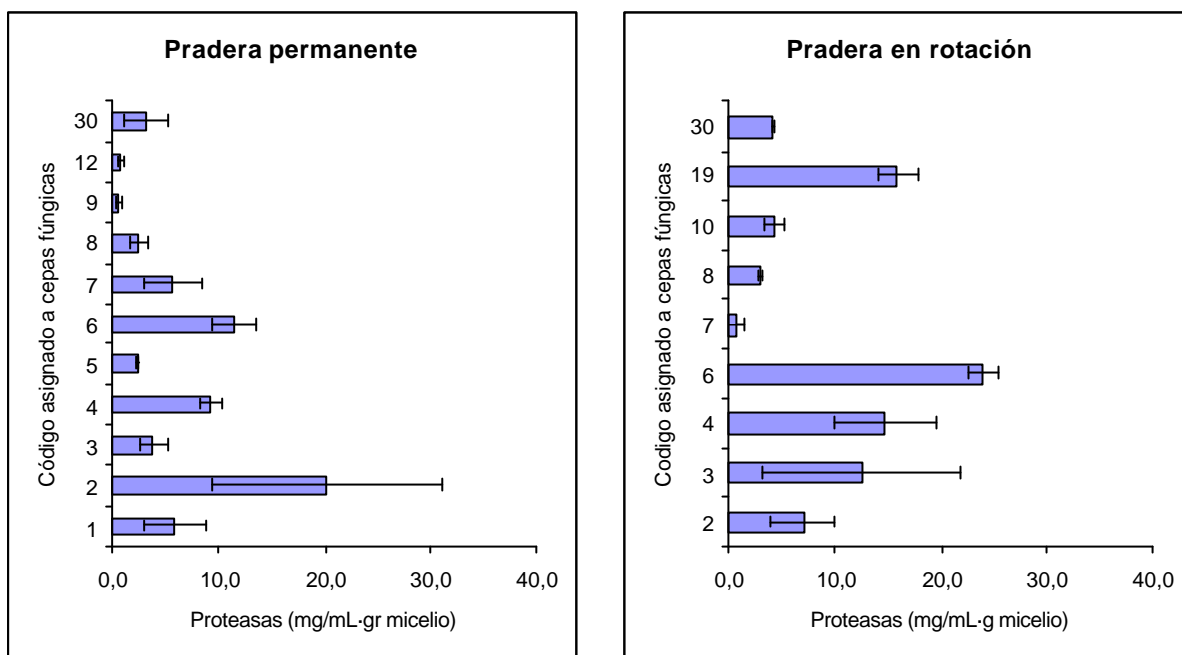


Figura 18. Actividad proteolítica de cepas fúngicas rizosféricas de *D. glomerata*, pradera en rotación y permanente.

Como se aprecia en la Fig. 18, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera en rotación, la máxima actividad se presentó en la cepa 6 (*Fusarium oxysporum* 1R) con 23.96 mg/mL·gr micelio, la mínima actividad en la cepa 7 (*Microsporium gypseum* 1R) con 0.67 mg/mL·gr micelio, ambas difieren significativamente con respecto a las otras cepas fúngicas. Por su parte, de las cepas fúngicas aisladas de *D. glomerata* de pradera permanente la máxima actividad se observaron en las cepas 2 (20.31 mg/mL·gr micelio *Acremonium breve* 1SR), 4 (9.28 mg/mL·gr micelio *Aspergillus terreus* 1R) y 6 (11.49 mg/mL·gr micelio *Geotrichum candidum* 1SR) no presentaron diferencias significativas entre sí. La mínima actividad se observó en las cepas 9 (0.60 mg/mL·gr micelio *Phialophora mutabilis* 1R) y 12 (0.80 mg/mL·gr micelio *Penicillium chrysogenum* 3SR), no presentaron diferencias significativas entre sí.

5. DISCUSIÓN

5.1. Actividad amilolítica, celulolítica, ureolítica, proteolítica y fosfatásica (ácida y alcalina) de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L., *Trifolium repens* L. y *Dactylis glomerata* L.

De acuerdo a los resultados señalados en los puntos 4.1.1; 4.2.1 y 4.3.1, independiente del origen de las cepas aisladas todas presentaron actividad amilolítica, cuyo máximo del total de cepas ensayadas (180) desde la rizósfera de las tres especies de plantas forrajeras, la presentó una cepa de *Penicillium chrysogenum* aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera permanente (ver Fig. 1), registrando una actividad de 1055.56 mg/mL·gr micelio. Estos resultados difieren de los informados por Domingues & Peralta (1993) para quienes la especie fúngica de *Aspergillus fumigatus* Fresenius aislado desde muestras de suelo, mostró el máximo de actividad para α -amilasa y glucosamilasa, determinada con un pH óptimo para la enzima de 6.0 y a 50°C. Sin embargo es coincidente con lo informado por Valenzuela *et al* (2001) quienes en cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde las hojas senescentes y hojarasca de *Nothofagus pumillo* observaron un potencial enzimático amilolítico de un 21,3% con respecto al total de cepas ensayadas detectando además una cepa de *P. chrysogenum* que presentó actividad amilolítica positiva.

En general, en las 180 cepas ensayadas aisladas desde las respectivas rizósferas, se observó alta actividad amilolítica, degradando casi la totalidad del almidón proporcionado como sustrato (10 mg/mL). Esto pudo deberse al medio de cultivo en que crecieron las cepas fúngicas (AEM al 2 % y CM al 1 %) que pudo inducir la alta actividad amilolítica. Así lo reporta Oso (1979) informando que la actividad de la amilasa estaba inducida principalmente por el almidón y

en una baja proporción por celobiosa, glucosa, fructosa, galactosa y maltosa. Además, se ha reportado que la maltosa es el mejor inductor de la actividad de α -amilasa extracelular de *Aspergillus oryzae* y en especies de *Humicola* sp. (Yabuki, M. *et al.* 1997; Oliveira, A. *et al.* 1991).

De acuerdo a los resultados señalados en los puntos 4.1.2; 4.2.2 y 4.3.2, independiente del origen de las cepas aisladas todas presentaron actividad celulolítica, cuyo máximo de actividad celulolítica la presentó una cepa de *Penicillium chrysogenum* aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera permanente (ver Fig. 2), registrándose una actividad de 6.149 mg/mL·gr micelio. Por su parte, las cepas que presentaron el máximo de actividad celulolítica, aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera en rotación fue una cepa de *Absidia cilindrospora*, la cepa aislada desde la rizósfera de *T. repens* cultivado en pradera permanente, una especie de *P. restrictum* y la cepa aislada desde la pradera en rotación, *Geotrichum candidum*. Las cepas aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata*, con los máximos de actividad celulolítica, cultivadas en una pradera en rotación y permanente fueron las especies fúngicas *A. glauca* y *Mucor hiemalis*, respectivamente. Respecto a la actividad celulolítica Lee *et al.* (2002), reporta que la capacidad celulolítica está representado por un gran número de cepas fúngicas aeróbicas, realizándose estudios con respecto a sus enzimas celulolíticas y/o la degradación de la madera, incluyendo a cepas con actividad celulolíticas pertenecientes a los géneros Ascomicetes, Basidiomicetes y Deuteromicetes, como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*, Por su parte Vilches (2002) informa que las cepas celulolíticas de Huaylas predominaron los géneros *Aspergillus* (32.1%) y *Penicillium* (42.9%) y en menores porcentajes *Cladosporium* y *Fusarium*, mientras que las cepas celulolíticas de Huaraz predominó el género de *Fusarium*

(52%), seguido de *Penicillium* (28%) y en menores porcentajes *Chrysosporium*, *Aspergillus* y *Nigrospora*. Respecto a la actividad celulolítica *P. chrysogenum* presentó la mayor actividad, la cual equivale a 0.024 UI/mL. Vilches (2002), en cambio señala que las mayores actividades enzimáticas sobre papel filtro fueron logradas por cepas de Huaraz, siendo estas especies de *Fusarium* sp., cuyas actividades fueron 0.137 UI/mL y 0.112 UI/mL, y en tanto que la especies de *Penicillium* sp. arrojaron actividades de 0.051 UI/mL. Steiner *et al* (1994) lograron 0.22 UI/mL con *Penicillium purpurogenum* cultivado en medios Mandels & Weber con celulosa como fuente de carbono en agitación continua. Ceroni & Gutiérrez-Correa (1998) lograrón 0.462 UI/mL y 0.625 UI/mL en *Penicillium implicatum* y *P. spinolosum* respectivamente en cultivos con medios suplementados con vitaminas, un surfactante y lactosa (1%) como inductor, cultivadas en agitación. Cabe mencionar que los estudios realizados por Vilches (2002), fueron ensayados con sustrato de papel filtro, por el contrario, al sustrato utilizado en el presente estudio de CMC (carboximetilcelulosa sal sódica), que podría explicar la alta actividad celulolítica que mostraron las cepas fúngicas de *Absidia cilindrospora* y *A. Glauca*. Si bien, estas son especies saprófitas que en estudios cualitativos han presentado actividad celulolítica positiva, las especies que generalmente alcanzan las máximas actividades enzimáticas celulolíticas reportadas corresponden a *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Nigrospora* (Barboza & de Queiroz, 1997). Sin embargo, las experiencias que se realizan en laboratorio y condiciones controladas, generalmente utilizan como sustrato CMC (Domsh & Gams 1969; Flanagan, 1981) y esto es una aproximación de lo que ocurre en la naturaleza, ya que en ella esta actividad está afectada por un número importante de factores, tales como la disponibilidad del sustrato, condiciones óptimas de pH, composición mineral y disponibilidad de nutrientes, que se refleja en los cambios de la actividad celulolítica de una misma especie en distintos suelos (Lungdahl & Eriksson, 1985).

De acuerdo a los resultados señalados en los puntos 4.1.3 ; 4.2.3 y 4.4.3, Del total de cepas ensayadas, 178 de ellas presentó actividad ureolítica. El máximo lo presentó una cepa de *Penicillium chrysogenum*, aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera permanente (ver Fig. 3) registrándose una actividad de 18.52 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{gr}$ micelio. En general la actividad ureolítica fué baja, comparando con la actividad enzimática de las otras enzimas en estudio. Esta enzima (ureasa) desempeña un papel importante en el ciclo del nitrógeno, el producto de la reacción ureolítica el amonio y CO_2 , el amonio puede ser utilizado por las plantas y los microorganismos del suelo, esto explica el uso de urea como fertilizante nitrogenado, siendo de bajo costo y alto contenido de nitrógeno (Quin & Cabral, 2002). La ureasa ha sido aislada de varias bacterias, hongos y plantas superiores, generando en su conjunto cantidades considerables de actividad enzimática ureolítica en los suelos, esto es de gran importancia en la agricultura, ya que la rápida hidrólisis de la urea agregada como fertilizante realizada por las ureasas excretadas desde las bacterias del suelo provoca una improductiva volatilización del amonio y una amonio toxicidad o inducción de alcalinidad, dañando a la planta (Quin & Cabral, 2002). De acuerdo a lo anterior, la baja actividad ureásica obtenida por las cepas fúngicas aisladas desde las distintas rizósferas, resulta beneficioso para las 3 especies forrajeras, evitando la pérdida de los compuestos nitrogenados esenciales para la nutrición de las plantas. Además, debido a la pérdida del amonio por volatilización, se han realizado ensayos agrícolas mostrando que la inhibición de la ureasa puede ir combinada con el fertilizante, aumentando la eficiencia de utilización de nitrógeno (Quin & Cabral, 2002).

De acuerdo a los resultados señalados en los puntos 4.2.4; 4.3.4 y 4.4.4, independiente del origen de las cepas aisladas todas presentaron actividad fosfatásica ácida y alcalina, cuyo máximo del

total de cepas ensayas (180) la presentó una cepa de *Penicillium chrysogenum* aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera permanente (ver Fig. 4 y 5), registrándose una actividad de 139.68 mg/mL·gr micelio y 127.12 mg/mL·gr micelio, fosfatasa ácida y alcalina respectivamente. Por su parte los máximos de actividad fosfatásica excretados por cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera en rotación, corresponden a especies de *Penicillium* y muestran una actividad significativamente menor con respecto a la cepa aislada desde la misma rizósfera, pero cultivada en una pradera permanente. Guimaraes., *et al* (2003) aisló 30 especies de hongos filamentosos desde suelos de Brazilian, observaron una cepa de *Aspergillus caespitosus*, que produce y secreta altos niveles de fosfatasa alcalina en medios de cultivo suplementados con xilano. Estos resultados difieren a las cepas aisladas de *Aspergillus sp.* las cuales presentaron actividad fosfatásica ácida y alcalina, pero en una cantidad muy baja. Por su parte, Tarafdar & Rao (1999) ensayaron la eficiencia de cepas de *Aspergillus* en el suelo, evaluando los efectos de este hongo en las actividades enzimáticas rizosféricas de *Triticum aestivum* L. y *Cicer arietinum* Linn., concluyendo que *Aspergillus rugulosus* registró la mejor producción de fosfatasa, y *Aspergillus niger* la menor, en general el experimento mostró que las cepas de *Aspergillus* aumentan significativamente el P disponible y la producción de biomasa de *T. aestivum* y *C. arietinum*. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la disponibilidad de P en los suelos para la absorción por parte de las plantas, y los hongos filamentosos capaces de solubilizar fósforo, están enfocados a cepas fúngicas capaces de excretar ácidos orgánicos e inorgánicos (Varsha-Narsian.*et al* 1994; Valenzuela.*et al.* 2002), destacando en todos los casos cepas de *Aspergillus sp.* Por su parte, Borie *et al.*, (1983) determinó, in vitro, en 7 suelos derivados de cenizas volcánicas la población de bacterias y hongos capaces de solubilizar tanto fosfatos inorgánicos como orgánicos, observando que los hongos eran mas activos que las

bacterias: *Penicillium sp.*; *Aspergillus niger*; *Mucor sp.* y posiblemente *Botrytis sp.* , comprobando que existe una solubulización importante de fosfatos y del fitato del aluminio por *Aspergillus niger* y la posible *Botrytis sp.*, no dejando en claro el mecanismo de solubilización de los fosfatos. Estudios realizados por Weber & Pitt (1997) en la excreción de fosfatasa ácida por *Botrytis cinerea*, obtuvieron secreción activa de fosfatasas ácidas en medios líquidos enriquecidos con fosfatos, hidrolizando completamente los fosfatos orgánicos entre 24 y 48 horas de incubación, además observaron que la secreción de la enzima estuvo reprimida por la presencia de Pi, no inducida por el sustrato. En el presente estudio, es posible descartar la inhibición de la actividad enzimática, ya que el producto de la acción de las fosfatasas (ácida y alcalina) fue el p-nitrofenol, el cual fue cuantificado por espectrofotometría. Por su parte, Mamatha., *et al.* (2004) reportó que la actividad de fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, y deshidrogenasa fueron más altas en la rizósfera de un bosque de sándalos que la rizósfera de hierbas, donde el tipo de vegetación influencia en gran parte la presencia de fosfatasa ácida. Por su parte la fosfatasa alcalina es derivada de las poblaciones microbianas del suelo y observaron una correlación entre la actividad fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y el número de microorganismos del suelo; esto sugiere que la micoflora asociada a la rizósfera juega un importante rol en las transformaciones del fósforo.

De acuerdo a los resultados señalados en los puntos 4.1.5; 4.2.5 y 4.3.5, independiente del origen de las cepas aisladas todas presentaron actividad proteolítica, cuyo máximo del total de cepas ensayadas (180) la presentó una cepa de *Penicillium chrysogenum* aislada desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera permanente (ver Fig. 5), registrándose una actividad de 81.19 mg/mL·gr micelio. Al igual que ureasas, las proteasas son parte de las reacciones de mineralización en el ciclo del nitrógeno, fisiológicamente necesarias para la vida de los

organismos, omnipresentes, aisladas desde las plantas, animales y microorganismos. Las proteasas fúngicas son activas dentro de un rango amplio de pH (pH 4 a 11) y exhiben una amplia especificidad de sustratos, se ha estudiado en *Aspergillus oryzae* produce proteasas ácidas, neutras y alcalinas (Rao *et al.*,1998). En el presente estudio se cuantificó la acción de las proteasas en forma total, no especificado el pH al cual actuaba, siendo estas clasificadas en: endopeptidasas, exopeptidasas y de acuerdo a su sitio de acción (Rao *et al.*,1998) , por tanto, las exopeptidasas corresponderían a las excretadas por las cepas fúngicas, y específicamente Rao *et al.* (1998) informan que serina carboxipeptidasa ha sido aislada desde *Penicillium* sp., *Saccharomyces* sp., y *Aspergillus* sp. Con respecto a los máximos de actividad proteolítica obtenidos por las cepas fúngicas, se obtuvieron por especies de *Penicillium* sp.

En general se ha señalado que la calidad del suelo es uno de los factores más importantes para la sostenibilidad de la biosfera global, siendo definida de diferentes formas incluyendo los principios de productividad, sustentabilidad y calidad ambiental (España, 2003). En el presente estudio se observaron las diferencias entre la actividad enzimática de las cepas fúngicas aisladas desde las respectivas rizósferas las cuales fueron cultivadas con dos prácticas de manejo. En un experimento de campo en las sabanas ácidas del estado de Guarico, se determinó la actividad de algunas enzimas del suelo (deshidrogenasa y fosfatasa ácida) evaluando diferentes tipos de residuos (gramíneas, leguminosas y nativos), los resultados mostraron una clara diferencia, en la actividad de la deshidrogenasa, entre los residuos de gramíneas y leguminosas, con respecto a los suelos bajo residuos nativos y sin residuos. Por su parte la actividad de fosfatasa ácida fue mayor en los tratamientos con menor disponibilidad de P. Esto demostró la importancia del uso de prácticas de manejo conservacionistas (España, 2003). Albiach *et al.* (1996), realizaron un

estudio comparativo del contenido de materia orgánica, biomasa microbiana y de distintas actividades enzimáticas en diversos huertos de cítricos de la comunidad Valenciana, comprobaron que los huertos cultivados mediante métodos de agricultura ecológica presentaron valores claramente superiores en todos los parámetros estudiados a los de las parcelas de cultivo convencional, dejando en claro que el manejo ecológico induce a un incremento de la actividad del suelo causado tanto por el aporte de materia orgánica como por el estado de activación biológica en el que ésta se encuentra, componente fundamental de la fertilidad del mismo. Saucés *et al.* (1998) realizaron estudios en la actividad enzimática de estereasas, fosfatasas, y β -galactosidasas, en suelos de tres fincas ganaderas con pastos permanentes y manejo tradicional, situadas a diferente altitud, comprobaron que al aumentar la altitud disminuye el pH y aumenta el agua útil, la materia orgánica, la relación C/N, el nitrógeno total y la actividad de las tres enzimas estudiadas. Concluyendo que la actividad enzimática, en especial fosfatasas y estereasas en suelos del mismo tipo y meteorología podrían ser considerada parámetro indicador de la fertilidad del suelo.

En el presente estudio, las cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L. cultivado en pradera permanente, mostraron un alto número de cepas con actividad enzimática, para todas las enzimas ensayadas. Es posible que esta especie ejerza una influencia sobre la micoflora, ya que de acuerdo a la especie varían los exudados radiculares vertidos en la rizósfera. Sin embargo, la cepa fúngica que presentó la mayor actividad enzimática para las 6 enzimas estudiadas, fue aislada desde la rizósfera de *Lolium perenne* L. cultivada en pradera permanente *Penicillium chrysogenum*, siendo esta especie aislada desde las 3 rizósferas en estudio.

Este estudio permitió conocer la diversidad microbiológica y parámetros bioquímicos cuantificables capaces de evidenciar el estado de la fertilidad de los suelos, específicamente una porción que afecta directamente a las plantas, la rizósfera, y su interacción directa con los microorganismos y los procesos bioquímicos esenciales para el total desarrollo de l ecosistema. El perfil enzimático sirve como indicador de cambios en la estructura de los suelos, niveles de materia orgánica, captabilidad de los ciclos biogeoquímicos, indicador de los efectos negativos de contaminación, y por consiguiente indicador de la calidad del suelo. De esta forma, desde el punto de vista microbiológico y bioquímico, es posible calificar de buena calidad los suelos desde donde fueron extraídas las muestras, por la diversidad de taxas fúngicas encontradas y la actividad enzimática obtenida. Sin embargo, se observaron diferencias en sus perfiles enzimáticos, dependiendo de la rizósfera de donde fueron aisladas las cepas fúngicas y el tipo de manejo.

De acuerdo a los resultados obtenidos la hipótesis del presente estudio se acepta como fue formulada.

6. CONCLUSIONES

-Las 180 cepas fúngicas ensayadas presentaron actividad para las enzimas amilasa, celulasa, fosfatasa (ácida y alcalina) y proteasa.

-De las 180 cepas fúngicas ensayadas sólo tres: *Absidia glauca* 1SR aislada desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* (pradera en rotación), *Aspergillus niger* 2SR y *Penicillium restrictum* 1R aisladas desde *Lolium perenne* (pradera en rotación) no presentaron actividad ureolítica.

-La mayor actividad enzimática se determinó para amilasa variando de 0.66 mg/ml·gr.micelio (*Penicillium restrictum* 7SR, aislado desde la rizósfera de *L. perenne* de pradera en rotación) a 1055.56 mg/ml·gr.micelio (*P. chrysogenum* 2R, aislado desde la rizósfera de *L. perenne* de pradera permanente) y la menor actividad se determinó para ureasa variando de $7 \cdot 10^{-5}$ mg/ml·gr.micelio (*Phialophora mutabilis* 1R, aislada desde la rizósfera de *D. glomerata* de pradera permanente) a 0.0185 mg/ml·gr.micelio (*P. chrysogenum* 2R, aislado desde la rizósfera de *L. perenne* de pradera permanente).

-El mayor y menor peso seco micelial se determinó para la cepa *Mucor hiemalis* 1SR (2.39 grs.) aislada desde la rizósfera de *Trifolium repens* (pradera en rotación) y para la cepa *Penicillium chrysogenum* 2R (0.01 grs.) aislada desde la rizósfera de *L. perenne* (pradera permanente), respectivamente.

-Al relacionar el peso seco con la actividad enzimática se determinó que siempre a menor peso seco mayor actividad enzimática.

-De las 180 cepas fúngicas ensayadas *Penicillium chrysogenum* 2R (aislada desde la rizósfera de *L. perenne* de pradera permanente) fue la que presentó las máximas actividades para las 6 enzimas cuantificadas, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

7. BIBLIOGRAFIA

- **Albiach, R., Pomares, F. & Canet, R. (1996).** Actividades enzimáticas como índices de la actividad biológica del suelo en huertos ecológicos cítricos. Agricultura ecológica y desarrollo rural. Actas del II Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE). Pamplona-Iruña. 584 p. Web: <http://www.agroecología.net> (citado 2 Diciembre 2003)
- **Benítez, E. Melgar, R., Sainz, H., Gómez, M. & Nogales, R. (2000).** Enzymes activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annuum*, L) grown with olive cake mulches. Soil Biology and Biochemistry 32(13):1829-1835.
- **Borie, F., Quinteros, J. & Aguilera, M. (1983).** Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas, 4. Solubilización de fosfatos por hongos del suelo. Agricultura Técnica 43 (4): 371-376.
- **Ceroni, A. & Gutierrez-Correa, M. (1988).** Citado por Vilches, L. (2002). Determinación de la actividad de exonucleasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 90 p.
- **Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIS (2001).** Cuarto informe del diagnóstico sobre la situación ambiental del entorno de la ría Huelva. Departamento de comunicación y prensa del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIS). Web: <http://www.csic.es/prensa/Riahuelva4.html> (citado 2 Diciembre 2003)
- **Dick, W. & Tabatabai, M. (1993).** Significance and potential uses of soil enzymes. Hydrobiologia 352: 251-262.

- **Domínguez, C. & Peralta, R. (1993).** Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of a selected strain (*Aspergillus fumigatus fresenius*). Canadian Journal of Microbiology 39 (7):681-685.
- **España, M. (2003).** Evaluación de la calidad del suelo a través de indicadores bioquímicos. Biología de Suelo. Seminario CENIAP.
Web: <http://www.CENIAP.Gov.ve/Seminarios/Mespaña.htm> (citado 28 diciembre 2004)
- **Fan, L., Lee, Y. & Gharpuray, M. (1982).** The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Microbial reaction. Advances in Biochemical Engineering 23: 157.
- **García, C. Hernández, T., Roldan, A. & Albaladejo, J. (1997).** Biological and biochemical quality of a semiarid soil after induced devegetación. Soil processes and chemical transport. J. Environ. Qual. 26: 1116-1122.
- **Gehl, K. (2002)** Phosphatase activity of soil. Soil Microbial Ecology. Web: http://www.oznel.ksu.edu/ed_agro645/lab/645lab5.htm (citado 25 Noviembre 2003)
- **Gomez de Guinan, Y. & Nageswara, I., (1996).** Effect of the rhizosphere of peanut (*Papilloniaceae*) on the fungal flora and the activity of phosphatases. Caribbean Journal of Science 32 (2):214-220.
- **Goyal, S., Mishra, M., Dhankar, S., Kapoor, K. & Batra, r. (1993).** Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term application. Biology and Fertility of Soil 15: 60-64.

- **Guía de trabajos prácticos de bioquímica Bioq. 160 (2001).** Instituto de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia.
- **Guimaraes, LH., Terenzi, HF., Jorge, JA., Leone, FA. & Polizeli, ML. (2003).** Extracellular alkaline phosphatase from the filamentous fungus *Aspergillus caespitosus*: purification and biochemical characterization. *Folia Microbiológica* 48 (5): 627-32.
- **Han, Y., Dunlap, C. & Callihan, C. (1971).** Single cell protein from cellulosic waste. *Food Technology* 25:130,32-35.
- **Haim, L. (2000).** Guía de prácticos Conceptos y Técnicas de Biotecnología I. Departamento de fisiología, biología molecular y celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Argentina. Web: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/cytdb1gtp/amilasagtp.doc> (citado 2 diciembre 2003)
- **Harris, J. & Birch, P. (1989).** Soil microbial activity in opencast coal mine restoration. *Soil Use Manag.* 5,155-160.
- **Hattori, H. (1998).** Microbial activities in soil amended with sewage sludge. *Soil Science and Plant Nutrition*, 34:221-232.
- **Jenkinson, D. & Ladd, J. (1981),** citados en Albiach, R., Pomares, F. & Canet, R. Actividades enzimáticas como índices de la actividad biológica del suelo en huertos ecológicos de cítricos. *Agricultura ecológica y desarrollo rural. Actas del II Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica (SEAE).* Pamplona-Iruña. 584 p. Web: <http://www.agroecología.net> (citado 2 Diciembre 2003)
- **Jones, C., Lonergan, G. & Mainwaring, D. (1995).** Acid phosphatase positional correlations in solid surface fungal cultivation: a fractal interpretation of

- biochemical differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208 (3): 1159-1165.
- **Ladd, J. (1978)**, Origin and range of enzymes in soil. En soil enzymes (R.G. Burns, ed.), Academic Press, New York, 51-96 p.
 - **Ladisch, M., Lin, K., Voloch, M. & Tsao, G (1983)**. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 82-102. Martens, R. (1992). A comparison of soil adenine nucleotide measurements by HPLC and enzymatic analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 639-645.
 - **Mamatha, G., Jayanthi, S., Bag & Raj, D & Suresh, C. (2004)**. Preliminary survey of microbial communities and enzyme activities of sandalwood rhizospheres in different agro climatic zones in Karnataka. *Journal of Tropical Forest Science.* 16(3) : 283-293.
 - **Montecinos, C (1997)**. Manejo biológico del fósforo en el suelo. *Agroecología y desarrollo.* Revista Clades. Web: <http://www.claces.org/r8.art4.htm> (citado 2 Diciembre 2003).
 - **Nannipieri, P., Grego, S. & Canti, B. (1990)**. Ecological significance of the biological activity in soil. *Soil Biochemistry* 6:203-355.
 - **Nannipieri, P., Pechozzini, F., Arcada, P. & Pioranelli, C. (1979)**. Changes in aminoacids, enzyme activity and biomass during soil microbial growth. *Soil Science*, 127:26-34.
 - **Quin, Y. & Cabral, J. (2002)**. Properties and Applications of Urease. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(1): 1-14.
 - **Ramos, A. & Forchiassin, F. (1996)**. Producción de endonucleasa en cuatro especies del género *Saccobolus*. *Rev. Argentina de Microbiología.* 28,55-62.

- **Rao, M., Tanksale, A., Ghate, M. & Deshpande, V. (1998).** Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3): 597-635.
- **Sauces, L., Perez-Sarmentero, J. & Molina, A. (1998).** Actividad enzimática de estereasas, fosfatasas y β -galactosidasas en suelos de tres fincas de pastos permanentes con diferente altitud. *Actas del III Congreso de la Sociedad de Agricultura Ecológica*
- **Schinner, F., Kandeler, E., Öhlinger, R. & Margesin, R. (1993).** *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. 2. Aufl. Springer-Labor. Berlin. 389 p.
- **Schmidt, G. & Laskowski, M (1961).** Phosphate ester cleavage (survey). *The enzymes*. 2 rd. Academic Press Inc. New York. P. 3-35.
- **Shukla, L., Sing, D., Yaduraju, N., Das, T. & Magu, S (2000)** Effect of soil solarization on soil microflora and soil enzymatic activity. *Annals of Plant Protection Sciences* 8 (2): 218-222.
- **Smith, J., Panependick, R., Benzdicck, D. & Lynch, J (1993).** Soil organic matter dynamics and crop residue management. *Soil microbial ecology*. Merce Dekker. New York. p 65-95.
- **Steiner, J., Socha, C. & Eyzaguirre, J. (1994).** Citado por Vilches, L. (2002). Determinación de la actividad de exonucleasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 90 p.
- **Steubing, L., Godoy, R. & Alberdi, M. (2002).** *Métodos de Ecología Vegetal*. Editorial Universitaria. Chile. 345p.

- **Tarafdar, J., Rao, A., Praveen-Kumar & Kumar, P. (1995).** Role of phosphatase-producing fungi on the growth and nutrition of clusterbean (*Cyamopsis tetragono loba* (L.) taub.). *Journal of Arid Environments* 29 (3): 331-337.
- **Tarafdar, J., Yadav, R. & Niwas, R (2001).** Relative efficiency of fungal intra- and extracellular phosphatases and phytase. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165: 17-19
- **Tate III, R. (2000).** *Soil Microbiology*. 2^a Ed. John Wiley & sons., New York. 508 p.
- **Valenzuela, E., Barrera, S. & Pinochet, D. (2002).** Solubilización de roca fosfórica Carolina del Norte con cepas de *Aspergillus niger* aisladas desde un suelo trumao. *Boletín micológico* 17: 81-88.
- **Valenzuela, E., Leiva, S. & Godoy, R. (2001).** Variación estacional y potencial enzimático de microhongos asociados con la descomposición de hojarasca de *Nothofagus pumilio*. *Revista Chilena de Historia Natural* 74:4
- **Varsha, N., Jugnu, T. & Patel, H. (1994).** Isolation and screening of phosphate solubilizing fungi. *Indian Journal of Microbiology* 34 (2): 113-118.
- **Vilches, L. (2002).** Determinación de la actividad de exonucleasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 90 p.
- **Weber, R. & Pitt, D. (1997).** Acid phosphatase secretion by *Botrytis cinerea*. *Mycol. Res.* 101 (3): 349-356

- **Whipps, J. (1984)** citado en Whitelaw, M. (2000). Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy* 69:99-149.

ANEXO 1

CURVAS DE CALIBRACIÓN

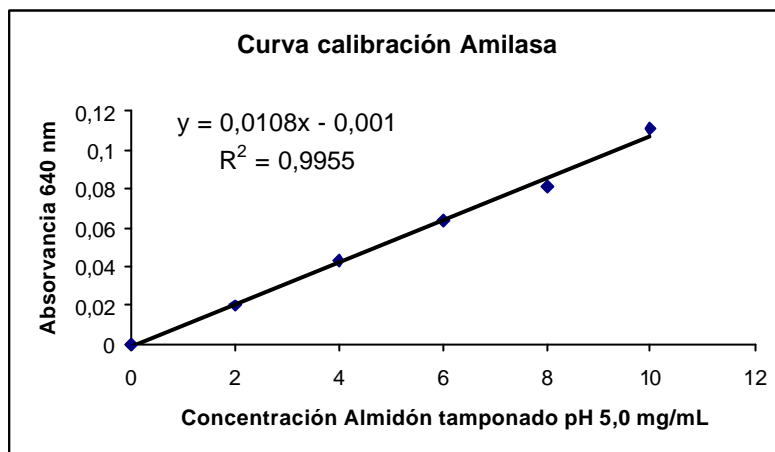


Gráfico 1. Curva calibración Amilasa

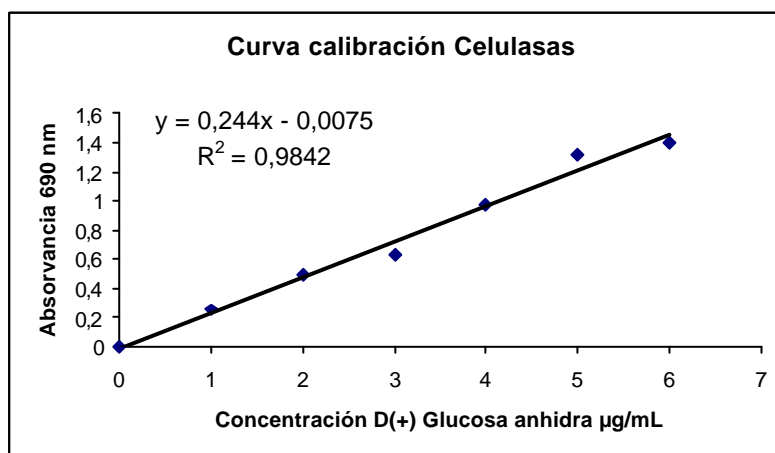


Gráfico 2. Curva calibración Celulasa

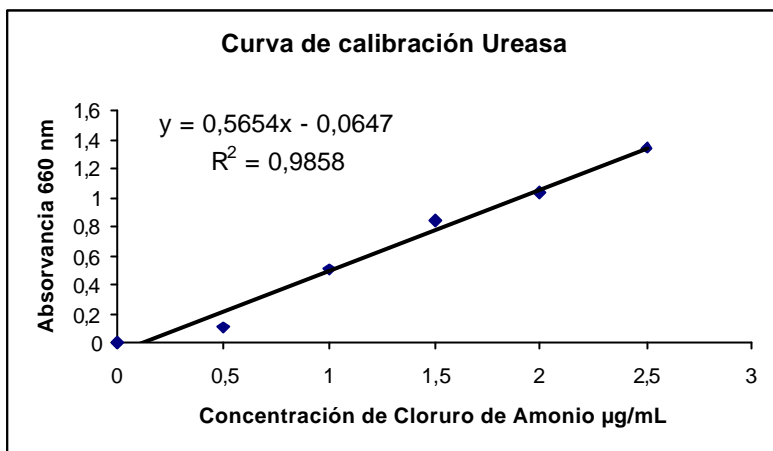


Gráfico 3. Curva calibración Ureasa

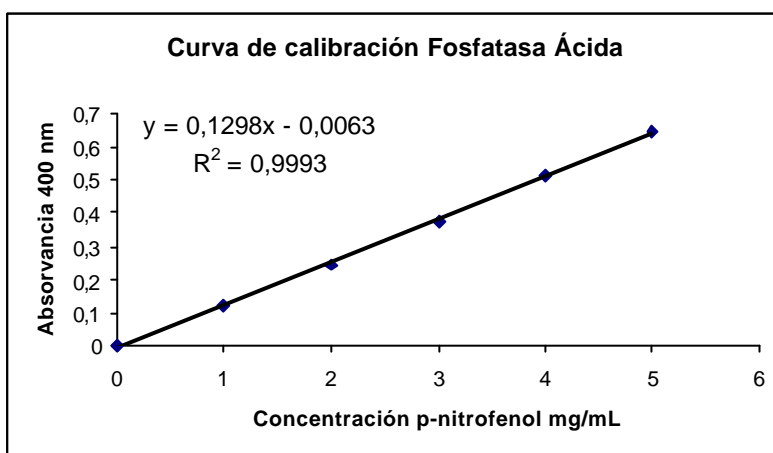


Gráfico 4. Curva calibración Fosfatasa Acida

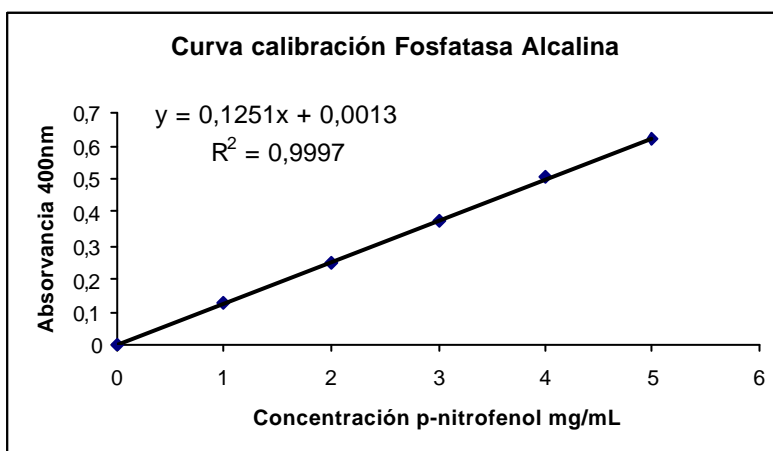


Gráfico 5. Curva calibración Fosfatasa Alcalina

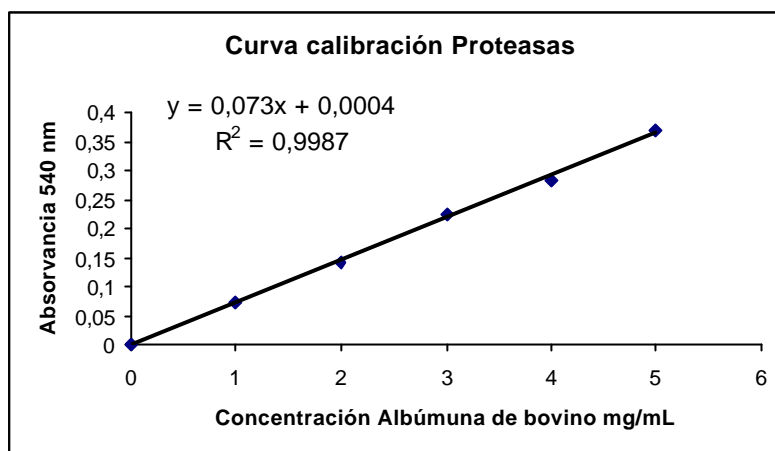


Gráfico 6. Curva de calibración Proteasa

ANEXO 2

Tabla 5. Códigos asignados a taxas de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L.

Código asignado a cepas fúngicas	Cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>L. perenne</i> (b. Inglesa) cultivado en pradera permanente	Cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>L. perenne</i> (b. Inglesa) cultivado en pradera en rotación
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1R	<i>Absidia cilindrospora</i> 1SR
2	<i>Absidia cilindrospora</i> 2R	<i>Absidia cilindrospora</i> 2R
3	<i>Acremonium strictum</i> 1R	<i>Absidia glauca</i> 1SR
4	<i>Acremonium strictum</i> 2SR	<i>Aspergillus niger</i> 1R
5	<i>Aspergillus niger</i> 1R	<i>Aspergillus niger</i> 2SR
6	<i>Aspergillus niger</i> 2R	<i>Aspergillus niger</i> 3SR
7	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R	<i>Chaetomium globosum</i> 1SR
8	<i>Epicoccum purpurascens</i> 1SR	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R
9	<i>Epicoccum purpurascens</i> 2SR	<i>Gliocladium roseum</i> 1SR
10	Micelio esteril "A" 1R	<i>Humicola gricea</i> 1SR
11	Micelio esteril Demataceus "e" 1SR	<i>Paecilomyces marquandii</i> 1SR
12	<i>Mucor hiemalis</i> 1R	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R
13	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	<i>Penicillium commune</i> 1SR
14	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2R	<i>Penicillium expansum</i> 1R
15	<i>Penicillium chrysogenum</i> 3R	<i>Penicillium frequentans</i> 1R
16	<i>Penicillium chrysogenum</i> 4SR	<i>Penicillium purpurascens</i> 1SR
17	<i>Penicillium chrysogenum</i> 5SR	<i>Penicillium purpurascens</i> 2SR
18	<i>Penicillium commune</i> 1R	<i>Penicillium purpurascens</i> 3SR
19	<i>Penicillium commune</i> 2R	<i>Penicillium purpurascens</i> 4SR
20	<i>Penicillium commune</i> 3SR	<i>Penicillium purpurascens</i> 5SR
21	<i>Penicillium commune</i> 4SR	<i>Penicillium restrictum</i> 1R
22	<i>Penicillium commune</i> 5SR	<i>Penicillium restrictum</i> 2R
23	<i>Penicillium frequentans</i> 1SR	<i>Penicillium restrictum</i> 3R
24	<i>Penicillium frequentans</i> 2SR	<i>Penicillium restrictum</i> 4R
25	<i>Penicillium frequentans</i> 3SR	<i>Penicillium restrictum</i> 5R
26	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	<i>Penicillium restrictum</i> 6SR
27	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	<i>Penicillium restrictum</i> 7SR
28	<i>Penicillium restrictum</i> 3R	<i>Penicillium restrictum</i> 8SR
29	<i>Penicillium restrictum</i> 4R	<i>Trichoderma konningii</i> 1R
30	<i>Penicillium restrictum</i> 5SR	<i>Zygorhynchus moelleri</i> 1SR

Tabla 6. Códigos asignados a taxas de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de*Trifolium repens* L.

Código asignado a cepas fúngicas	Cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>T. repens</i> (t. blanco) cultivado en pradera permanente	Cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>T. repens</i> (t. blanco) cultivado en pradera en rotación
1	<i>Aspergillus niger</i> 1SR	<i>Absidia cilindrospora</i> 1R
2	<i>Bauveria bassiana</i> 1SR	<i>Absidia glauca</i> 1SR
3	<i>Bauveria bassiana</i> 1R	<i>Absidia spinosa</i> 2SR
4	<i>Eurotium amstelodami</i> 1SR	<i>Aspergillus subsessilis</i> 1SR
5	<i>Fusarium oxysporum</i> 1R	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R
6	<i>Geotrichum candidum</i> 1SR	<i>Mortierella vinacea</i> 1SR
7	Micelio esteril "B" 1SR	<i>Mucor hiemalis</i> 1SR
8	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1SR
9	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2SR	<i>Penicillium commune</i> 1SR
10	<i>Penicillium commune</i> 1SR	<i>Penicillium frequentans</i> 1R
11	<i>Penicillium frequentans</i> 1R	<i>Penicillium frequentans</i> 2R
12	<i>Penicillium frequentans</i> 2R	<i>Penicillium frequentans</i> 3R
13	<i>Penicillium frequentans</i> 3R	<i>Penicillium restrictum</i> 1R
14	<i>Penicillium frequentans</i> 4R	<i>Penicillium restrictum</i> 2R
15	<i>Penicillium frequentans</i> 5R	<i>Penicillium restrictum</i> 3R
16	<i>Penicillium frequentans</i> 6SR	<i>Penicillium restrictum</i> 4R
17	<i>Penicillium frequentans</i> 7SR	<i>Penicillium restrictum</i> 5R
18	<i>Penicillium frequentans</i> 8SR	<i>Penicillium restrictum</i> 6SR
19	<i>Penicillium frequentans</i> 9SR	<i>Penicillium restrictum</i> 7SR
20	<i>Penicillium purpurescens</i> 1R	<i>Penicillium restrictum</i> 8SR
21	<i>Penicillium purpurascens</i> 2SR	<i>Penicillium restrictum</i> 9SR
22	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	<i>Penicillium restrictum</i> 10SR
23	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	<i>Penicillium restrictum</i> 11SR
24	<i>Penicillium restrictum</i> 3R	<i>Penicillium restrictum</i> 12SR
25	<i>Penicillium restrictum</i> 4R	<i>Penicillium restrictum</i> 13SR
26	<i>Penicillium restrictum</i> 5R	<i>Penicillium restrictum</i> 14SR
27	<i>Penicillium restrictum</i> 6R	<i>Penicillium restrictum</i> 15SR
28	<i>Trichoderma konningii</i> 1R	<i>Penicillium serie raistricke</i> 1SR
29	<i>Trichoderma konningii</i> 2R	<i>Pythium devaryanum</i> 1SR
30	<i>Trichoderma konningii</i> 3SR	<i>Trichoderma konningii</i> 1R

Tabla 7. Códigos asignados a taxas de cepas fúngicas aisladas desde la rizósfera de*Dactylis glomerata* L.

Código asignado a cepas fúngicas	Cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>D. glomerata</i> (p. ovilla) cultivado en pradera permanente	Cepas fúngicas aisladas de la rizósfera de <i>D. glomerata</i> (p. ovilla) cultivado en pradera en rotación.
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1SR	<i>Absidia cilindrospora</i> 1R
2	<i>Acremonium breve</i> 1SR	<i>Absidia glauca</i> 1SR
3	<i>Aspergillus niger</i> 1R	<i>Aspergillus niger</i> 1R
4	<i>Aspergillus terreus</i> 1R	<i>Chaetomiium globosum</i> 1R
5	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R	<i>Chaetomiium globosum</i> 2R
6	<i>Geotrichum candidum</i> 1SR	<i>Fusarium oxysporum</i> 1R
7	<i>Mucor hiemalis</i> 1SR	<i>Microsporium gypseum</i> 1R
8	<i>Paecilomyces marquandii</i> 1SR	<i>Mortierella vinacea</i> 1SR
9	<i>Phialophora mutabilis</i> 1R	<i>Mucor hiemalis</i> 1R
10	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	<i>Mucor hiemalis</i> 2SR
11	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2SR	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R
12	<i>Penicillium chrysogenum</i> 3SR	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2SR
13	<i>Penicillium chrysogenum</i> 4SR	<i>Penicillium commune</i> 1SR
14	<i>Penicillium chrysogenum</i> 5SR	<i>Penicillium frequentans</i> 1R
15	<i>Penicillium chrysogenum</i> 6SR	<i>Penicillium frequentans</i> 2SR
16	<i>Penicillium commune</i> 1R	<i>Penicillium frequentans</i> 3SR
17	<i>Penicillium commune</i> 2R	<i>Penicillium frequentans</i> 4SR
18	<i>Penicillium expansum</i> 1SR	<i>Penicillium purpurascens</i> 1SR
19	<i>Penicillium frequentans</i> 1SR	<i>Penicillium purpurascens</i> 2SR
20	<i>Penicillium frequentans</i> 2SR	<i>Penicillium purpurascens</i> 3SR
21	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	<i>Penicillium restrictum</i> 1SR
22	<i>Penicillium restrictum</i> 2SR	<i>Penicillium restrictum</i> 2R
23	<i>Penicillium restrictum</i> 3SR	<i>Penicillium restrictum</i> 3SR
24	<i>Penicillium restrictum</i> 4SR	<i>Penicillium restrictum</i> 4SR
25	<i>Penicillium restrictum</i> 5SR	<i>Penicillium restrictum</i> 5SR
26	<i>Penicillium serie raistricke</i> 1R	<i>Penicillium restrictum</i> 6SR
27	<i>Penicillium serie raistricke</i> 2R	<i>Penicillium restrictum</i> 7SR
28	<i>Penicillium purpurascens</i> 1R	<i>Penicillium restrictum</i> 8SR
29	<i>Penicillium purpurescens</i> 2R	<i>Penicillium serie raistricke</i> 1SR
30	<i>Trichoderma konningii</i> 1SR	<i>Zygorhynchus moelleri</i> 1SR

ANEXO 3

Tabla 8. Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L. cultivado en pradera permanente.

N°	Taxa	Peso seco grs.	Proteasas mg/mL	Fosfatasa Alcalina mg/mL	Fosfatasa Acida mg/mL	Celulasa µg/mL	Ureasa µgN/mL	Amilasa mg/mL
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1R	0.33	0.6520	0.9808	1.3737	37.0308	0.1480	11.2037
		-	0.8027	0.7730	1.6664	-	-	-
		-	0.7205	1.1487	1.3274	-	-	-
2	<i>Absidia cilindrospora</i> 2R	0.32	0.8301	1.0528	0.7958	14.9304	0.1622	10.5556
		-	0.9534	0.8689	1.3351	-	-	-
		-	0.7753	0.8929	1.0809	-	-	-
3	<i>Acremonium strictum</i> 1R	0.06	0.5562	1.8761	1.9592	44.7912	0.1834	11.2037
		-	0.9260	1.7242	1.5431	-	-	-
		-	0.9671	1.9960	1.7512	-	-	-
4	<i>Acremonium strictum</i> 2SR	0.34	0.4329	1.3485	1.4661	4.1333	0.2011	11.2037
		-	0.9123	1.7082	1.6895	-	-	-
		-	1.0630	1.5164	1.5508	-	-	-
5	<i>Aspergillus niger</i> 1R	0.18	1.5973	4.1783	1.8513	14.9304	0.1658	11.2037
		-	1.3369	1.4125	1.8128	-	-	-
		-	0.7342	1.3965	2.1749	-	-	-
6	<i>Aspergillus Niger</i> 2R	0.37	0.5973	1.5084	1.3814	15.4365	0.1958	11.2037
		-	1.2137	0.4452	1.4507	-	-	-
		-	0.9945	1.3565	1.4661	-	-	-
7	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R	0.53	0.6657	1.4603	1.5971	3.2898	0.1905	10.5556
		-	0.8027	1.4364	1.3582	-	-	-
		-	0.6109	1.4364	1.4738	-	-	-
8	<i>Epicoccum purpurascens</i> 1SR	0.10	0.5973	1.3737	1.5484	43.2729	0.1887	11.2037
		-	0.3096	2.0747	1.5244	-	-	-
		-	0.9123	1.6895	1.3965	-	-	-
9	<i>Epicoccum purpurascens</i> 2SR	0.12	0.4192	1.3814	5.8809	120.7086	0.1781	11.2037
		-	0.7753	1.4122	1.2446	-	-	-
		-	0.3781	1.4661	1.2126	-	-	-
10	Micelio esteril "A" 1R	0.20	1.1178	2.0919	2.4676	22.1847	0.1728	10.5556
		-	0.8438	2.5476	2.7373	-	-	-
		-	1.0493	2.4916	1.9052	-	-	-
11	Micelio esteril Demataceus "e" 1SR	0.30	1.4466	1.0578	1.0608	5.989	0.1693	10.5556
		-	1.2411	1.3428	1.5803	-	-	-
		-	0.9260	1.8051	1.6523	-	-	-

(Continuación Tabla)

12	<i>Mucor hiemalis</i> 1R	0.24 - -	1.2411 0.3644 0.8164	2.0439 1.3120 3.0689	1.4045 1.6763 2.6035	156.6428 - -	0.2577 - -	11.2037 - -
13	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	0.26 - -	0.8301 0.5699 1.0082	1.4844 1.5484 1.6523	1.9438 1.9977 1.9669	2.7837 - -	0.2064 - -	11.2037 - -
14	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2R	0.01 - -	1.0630 0.7342 0.6384	1.2206 1.3085 1.2846	1.4199 1.3351 1.4353	61.493 - -	0.1852 - -	10.5556 - -
15	<i>Penicillium chrysogenum</i> 3R	0.26 - -	1.0904 1.5151 1.3096	1.2366 1.1407 1.1966	1.7512 1.5123 1.6202	40.4049 - -	0.1940 - -	10.5556 - -
16	<i>Penicillium chrysogenum</i> 4SR	0.84 - -	0.7068 0.8301 0.0630	1.0927 1.3005 1.2286	1.2812 1.3043 1.3891	82.7499 - -	0.1693 - -	11.2037 - -
17	<i>Penicillium chrysogenum</i> 5SR	0.29 - -	1.1315 0.5288 0.9534	0.5572 1.1727 1.0048	0.6880 1.9361 1.2889	94.8967 - -	0.1799 - -	10.5556 - -
18	<i>Penicillium commune</i> 1R	0.10 - -	0.4466 0.9534 0.2548	1.3405 1.5004 1.4524	1.2966 1.1888 1.2119	12.0624 - -	0.2135 - -	11.2037 - -
19	<i>Penicillium commune</i> 2R	0.27 - -	0.8575 0.6657 0.8027	1.1806 1.1487 1.2446	1.8128 1.7357 1.4738	98.2708 - -	0.1869 - -	11.2037 - -
20	<i>Penicillium commune</i> 3SR	0.26 - -	1.1863 1.0493 0.6795	1.4045 0.9179 0.7970	1.6664 0.7188 0.9730	10.3754 - -	0.1693 - -	11.2037 - -
21	<i>Penicillium commune</i> 4SR	0.18 - -	1.1178 0.8438 1.0493	0.1735 0.6211 0.9728	0.6803 1.7280 1.1656	22.5221 - -	0.1799 - -	11.2037 - -
22	<i>Penicillium commune</i> 5SR	0.35 - -	0.7479 0.7616 0.6794	1.1087 0.5731 0.7490	1.3737 1.7743 0.6572	26.7398 - -	0.1869 - -	11.2037 - -
23	<i>Penicillium frequentans</i> 1SR	0.41 - -	0.4877 0.7068 1.5151	1.2526 1.0048 1.3485	1.9669 2.1518 1.9977	8.3509 - -	0.1905 - -	11.2037 - -
24	<i>Penicillium frequentans</i> 2SR	0.27 - -	2.2000 1.5836 0.5288	2.0440 2.2598 1.7722	3.1841 2.1055 3.0609	19.6542 - -	0.2648 - -	11.2037 - -

(Continuación Tabla)

25	<i>Penicillium frequentans</i> 3SR	0.36	0.5562	1.2286	0.9730	112.442	0.1728	10.5556
		-	0.5562	0.5572	0.6803	-	-	-
		-	0.7068	1.1727	1.7280	-	-	-
26	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	0.30	0.7890	1.1567	1.4969	132.5179	0.1693	10.5556
		-	1.3150	1.6283	1.7435	-	-	-
		-	1.2000	1.5563	1.0578	-	-	-
27	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	0.35	0.4466	0.2854	1.4311	36.6934	0.1657	11.2037
		-	0.6384	0.3908	1.8975	-	-	-
		-	0.8849	0.1175	2.0670	-	-	-
28	<i>Penicillium restrictum</i> 3R	0.31	1.1178	1.0847	0.9807	21.5099	0.1799	10.5556
		-	1.0630	1.1007	1.2889	-	-	-
		-	0.6397	1.1806	1.0732	-	-	-
29	<i>Penicillium restrictum</i> 4R	0.42	0.9945	0.4532	0.9499	2.9523	0.1834	11.2037
		-	0.8986	0.4452	0.9884	-	-	-
		-	0.5686	0.1175	1.2042	-	-	-
30	<i>Penicillium restrictum</i> 5SR	0.29	1.2685	2.0439	2.0747	27.752	0.1852	11.2037
		-	1.1589	2.0689	1.8975	-	-	-
		-	0.8849	1.9880	2.0670	-	-	-

Tabla 9. Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivado en pradera en rotación.

N°	Taxa	Peso seco grs.	Proteasas mg/mL	Fosfatasa Alcalina mg/mL	Fosfatasa Acida mg/mL	Celulasa µg/mL	Ureasa µgN/mL	Amilasa Mg/mL
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1SR	0.26	2.0219	0.6997	1.9492	2.2775	0.1374	8.0056
		-	0.0767	0.5932	2.0114	-	-	-
		-	2.1315	0.3376	1.8870	-	-	-
2	<i>Absidia cilindrospora</i> 2R	0.19	0.4466	1.6363	1.3737	102.8259	0.1710	9.9074
		-	0.6247	1.5643	1.8744	-	-	-
		-	0.6931	1.2286	1.5123	-	-	-
3	<i>Absidia glauca</i> 1SR	0.18	1.4329	0.6358	2.6642	2.9523	0.1639	8.2407
		-	2.0630	1.4345	1.9907	-	-	-
		-	2.2274	0.1778	2.7886	-	-	-
4	<i>Aspergillus niger</i> 1R	0.37	0.6520	1.2206	1.9823	19.8229	0.1834	7.8704
		-	0.9397	1.5723	1.9129	-	-	-
		-	0.3370	1.6363	1.4892	-	-	-
5	<i>Aspergillus niger</i> 2SR	0.41	1.1315	0.4654	1.2238	0.5905	0.000	8.1481
		-	1.9671	0.4654	1.0580	-	-	-
		-	1.7205	0.9223	1.4518	-	-	-
6	<i>Aspergillus niger</i> 3SR	0.34	1.7890	0.5186	0.4259	99.6205	0.1922	2.5926
		-	1.8164	0.2949	2.3741	-	-	-
		-	2.7205	0.1778	2.9233	-	-	-
7	<i>Chaetomium globosum</i> 1SR	0.17	1.7616	0.5719	1.2549	6.3264	0.1816	8.0056
		-	1.7890	0.4121	2.0114	-	-	-
		-	1.9945	0.7636	2.0839	-	-	-
8	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R	0.41	0.5013	1.5354	1.1567	6.3264	0.1710	11.2037
		-	0.6247	1.5817	0.9089	-	-	-
		-	0.5836	1.5354	1.4205	-	-	-
9	<i>Gliocladium roseum</i> 1SR	0.22	2.0219	0.2311	4.6953	0.44218	0.2736	7.5
		-	1.9945	0.1778	4.3016	-	-	-
		-	1.9534	0.6251	3.3482	-	-	-
10	<i>Humicola gricea</i> 1SR	0.31	2.0767	2.3078	2.8508	5.6516	0.2046	8.2407
		-	2.3781	0.6251	0.5192	-	-	-
		-	1.5561	0.6358	0.6746	-	-	-
11	<i>Paecilomyces marquandii</i> 1SR	0.11	1.6794	0.9446	3.0062	3.7959	0.1286	8.0056
		-	1.0630	0.6571	2.0010	-	-	-
		-	2.2137	0.2949	1.6591	-	-	-

(Continuación Tabla)

12	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	0.16 - -	0.5973 0.9123 1.3233	2.3058 2.4291 2.1980	1.6043 1.6683 1.9320	4.6957 - -	0.2135 - -	11.2037 - -
13	<i>Penicillium commune</i> 1SR	0.34 - -	0.9534 0.9945 0.0904	1.4122 0.9422 1.2350	1.0767 1.3485 1.5084	3.7959 - -	0.1763 - -	11.2037 - -
14	<i>Penicillium expansum</i> 1R	0.13 - -	0.4740 0.2685 0.5151	0.6880 1.1117 1.0886	1.0368 1.2846 0.7330	2.7836 - -	0.1533 - -	11.2037 - -
15	<i>Penicillium frequentans</i> 1R	0.32 - -	2.2000 1.7753 1.3918	1.4132 0.4121 1.0618	1.5451 0.7575 2.1357	13.4121 - -	0.1533 - -	7.7778 - -
16	<i>Penicillium purpurascens</i> 1SR	0.08 - -	1.1315 2.5151 1.9808	0.2630 0.5612 0.1672	0.5192 1.1720 0.5088	9.0257 - -	0.1268 - -	7.963 - -
17	<i>Penicillium purpurascens</i> 2SR	0.04 - -	1.7890 1.4055 2.2137	0.6038 0.5186 0.3269	0.9855 1.4518 0.6953	13.4121 - -	0.1233 - -	8.1481 - -
18	<i>Penicillium purpurascens</i> 3SR	0.19 - -	1.4877 2.4192 1.3370	0.1033 0.4334 0.1991	0.8301 0.4466 0.0000	4.8081 - -	0.1622 - -	7.8704 - -
19	<i>Penicillium purpurascens</i> 4SR	0.25 - -	2.3918 2.0900 1.8438	0.1459 0.2630 0.3163	0.1565 0.1775 0.2497	35.175 - -	0.1710 - -	7.2222 - -
20	<i>Penicillium purpurascens</i> 5SR	0.26 - -	1.6794 1.8712 2.3370	0.1885 0.4228 0.5719	1.4829 0.3741 0.6332	15.6052 - -	0.1551 - -	7.1296 - -
21	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	0.35 - -	1.5698 1.8712 1.2137	0.0607 1.6581 1.3919	1.8249 1.8145 1.8352	13.7495 - -	0.000 - -	8.2407 - -
22	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	0.32 - -	1.2685 1.7068 2.2000	1.9031 2.0415 2.0200	2.0217 2.3430 2.4052	4.4707 - -	0.1463 - -	8.1481 - -
23	<i>Penicillium restrictum</i> 3R	0.27 - -	0.3507 0.6384 0.5151	1.1425 1.6048 1.4584	0.3093 1.2526 1.3965	14.0869 - -	0.1622 - -	11.2037 - -
24	<i>Penicillium restrictum</i> 4R	0.36 - -	1.0219 0.6520 0.9534	0.6803 1.8282 1.3659	1.3725 0.1735 1.0128	19.3167 - -	0.1693 - -	11.2037 - -

(Continuación Tabla)

25	<i>Penicillium restrictum</i> 5R	0.36 - -	1.0219 0.6520 0.9534	0.6803 1.8282 1.3659	1.3725 0.1735 1.0128	19.3167 - -	0.1693 - -	11.2037 - -
26	<i>Penicillium restrictum</i> 6SR	0.13 - -	0.6520 0.8027 0.9534	1.4353 2.0054 2.2057	1.2766 1.5324 1.5004	14.0869 - -	0.1922 - -	11.2037 - -
27	<i>Penicillium restrictum</i> 7SR	0.14 - -	0.7753 0.5836 1.1726	2.0200 1.3659 1.4584	1.2526 0.1735 1.3965	3.6272 - -	0.2754 - -	0.0926 - -
28	<i>Penicillium restrictum</i> 8SR	0.32 - -	0.7068 1.6795 0.6109	2.0054 1.8282 0.6803	0.3741 1.2766 1.3965	3.7959 - -	0.1604 - -	11.2037 - -
29	<i>Trichoderma konningii</i> 1R	1.24 - -	0.4329 0.7890 0.5836	1.3659 1.7357 1.8513	1.3325 1.1567 0.5651	0.9279 - -	0.2294 - -	7.8704 - -
30	<i>Zygorhynchus moelleri</i> 1SR	0.24 - -	1.5151 1.9810 1.611	0.0500 0.3163 1.9989	1.1617 1.1202 2.0632	2.1088 - -	0.1162 - -	8.1481 - -

Tabla 10. Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L. cultivado en pradera permanente.

Nº	Taxa	Peso seco grs.	Proteasas mg/mL	Fosfatasa Alcalina mg/mL	Fosfatasa Acida mg/mL	Celulasa µg/mL	Ureasa µgN/mL	Amilasa Mg/mL
1	<i>Aspergillus niger</i> 1SR	0.27	2.3370	1.8761	2.1980	36.1873	0.2082	11,. 037
		-	2.2274	1.1247	1.8667	-	-	-
		-	2.1315	2.7154	2.0131	-	-	-
2	<i>Bauveria bassiana</i> 1SR	0.13	2.1726	1.8921	2.5601	38.7178	0.1728	10.5556
		-	1.7616	2.1159	2.2365	-	-	-
		-	1.6384	1.6683	1.7280	-	-	-
3	<i>Bauveria bassiana</i> 1R	0.22	0.4603	1.6363	1.9592	38.5491	0.1675	11.2037
		-	0.8438	1.5883	2.5832	-	-	-
		-	0.5014	1.3165	2.2057	-	-	-
4	<i>Eurotium amstelodami</i> 1SR	0.28	2.5836	1.5164	1.650	29.1016	0.1852	11.1111
		-	2.8301	1.3245	1.1271	-	-	-
		-	2.5836	1.4364	1.4661	-	-	-
5	<i>Fusarium oxysporum</i> 1R	0.24	1.6932	1.8921	1.9206	7.423	0.1799	10.5556
		-	1.1589	2.2998	2.4676	-	-	-
		-	1.0356	2.6355	2.4599	-	-	-
6	<i>Geotrichum candidum</i> 1SR	0.10	0.0082	2.8833	2.7296	106.5373	0.1940	11.2037
		-	0.8849	2.0359	2.1518	-	-	-
		-	1.2411	0.9568	1.7435	-	-	-
7	Micelio esteril "B" 1SR	0.15	2.5425	0.7889	0.9730	14.593	0.2347	11.2037
		-	2.6932	1.7082	2.9068	-	-	-
		-	2.8712	1.6603	1.7897	-	-	-
8	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	0.25	1.0082	1.6356	1.0288	1.9401	0.1604	10.5556
		-	1.0493	1.4892	1.1966	-	-	-
		-	1.0356	1.6279	1.7802	-	-	-
9	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2SR	0.34	2.8301	1.3813	2.2083	7.423	0.2135	11.2037
		-	2.2685	2.3675	2.3237	-	-	-
		-	2.1315	2.4291	1.7802	-	-	-
10	<i>Penicillium commune</i> 1SR	0.21	2.6521	1.9669	2.2601	1.6027	0.2046	11.2037
		-	2.9945	1.6741	1.4684	-	-	-
		-	2.4603	1.9052	1.6363	-	-	-
11	<i>Penicillium frequentans</i> 1R	0.33	0.4877	2.1639	2.6371	104.7659	0.1799	11.2037
		-	1.0630	2.3397	2.8297	-	-	-
		-	0.8849	1.5883	2.7835	-	-	-

(Continuación Tabla)

12	<i>Penicillium frequentans</i> 2R	0.35 - -	1.0356 1.4329 1.0082	2.7634 3.0032 2.5955	3.0840 2.5909 3.0146	5.9890 - -	0.1834 - -	11.2037 - -
13	<i>Penicillium frequentans</i> 3R	0.31 - -	0.3918 1.0219 0.4603	0.0871 0.8652 0.7342	0.4532 0.0616 0.1255	7.5074 - -	0.1798 - -	11.2037 - -
14	<i>Penicillium frequentans</i> 4R	0.14 - -	0.6521 1.3507 0.8164	0.4852 0.5491 0.1415	0.6649 0.9114 0.3490	38.5491 - -	0.1675 - -	11.2037 - -
15	<i>Penicillium frequentans</i> 5R	0.33 - -	1.3233 1.3781 1.6384	0.0935 0.1335 0.1015	0.6880 2.1903 1.0578	16.1957 - -	0.1675 - -	10.5556 - -
16	<i>Penicillium frequentans</i> 6SR	0.38 - -	1.4603 1.6384 1.4877	0.3490 3.1610 3.7928	0.3333 2.8273 4.2262	96.3307 - -	0.1887 - -	11.2037 - -
17	<i>Penicillium frequentans</i> 7SR	0.38 - -	2.5699 2.5562 2.6247	1.9321 1.9321 1.7322	1.9206 0.3952 1.6895	6.9169 - -	0.1958 - -	11.2037 - -
18	<i>Penicillium frequentans</i> 8SR	0.32 - -	2.2822 2.6247 2.5288	1.9161 2.1958 1.8521	2.2596 2.2211 2.7065	10.4597 - -	0.1852 - -	11.2037 - -
19	<i>Penicillium frequentans</i> 9SR	0.17 - -	2.5562 2.5288 2.6384	2.5634 1.1087 1.2126	3.0477 2.3598 2.3367	123.1548 - -	0.1518 - -	11.2037 - -
20	<i>Penicillium purpurescens</i> 1R	0.41 - -	0.2411 0.7205 0.6247	0.0376 0.2294 0.1495	0.6263 0.0948 1.3659	63.9393 - 28.8486	0.1728 - -	10.5556 - -
21	<i>Penicillium purpurascens</i> 2SR	0.09 - -	1.5562 1.1863 1.2411	0.9249 0.2294 0.0376	1.2658 0.0794 0.2103	22.2658 - -	0.1799 - -	11.2037 - -
22	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	0.37 - -	2.4192 1.0082 1.2822	0.4213 0.4133 0.4133	0.3105 0.3182 0.5801	79.3758 - -	0.1763 - -	11.2037 - -
23	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	0.32 - -	0.4877 0.6521 1.0082	0.1015 0.7090 0.7090	0.1949 0.5185 0.5185	28.8486 - -	0.1639 - -	11.2037 - -
24	<i>Penicillium restrictum</i> 3R	0.38 - -	0.9945 0.7753 0.7068	0.0775 0.4852 1.1247	0.3413 1.2889 1.2889	60.059 - -	0.1799 - -	11.2037 - -

(Continuación Tabla)

25	<i>Penicillium restrictum</i> 4R	0.30	1.3096	1.288	0.4569	9.6162	0.1763	11.2037
		-	0.8027	0.8289	0.1256	-	-	-
		-	1.0219	0.7970	0.3413	-	-	-
26	<i>Penicillium restrictum</i> 5R	0.05	0.6658	3.1551	2.5062	35.2594	0.1639	11.2037
		-	1.0356	0.1655	0.1641	-	-	-
		-	0.7753	0.1015	1.1040	-	-	-
27	<i>Penicillium restrictum</i> 6R	0.14	2.5425	4.2141	3.3793	33.8254	0.1905	11.2037
		-	2.9671	0.3333	0.7958	-	-	-
		-	2.9260	0.5172	0.6341	-	-	-
28	<i>Trichoderma konningii</i> 1R	0.32	0.7342	0.4183	0.0775	80.4724	0.1834	10.5556
		-	1.2548	1.1886	0.7890	-	-	-
		-	1.0630	0.6418	0.5031	-	-	-
29	<i>Trichoderma konningii</i> 2R	0.27	0.8849	1.6279	0.0775	19.2324	0.1958	11.2037
		-	0.8575	1.1886	1.6279	-	-	-
		-	0.3918	0.3493	0.4414	-	-	-
30	<i>Trichoderma konningii</i> 3SR	0.18	2.5425	2.2838	2.0362	8.3509	0.2011	11.2037
		-	2.6384	1.6279	0.5031	-	-	-
		-	2.4192	0.7410	1.6279	-	-	-

Tabla 11. Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivado en pradera en rotación.

Nº	Taxa	Peso seco grs.	Proteasas mg/mL	Fosfatasa Alcalina mg/mL	Fosfatasa Acida mg/mL	Celulasa µg/mL	Ureasa µgN/mL	Amilasa Mg/mL
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1R	0.36	0.3644	0.1735	1.1810	32.1383	0.1693	11.2037
		-	0.8986	0.2612	0.1179	-	-	-
		-	0.9123	0.3173	1.0039	-	-	-
2	<i>Absidia glauca</i> 1SR	0.32	0.9945	0.0024	0.0048	29.9452	0.1728	11.2037
		-	0.9808	0.0024	0.4260	-	-	-
		-	0.5562	0.0104	0.2488	-	-	-
3	<i>Absidia spinosa</i> 2SR	0.33	0.0904	1.2925	0.4183	1.0966	0.2294	11.2037
		-	0.6109	2.0759	0.2026	-	-	-
		-	0.2822	0.2534	0.0048	-	-	-
4	<i>Aspergillus subsessilis</i> 1SR	0.16	0.1041	0.0855	1.3737	64.361	0.2099	11.2037
		-	0.9945	0.1335	2.0362	-	-	-
		-	0.9397	0.0104	0.2411	-	-	-
5	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R	0.12	0.1589	2.5715	0.7034	12.5685	0.1922	10.5556
		-	0.5562	0.0104	0.7958	-	-	-
		-	0.7342	0.0615	0.3413	-	-	-
6	<i>Mortierella vinacea</i> 1SR	0.39	0.6109	0.0775	0.8729	3.121	0.1869	10.5556
		-	0.9260	0.0855	0.7111	-	-	-
		-	0.9123	0.1335	0.5878	-	-	-
7	<i>Mucor hiemalis</i> 1SR	2.39	1.1041	0.0104	1.0809	1.0966	0.2011	11.2037
		-	0.8575	0.1655	0.4414	-	-	-
		-	0.7479	0.0104	0.1795	-	-	-
8	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1SR	0.41	0.9397	0.2454	1.0732	12.3998	0.1728	11.1111
		-	1.2000	0.1575	1.2966	-	-	-
		-	1.2685	0.2214	1.3737	-	-	-
9	<i>Penicillium commune</i> 1SR	0.27	0.7205	0.0695	2.0362	12.5685	0.2099	11.2037
		-	1.1315	0.0136	0.2411	-	-	-
		-	0.8027	0.2454	0.5801	-	-	-
10	<i>Penicillium frequentans</i> 1R	0.36	0.6397	0.1575	0.1949	13.2434	0.1799	10.5556
		-	0.6384	0.2214	1.0732	-	-	-
		-	0.7342	0.6451	1.2966	-	-	-
11	<i>Penicillium frequentans</i> 2R	0.34	0.6507	0.3163	1.3737	96.3307	0.1816	11.2037
		-	0.9123	0.3173	0.5031	-	-	-
		-	1.3507	0.3093	0.7111	-	-	-

(Continuación Tabla)

12	<i>Penicillium frequentans</i> 3R	0.50 - -	2.0219 0.9260 1.3369	0.6109 0.7970 0.5801	1.3805 0.5332 0.2103	16.1957 - -	0.1763 - -	11.2037 - -
13	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	0.43 - -	0.2137 0.8575 1.5836	0.0820 0.0535 0.6451	0.1102 0.1025 0.0048	57.1067 - -	0.1657 - -	11.2037 - -
14	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	0.43 - -	0.6521 0.7068 0.9945	0.3163 0.5801 0.0716	0.7886 1.0288 1.3805	16.7862 - -	0.1993 - -	10.5556 - -
15	<i>Penicillium restrictum</i> 3R	0.47 - -	0.4329 1.0630 0.8712	0.4547 0.3333 0.6109	0.5332 0.2103 0.2103	0.9279 - -	0.2259 - -	10.5556 - -
16	<i>Penicillium restrictum</i> 4R	0.27 - -	1.2959 1.5425 1.2137	0.7970 0.0056 0.2534	0.3336 0.1795 0.3028	76.3391 - -	0.2170 - -	10.5556 - -
17	<i>Penicillium restrictum</i> 5R	0.37 - -	0.4739 0.8849 0.8849	0.7970 0.5891 0.1641	0.2797 0.6186 1.0270	42.9355 - -	0.1816 - -	11.2037 - -
18	<i>Penicillium restrictum</i> 6SR	0.12 - -	1.2000 2.1178 1.1726	0.0695 0.5891 0.6771	0.8498 0.4029 0.0562	95.2341 - -	0.1993 - -	11.2037 - -
19	<i>Penicillium restrictum</i> 7SR	0.04 - -	1.6384 0.8575 1.6384	0.1641 0.0948 0.1641	0.0775 0.0695 0.3413	4.8081 - -	0.1834 - -	10.5556 - -
20	<i>Penicillium restrictum</i> 8SR	0.09 - -	1.2137 1.3096 1.7342	0.6451 0.5731 0.3413	0.7496 0.3336 0.2411	3.7959 - -	0.2259 - -	11.1111 - -
21	<i>Penicillium restrictum</i> 9SR	0.34 - -	1.0767 1.2137 0.7068	0.4053 0.8849 0.8689	0.8883 0.6263 0.6109	3.121 - -	0.2135 - -	10.5556 - -
22	<i>Penicillium restrictum</i> 10SR	0.38 - -	0.2411 0.7753 1.1863	0.5891 0.5012 0.3333	0.3644 0.3336 0.2797	26.7398 - -	0.2329 - -	11.2037 - -
23	<i>Penicillium restrictum</i> 11SR	0.27 - -	1.0493 0.9945 0.8849	0.8050 0.6371 0.5651	1.0039 0.9807 1.2427	28.8486 - -	0.1498 - -	10.5556 - -
24	<i>Penicillium restrictum</i> 12SR	0.37 - -	0.6384 0.2822 1.0356	0.6691 0.5252 0.0136	0.9422 0.8652 1.0886	60.059 - -	0.1887 - -	11.2037 - -

(Continuación Tabla)

25	<i>Penicillium restrictum</i> 13SR	0.40	1.2548	0.5971	1.0193	9.6162	0.1852	11.2037
		-	1.1452	0.6771	1.0116	-	-	-
		-	0.2822	0.2774	1.0886	-	-	-
26	<i>Penicillium restrictum</i> 14SR	0.40	0.5014	0.2774	1.0193	35.2594	0.1852	10.5556
		-	0.8575	0.1495	0.6495	-	-	-
		-	0.7616	0.3813	0.6341	-	-	-
27	<i>Penicillium restrictum</i> 15SR	0.41	1.2137	0.2614	0.7958	28.8486	0.2259	11.2037
		-	0.0219	0.3333	0.6186	-	-	-
		-	1.0356	0.3014	0.7573	-	-	-
28	<i>Penicillium serie raistricke</i> 1SR	0.15	0.7068	0.0056	0.7419	56.7693	0.1816	11.2037
		-	0.8027	0.5332	0.8421	-	-	-
		-	0.5288	0.2694	0.6649	-	-	-
29	<i>Pythium devaryanum</i> 1SR	0.31	1.3233	0.2934	0.7958	42.4294	0.1905	11.2037
		-	0.9123	0.2614	1.8898	-	-	-
		-	0.0630	0.3173	1.0501	-	-	-
30	<i>Trichoderma konningii</i> 1R	0.21	0.8027	0.7570	1.6818	80.4724	0.1816	10.5556
		-	0.5699	1.0128	5.5801	-	-	-
		-	0.2959	0.9808	4.5401	-	-	-

Tabla 12. Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* L. cultivada en pradera permanente.

Nº	Taxa	Peso seco grs.	Proteasas mg/mL	Fosfatasa Alcalina mg/mL	Fosfatasa Acida mg/mL	Celulasa µg/mL	Ureasa µgN/mL	Amilasa mg/mL
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1SR	0.18	0.4329	2.1693	3.5451	5.3142	0.1834	10.463
		-	1.3370	2.5527	3.1720	-	-	-
		-	1.3507	2.5740	3.3896	-	-	-
2	<i>Acremonium breve</i> 1SR	0.06	0.4740	2.6379	4.2083	1.7714	0.1746	10.278
		-	1.6110	2.5953	3.9285	-	-	-
		-	1.5699	2.2744	4.3430	-	-	-
3	<i>Aspergillus niger</i> 1R	0.40	2.0904	0.0713	3.0787	9.8693	0.1533	7.3148
		-	1.0356	1.6363	1.7126	-	-	-
		-	1.5562	1.4364	1.8205	-	-	-
4	<i>Aspergillus terreus</i> 1R	0.18	1.4329	2.9392	3.5462	65.8794	0.1816	5.9259
		-	1.8027	1.7242	1.8821	-	-	-
		-	1.7753	2.2438	1.6279	-	-	-
5	<i>Cladosporium cladosporoides</i> 1R	0.52	1.2000	3.2236	2.9233	12.3998	0.1463	7.5926
		-	1.2137	3.2030	2.8475	-	-	-
		-	1.1726	2.9998	1.8075	-	-	-
6	<i>Geotrichum candidum</i> 1SR	0.11	1.0082	2.4889	3.8767	19.480	0.1763	10
		-	1.3644	2.1267	3.8974	-	-	-
		-	1.4192	2.4782	3.1617	-	-	-
7	<i>Mucor hiemalis</i> 1SR	0.20	0.5014	0.0000	0.3430	132.1805	0.2435	10.3704
		-	1.5014	0.0500	0.8611	-	-	-
		-	1.3781	0.3908	0.6953	-	-	-
8	<i>Paecilomyces marquandii</i> 1SR	0.45	0.6932	5.4707	4.4155	26.4024	0.1852	10.278
		-	1.4603	5.3216	4.1979	-	-	-
		-	1.1041	5.3000	4.4570	-	-	-
9	<i>Phialophora mutabilis</i> 1R	2.22	1.3781	3.1171	6.4570	0.4218	0.1657	7.5
		-	1.8438	3.0852	5.2756	-	-	-
		-	0.7616	3.1917	5.3585	-	-	-
10	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	0.32	0.0219	0.1459	0.2912	8,3509	0.1869	7.3148
		-	0.3096	0.2103	0.1015	-	-	-
		-	0.2822	3.2226	3.2350	-	-	-
11	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2SR	0.29	0.5562	2.6486	2.6435	30.5211	0.1852	10.3704
		-	1.6932	2.5920	3.2130	-	-	-
		-	1.5288	2.5314	3.2031	-	-	-
12	<i>Penicillium chrysogenum</i> 3SR	0.12	0.5836	0.0181	0.4984	4.4707	0.1675	10.3704
		-	1.3781	0.0500	0.3637	-	-	-
		-	1.4740	0.0287	0.7368	-	-	-

(Continuación Tabla)

13	<i>Penicillium chrysogenum</i> 4SR	0.39 - -	1.3644 1.3781 1.3918	0.4441 0.0713 0.1885	0.5399 0.6953 0.3844	32.6445 - -	0.2028 - -	10.1852 - -
14	<i>Penicillium chrysogenum</i> 5SR	0.45 - -	1.4877 1.5014 1.0493	2.0096 1.4026 2.1267	2.6642 2.4778 2.5917	15.3255 - -	0.1586 - -	10.2778 - -
15	<i>Penicillium chrysogenum</i> 6SR	0.36 - -	1.0356 1.0219 1.0630	2.8509 2.8722 2.3322	3.1202 3.6280 3.0684	8.5196 - -	0.1639 - -	10.3704 - -
16	<i>Penicillium commune</i> 1R	0.36 - -	0.6657 1.4328 1.4192	0.2630 0.2417 0.2098	0.4466 0.4052 1.1409	0.4218 - -	0.1852 - -	7.5926 - -
17	<i>Penicillium commune</i> 2R	0.35 - -	0.9123 1.4603 1.4739	0.0288 0.0181 0.1246	0.8390 0.2497 0.3119	0.4218 - -	0.1622 - -	7.4074 - -
18	<i>Penicillium expansum</i> 1SR	0.45 - -	1.5836 1.5425 1.5562	2.8083 2.0096 3.1704	3.5036 2.6642 3.2860	28.0894 - -	0.1816 - -	7.5926 - -
19	<i>Penicillium frequentans</i> 1SR	0.15 - -	0.5973 1.4603 1.3781	1.4026 1.3813 1.0618	2.8922 3.2653 2.2808	17.1236 - -	0.1852 - -	10.1852 - -
20	<i>Penicillium frequentans</i> 2SR	0.24 - -	1.5288 1.4055 1.4077	3.2982 3.1810 3.1810	4.1254 4.1150 4.2083	140.9532 - -	1.1922 - -	10,2778 - -
21	<i>Penicillium restrictum</i> 1R	0.31 - -	1.1773 0.5973 0.9260	3.8313 1.9206 1.7049	1.3325 1.4604 1.2766	3.4585 - -	0.2099 - -	10.2778 - -
22	<i>Penicillium restrictum</i> 2SR	0.33 - -	1.6247 1.5288 1.3644	1.8711 1.6262 1.7966	2.7057 2.5502 2.2497	0.5905 - -	0.1374 - -	7.4074 - -
23	<i>Penicillium restrictum</i> 3SR	0.31 - -	1.6109 1.4739 1.5699	0.3695 0.3163 0.1033	0.2808 0.6021 0.5295	107.8870 - -	0.1533 - -	8.0556 - -
24	<i>Penicillium restrictum</i> 4SR	0.44 - -	1.6384 1.6520 1.5836	2.6486 2.4356 2.3078	2.7161 2.3844 2.8611	63.5175 - -	0.2029 - -	10.2778 - -
25	<i>Penicillium restrictum</i> 5SR	0.25 - -	1.3781 0.3781 1.3588	0.0820 0.6358 0.3908	0.6746 0.2912 0.2601	2.6149 - -	0.1763 - -	10.2778 - -

(Continuación Tabla)

26	<i>Penicillium</i>	0.43	1.2274	1.1885	0.3430	16.9549	0.1516	10.463
	<i>serie raistricke</i>	-	1.2022	1.1991	0.3015	-	-	-
	1R	-	1.0777	1.2204	0.2808	-	-	-
27	<i>Penicillium</i>	0.38	1.1589	0.2565	0.3173	8.3509	0.1498	7.3148
	<i>serie raistricke</i>	-	0.1452	2.1672	1.444	-	-	-
	2R	-	1.5699	2.2673	2.0759	-	-	-
28	<i>Penicillium</i>	0.36	0.0000	1.0347	0.1974	1.7714	0.1834	7.4074
	<i>purpurascens</i>	-	0.4466	1.7511	1.6683	-	-	-
	1R	-	0.3370	1.7820	1.5004	-	-	-
29	<i>Penicillium</i>	0.40	0.0000	0.2311	0.7471	0.4218	0.1586	7.037
	<i>purpurescens</i>	-	1.3918	0.2212	0.8912	-	-	-
	2R	-	1.5562	0.2011	0.8021	-	-	-
30	<i>Trichoderma</i>	0.37	0.2959	0.0745	0.8093	2.4462	0.1763	7.3148
	<i>konningii</i> 1SR	-	1.6657	0.4970	0.7782	-	-	-
		-	1.5562	0.3802	0.4466	-	-	-

Tabla 13. Actividad enzimática de cepas fúngicas y su peso seco micelial aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivada en pradera en rotación.

Nº	Taxa	Peso seco grs.	Proteasas mg/mL	Fosfatasa Alcalina mg/mL	Fosfatasa Acida mg/mL	Celulasa µg/mL	Ureasa µgN/mL	Amilasa Mg/mL
1	<i>Absidia cilindrospora</i> 1R	0.31	0.1920	0.7636	0.1150	5.3142	0.1657	9.6296
		-	0.0630	0.3802	0.1668	-	-	-
		-	0.0356	0.4867	0.1461	-	-	-
2	<i>Absidia glauca</i> 1SR	0.20	0.7890	0.1565	0.2705	100.632	0.000	8.2407
		-	1.4740	0.4121	0.3119	-	-	-
		-	1.9945	0.2843	0.5813	-	-	-
3	<i>Aspergillus niger</i> 1R	0.26	6.0790	0.3482	0.1668	9.8693	0.1410	11.2963
		-	1.9945	0.2311	0.7638	-	-	-
		-	1.7068	1.0192	1.4311	-	-	-
4	<i>Chaetomium globosum</i> 1R	0.12	1.8849	2.3930	2.4466	13.7495	0.2312	9.7222
		-	1.1726	2.4036	2.1461	-	-	-
		-	2.2959	2.3610	2.3844	-	-	-
5	<i>Chaetomium globosum</i> 2R	0.19	1.0330	0.1139	0.8611	13.4121	0.1516	10.556
		-	1.6068	3.5431	0.7989	-	-	-
		-	1.2685	3.1491	0.7679	-	-	-
6	<i>Fusarium oxysporum</i> 1R	0.06	1.4466	0.7250	2.0208	16.2801	0.2365	11.2963
		-	1.3507	0.3573	1.7820	-	-	-
		-	1.5151	0.0136	1.6741	-	-	-
7	<i>Microsporum gypseum</i> 1R	0.26	0.0980	0.8807	7.4980	11.725	0.1799	11.1111
		-	0.0212	0.8807	2.5192	-	-	-
		-	0.4055	1.9888	1.3793	-	-	-
8	<i>Mortierella vinacea</i> 1SR	0.40	1.1452	0.0074	0.6642	50.6959	0.1445	8.0556
		-	1.1041	0.0607	0.7472	-	-	-
		-	1.2548	1.7114	0.6539	-	-	-
9	<i>Mucor hiemalis</i> 1R	0.27	1.7753	0.3649	0.7341	11.0502	0.2046	8.2407
		-	0.2411	0.6677	0.1150	-	-	-
		-	1.1315	0.5506	0.5917	-	-	-
10	<i>Mucor hiemalis</i> 2SR	0.41	1.5425	0.5612	0.6435	1.0966	0.2029	7.5
		-	1.6384	0.1459	0.6746	-	-	-
		-	2.1863	0.1991	1.2756	-	-	-
11	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1R	0.35	0.6590	0.2020	4.2210	22.6908	0.1657	10.8333
		-	0.1315	0.0074	1.7834	-	-	-
		-	0.0904	0.8701	3.2135	-	-	-

(Continuación Tabla)

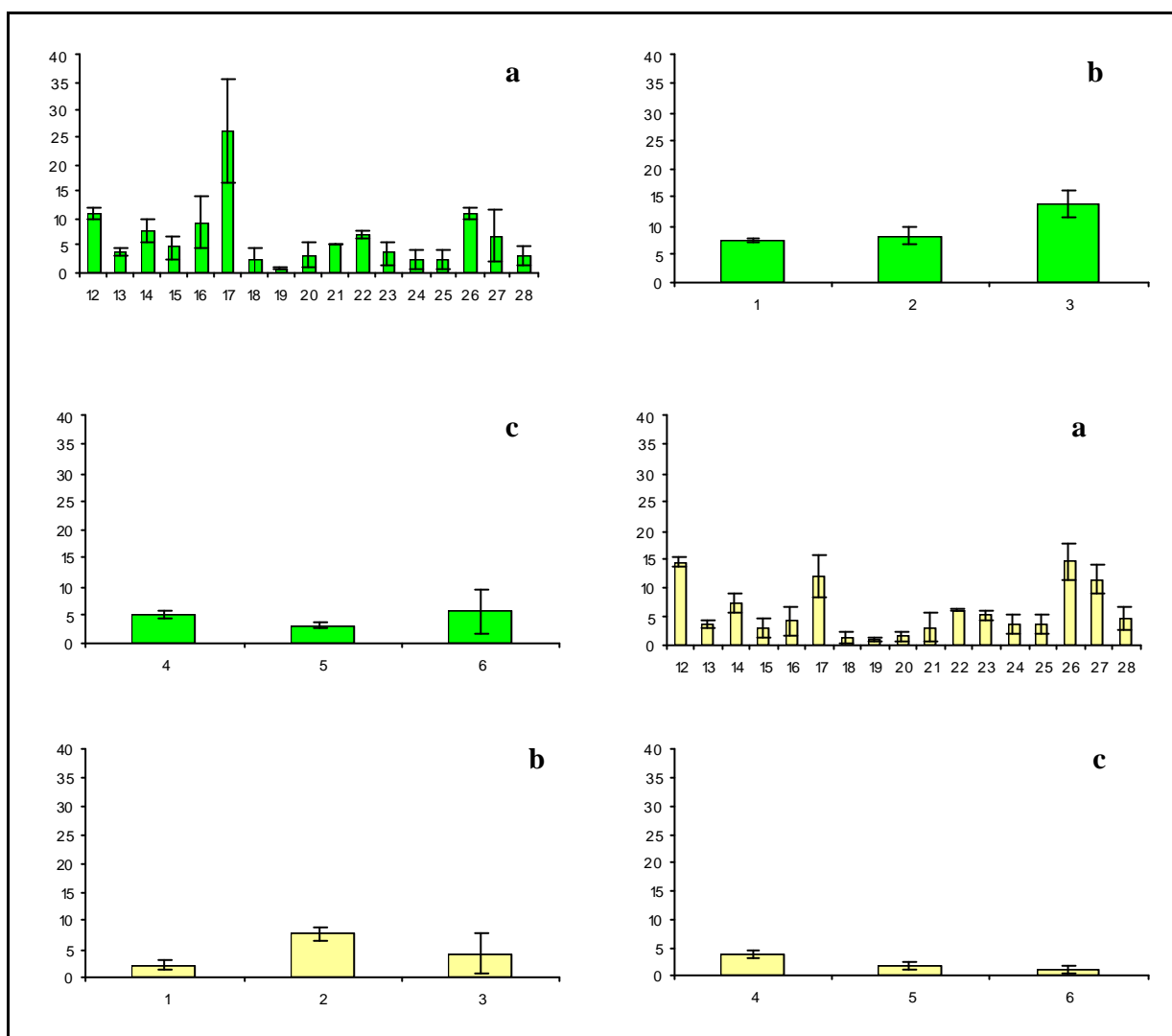
12	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2SR	0.23 - -	1.4603 1.4055 0.8712	0.0000 0.2950 0.8062	0.7472 0.1876 0.9026	8.3509 - -	0.2082 - -	8.3333 - -
13	<i>Penicillium commune</i> 1SR	0.18 - -	0.5288 0.9945 0.5288	0.4334 0.7316 0.2950	0.5089 0.7161 0.6850	43.6103 - -	0.2054 - -	8.2407 - -
14	<i>Penicillium frequentans</i> 1R	0.15 - -	0.9260 1.4603 1.3644	0.3378 0.4547 1.0192	0.1460 0.4778 0.2394	8.1822 - -	0.1551 - -	7.5926 - -
15	<i>Penicillium frequentans</i> 2SR	0.20 - -	0.6794 0.9671 1.1178	0.1352 0.0181 0.3056	4.5710 5.5140 5.6280	9.7005 - -	0.2223 - -	8.3333 - -
16	<i>Penicillium frequentans</i> 3SR	0.24 - -	2.0082 0.6931 1.0493	0.1352 1.1363 0.7955	0.2186 0.3326 1.2238	27.0072 - -	0.1976 - -	8.2407 - -
17	<i>Penicillium frequentans</i> 4SR	0.10 - -	1.4877 1.5836 1.6520	1.5942 1.1886 1.4199	2.0114 1.4892 1.1727	11.7250 - -	0.1728 - -	11.2037 - -
18	<i>Penicillium purpurascens</i> 1SR	0.12 - -	1.3644 1.5425 1.6520	0.3163 0.0926 0.1352	0.2601 0.2290 1.0373	24.0405 - -	0.2117 - -	3.6111 - -
19	<i>Penicillium purpurascens</i> 2SR	0.07 - -	1.2680 0.9945 1.0900	0.3376 0.5293 0.8594	0.3223 0.6746 0.9958	16.201 - -	0.1799 - -	8.3333 - -
20	<i>Penicillium purpurascens</i> 3SR	0.34 - -	2.0000 0.3233 0.4877	1.9976 1.9702 0.4654	1.9803 1.7420 1.0787	11.0502 - -	0.1622 - -	11.2037 - -
21	<i>Penicillium restrictum</i> 1SR	0.26 - -	0.1400 0.3370 0.1589	0.6475 0.9553 0.9233	1.0891 1.2342 0.8819	5.989 - -	0.1781 - -	11.0185 - -
22	<i>Penicillium restrictum</i> 2R	0.44 - -	2.0000 1.5288 1.4466	7.8570 1.6124 1.2735	1.8510 0.7730 1.4844	1.434 - -	0.1852 - -	10.463 - -
23	<i>Penicillium restrictum</i> 3SR	0.43 - -	0.8460 0.3096 0.6384	1.7859 1.0930 0.3802	1.4829 1.2964 1.1306	11.5563 - -	0.1665 - -	10.9259 - -
24	<i>Penicillium restrictum</i> 4SR	0.41 - -	0.2137 1.5699 1.6247	0.1885 0.4760 0.3056	1.0269 1.3585 0.0943	16.2801 - -	0.1869 - -	8.2407 - -

(Continuación Tabla)

25	<i>Penicillium restrictum</i> 5SR	0.36	1.5973	0.6038	0.9648	24.0405	0.1463	8.3333
		-	1.4466	0.5399	0.2912	-	-	-
		-	1.3644	0.6697	0.5192	-	-	-
26	<i>Penicillium restrictum</i> 6SR	0.41	1.1320	0.0713	0.2912	12.9059	0.1586	6.2037
		-	1.1041	0.1565	0.7368	-	-	-
		-	1.3781	0.4654	0.5089	-	-	-
27	<i>Penicillium restrictum</i> 7SR	0.23	0.8986	1.4451	2.1358	4.1333	0.1374	5.6481
		-	1.8712	1.0618	2.1772	-	-	-
		-	1.4192	1.0085	2.5192	-	-	-
28	<i>Penicillium restrictum</i> 8SR	0.34	1.5699	0.1999	0.1876	24.0405	0.1675	8.2407
		-	0.8575	0.0288	0.2394	-	-	-
		-	0.9260	0.2204	0.8300	-	-	-
29	<i>Penicillium serie raistricke</i> 1SR	0.25	1.5836	0.3589	1.3689	9.0257	0.1604	7.8704
		-	0.9808	0.1672	0.1150	-	-	-
		-	1.5836	0.4121	0.3948	-	-	-
30	<i>Zygorhynchus moelleri</i> 1SR	0.33	1.3644	0.0000	1.3275	92.8722	0.2524	8.3333
		-	1.3919	0.4121	0.9233	-	-	-
		-	1.4192	0.1669	1.2342	-	-	-

ANEXO 4

Cuadro 1. Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L. cultivada en pradera en rotación.

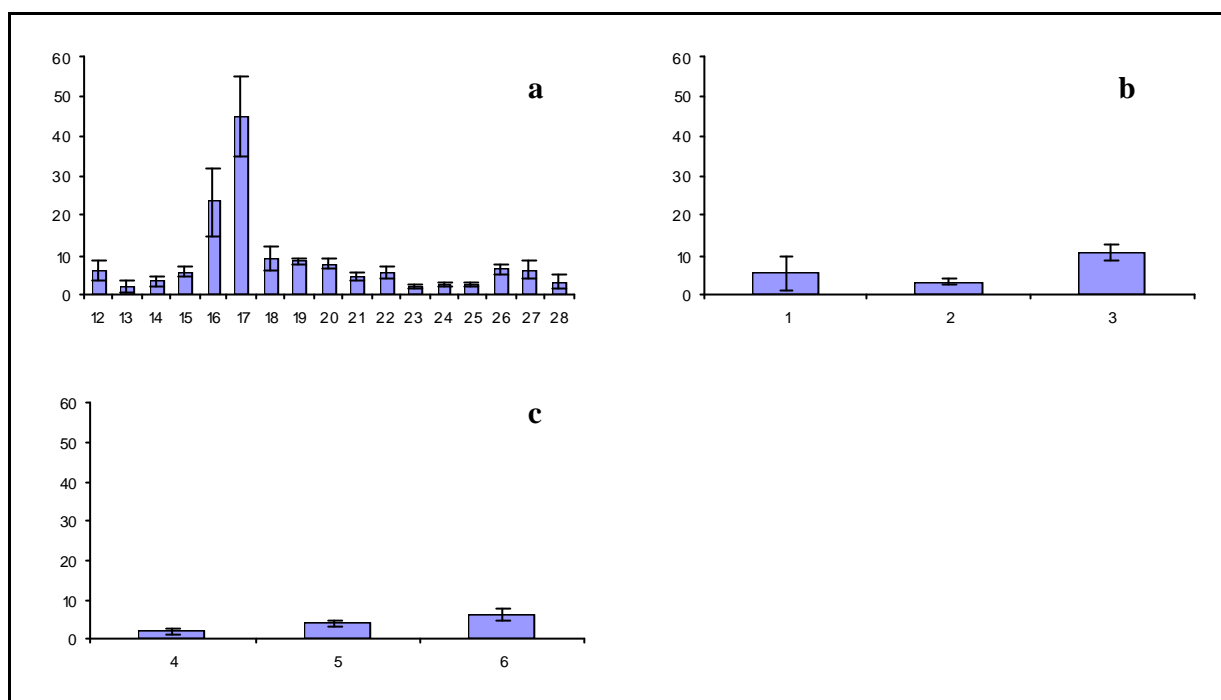


a= Especies de *Penicillium* sp. ; b= Especies de *Absidia* sp.; c= Especies de *Aspergillus* sp. ;

■ Fosfatasa àcida ; ■ Fosfatasa alcalina Eje X= Código asignado a cepas fúngicas;

Eje Y = Unidades en mg/mL·gr micelio.

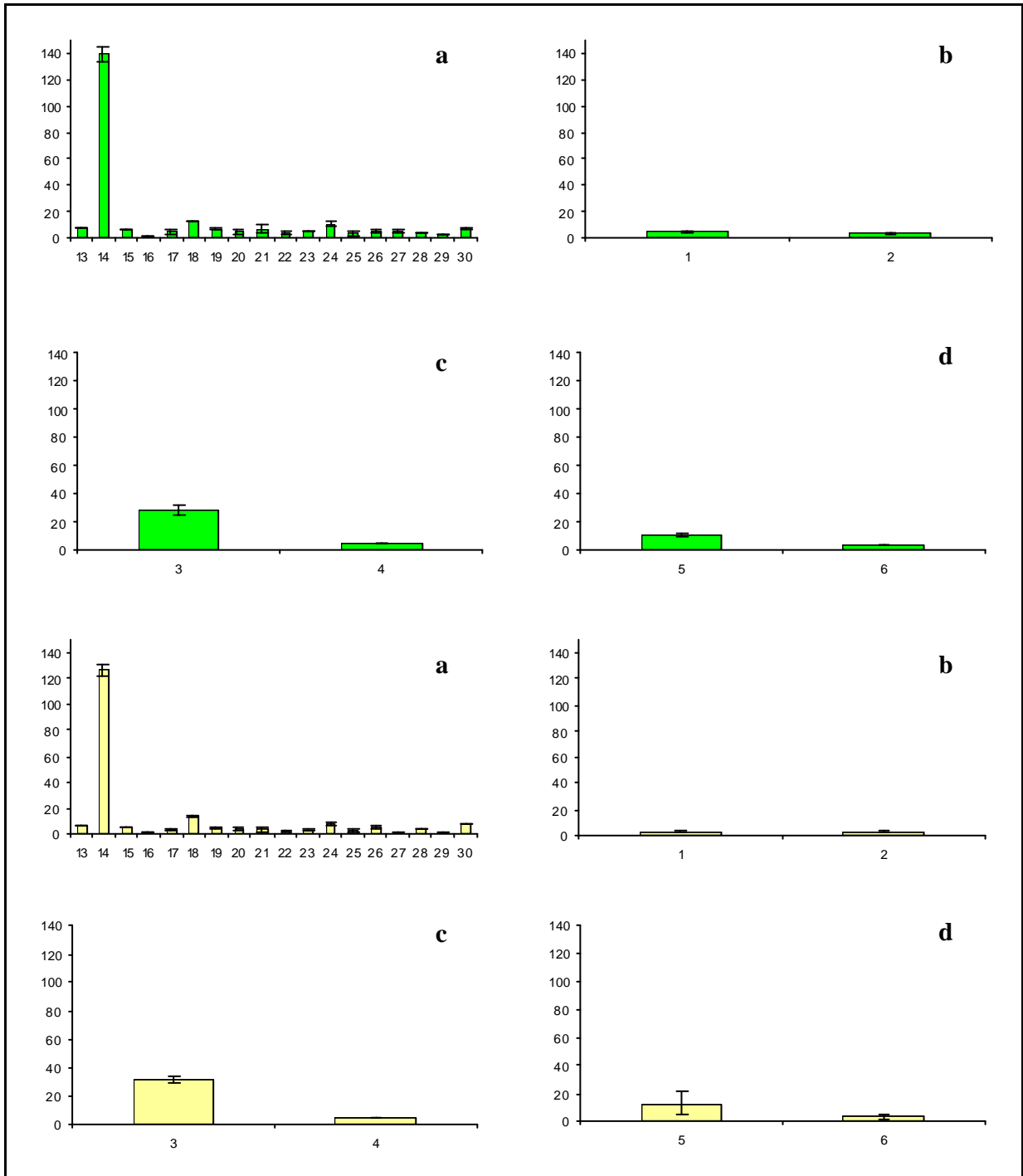
(Continuación Cuadro 1)



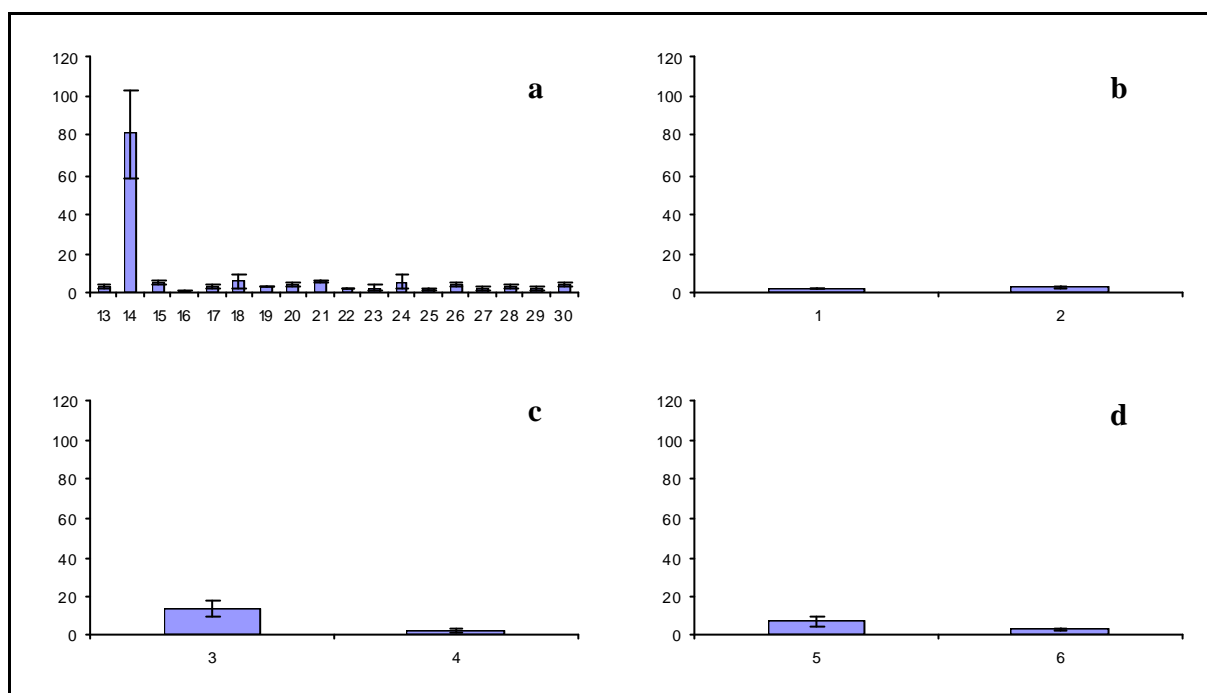
a= Especies de *Penicillium* sp. ; b= Especies de *Absidia* sp.; c= Especies de *Aspergillus* sp. ;

■ Fosfatasa àcida; ■ Fosfatasa alcalina; ■ Proteasas; Eje X= Código asignado a cepas fúngicas; Eje Y= Unidades en mg/mL·gr micelio.

Cuadro 2. Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivada en pradera permanente.

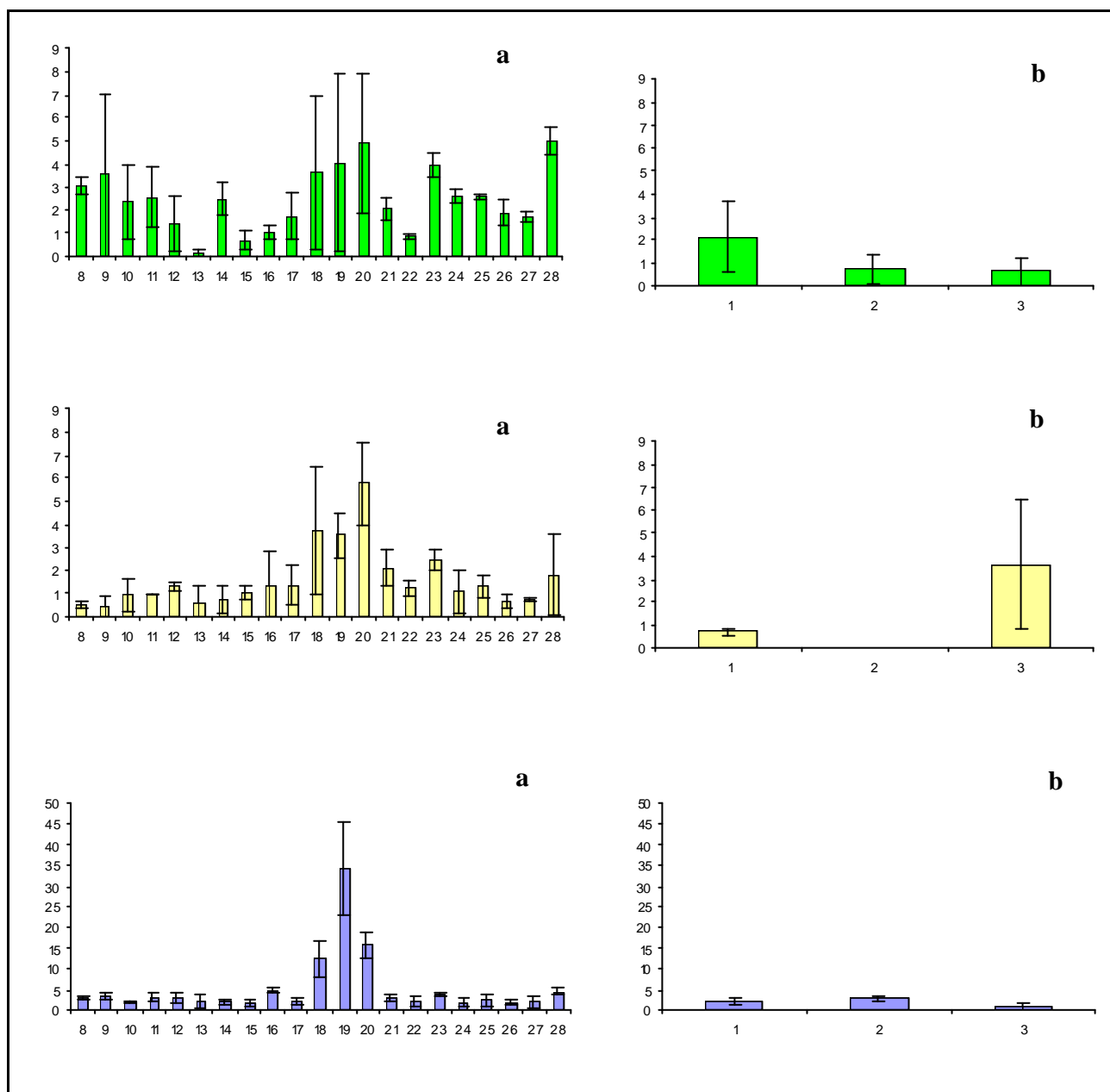


(Continuación Cuadro 2)



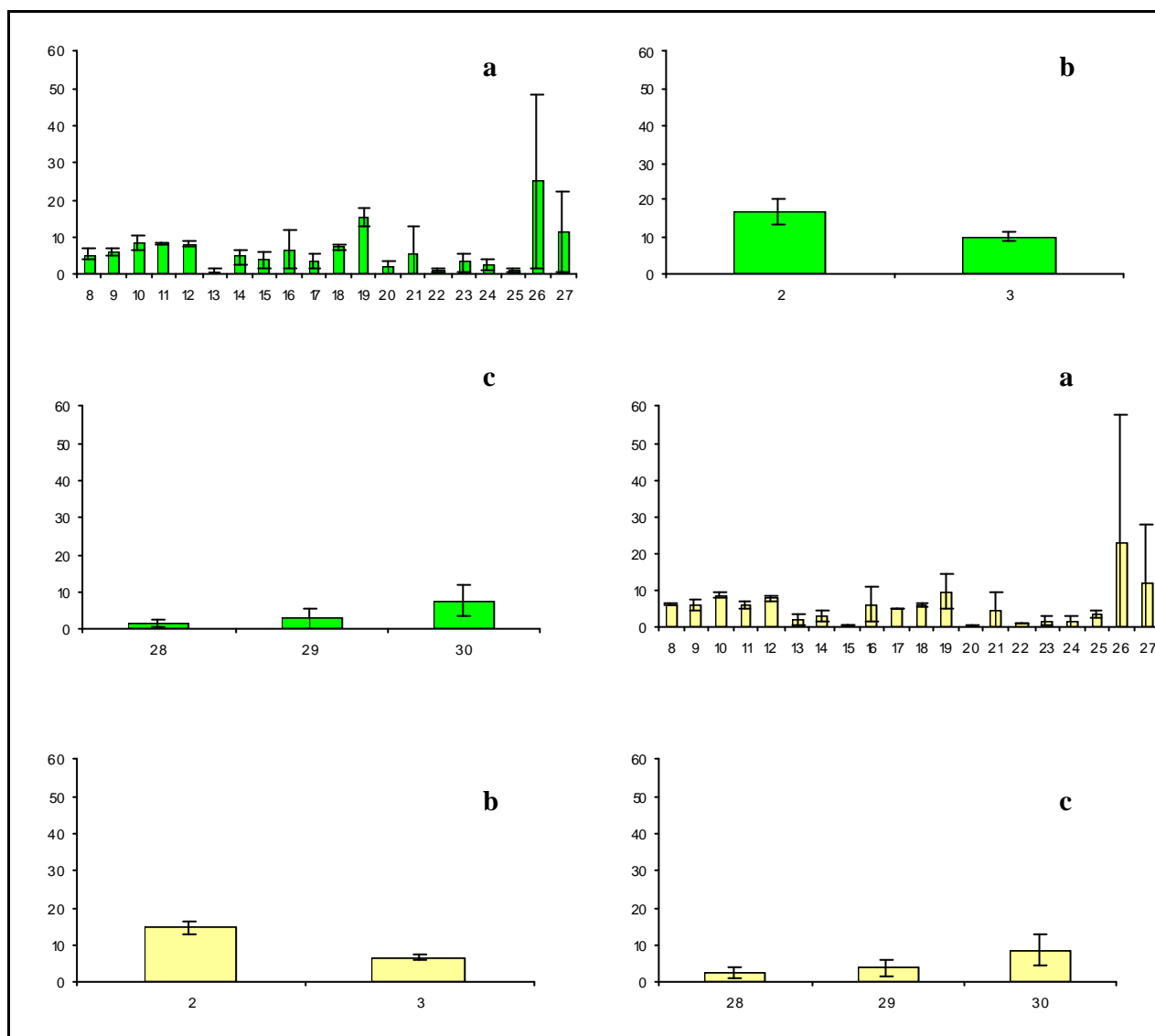
a= Especies de *Penicillium* sp. ; b= Especies de *Absidia* sp.; c= Especies de *Acremonium* sp. ;
d= Especies de *Aspergillus* sp; ■ Fosfatasa ácida ; ■ Fosfatasa alcalina; ■ Proteasas ;
Eje X = Código asignado a cepas fúngicas; Eje Y= Unidades en mg/mL·gr micelio.

Cuadro 3. Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* L. cultivada en pradera en rotación.

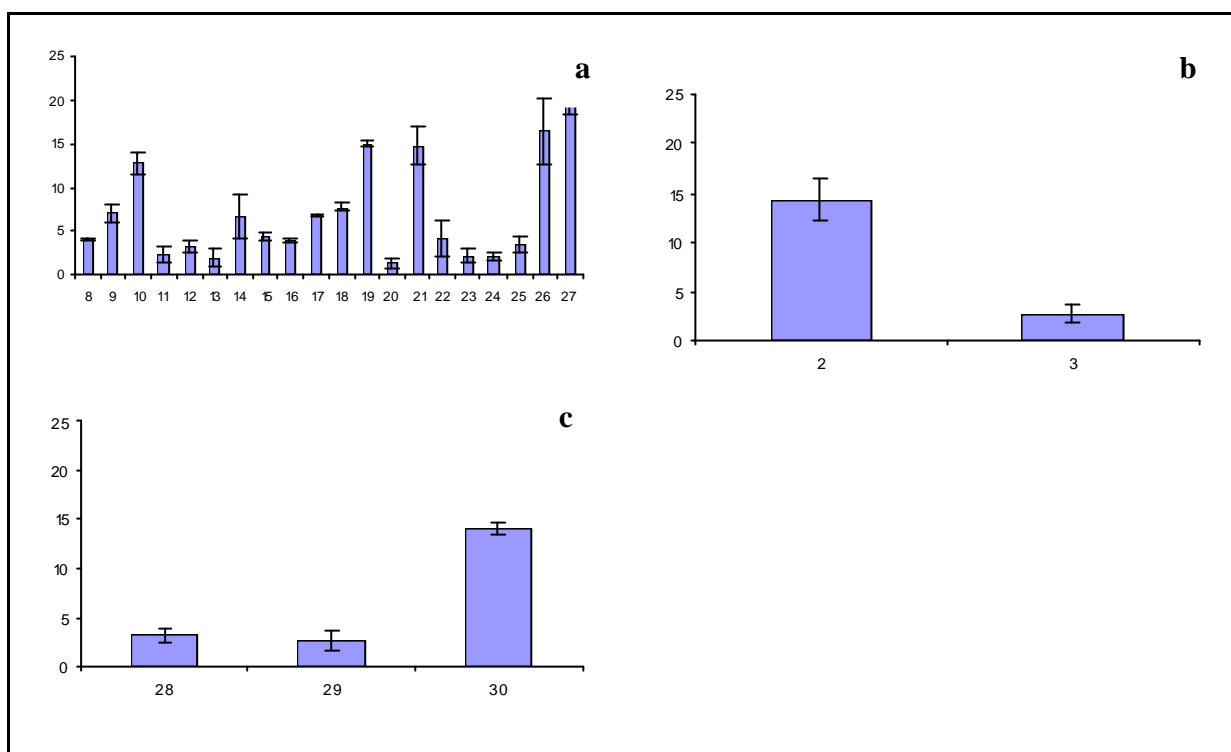


a= Especies de *Penicillium* sp. ; b= Especies de *Absidia* sp.; ■ Fosfatasa ácida; ■ Fosfatasa alcalina; ■ Proteasas; Eje X=Código asignado a cepas fúngicas; Eje Y=Unidades en mg/mL·gr micelio.

Cuadro 4. Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivada en pradera permanente.



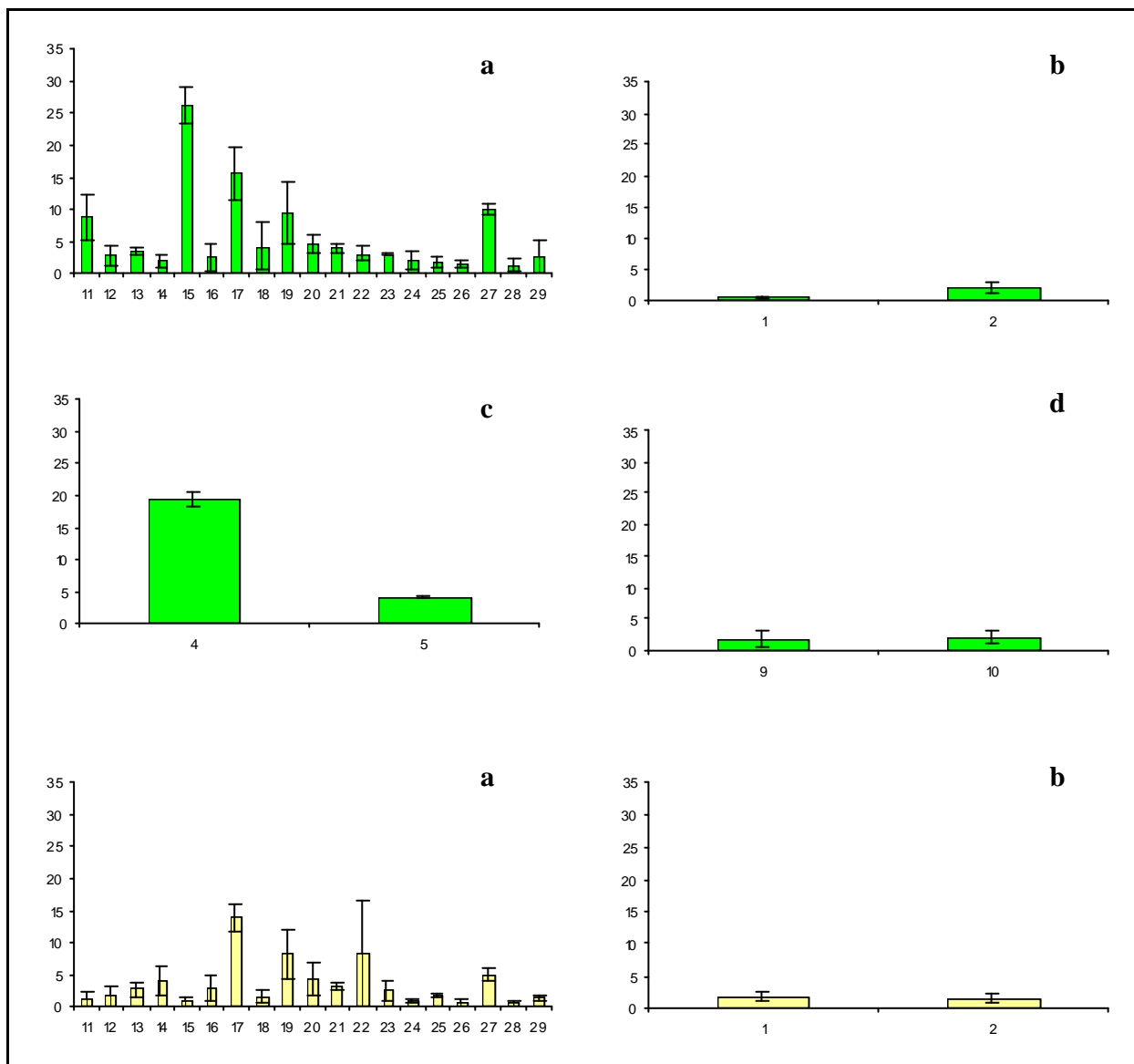
(Continuación Cuadro 4)



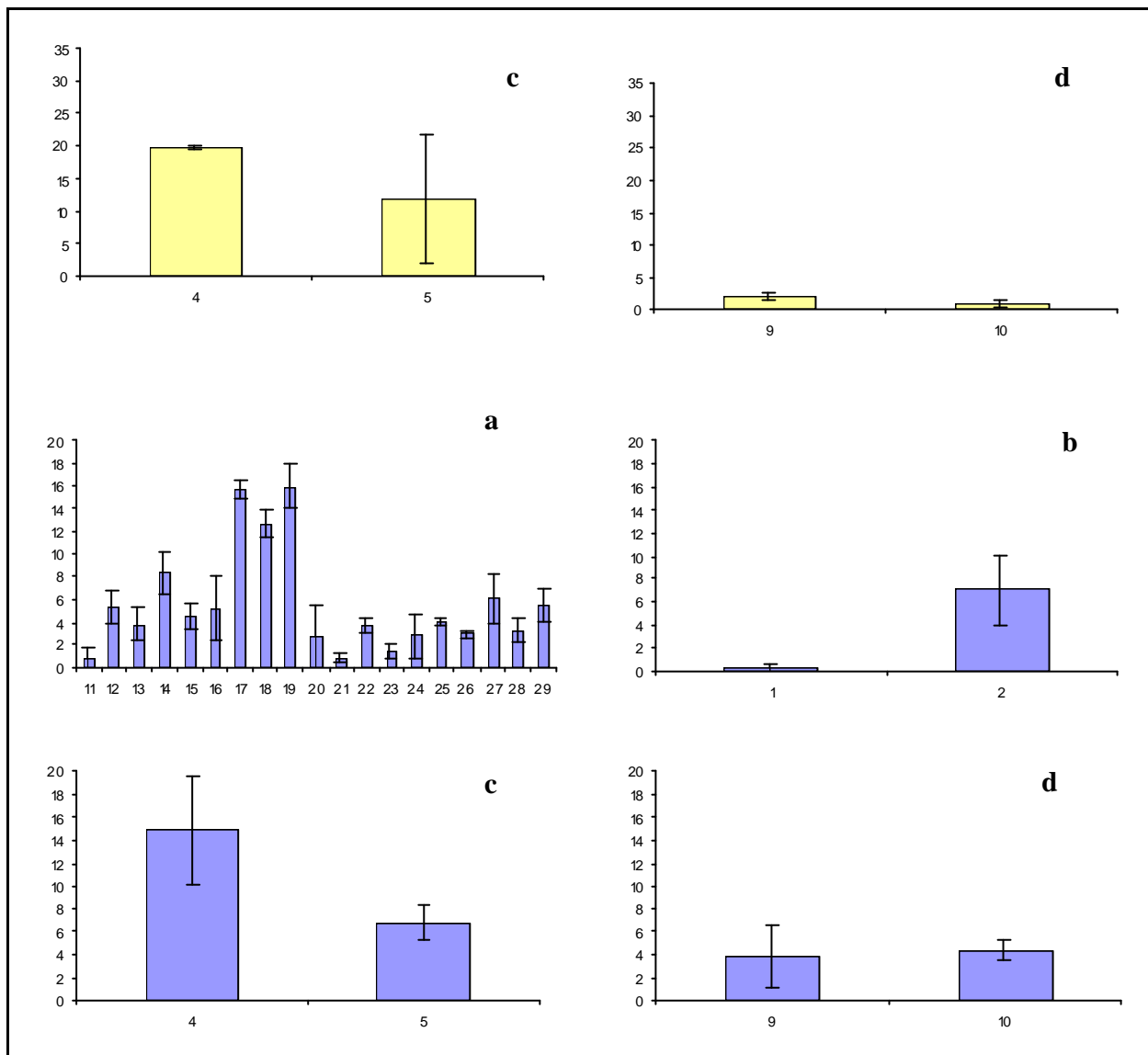
a= Especies de *Penicillium* sp. ; b= Especies de *Bauveria* sp.; c= Especies de *Trichoderma* sp. ;

■ Fosfatasa ácida; □ Fosfatasa alcalina; ■ Proteasas; Eje X=Código asignado a cepas fúngicas; Eje Y= Unidades en mg/mL·gr micelio.

Cuadro 5. Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* L. cultivada en pradera en rotación.



(Continuación Cuadro 5)

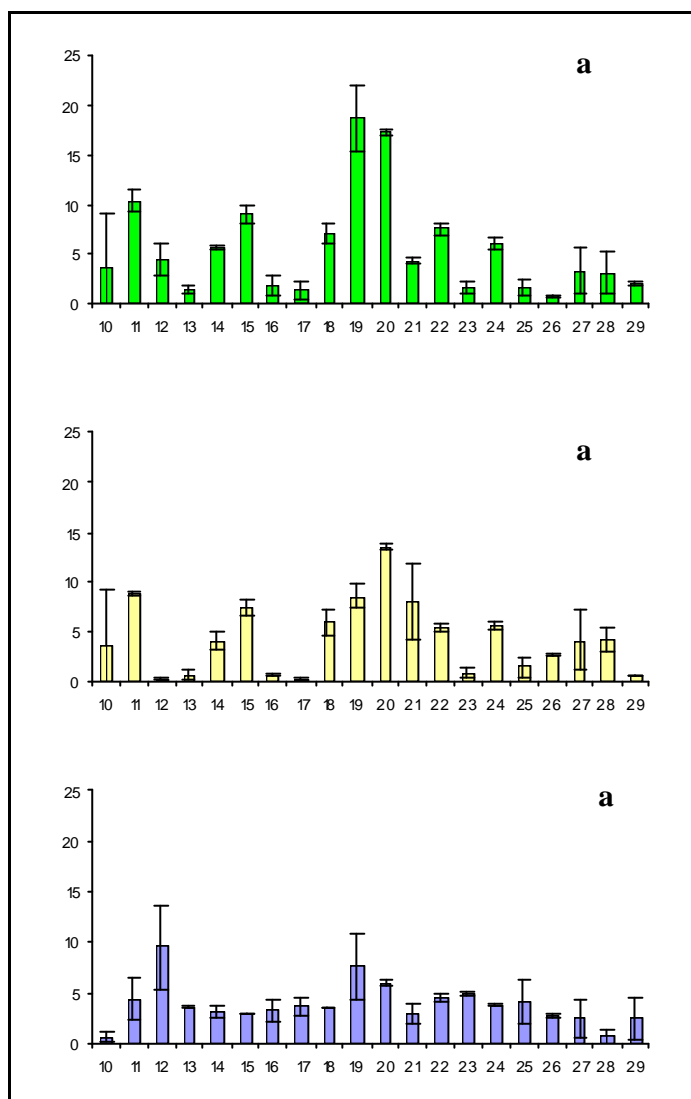


a= Especies de *Penicillium* sp. ; b= Especies de *Absidia* sp.; c= Especies de *Chaetonium* sp. ;

d= Especies de *Mucor* sp; ■ Fosfatasa ácida ; ■ Fosfatasa alcalina; ■ Proteasas ; Eje X =

Código asignado a cepas fúngicas; Eje Y= Unidades en mg/mL·gr micelio.

Cuadro 6. Gráficos de cepas fúngicas agrupadas en géneros, aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivada en pradera permanente.



a= Especies de *Penicillium* sp; ■ Fosfatasa ácida; ■ Fosfatasa alcalina; ■ Proteasas;

Eje X=Código asignado a cepas fúngicas; Eje Y= Unidades en mg/mL·gr micelio.

ANEXO 5

Tabla 14. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *Lolium perenne* L. cultivadas en pradera en rotación .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
13	5.9 ± 2.3 a	14.4 ± 0.7 abcd	10.8 ± 1.1 abc
23	2.0 ± 1.5 ab	3.5 ± 0.7 abcd	3.9 ± 0.6 abc
24	3.2 ± 1.0 abc	7.4 ± 1.8 abcd	7.8 ± 2.1 ab
25	5.6 ± 1.3 abc	3.0 ± 1.6 abcd	4.6 ± 2.2 ab
28	23.4± 8.7 abc	4.1 ± 2.6 abcd	9.2 ± 4.7 abc
14	45.1± 10.1abc	12.1 ± 2.5 cd	26.1 ± 9.5 bc
21	9.2 ± 3.1 abc	1.3 ± 0.9 abc	2.2 ± 2.2 abc
22	8.4 ± 1.1 bc	1.0 ± 0.3 bcd	0.8 ± 0.2 abc
15	7.5 ± 1.3 bc	1.5 ± 0.7 abcd	3.2 ± 2.2 abc
12	4.4 ± 0.9 bc	3.0 ± 2.4 d	5.2 ± 0.0 c
27	5.4 ± 1.5 bcd	6.2 ± 0.2 d	7.1 ± 0.6 abc
26	1.9 ± 0.5 bcd	5.2 ± 0.9 d	3.7 ± 2.2 c
20	2.4 ± 0.5 cd	3.6 ± 1.6 abc	2.4 ± 1.7 abc
19	2.4 ± 0.5 cd	3.6 ± 1.6 a	2.4 ± 1.7 a
18	6.2 ± 1.2 cd	14.5 ± 3.1 ab	11.0 ± 1.1 ab
16	6.0 ± 2.1 de	11.5 ± 2.5 abcd	6.7 ± 4.8 bc
17	3.1 ± 1.8 e	4.7 ± 2.2 d	3.2 ± 1.7 d

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 15. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Absidia* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera en rotación .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
1	5.4 ± 4.4 ab	2.1 ± 0.7 a	7.5 ± 0.2 a
2	3.1 ± 0.7 a	7.8 ± 1.1 b	8.4 ± 1.4 a
3	10.6 ± 2.3 b	4.2 ± 3.5 ab	13.8 ± 2.4 b

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 16. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Aspergillus* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera en rotación .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
4	1.7 ± 0.8 a	4.0 ± 0.6 b	4.9 ± 0.7 a
5	3.9 ± 1.0 ab	1.5 ± 0.6 a	3.0 ± 0.5 a
6	6.2 ± 1.6 b	1.0 ± 0.6 a	5.6 ± 3.9 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 17. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
13	3.1 ± 0.8 bc	6.0 ± 0.3 efghi	7.6 ±0.1 efg
14	81.2 ± 22.3 c	127.1± 4.5 i	139.7±5.4 f
15	5.0 ± 0.8 bc	4.6 ± 0.2 defgh	6.3 ±0.5 cdefg
16	0.6 ± 0.5 a	1.4 ±0.1abc	1.6 ±0.1 a
17	3.0 ± 1.1 bc	3.1 ±1.1 cdefg	4.5 ±2.2 bcdef
18	5.5 ± 3.6 bc	14.3 ±0.8 hi	12.3 ±0.6 ef
19	2.9 ± 0.4 bc	4.4 ±0.2 defgh	6.2 ±0.7 cdefg
20	3.7 ± 1.0 bc	4.0 ±1.2 defgh	4.3 ±0.9 bcdef
21	5.6 ± 0.8 bc	3.3 ±2.2 cdef	6.6 ±2.9 cdefg
22	2.1 ± 0.1 b	2.3 ±0.8 bcd	3.6 ±1.6 bcd
23	2.2 ± 1.3 b	2.9 ±0.4 cdefg	5.0 ±0.2 bcdef
24	5.3 ± 3.1 bc	7.5 ±0.9 ghi	10.3 ±2.2 efg
25	1.7 ± 0.2 b	2.7 ±1.0 cde	3.1 ±1.5 abc
26	3.7 ± 0.9 bc	4.8 ±0.8 defgh	4.8 ±1.2 bcdef
27	1.9 ± 0.6 b	0.8 ±0.4 a	5.1 ±0.9 bcdef
28	3.0 ± 0.8 bc	3.6 ±0.2 defgh	3.6 ±0.5 bcde
29	2.0 ± 0.5 b	0.8 ±0.5 ab	2.5 ±0.3 ab
30	3.8 ± 0.7 bc	7.0 ±0.1 fghi	6.9 ±0.3 cdefg

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 18. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Absidia* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
1	2.2 ± 0.2 a	2.9 ± 0.6 a	4.4 ± 0.6 a
2	2.7 ± 0.3 a	2.9 ± 0.3 a	3.3 ± 0.8 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 19. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Acremonium* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
3	13.6 ± 3.8 b	31.1 ± 2.3 b	29.2 ± 3.5 b
4	2.4 ± 1.0 a	4.5 ± 0.5 a	4.6 ± 0.3 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 20. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Aspergillus* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
5	6.8 ± 2.5 b	12.9 ± 8.9 a	10.8 ± 1.1 b
6	2.5 ± 0.8 a	3.0 ± 1.6 a	3.9 ± 0.1 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 21. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Epicoccum* sp. aisladas desde la rizósfera de *L. perenne* cultivadas en pradera permanente .

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
8	6.1 ± 3.0 a	17.1 ± 3.5 b	14.9 ± 0.8 a
9	4.4 ± 1.8 a	11.8 ± 0.4 a	23.2 ± 22.4 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 22. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *Trifolium repens* cultivadas en pradera en rotación

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
8	2.8 ± 0.4 abcd	0.5 ± 0.1 a	3.0 ± 0.4 b
9	3.3 ± 0.8 abcd	0.4 ± 0.4 a	3.5 ± 3.5 b
10	1.9 ± 0.2 abcd	0.9 ± 0.7 a	2.4 ± 1.6 b
11	2.9 ± 1.0 abcd	0.9 ± 0.0 a	2.5 ± 1.3 b
12	2.9 ± 1.1 abcd	1.3 ± 0.2 a	1.4 ± 1.2 b
13	2.1 ± 1.6 ab	0.6 ± 0.8 a	0.2 ± 0.1 a
14	1.8 ± 0.4 abc	0.8 ± 0.6 a	2.5 ± 0.7 b
15	1.7 ± 0.7 ab	1.0 ± 0.3 a	0.7 ± 0.4 ab
16	5.0 ± 0.6 abcd	1.3 ± 1.5 a	1.0 ± 0.3 b
17	2.0 ± 0.6 abcd	1.4 ± 0.9 a	1.7 ± 1.0 b
18	12.5 ± 4.5 bcd	3.7 ± 2.7 a	3.6 ± 3.3 b
19	34.5 ± 11.3 d	3.5 ± 1.0 a	4.1 ± 3.9 b
20	15.8 ± 3.1 cd	5.8 ± 1.8 a	4.9 ± 3.0 b
21	2.9 ± 0.8 abcd	2.1 ± 0.8 a	2.1 ± 0.5 b
22	1.9 ± 1.2 ab	1.2 ± 0.3 a	0.9 ± 0.1 b
23	3.6 ± 0.3 abcd	2.5 ± 0.5 a	4.0 ± 0.5 b
24	1.8 ± 1.0 ab	1.1 ± 0.9 a	2.6 ± 0.3 b
25	2.2 ± 1.3 abcd	1.3 ± 0.5 a	2.6 ± 0.1 b
26	1.8 ± 0.5 abc	0.7 ± 0.3 a	1.9 ± 0.5 b
27	1.8 ± 1.6 a	0.7 ± 0.1 a	1.8 ± 0.2 b
28	4.5 ± 0.9 abcd	1.8 ± 1.8 a	5.0 ± 0.6 b

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05).

Tabla 23. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Absidia* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera en rotación

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
1	2.0 ± 0.9 a	0.7 ± 0.2 b	2.1 ± 1.6 a
2	2.6 ± 0.8 a	0.0 ± 0.0 a	0.7 ± 0.7 a
3	1.0 ± 0.8 a	3.7 ± 0.8 b	0.6 ± 0.6 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05).

Tabla 24. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente.

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
8	4.1 ± 0.1 bcd	6.3 ± 0.3 e	5.3 ± 1.6 cde
9	7.1 ± 1.1 defgh	6.1 ± 1.7 e	6.2 ± 0.8 cde
10	12.9± 1.3 fghij	8.8 ± 0.7 e	8.5 ± 2.0 de
11	2.5 ± 0.9 abc	6.2 ± 1.2 e	8.3 ± 0.3 de
12	3.3 ± 0.7 bcd	8.0 ± 0.6 e	8.3 ± 0.8 de
13	2.0 ± 1.1 ab	1.8 ± 1.3 bcd	0.7 ± 0.7 a
14	6.7 ± 2.6 def	2.8 ± 1.6 cde	4.6 ± 2.0 cde
15	4.4 ± 0.5 cde	0.3 ± 0.1 ab	4.0 ± 2.4 cde
16	4.0 ± 0.3 bcde	6.4 ± 4.8 de	6.5 ± 5.2 cde
17	6.8 ± 0.1 defg	4.9 ± 0.3 de	3.5 ± 2.2 bcde
18	7.7 ± 0.6 efghi	6.2 ± 0.6 e	7.5 ± 0.8 cde
19	15.1± 0.3 hij	9.6 ± 4.8 e	15.2± 2.4 e
20	1.3 ± 0.6 a	0.3 ± 0.2 a	1.7 ± 2.6 abc
21	14.8± 2.2 ghij	4.4 ± 5.2 cde	5.8 ± 7.2 bcde
22	4.2 ± 2.0 bcde	1.1 ± 0.0 abcd	1.1 ± 0.4 abc
23	2.2 ± 0.8 abc	1.6 ± 1.1 abcd	3.1 ± 2.6 bcde
24	2.2 ± 0.4 abc	1.5 ± 1.4 abc	2.6 ± 1.4 bcd
25	3.5 ± 0.8 bcde	3.2 ± 0.9 cde	1.0 ± 0.6 ab
26	16.5± 3.8 ij	22.8± 33.9 e	25.2± 23.6 e
27	20.1± 1.7 j	12.1± 15.3 e	11.5± 11.0 de

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 25. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Bauveria* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente.

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
2	14.3± 2.2 b	14.7± 1.7 b	16.7 ± 3.2 b
3	2.7 ± 1.0 a	6.9 ± 0.8 a	10.2 ± 1.4 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 26. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Trichoderma* sp. aisladas desde la rizósfera de *T. repens* cultivadas en pradera permanente.

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
28	3.2 ± 0.8 ab	2.3 ± 1.2 a	1.4 ± 1.1 a
29	2.6 ± 1.0 a	3.9 ± 2.4 a	2.7 ± 3.0 a
30	14.1 ± 0.6 b	8.6 ± 4.3 a	7.7 ± 4.4 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05).

Tabla 27. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *Dactylis glomerata* cultivadas en pradera en rotación

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
11	0.8 ± 0.9 a	1.0 ± 1.3 ab	8.8 ± 3.5 bcde
12	5.4 ± 1.4 cde	1.6 ± 1.8 abc	2.7 ± 1.6 abcd
13	3.8 ± 1.5 abcde	2.7 ± 1.2 abc	3.5 ± 0.6 abcde
14	8.3 ± 1.9 def	4.0 ± 2.4 abc	1.9 ± 1.1 abc
15	4.6 ± 1.1 cde	0.8 ± 0.7 a	26.2 ± 2.9 e
16	5.2 ± 2.8 cde	2.9 ± 2.1 abc	2.5 ± 2.3 abc
17	15.7 ± 0.8 f	14.0 ± 2.0 d	15.6 ± 4.2 de
18	12.7 ± 1.2 ef	1.5 ± 1.0 abc	4.2 ± 3.8 abcd
19	16.0 ± 2.0 f	8.2 ± 3.8 cd	9.5 ± 4.8 bcde
20	2.8 ± 2.7 abcd	4.3 ± 2.6 abc	4.7 ± 1.4 abcde
21	0.8 ± 0.4 ab	3.2 ± 0.7 abc	4.1 ± 0.7 abcde
22	3.8 ± 0.7 abcde	8.1 ± 8.4 bcd	3.1 ± 1.2 abcd
23	1.4 ± 0.6 abc	2.5 ± 1.6 abc	3.0 ± 0.4 abcd
24	2.8 ± 1.9 abcd	0.8 ± 0.4 a	3.0 ± 1.6 ab
25	4.1 ± 0.3 bcde	1.7 ± 0.2 abc	1.6 ± 1.0 abc
26	2.9 ± 0.4 abcde	0.6 ± 0.5 a	1.2 ± 0.5 ab
27	6.1 ± 2.1 def	5.1 ± 1.0 abcd	9.9 ± 0.9 cde
28	3.3 ± 1.2 abcde	0.4 ± 0.3 a	1.2 ± 1.0 a
29	5.5 ± 1.4 cd	1.3 ± 0.5 ab	2.5 ± 2.6 abc

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05).

Tabla 28. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Absidia* sp. aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivadas en pradera en rotación

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
1	0.3 ± 0.3 a	1.8 ± 0.6 a	0.5 ± 0.1 a
2	7.1 ± 3.0 b	1.4 ± 0.6 a	1.9 ± 0.8 b

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 29. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Chaetomium* sp. aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivadas en pradera en rotación

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
4	14.9± 4.7 b	19.9 ± 0.2 b	19.4 ± 1.3 b
5	6.9 ± 1.5 a	11.9 ± 9.9 a	4.3 ± 0.2 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 30. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Mucor* sp. aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivadas en pradera en rotación

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
9	3.9 ± 2.9 a	2.0 ± 0.6 a	1.8 ± 1.2 a
10	4.4 ± 0.8 a	0.7 ± 0.6 a	2.1 ± 0.9 a

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido (P<0.05) .

Tabla 31. Actividad enzimática de proteasas, fosfatasa ácida y alcalina de cepas fúngicas de *Penicillium* sp. aisladas desde la rizósfera de *D. glomerata* cultivadas en pradera permanente

Código cepa fúngica	Proteasas	Fosfatasa alcalina	Fosfatasa ácida
10	0.6 ± 0.5 a	3.7 ± 5.5 bcdef	3.8 ± 5.5 abc
11	4.3 ± 2.1 abcde	8.9 ± 0.2 gh	10.4 ± 1.1 ef
12	9.5 ± 4.1 e	0.3 ± 0.1 ab	4.4 ± 1.6 abcdef
13	3.5 ± 0.0 abcde	0.6 ± 0.5 abc	1.4 ± 0.4 abc
14	3.0 ± 0.6 abcd	4.1 ± 0.9 defgh	5.7 ± 0.2 bcdef
15	2.9 ± 0.1 abcd	7.5 ± 0.8 fgh	9.1 ± 0.9 def
16	3.3 ± 1.2 abcd	0.7 ± 0.1 abcd	1.8 ± 1.1 abcd
17	3.7 ± 0.9 abcde	0.2 ± 0.2 a	1.3 ± 0.9 ab
18	3.5 ± 0.0 abcde	5.9 ± 1.3 fgh	7.0 ± 1.0 bcdef
19	7.6 ± 3.2 de	8.5 ± 1.3 gh	18.8 ± 3.3 f
20	6.0 ± 0.3 cde	13.4 ± 0.3 h	17.3 ± 0.2 f
21	2.9 ± 0.9 abcd	8.0 ± 3.8 fgh	4.4 ± 0.3 abcdef
22	4.6 ± 0.4 bcde	5.3 ± 0.4 efgh	7.6 ± 0.7 cdef
23	5.0 ± 0.2 cde	0.8 ± 0.5 abcde	1.5 ± 0.5 abcd
24	3.7 ± 0.1 abcde	5.6 ± 0.4 fgh	6.0 ± 0.6 bcdef
25	4.2 ± 2.3 abcd	1.5 ± 1.1 bcdef	1.6 ± 0.9 abcd
26	2.7 ± 0.2 abcd	2.8 ± 0.0 cdefgh	0.7 ± 0.1 a
27	2.5 ± 1.9 abcd	4.1 ± 3.0 cdefgh	3.4 ± 2.3 abcde
28	0.7 ± 0.6 ab	4.2 ± 1.2 defgh	3.1 ± 2.2 abcde
29	2.5 ± 2.1 abc	0.5 ± 0.0 abcd	2.0 ± 0.2 abcde

Valores con letras distintas difieren significativamente a través de la columna en el parámetro medido ($P < 0.05$).