



Universidad de Concepción

Carrera Biología Marina

Departamento de Oceanografía

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Efecto de la interacción hongo-bacteria sobre la degradación de materia orgánica, en sedimentos marinos costeros.

Por Karina Andrea Fuentes Cruz

Tesis presentada a la facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bióloga Marina

Profesor guía: Dr. Marcelo Gutiérrez Astete

Comisión: Dr. Silvio Pantoja Gutiérrez

Dr. Renato Quiñones Bergeret

Concepción – Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a toda mi familia, en especial a mi mamá y papá, ya que sin su cariño y apoyo incondicional durante mi vida académica y personal no hubiera sido posible culminar esta etapa. Agradezco enormemente también a mi hermano Cristian por ser un excelente hermano, persona y una linda compañía en mi vida y a Catalina Paz que es mi amiga/prima/hermana desde los primeros momentos y su presencia y apoyo es algo que me recuerda que pase lo que pase todo en la vida estará bien, ambos son un componente muy valioso en mi vida que agradezco tener. También deseo incluir a mis gatitas ya que su presencia y compañía otorga constantes momentos de alegría y paz. A mis amigas y amigos quienes son personas muy valiosas y estoy sumamente agradecida de tenerlas en mi vida, en particular a Jimena y Celeste por hacer de la vida universitaria una etapa con momentos muy felices y ser una reconfortante compañía en momentos complicados, también a Claudia, Camila, Paloma, Angélica, Jorge y Catalina sin su preciado apoyo y años de amistad todo sería más difícil de lograr. A Manuel, Jaime y María Teresa, por hacer de compartir un hogar durante gran parte de mi etapa universitaria una bonita experiencia de grata compañía y apoyo mutuo y también, por las largas horas de cervezas y catán. Quiero también agradecer a Rodrigo, cuya reciente llegada a mi vida ha sido un significativo apoyo y motivación durante las últimas etapas de mi formación académica.

Al Dr. Marcelo Gutiérrez por aceptar ser mi profesor guía, ser un apoyo durante la investigación y sobre todo por darse el tiempo siempre y con buena disposición para resolver dudas, compartir su conocimiento y entusiasmo sobre el tema y contribuir a mejorar mi rendimiento en mi seminario de título. También agradezco al Dr. Silvio Pantoja y al Dr. Renato Quiñones por aceptar ser parte de mi comisión y por sus buenos deseos y contribuciones al comienzo del desarrollo de mi tesis. Deseo también agradecer a todo el equipo que conforma el laboratorio de Geoquímica Orgánica Marina a Cristóbal, Paulina, Amanda, Víctor, Jeanette y a Pedro por su excelente disposición ante todas mis dudas, por su orientación durante el desarrollo metodológico del seminario y por hacer del laboratorio un ambiente agradable y cómodo siempre.

Finalmente, agradezco al proyecto Fondecyt 1200252 cuyo financiamiento hizo posible el desarrollo de la investigación realizada en este seminario de título.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 Área de estudios y muestreo de sedimentos.....	9
2.2 Métodos de aislación de hongos y bacterias desde sedimentos	10
2.2.1 Medios de cultivo.....	10
2.2.2 Incubaciones de sedimento en placas Petri para aislación de hongos y bacterias.....	11
2.2.3 Método de columnas de vidrio para aislación hongo-bacteria.....	11
2.2.4 Método de placas Petri invertidas	12
2.2.5 Método de placas Petri con medio de cultivo dividido	12
2.3 Seguimiento microscópico del crecimiento de cepas.....	14
2.4 Experimento con enriquecimiento de materia orgánica terrestre.....	14
2.5 Actividad enzimática extracelular.....	16
2.5.1 Medición de actividad enzimática extracelular de cepas aisladas desde incubaciones de sedimento y placas Petri divididas	16
2.5.2 Medición de actividad enzimática extracelular en experimentos de sedimento con enriquecimiento de materia orgánica terrestre	18
2.6 Estimación de cantidad de suspensión microbiana mediante densidad óptica (DO)	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Métodos para aislamiento de cepas con potencial interacción hongo-bacteria.....	21
3.1.1 Incubaciones de sedimento en placas Petri	21
3.1.2 Método de columnas de vidrio.....	23
3.1.3 Método de placas Petri invertidas	23
3.1.4 Método de placas Petri con medio de cultivo dividido	26
3.2 Actividad enzimática extracelular de cepas de hongos y bacterias.....	30
3.2.1. AEE en cepas aisladas por método tradicional de incubaciones de sedimento en placas Petri.	30
3.2.2 Actividad enzimática en cepas aisladas a través del método de placa dividida. ...	34
3.2.3. Actividad enzimática en sedimento inoculado con cepas aisladas y enriquecimiento de materia orgánica terrígena.....	40

3.3 Cuantificación de las suspensiones microbianas mediante densidad óptica (DO).....	44
4. DISCUSIÓN	45
5. CONCLUSIONES	50
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Importancia de las interacciones hongo-bacteria.....	6
Figura 2: Mapa área de estudio y estaciones de muestreo	10
Figura 3: Diseño de métodos para aislar interacción hongo-bacteria.	13
Figura 4: :Esquema tratamientos con adición de materia orgánica terrestre.....	15
Figura 5: Descripción de preparación de suspensiones microbianas para mediciones de actividad enzimática extracelular	17
Figura 6: Procedimiento para medición de actividad enzimática extracelular.....	18
Figura 7: Etapas de medición de actividad enzimática extracelular en sedimento	19
Figura 8: Primeros registros de observaciones microscópicas de incubaciones de sedimento en placa petri tradicional.....	22
Figura 9: Registros de observaciones en microscopio estereoscópico de incubaciones de sedimento en placa petri tradicional.....	22
Figura 10: Primeros registros de observaciones microscópicas de incubaciones de sedimento en placa petri invertida	24
Figura 11: Observaciones microscópicas de incubaciones de sedimento en placa petri invertida, estructuras reproductivas aumento 10X.....	25
Figura 12: : Observaciones microscópicas de incubaciones de sedimento en placa petri invertida, estructuras reproductivas aumento 100X.....	26
Figura 13: Primeros registros de observaciones microscópicas de incubaciones de sedimento en placa petri dividida.....	27
Figura 14: Segundos registros de observaciones microscópicas de incubaciones de sedimento en placa petri invertida	28
Figura 15: Observaciones microscópicas de frotis de bacterias placa dividida	28
Figura 16: Registros macroscópicos en placa dividida: Control negativo, incubación de sedimento, aislados bacterianos desde sección de llegada.....	29
Figura 17: Actividad enzimática extracelular promedio de aminopeptidasas y glucosidasas para tratamientos de placa petri tradicional	31
Figura 18: Actividad enzimática extracelular promedio de aminopeptidasas y glucosidasas por estación de placa petri tradicional	32
Figura 19: Tasas de degradación primera combinación de cepas de placa petri tradicional.....	32
Figura 20: Tasas de degradación segunda combinación de cepas de placa petri tradicional	33
Figura 21: Tasas de degradación tercera combinación de cepas de placa petri tradicional	34
Figura 22: Tasas de degradación cuarta combinación de cepas de placa petri tradicional	34

Figura 23: Actividad enzimática extracelular promedio de aminopeptidasas y glucosidasas para tratamientos de placa petri dividida.	36
Figura 24: Tasas de degradación primera combinación de cepas de placa petri dividida.....	36
Figura 25: Tasas de degradación segunda combinación de cepas de placa petri dividida.....	37
Figura 26: Tasas de degradación tercera combinación de cepas de placa petri dividida	38
Figura 27: Tasas de degradación cuarta combinación de cepas de placa petri dividida.	38
Figura 28: Actividad enzimática extracelular promedio de cepas aisladas a través de incubaciones de sedimento en placa petri tradicional versus placa dividida	39
Figura29: Actividad enzimática extracelular promedio de tratamiento HB de incubaciones de sedimento en placa petri tradicional versus placa dividida.....	40
Figura 30: Actividad enzimática extracelular promedio de tratamientos con adición de materia orgánica terrígena versus sin adición.....	41
Figura 31: Tasas de degradación para aminopeptidasas tiempo inicial, tratamientos con y sin adición de materia orgánica terrestre.	41
Figura 32: Taaas de degradación para glucosidasas tiempo inicial, tratamientos con y sin adición de materia orgánica terrestre	42
Figura 33: Taaas de degradación para aminopeptidasas tiempo final, tratamientos con y sin adición de materia orgánica terrestre	43
Figura 34: Taaas de degradación para glucosidasas tiempo final, tratamientos con y sin adición de materia orgánica terrestre	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de aislados de hongos y bacterias a través de los diferentes métodos y estaciones	29
Tabla 2: Promedio y desviación estándar de tasas de actividad enzimática extracelular de todos los tratamientos realizados en método de placa Petri tradicional.	31
Tabla 3: Promedio y desviación estándar de tasas de actividad enzimática extracelular de todos los tratamientos realizados en método de placa Petri dividida.....	35
Tabla 4: Valores de la cuantificación de las suspensiones microbianas mediante densidad óptica	44



RESUMEN

Los hongos y las bacterias coexisten en una gran variedad de entornos, donde dominan las comunidades descomponedoras de materia orgánica. Estos organismos interactúan a través de procesos que incluyen sinergia, competencia o antagonismo siendo un importante impulsor de muchas funciones de los ecosistemas. Sin embargo, las interacciones entre hongos y bacterias han sido investigadas más ampliamente en ecosistemas terrestres que en ecosistemas marinos. En esta investigación se estudió el efecto combinado de cepas de hongos y bacterias aisladas desde sedimento marino sobre tasas de degradación de materia orgánica. Las muestras de sedimento fueron obtenidas desde 2 estaciones ubicadas al interior de la bahía de Concepción (estación 6 y 7, 36°37'328S 73°00'565W, 36°35'163S, 73°00'958W) y la estación 18 (36°30'762S, 73°07'671W) situada a 18 millas náuticas de la costa, con mayor influencia oceánica.

Se aislaron hongos y bacterias utilizando diferentes diseños de cultivo en placas Petri para probar la posible movilización bacteriana a través de hifas, y así aislar una potencial interacción hongo-bacteria. Adicionalmente, se realizaron incubaciones de sedimento con inoculación de cepas y adición de material orgánico terrígeno (MOT) para probar el efecto de la interacción hongo-bacteria sobre la degradación de MOT. La degradación de materia orgánica se evaluó con experimentos de actividad enzimática extracelular utilizando los sustratos fluorogénicos L-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide (MCA-leu) y 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUF-glu) para medir la actividad de enzimas extracelulares aminopeptidasas y glucosidasas, respectivamente. Entre los métodos de aislamiento, la placa Petri dividida permitió aislar la mayor cantidad de cepas, con una mayor cantidad de cepas de bacterias obtenidas en la sección de la placa hacia donde se movilizaron las hifas. En cepas aisladas a través de placa dividida, la actividad enzimática extracelular (AEE) de aminopeptidasas fue mayor en el tratamiento de interacción (hongo-bacteria) (2886.9 nM h^{-1}), mientras que para glucosidasas fue más alta en el tratamiento de hongos (7111.4 nM h^{-1}) seguido por la interacción (5732.1 nM h^{-1}). En los tratamientos con adición de materia orgánica terrígena (MOT), la actividad promedio de hidrólisis enzimática fue más alta en el tratamiento de interacción más adición de MOT tanto para

aminopeptidasas ($24.9 \text{ nM g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) como glucosidasas ($42.9 \text{ nM g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Los resultados de crecimiento microbiano desde los diferentes sistemas de cultivo sugieren la movilización de bacterias a través de hifas en sedimentos marinos, siendo además las cepas de hongos y bacterias aisladas bajo esta condición las que presentarían una potencial acción sinérgica en la degradación de materia orgánica. Considerando que las bacterias tendrían una mayor capacidad para descomponer polisacáridos simples y péptidos y los hongos cuentan con un mayor repertorio de enzimas extracelulares eficaces en la descomposición de material más refractario se sugiere que la interacción hongo-bacteria podría ser un mecanismo para explicar la remoción de la materia orgánica terrígena en los ecosistemas marinos costeros.



1. INTRODUCCIÓN

Bacterias y arqueas tienen un rol significativo en el procesamiento de la materia orgánica y los ciclos biogeoquímicos del océano (Azam et al, 1994; Azam, 1998; Fenchel, 2008; Kirchman, 2017; McDonald et al., 2019). Al contrario, aunque se ha reportado su presencia en diversos ambientes marinos (Damare et al, 2006; Gutiérrez et al., 2011; Taylor & Cunliffe, 2016, Amend et al. 2019), el rol de hongos en el procesamiento de carbono orgánico marino permanece poco estudiado (Dighton, 2007; Crowther et al., 2012). Diversos estudios han propuesto que los hongos podrían ser componentes predominantes de la descomposición de materia orgánica en el océano (Newell, 1984; Hyde et al., 1998; Gressner et al., 2017; Yurchenko et al., 2021). Por ejemplo, Hyde et al (1998) mencionaron que los hongos son los principales descomponedores de sustratos leñosos y herbáceos en ecosistemas marinos, debido a su capacidad para degradar activamente la celulosa y lignocelulosa. Adicionalmente, Gutiérrez et al (2011) señalaron que los hongos son responsables de una mayor fracción de la actividad degradativa sobre polímeros orgánicos durante periodos productivos en el ecosistema de surgencia costero frente a Chile. Estos autores también evidenciaron que incrementos de la biomasa fúngica se asocian a aumentos de la biomasa fitoplanctónica durante periodos productivos, alcanzando valores comparables a los de la biomasa de procariotas (bacterias y arqueas). Por otro lado, Cunliffe et al (2017) plantean que el micoplancton asimila el carbono orgánico particulado derivado de algas mediante la excreción de enzimas glucosidasas, identificando 2 géneros saprótrofos activos en aguas costeras, *Malassezia* y *Cladosporium*. En conjunto, estos estudios apoyan la hipótesis de un rol significativo de hongos en el ciclo de carbono de los océanos, sin embargo, los mecanismos e interacciones por los cuales las comunidades fúngicas intervienen en la dinámica del carbono marino aún no se conocen del todo.

La materia orgánica en el océano puede proceder directa o indirectamente de la biomasa producida por la producción primaria del fitoplancton marino y también, de fuentes terrestres (Middelburg et al., 1993). El océano costero recibe significativas cantidades de carbono terrígeno (0.25 y 0.15×10^{15} g anuales de carbono orgánico disuelto y particulado, respectivamente), compuesto principalmente por residuos de plantas

vasculares y detrito del suelo (López & Levinton, 2011; Hedges et al., 1997), que pueden representar una importante fuente de carbono orgánico para el ambiente marino (Schlesinger & Melack, 1981), y contribuir al sustento de la actividad biológica en ecosistemas costeros (Martin & Whitfield, 1983; Skreslet, 1985). El carbono terrígeno tiene una estructura química aromática compleja y una estequiometría enriquecida en carbono respecto a nitrógeno o fósforo (McGroddy et al., 2004), por lo tanto, se considera refractario a la descomposición microbiana (Fabian et al., 2016). Además, durante el transporte hacia el océano, el carbono orgánico es parcialmente degradado, resultando en un material con un estado de procesamiento avanzado (Bianchi, 2011). Esto sugiere que la materia orgánica terrestre (MOT) en el océano estaría sujeta a una respiración mínima y tendría una remineralización menos eficiente (Burdige, 2005). Sin embargo, estudios sobre balance de carbono en los océanos, sugieren que el transporte fluvial aporta entre dos y tres veces más carbono orgánico que el detectado en ambientes marinos (Hedges y Keil, 1995). Lo anterior sugiere que los mecanismos que controlan el intercambio de carbono entre ecosistemas marinos y terrestres, y que el destino de material terrígeno en sedimentos y aguas costeras aún no han sido del todo definidos (Liu et al., 2000; Hedges y Keil, 1995). Es más, una de las principales incógnitas del ciclo del carbono es por qué la MOT no es detectada en el océano abierto y sedimentos marinos en las cantidades que corresponden a sus entradas (Hedges et al., 1997). Uno de los mecanismos que podrían explicar dicha interrogante es una remineralización activa por microorganismos especializados en la zona costera (Hedges, 1997).

La descomposición de la materia orgánica es en gran medida un proceso enzimático, y tanto bacterias como hongos sintetizan enzimas intra y extracelulares para metabolizar variados tipos de sustratos (Khatoon et al., 2017). En ambientes acuáticos, la mayor parte de los componentes orgánicos son polímeros de alto peso molecular (Banoub & Williams, 1972; Chrost, 1991), por lo que su incorporación a través de la membrana celular microbiana requiere el procesamiento previo a través de una variedad de enzimas hidrolíticas extracelulares (Arnosti, 2011; Pantoja et al., 2011; Arnosti, 2014). En general, los descomponedores fúngicos tienen mayores capacidades enzimáticas que las bacterias, ya que utilizan un diverso repertorio de enzimas extracelulares que procesan una amplia

gama de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como ésteres de fosfato y oligosacáridos, y de alto peso molecular como celulosa, hemicelulosa y lignina (Van der Wal et al., 2013; Bonugli-Santos et al., 2015; Fabian et al., 2016; Baudy et al., 2021). En cambio, las bacterias se caracterizan por tener menores capacidades enzimáticas extracelulares (Romaní et al., 2009), y en ambientes acuáticos se han relacionado principalmente con la absorción y degradación de monómeros como aminoácidos y glucosas (Kaplan & Newbold, 2003; Artigas, 2009).

Los hongos y bacterias están presentes en todos los hábitats de la biósfera, tanto en ambientes terrestres como acuáticos (Gressner et al., 2007), y pese a ser filogenéticamente distantes y diferir en sus requerimientos metabólicos (Mille-Lindblom & Tranvik, 2003; Zhang et al., 2015), sus representantes heterotróficos dominan las comunidades descomponedoras de materia orgánica en todos los ambientes (Hyde et al., 1998). Dado que estos organismos habitan los mismos nichos, están continuamente involucrados en interacciones sinérgicas o competitivas (Figura 1) que influyen en el entorno biótico y abiótico (Abeysinghe et al., 2020) y que aún no han sido del todo caracterizadas (Cunliffe et al., 2017). Por ejemplo, Mille-Lindblom (2005) menciona que la actividad enzimática extracelular de hongos podría tener un efecto indirecto al procesar el tejido vegetal a través de la penetración con hifas, generando ruptura del material orgánico y tornándolo más accesible para ser colonizado y procesado por bacterias. Por otro lado, Bengtsson (1992) estudió el efecto de consorcios microbianos sobre degradación de hojarasca de ecosistemas fluviales, y evidenció que la presencia bacteriana tuvo un efecto beneficioso sobre el crecimiento de los hongos en la hojarasca durante las primeras etapas de descomposición, lo que potenció la degradación de las hojas. Además, Purahong et al (2016) en un estudio sobre la interacción entre comunidades fúngicas descomponedoras de lignocelulosa con taxones bacterianos fijadores N_2 en presencia de hojarasca, indicaron que algunas bacterias fijadoras de nitrógeno pueden haber contribuido a la acumulación de nitrógeno en la hojarasca y así, a la nutrición de hongos, mientras que los hongos pondrían carbono a disposición de las bacterias. En ecosistemas marinos, el estudio de interacciones microbianas ha sido menos caracterizado, aun así, algunas investigaciones realizadas muestran evidencia en procesos de biorremediación natural. Por ejemplo,

Deveau et al (2018) señalaron que los hongos serían los principales degradadores de hidrocarburos de alto peso molecular en sedimentos contaminados por petróleo, y potencian la actividad degradativa interactuando en sinergia con bacterias.

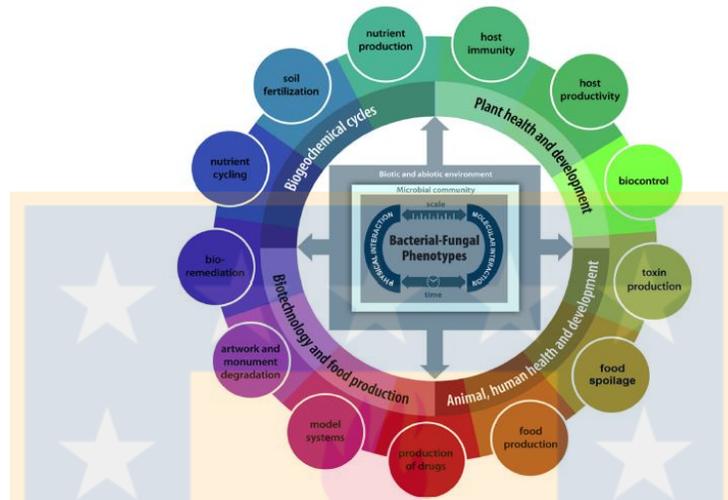


Figura 1. Impulsores, aplicaciones e importancia de las interacciones hongo-bacteria. Interacciones entre microorganismos influyen en el entorno, participando, regulando y modificando diversos factores como producción de nutrientes, biorremediación, producción de metabolitos o generación de infecciones a otros organismos. Extraída de Deveau et al (2018).

Dado que los filamentos fúngicos se extienden grandes distancias en el suelo, se ha indicado que constituyen vías de transporte ideales para bacterias (Kohlmeier et al., 2005; Warmink et al., 2011; Simon et al., 2015; Deveau et al., 2018). Los micelios de hongos parecen proporcionar una red de vías de medio acuoso continuo mediante puentes de poros llenos de aire, lo que permite un transporte bacteriano que no se produciría en ausencia de hongos (Kohlmeier et al., 2005). Se ha evidenciado también que la motilidad bacteriana influye en la translocación de hifas, así, Kohlmeier et al (2005) observaron que cepas de bacterias flageladas mostraban transporte activo por hifas, comparado a cepas no flageladas. Esta interacción puede estimular procesos de biodegradación en situaciones donde el sustrato y/o las bacterias están distribuidas de forma heterogénea o en las que el movimiento activo de bacterias se ve limitado por barreras físicas. Así también, la dispersión bacteriana facilitada por micelios puede promover la colonización de nuevos nichos (Deveau et al., 2018). De este modo, las “autopistas fúngicas”, así denominadas

por Kohlmeier et al (2005), podrían representar una buena forma de aproximarse al estudio de interacciones hongo-bacteria.

Los sedimentos costeros acumulan alrededor del 87% del total de la materia orgánica enterrada y representan el 83% de la mineralización sedimentaria mundial (Middelburg et al., 1993). Así, en sedimentos la descomposición de la materia orgánica es considerada un paso crítico que influye en los flujos de carbono, donde la comunidad microbiana que incluye bacterias, arqueas y hongos heterótrofos contribuyen activamente en el ciclo del carbono marino (Bongiorni, 2012). En ambientes sedimentarios se ha reportado una alta abundancia fúngica (Zhang et al., 2015; Taylor & Cunliffe, 2016; Nagano et al., 2017; Rojas et al., 2020), con varios hongos marinos considerados capaces de tolerar bajas concentraciones de oxígeno y por lo tanto, podrían ser componentes dominantes en la transformación de polímeros orgánicos más complejos como lignocelulosa (Hyde et al., 1998). Además, en sedimentos marinos se ha evidenciado que la utilización de lignina como fuente de carbono sería significativamente mayor que en la columna de agua (Cowie et al. 1992), lo que sugiere que, habría un aumento relativo en la utilización de tejidos provenientes de plantas vasculares (Cowie et al., 1992), y así, una posible remineralización activa de estos componentes considerados más refractarios.

En base a los antecedentes planteados, se estudió el efecto de la interacción entre hongos y bacterias aisladas de sedimentos marinos costeros, sobre la degradación de materia orgánica. La aproximación experimental incluyó la aislación de cepas de hongos y bacterias de sedimento superficial de 3 estaciones en un gradiente de influencia continental e incubaciones de sedimento con enriquecimiento de MOT más inoculación de cepas aisladas. La actividad degradativa de materia orgánica se evaluó mediante actividad enzimática extracelular. Además, se probaron diferentes métodos para analizar la potencial motilidad bacteriana a través de hifas fúngicas. El estudio del rol de hongos en el procesamiento de carbono orgánico en ambientes marinos contribuirá a mejorar el conocimiento sobre la función del componente fúngico en los ciclos biogeoquímicos marinos. Adicionalmente, el estudio del procesamiento microbiano de carbono terrígeno aportará nuevo conocimiento sobre el destino de la MOT en el océano. Finalmente,

estudiar la interacción entre hongos y bacterias es relevante para mejorar el conocimiento de la ecología microbiana en ecosistemas marinos.

Pregunta científica: ¿La interacción entre hongos y bacterias marinos tiene un efecto potenciador sobre la degradación de materia orgánica en sedimentos marinos costeros?

Hipótesis: La interacción de hongos y bacterias marinos produce un aumento en las tasas de degradación de materia orgánica en sedimentos costeros enriquecidos con material terrígeno.

Objetivo general

Determinar el efecto de la interacción entre hongos y bacterias marinos sobre la degradación de materia orgánica en sedimentos marinos costeros

Objetivos específicos:

- Aislar cepas de hongos y bacterias desde sedimentos marinos con potencial interacción en la degradación de materia orgánica.
- Evaluar métodos para comprobar potencial interacción hongo-bacteria mediante transporte bacteriano a través de hifas
- Evaluar el efecto de la acción conjunta de cepas de hongos y bacterias aisladas sobre las tasas de actividad enzimática extracelular
- Evaluar el efecto de la acción conjunta hongo-bacteria sobre las tasas de actividad enzimática extracelular en sedimentos enriquecidos con material de origen terrestre

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de estudios y muestreo de sedimentos

Se recolectaron muestras de sedimento marino superficial en 2 estaciones localizadas al interior de bahía Concepción, estación 6 (36°37'328S, 73°00'565W) y estación 7 (36°35'163S, 73°00'958W) y en la estación 18 (36°30'762S, 73°07'671W) de la serie de tiempo COPAS situada a 18 millas náuticas de la costa, con mayor influencia oceánica (Figura 2). La bahía de Concepción es semicerrada y poco profunda (45 m) (Farías et al., 1996), en ella desembocan diversos cuerpos de agua como el río Andalién, estero Bellavista, estero Lirquén, estero Penco y humedal Rocuant Andalién (Figuroa & Figuroa, 2015). En la interfaz sedimento-agua prevalecen condiciones anóxicas durante la mayor parte del año (Farías, 1992), lo que se debería a su alta carga de materia orgánica. Además, la superficie del sedimento suele estar cubierta frecuentemente de tapetes microbianos filamentosas del género *Thioploca* (Gallardo, 1977). La estación 18, se caracteriza por una marcada estacionalidad en las condiciones hidrográficas, como resultado de un intenso afloramiento de aguas de surgencia durante la primavera y el verano austral y el aporte de agua dulce durante el invierno (Sobarzo et al., 2007). Esta estación suele reportar la presencia de alta biomasa de bacterias filamentosas del género *Thioploca* en la superficie del sedimento más frecuentemente durante primavera verano, cuando prevalece la surgencia y una alta productividad del fitoplancton (Ferdelman et al., 1997; Holmkvist et al., 2010) lo que genera condiciones anóxicas (Holmkvist et al., 2010).

El muestreo se llevó a cabo a bordo de la embarcación de investigación científica KayKay II de la Universidad de Concepción. Para la colección de sedimento se utilizó una Draga tipo Van Veen, desde la cual se traspasó sedimento superficial a placas Petri estériles de vidrio. Las muestras de sedimento fueron mantenidas a ~5°C en cámara de frío.

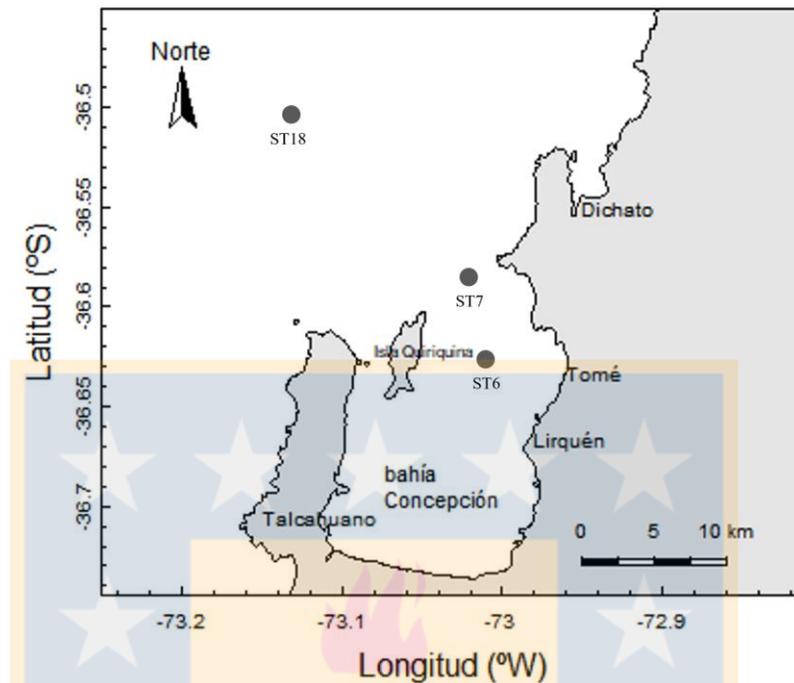


Figura 2. Mapa de área de estudios y estaciones de muestreo. Las estaciones 6 y 7 se encuentran dentro de la bahía de Concepción, mientras que la estación 18 se ubica a 18 millas náuticas de la costa, con una mayor influencia oceánica.

2.2 Métodos de aislamiento de hongos y bacterias desde sedimentos

2.2.1 Medios de cultivo

Se preparó el medio Glucose yeast extract agar (GYE) según el protocolo de Johnson & Sparrow (1961). El medio incluye glucosa (1 g), bacto yeast extract (0.1 g), agar (18 g) y cloranfenicol (200 mg), en un litro de agua de mar filtrada (0,2 μm). Se adicionó el antibiótico cloranfenicol para evitar crecimiento bacteriano en el medio destinado a aislamiento fúngico. Para aislamiento bacteriano se preparó un medio de agar nutritivo (NA), preparado con 23 g de agar nutritivo y 50 mg del antifúngico cicloheximida en 1 L de agua de mar filtrada. Para la filtración de agua de mar se utilizó un sistema con bomba de vacío y filtros de membrana de 0,2 μm . Los medios de cultivo fueron autoclavados durante una hora y 30 minutos, traspasados a placas Petri estériles, que fueron selladas con parafilm y almacenadas a 4°C. La preparación de medios de cultivo se realizó en un ambiente limpio bajo un gabinete de bioseguridad Labconco Class II type A2

2.2.2 Incubaciones de sedimento en placas Petri para aislación de hongos y bacterias
Aproximadamente 2 g de sedimento de cada estación (Est-6, Est-7 y Est-18) fueron sembrados en placas Petri estériles con medio de cultivo GYE sin cloranfenicol. Se incubó durante 60 días, a 20°C, protegidas de la luz (Figura 3A). El crecimiento microbiano (bacterias y hongos) se examinó periódicamente a través de microscopía durante las incubaciones.

2.2.3 Método de columnas de vidrio para aislación hongo-bacteria

Se confeccionaron columnas de vidrio adaptadas del método descrito por Simon et al (2015) diseñado para aislar bacterias capaces de desplazarse o moverse por medio del micelio de hongos. Las columnas de vidrio fueron elaboradas en el taller de soplado de vidrio de la Universidad de Concepción con las siguientes medidas: 1 cm de espesor, 6 cm de largo y 2 cm de ancho con una reducción en la parte central. La parte inferior de la columna se dispuso sobre sedimento de forma que cubriera todo el diámetro de la columna. Se incorporó medio de cultivo tanto en la parte inferior (sobre el sedimento) como en la parte superior de la columna. El objetivo del diseño es promover la colonización de hongos y bacterias del sedimento en el medio de cultivo inferior (medio de atracción) y la posterior extensión de hifas hacia el medio de cultivo superior (medio objetivo). Así, las bacterias del medio de atracción podrían desplazarse hacia el medio objetivo mediante las hifas. Se montaron dos columnas para cada estación, en una se dispuso GYE en la parte inferior y superior, más adición de perlas de vidrio de aproximadamente 1 mm de diámetro, lo cual evitaría la dispersión aérea de hongos y bacterias (Simon et al., 2015), mientras que en la otra no se dispuso perlas de vidrio (Figura 3B). Las columnas fueron selladas con parafilm, mantenidas en incubadora (LABWIT ZWYR-2102) a 20°C y protegidas de la luz durante 4 semanas (Simon et al., 2015). Se prepararon 2 columnas control, para el control positivo se recolectó una muestra de material terrígeno desde suelo cercano al bosque de las inmediaciones de la Universidad de Concepción. A esta columna se le añadieron perlas de vidrio (1 mm) en el interior para simular la estructura rígida de la tierra (Simon et al., 2015). En el control negativo se dispuso medio de cultivo en ambos extremos con ausencia de sustrato (Figura 3B).

2.2.4 Método de placas Petri invertidas

Se realizó el procedimiento descrito por Bravo et al (2013) para comprobar transporte bacteriano por medio de hifas fúngicas en sedimento marino utilizando un sistema de placas Petri invertidas. Se sembró aproximadamente 1 g de sustrato en la tapa de la placa Petri, y se dispuso medio de cultivo GYE en la base (Figura 3C), con tal de generar un espacio de aire entre el sedimento y el medio. El objetivo del dispositivo es que el crecimiento fúngico busque el medio de cultivo objetivo extendiendo las hifas hacia arriba, de esta forma, las bacterias presentes en el sustrato se desplazarán hacia el medio objetivo a través del transporte micelial. Las placas Petri preparadas fueron selladas con Parafilm e incubadas a 20°C en incubadora LABWIT ZWYR-2102 protegidas de la luz durante 4 semanas (Bravo et al., 2013) (Figura 3C).

2.2.5 Método de placas Petri con medio de cultivo dividido

Se aplicó un tercer método para probar el transporte bacteriano por medio de hifas, de acuerdo con el procedimiento realizado en Bravo et al (2013). Este método consiste en utilizar placas Petri con un medio de cultivo sólido (e g. GYE) y un corte central en este. De esta forma, se obtienen 2 secciones de medio de cultivo similares con un espacio intermedio de aproximadamente 3 mm (sección de origen y llegada) (Figura 3D). Se sembró aproximadamente 1 gramo de sedimento de las estaciones 7 y 18 en una de las secciones del medio de cultivo. Se realizó un control negativo en el cual se hizo un corte central en un medio de NA y se sembró bacterias aisladas de la estación 7 en una sección para descartar transporte bacteriano sin presencia fúngica. Además, se realizó un control positivo con medio GYE sin antibiótico y se sembró una cepa fúngica y una bacteriana, aisladas previamente de la sección de llegada de la placa dividida, en una de las mitades del medio. Las placas se incubaron a ~20°C durante 6 semanas.

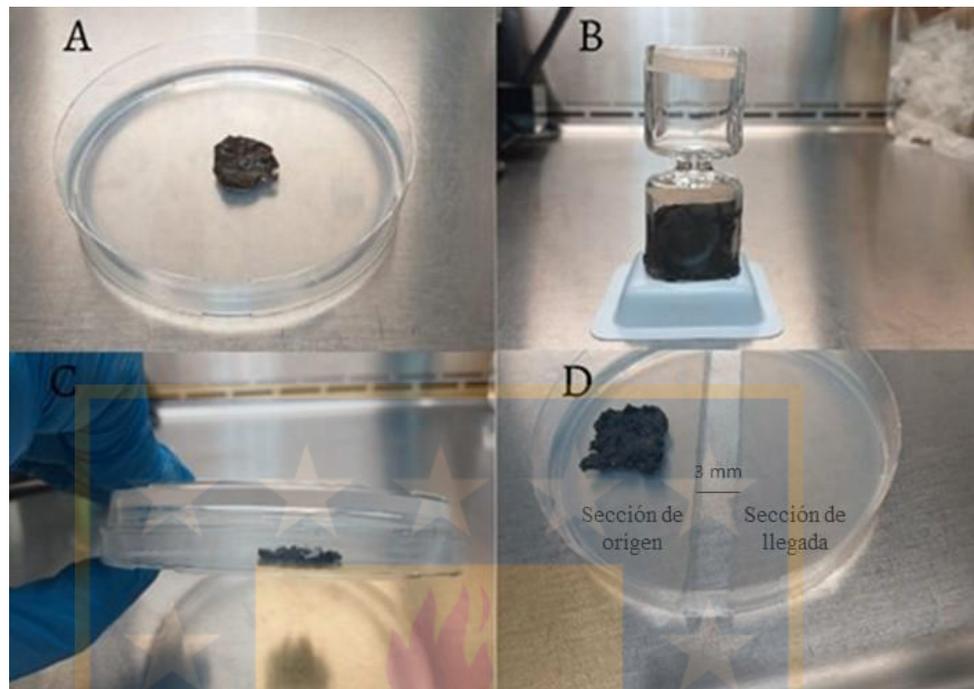


Figura 3. Placa Petri con incubación de sedimento (A); Montaje dispositivo de columna de vidrio sin adición de perlas (B); Método placa petri invertida (C); Método placa Petri dividida (D).

Cada uno de los métodos realizados para comprobar transporte bacteriano por medio de hifas fúngicas fue montado en ambiente estéril bajo un gabinete de bioseguridad Labconco Class II type A2. La aislación de hongos y bacterias se realizó a medida que se identificaba crecimiento en las incubaciones. Se realizaron traspasos sucesivos para obtención de colonias puras. Se les asignó un código de identificación “ID” a las cepas aisladas según la siguiente forma: St-18H3, donde el primer número corresponde a la estación, H y B a hongos y bacterias respectivamente, y el siguiente número al orden de aparición de la cepa aislada.

Se utilizó el medio GYE con cloranfenicol para los aislamientos sucesivos de hongos y el medio NA con adición de cicloheximida para aislamiento bacteriano. Las placas Petri sembradas se dejaron en incubación a 20°C, protegidas de la luz, con constante registro de crecimiento por microscopía. Las placas con crecimiento microbiano se almacenaron a 4°C para posteriores experimentos.

2.3 Seguimiento microscópico del crecimiento de cepas

El crecimiento de filamentos fúngicos se examinó por microscopía óptica directamente de la placa Petri, con aumentos 4X y 10X. También, se prepararon slides con fragmentos de agar extraídos de las placas Petri en incubación. Para observación de bacterias, se agregaron 5 μL de agua ultrapura a las slides preparadas, las cuales se observaron con aumento de 100x más aceite de inmersión. Además, para una observación más detallada, se realizaron frotis de colonias de bacterias. Para controlar la esterilización del ambiente de trabajo al realizar frotis bacterianos, se trabajó bajo gabinete de bioseguridad y con mechero. Con un asa metálica se añadieron gotas de agua estéril a un portaobjetos, luego se esterilizó el asa en la llama del mechero y se seleccionó la colonia de la placa Petri. La colonia fue diluida con el agua estéril y se dejó secar la muestra. Finalmente, el portaobjeto se sujetó directamente sobre calor para fijar la muestra. Para teñir la muestra se utilizó solución de cristal violeta de oxalato, Lugol, Acetona y solución de Safranina. Cada tinción se mantuvo sobre la muestra durante un minuto a excepción de la acetona, que se mantuvo 30 segundos.

2.4 Experimento con enriquecimiento de materia orgánica terrestre

Se realizó un experimento con incubaciones de sedimento y adición de materia orgánica terrígena (MOT) e inóculos microbianos. Se trabajó con sedimento de la estación 7, ya que fue la estación que presentó mayor y más rápido crecimiento microbiano. Para la preparación del sustrato, se recolectó suelo de una zona boscosa de la Universidad de Concepción, al cual se le añadió agua ultrapura y se sometió a alta temperatura hasta alcanzar su punto de ebullición (Giampaoli et al., 2014), de lo cual resultó un material disuelto apto para adicionar a los experimentos. El sedimento utilizado se dejó aclimatar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 2 días previo al comienzo del experimento.

El diseño experimental es presentado en la figura 4. En cada tratamiento se añadió 30 mL de sedimento a un matraz Erlenmeyer de 100 mL, además, se añadieron inóculos microbianos en 6 tratamientos y se adicionó MOT en 4 tratamientos (figura 4). Para los inóculos microbianos se preparó una suspensión de células de las cepas aisladas de hongos

y bacterias en 90 ml de agua de mar filtrada (0.2 μm) y autoclavada. Cada matraz con inóculo microbiano se pasó por vortex para homogeneización. Como se observa en la figura 2, en los tratamientos 1 y 4 se añadieron 30 mL de agua de mar con suspensión de hongos, en los tratamientos 2 y 5, se añadieron 30 mL de agua de mar con suspensión de bacterias, en los tratamientos 3 y 6 se añadieron 15 mL de agua de mar con suspensión de hongos más 15 mL de agua de mar con suspensión de bacterias. En los tratamientos 7 y 8, se añadieron 30 mL de agua de mar, y finalmente, en los tratamientos 1, 2, 3 y 7 se adicionó 6 mL de MOT al 10% del volumen total de cada tratamiento (60 mL). En cada tratamiento se formó una consistencia tipo slurry óptima para medir actividad enzimática extracelular (AEE) en el sedimento. Los matraces se dejaron en incubación a 20°C protegidos de la luz durante 30 días.

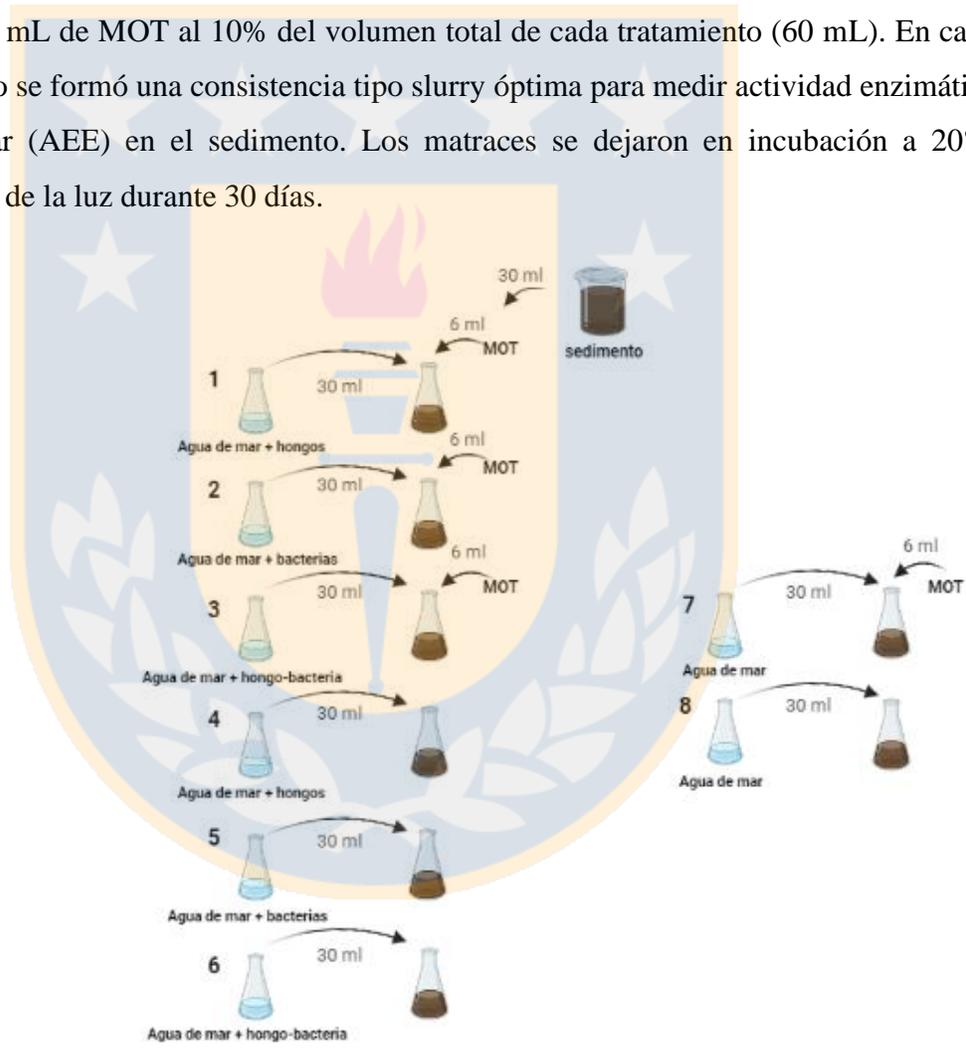


Figura 4. Descripción de los 8 tratamientos con incubaciones de sedimento de la estación 7 y enriquecimiento de MOT.

2.5 Actividad enzimática extracelular

2.5.1 Medición de actividad enzimática extracelular de cepas aisladas desde incubaciones de sedimento y placas Petri divididas

Se seleccionaron cepas de hongos y bacterias aisladas desde los cultivos de sedimento en placas Petri y desde la sección de partida y llegada de las placas Petri divididas. La medición de AEE se realizó con los sustratos fluorogénicos L-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide (MCA-leu) y 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUF-glu), para representar sustratos proteicos y glucosídicos como modelos para medir la actividad de enzimas extracelulares aminopeptidasas y glucosidasas respectivamente (Pantoja et al., 2011). Se preparó una suspensión de hongos y una de bacterias en 2 matraces Erlenmeyer (100 mL). Para lo anterior, se extrajo un fragmento de agar de la placa Petri con la cepa aislada de aproximadamente 4 cm de largo por 3 de ancho, procurando que el fragmento extraído fuera similar en la cepa de hongos y de bacterias. Los fragmentos fueron incorporados en 100 mL de agua de mar filtrada (0.2 μ m) y cada matraz se pasó por vortex para conseguir una suspensión homogénea. Para separar las mediciones por sustrato (MCA-Leu y MUF-Glu), se utilizaron tubos de centrifuga de 50 mL, 3 para cada sustrato más un tubo extra que se utilizó como control. El primer tubo se rotuló para suspensión fúngica (tubo H), el segundo para suspensión bacteriana (tubo B) y el tercero para una mezcla hongo-bacteria (tubo HB). Se traspasaron 50 mL de las suspensiones microbianas previamente homogenizadas a los tubos H y B, y para el tubo HB se traspasaron 15 ml del tubo H y 15 ml del tubo B. En el tubo 4, correspondiente al control, se añadió agua de mar filtrada (figura 5).

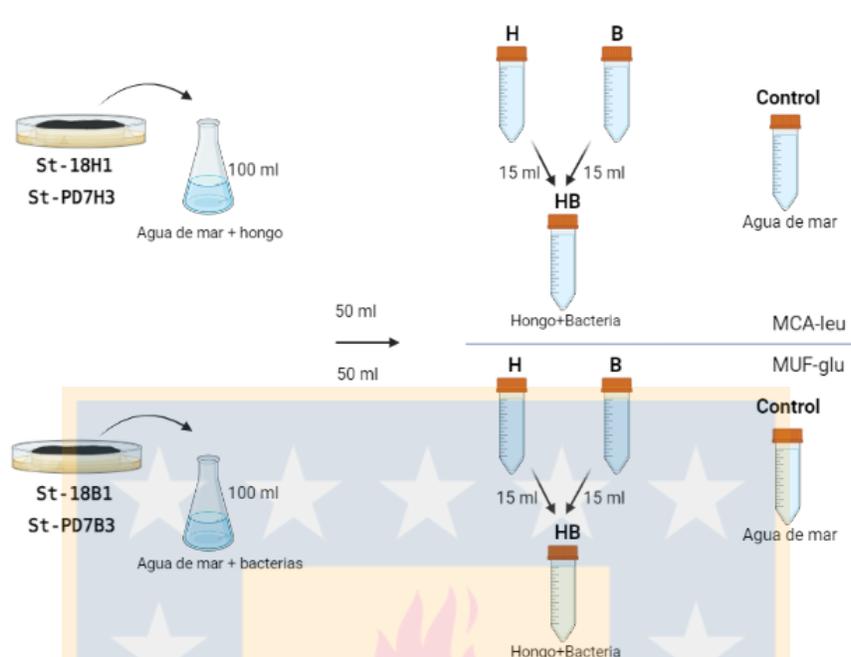


Figura 5. Descripción de suspensiones microbianas preparadas para mediciones de AEE. El código bajo las placas corresponde al ID de las cepas, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, las siglas PD corresponden al método realizado (placa dividida) y H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente.

Desde los tratamientos H, B y HB se traspasaron 5 ml a tubos de centrífuga de 15 ml para agregar los sustratos fluorogénicos (Figura 6). Cada tratamiento se realizó por duplicado, incluido el control. Se añadieron 100 μL de sustrato fluorogénico a cada réplica y se midió de inmediato la fluorescencia en un fluorómetro (Turner Biosystems) para registrar el tiempo 0 (Figura 6). Se registró la fluorescencia en 4 tiempos con intervalos de aproximadamente 20 minutos.

Las curvas de calibración se realizaron con las preparaciones de suspensión microbiana de cada tratamiento (H, B y HB). Se añadieron 2000 μL de suspensión a una cubeta de plástico más 20 μL de producto MCA y MUF 5 mM. Se realizaron diluciones seriadas para obtener 5 valores de fluorescencia en un rango de concentración entre 0,495 y 0,031 μM .

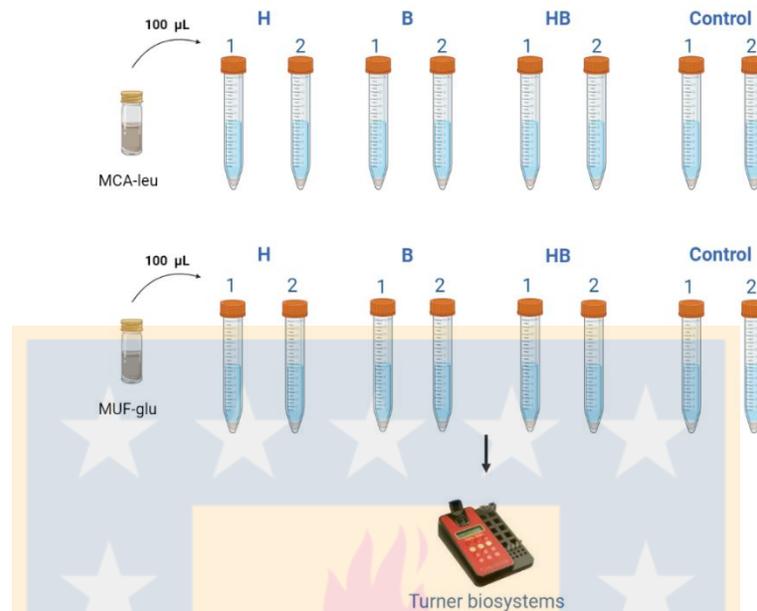


Figura 6. Procedimiento para de medición de AEE. Las letras H, B y HB corresponden a los 3 tratamientos realizados.

Las tasas de actividad enzimática extracelular fueron estimadas a partir de las tasas constantes de velocidad de primer orden que se calcularon a partir de la pendiente del gráfico $\ln [C_0/(C_0-P)]$ con el tiempo, donde P es la concentración del producto (MCA, MUF) en el tiempo t (Pantoja & Lee, 1994; Pantoja et al., 2011) y C_0 es la concentración inicial de sustrato en las incubaciones ($100 \mu\text{M}$). Las tasas de reacción en $\mu\text{M h}^{-1}$ se calcularon multiplicando las tasas constantes por C_0 .

Se realizaron las pruebas estadísticas no paramétricas Mann–Whitney–Wilcoxon y Kruskal-Wallis para comprobar diferencias significativas entre 2 y 3 grupos de muestras respectivamente.

2.5.2 Medición de actividad enzimática extracelular en experimentos de sedimento con enriquecimiento de materia orgánica terrestre

La AEE se midió en cada tratamiento al comienzo (tiempo inicial) y al final (tiempo final) del periodo de incubación con los sustratos MCA-leu y MUF-glu. Se extrajeron 5 ml de slurry de cada tratamiento, y se añadieron a tubos de centrifuga de 15 ml por duplicado. A cada tubo se adicionó $100 \mu\text{L}$ de sustrato fluorogénico. Se utilizaron tubos Eppendorf

de 1.5 ml para centrifugar el slurry y obtener aproximadamente 600 μL de sobrenadante. Se midió la fluorescencia (Turner designs) en 4 tiempos con intervalos de 20 minutos aproximadamente (Figura 7).

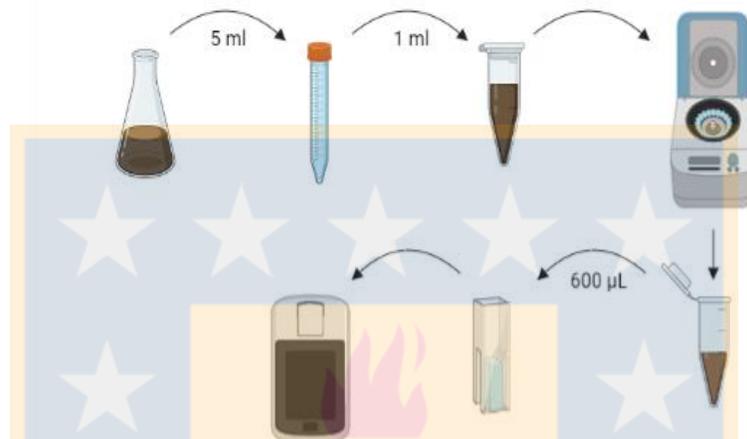


Figura 7. Etapas de la medición de AEE en muestras de sedimento.

Las curvas de calibración se realizaron con el mismo sedimento utilizado para experimentos (estación 7). Se añadieron 25 ml de sedimento más 25 ml de agua de mar filtrada en un tubo de centrífuga de 50 ml. Se centrifugó a 2500 rpm por 5 minutos y se utilizó el sobrenadante para las mediciones de fluorescencia. Se utilizaron 2000 μL del sobrenadante más 30 μL de producto MCA y MUF y se midió la fluorescencia diluciones seriadas para obtener 5 valores de fluorescencia en un rango de concentración entre 7,38 y 0,46 μM

Las tasas constantes y la velocidad de reacción se calcularon como se describió anteriormente. Para estimar las tasas en $\mu\text{M g}^{-1} \text{h}^{-1}$ se determinó el peso seco de sedimento por mL de slurry.

Se realizaron las pruebas estadísticas paramétricas Mann–Whitney–Wilcoxon y Kruskal–Wallis para comprobar diferencias significativas entre 2 y 3 grupos de muestras respectivamente.

2.6 Estimación de cantidad de suspensión microbiana mediante densidad óptica (DO)

Una suspensión microbiana es capaz de dispersar o transmitir luz, y mientras mayor es la cantidad de tejido suspendido, mayor es la turbidez del medio y se reduce la cantidad de luz transmitida por este. De esta forma, es posible correlacionar la densidad óptica con la turbidez y obtener una cuantificación relativa de la suspensión microbiana (Griffiths et al., 2011). Para medir la turbidez de una muestra microbiana se propone utilizar un haz de luz de 600 a 650 nm en bacterias (Willaert et al., 1996; Li & Mira de Orduña, 2009; Quiroga, 2010) y de 450 nm en hongos (Fuentes et al., 2015), ya que a esas longitudes de onda no se presenta una absorción significativa (Griffiths et al., 2011). La absorbancia de las suspensiones microbianas fue medida en espectrofotómetro Agilent 8453 y el valor de densidad óptica se calculó con la siguiente fórmula:

$$D_{\text{opt}} = \alpha l \quad \alpha = (2.303 \times A) / l$$

Donde D_{opt} corresponde a la densidad óptica, α al coeficiente de absorbancia, A es la absorbancia y l la dimensión de la cubeta.

3. RESULTADOS

3.1. Métodos para aislamiento de cepas con potencial interacción hongo-bacteria

3.1.1 Incubaciones de sedimento en placas Petri

A través del método tradicional de cultivo en placas Petri se lograron aislar un total de 11 cepas de hongos filamentosos y 12 de bacterias (Tabla 1). Se observó crecimiento de filamentos de hongos a los 28 días de incubación. Las primeras incubaciones que presentaron crecimiento microbiano fueron las de sedimento proveniente de la estación 7 y 18. En las incubaciones de sedimento de la estación 6 se observó crecimiento de hongos a partir de los 37 días de incubación (Figura 8: A, B y C).

Se identificaron estructuras similares a levaduras (figura 8B) en una alta densidad en el cultivo de sedimentos de la estación 18, así como hongos filamentosos en todas las estaciones (Figura 8). En los cultivos de la estación 7 (Figura 8A) se presentó una mayor variedad de estructuras de hongos filamentosos. Las observaciones bajo la lupa (Figura 9) proporcionaron una visión más detallada de la morfología de las colonias de hongos, incluyendo diferencias en las tonalidades de colores, que evidenció diferencias morfológicas de las cepas de hongos aisladas desde diferentes estaciones.

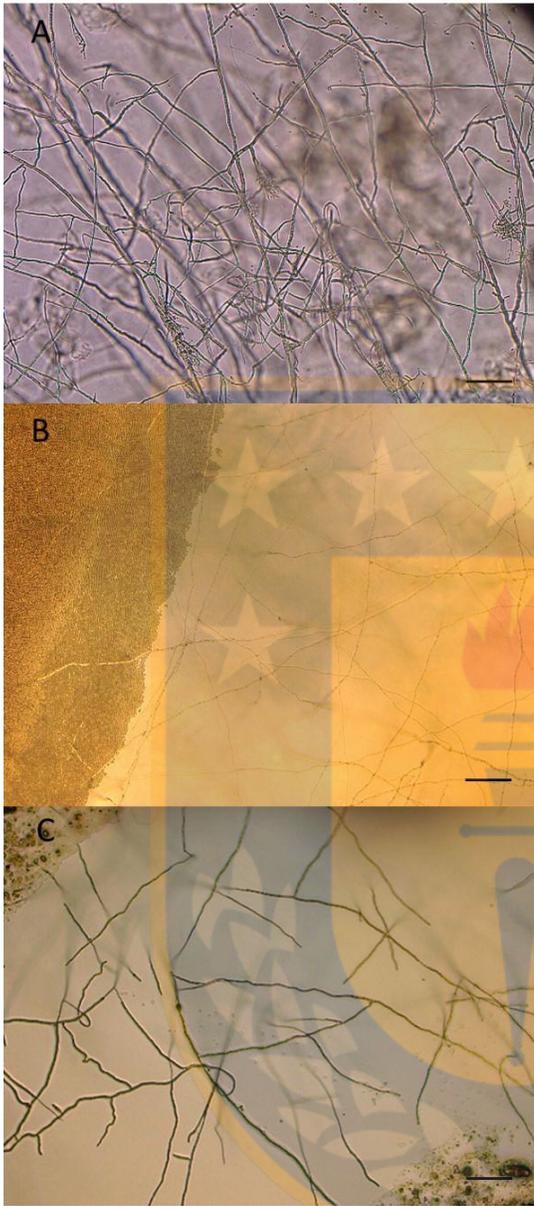


Figura 8. Registros fotográficos de observaciones microscópicas (aumento 10X) de hongos filamentosos en medios de cultivo tradicionales con sedimentos. Estación 7, 28 días de incubación (A); Estación 18, 28 días de incubación (B); Estación 6, 37 días de incubación (C). La barra de escala representa 2 μ m.

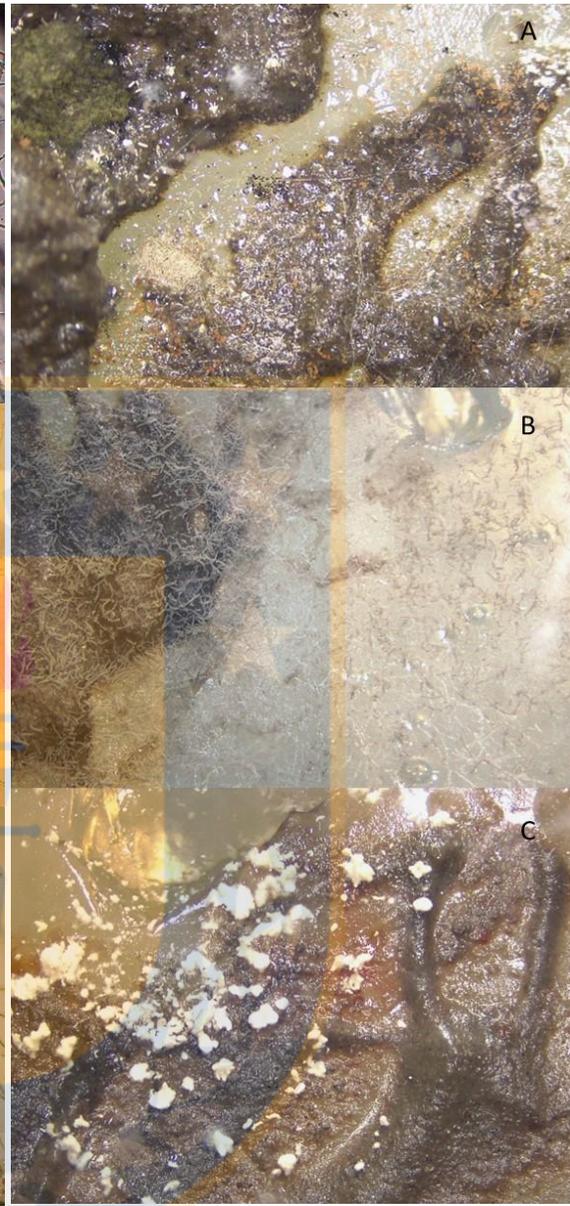


Figura 9. Registros fotográficos de observaciones en microscopio estereoscópico (aumento 8X) de hongos filamentosos en medios de cultivo tradicionales con sedimentos. Estación 7, 142 días de incubación (A); Estación 18, 142 días de incubación (B); Estación 6, 142 días de incubación (C).

3.1.2 Método de columnas de vidrio

Se observó crecimiento visible de filamentos fúngicos en el medio de cultivo de destino de las columnas de vidrio sólo en el sedimento proveniente de la estación 18 y en el control positivo. Se aislaron sólo 2 cepas de hongos filamentosos de la estación 18 (Tabla 1), los cuáles mostraron un rápido crecimiento (24 horas).

Todas las incubaciones realizadas a través del método de columnas de vidrio presentaron dificultad para la observación de crecimiento microbiano, ya que la forma curva de los dispositivos de aislación, así como su material, obstaculizaba la óptima observación bajo el microscopio. Además, en todas las estaciones, incluyendo los controles, hubo una retención de agua ineficiente, lo que provocó el secado del sedimento incubado, así como del agar que constituía los medios de cultivo de atracción y de destino.

3.1.3 Método de placas Petri invertidas

Las placas invertidas presentaron crecimiento de filamentos fúngicos, tanto en la superficie del medio de cultivo, como alrededor del sedimento sembrado (Figura 10). La observación microscópica durante el periodo de incubación se realizó sobre la placa, a fin de minimizar la manipulación interna del sedimento sembrado. A través de este método se logró aislar un total de 5 cepas de hongos filamentosos, y no fue posible aislar bacterias (Tabla 1). El primer registro de crecimiento de filamentos se observó a los 20 días de incubación, donde sólo la estación 18 presentó crecimiento de hifas alrededor del sedimento sembrado (Figura 10A), en cambio, en las estaciones 6 y 7 se observaron filamentos en el día 25 (Figuras 10B, 10C y 10D).

En los filamentos de la estación 18 se logró observar esporangios a partir de los 20 días de incubación (Figura 10A), los que se caracterizaron por mostrar una tonalidad oscura y encontrarse ubicados en los ápices de las hifas. Así también, en la estación 7 (Figura 10B) se logran observar estructuras reproductivas en la parte apical de algunos filamentos, con una diferencia morfológica a los observados en los filamentos de la estación 18. En la estación 6 (Figuras 10C y 10D) también se observaron diferencias morfológicas en la estructura de los filamentos de las cepas aisladas.

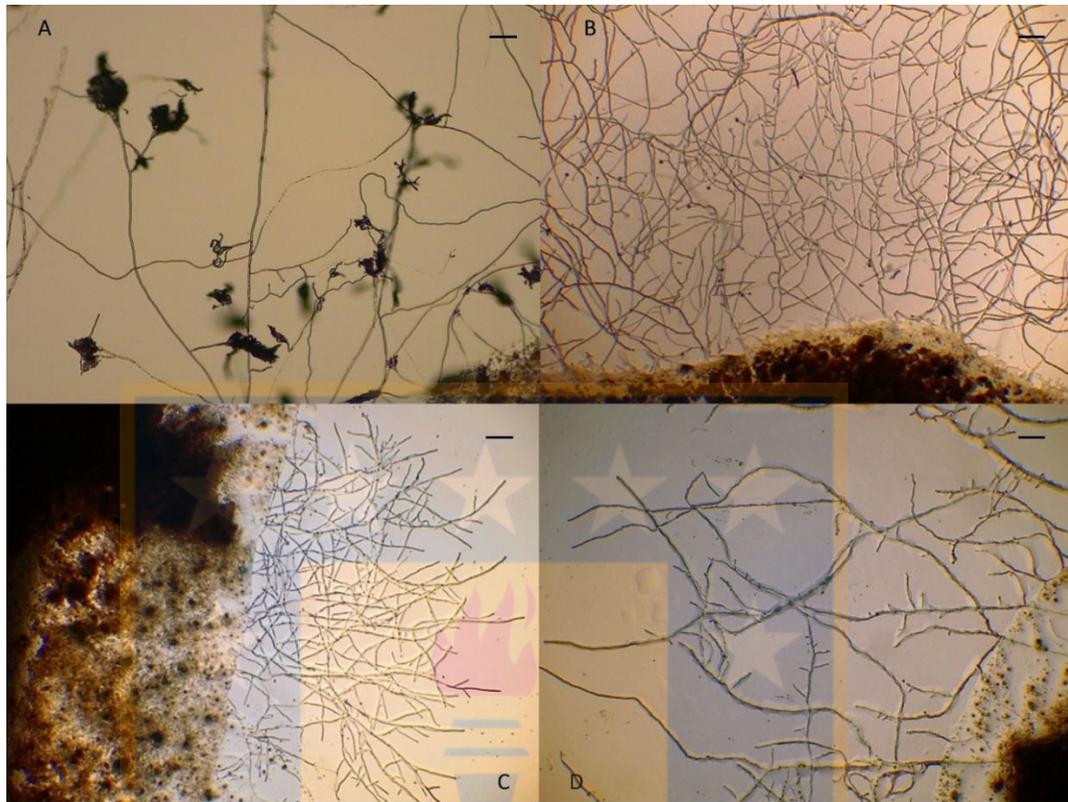


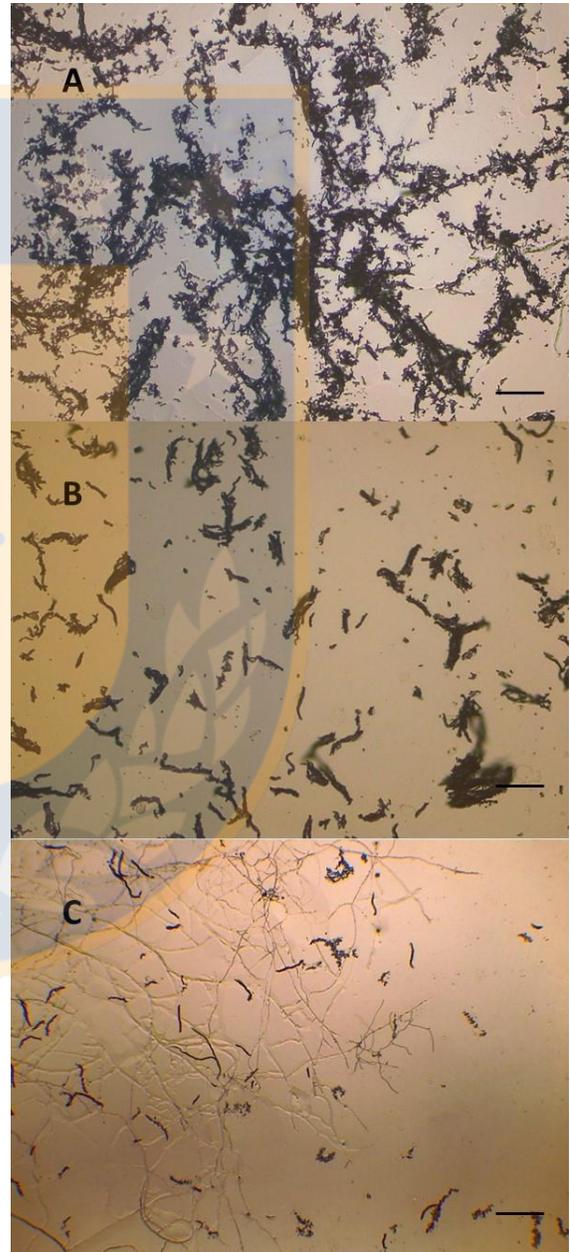
Figura 10. Registros fotográficos de observaciones microscópicas de hongos filamentosos en incubaciones de sedimento de placa Petri invertida, sección de abajo. Estación 18 (aumento 4X), 20 días de incubación (A); Estación 7 (aumento 10X), 25 días de incubación (B); Estación 6 (aumento 4X), 25 días de incubación (C); Estación 6 (aumento 10X), 25 días de incubación (D). La barra de escala representa 5 μ m (A y C) y 2 μ m (B y D).

A los 85 días de incubación de sedimentos, se observó la presencia de gran cantidad de estructuras reproductivas (Figura 11), principalmente en la estación 7 en donde se observaron tanto sobre la sección con siembra de sedimento (parte inferior) como sobre el medio de cultivo (parte superior). También, las incubaciones de sedimento de la estación 7 presentaron mayores agregaciones de estructuras reproductivas sobre la superficie de cultivo (Figura 11A).

En las incubaciones de sedimento de la estación 18 se observó una amplia cobertura de estructuras reproductivas en la sección de la placa con siembra de sedimento y sobre el medio de cultivo, pero en menor cantidad y más dispersas en comparación a la estación 7 (Figura 11: A y B). Contrario a esto, en las incubaciones correspondientes a la estación 6 se observó la menor cantidad de estructuras reproductivas (Figura 11C).

La figura 12 muestra algunas estructuras de crecimiento y reproductivas de hongos filamentosos detectadas sobre los cultivos de las diferentes estaciones. Debido al rápido crecimiento de micelio sobre el medio de cultivo, se dificultó la detección del ascenso de hifas hacia el medio objetivo a través el espacio de aire entre la placa o por los bordes de esta.

Figura 11. Registros fotográficos de observaciones microscópicas (aumento 10X) de hongos filamentosos en incubaciones de sedimento de placa Petri invertida, sección de abajo. Estación 7, 70 días de incubación (A); Estación 18, 85 días de incubación (B); Estación 6, 85 días de incubación (C). La barra de escala representa 2 μm .



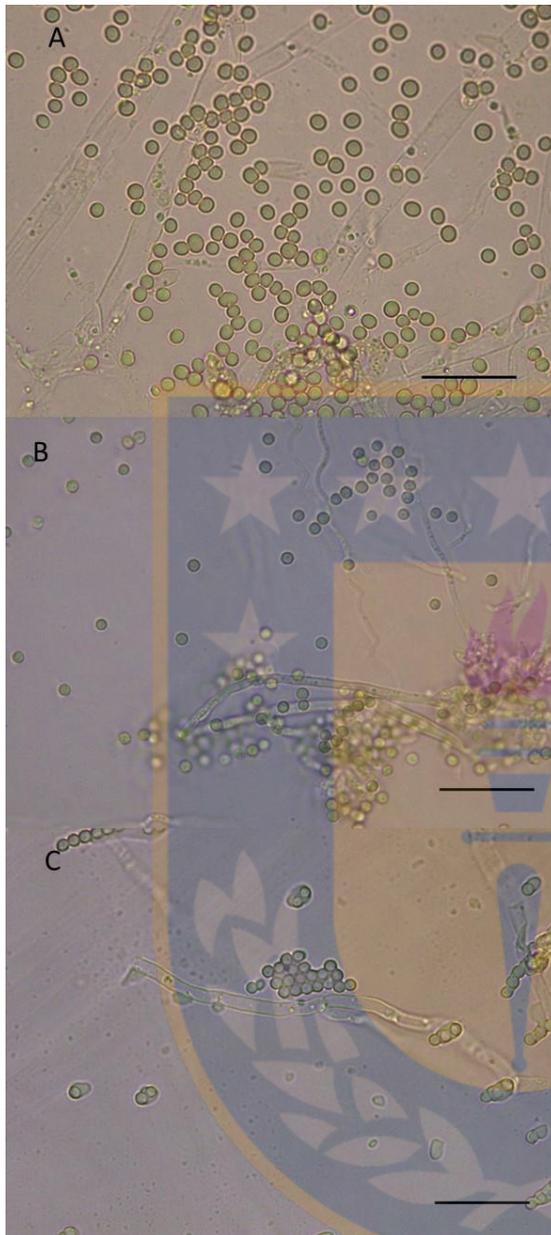


Figura 12. Registros fotográficos de observaciones microscópicas (aumento 100X) de hongos filamentosos en incubaciones de sedimento de placa Petri invertida, sección de abajo. Estación 18, 85 días de incubación (A); Estación 6, 85 días de incubación (B); Estación 7, 85 días de incubación (B). La barra de escala representa 0,5 um.

3.1.4 Método de placas Petri con medio de cultivo dividido

A través de este método se observó crecimiento de filamentos fúngicos alrededor del sedimento cercano al día 7 de incubación. A los 13 y 17 días de incubación, el crecimiento de filamentos presentó un notorio aumento, con una extensión de hifas en el borde del medio de cultivo de la sección con el sedimento sembrado (sección de origen) (Figura

13A y B) y a través del espacio de aire en la placa hacia el medio de cultivo de destino (Figura 13: B y C).

Se observaron filamentos fúngicos con diferentes morfologías (Figura 13C), extendidos hasta el medio de cultivo de llegada (Figura 13D) y una alta abundancia de estructuras reproductivas tanto en la sección de medio de origen como en el de llegada (Figura 14), pudiendo identificarse numerosos ascocarpos, estructuras reproductivas de ascomicetes (Figura 14B).

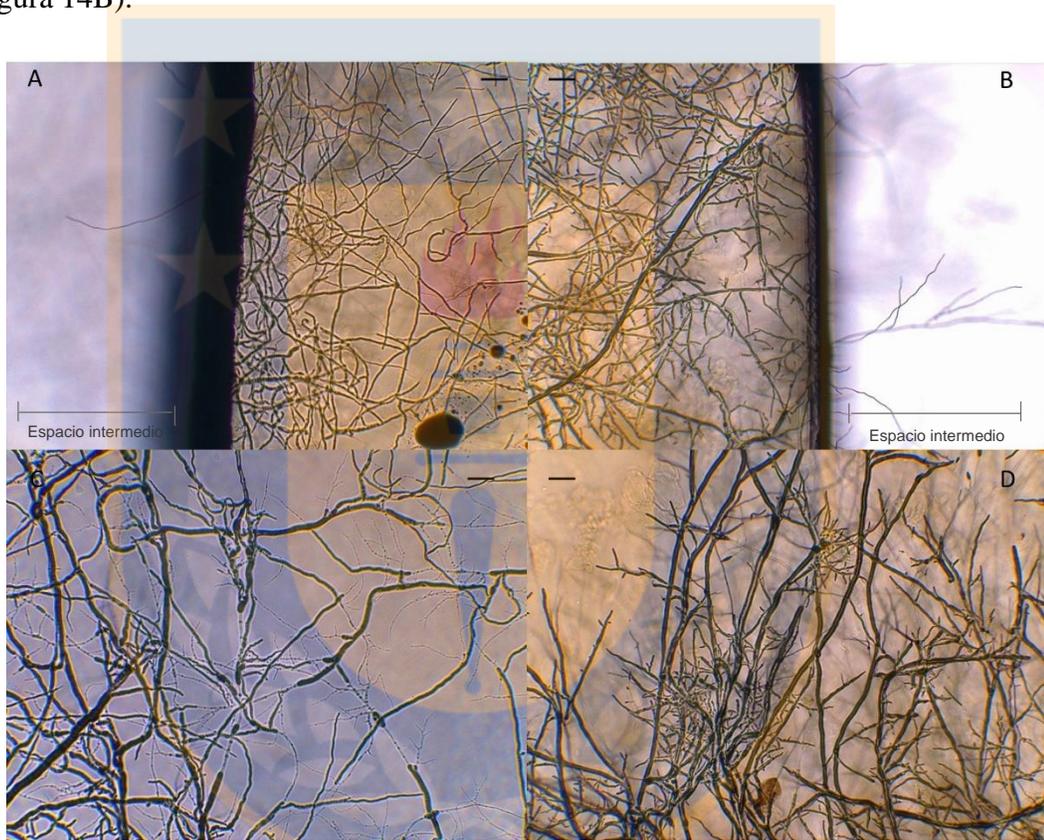


Figura 13. Registros fotográficos de observaciones microscópicas (aumento 4X) en incubaciones de sedimento de placa Petri dividida (estación 7). Se indica espacio intermedio en figuras A y B. Fracción de origen, 13 días de incubación (A); Fracción de origen, 17 días de incubación (B); Espacio intermedio, 20 días de incubación (C); Fracción de llegada, 20 días de incubación (D). La barra de escala representa 5 um.

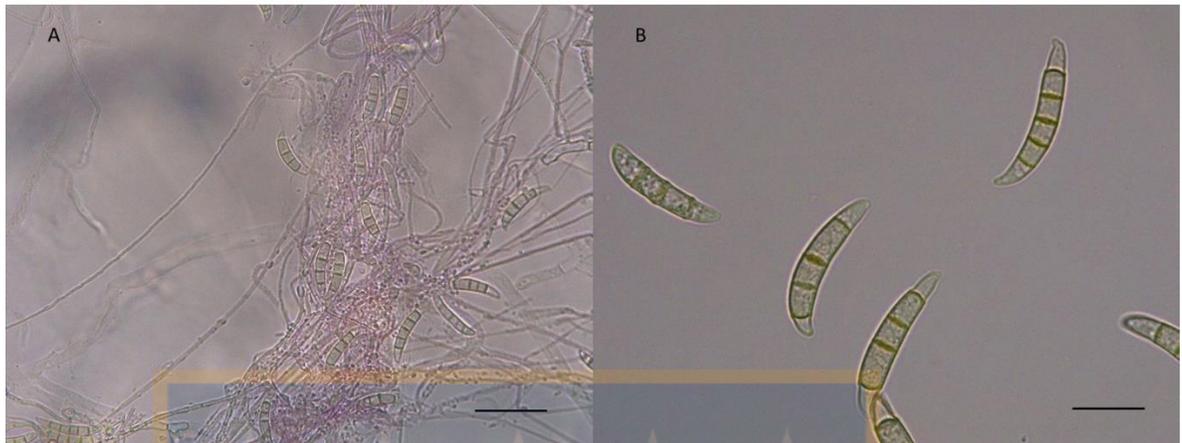


Figura 14. Registros fotográficos de observaciones microscópicas en incubaciones de sedimento de placa Petri dividida (estación 7). Aumento: 40X, 56 días de incubación (A); Aumento: 100X, 44 días de incubación (B). La barra de escala representa 1 μm (A) y 0,5 μm (B).

A través de este método, fue posible observar y aislar bacterias tanto desde el medio de origen como desde el medio de llegada. En total, se lograron aislar 7 cepas de hongos filamentosos y 10 cepas de bacterias (Tabla 1). En el medio de origen, se observó a simple vista la formación de varias colonias de bacterias alrededor del sedimento, y en el medio de llegada se evidenció la presencia de una colonia (Figura 15).

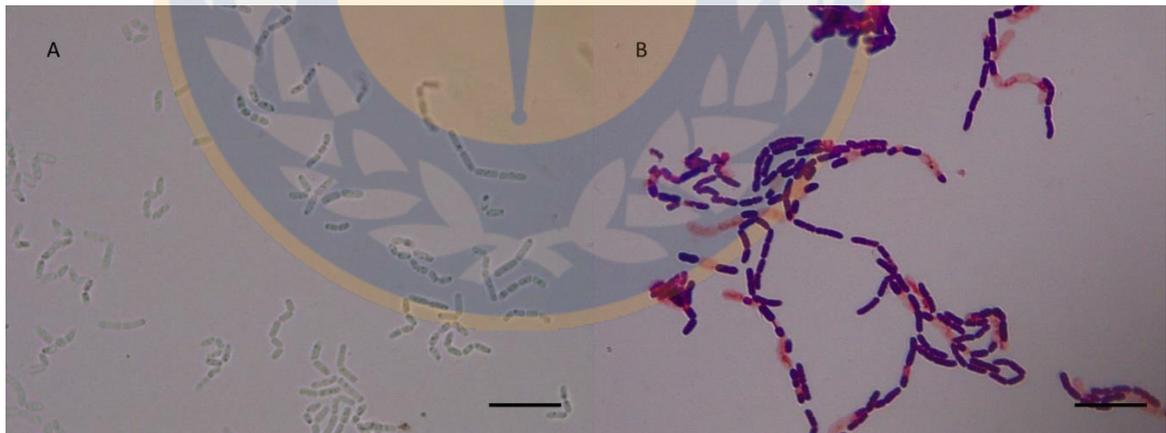


Figura 15. Registros fotográficos de observaciones microscópicas (aumento 100X) de aislamientos de bacterias en incubaciones de sedimento de placa Petri dividida, sección de llegada (estación 7), 56 días de incubación (A); 65 días de incubación (B). La barra de escala representa 0,5 μm .

Para confirmar la efectividad de la transferencia de bacterias a través de hifas se realizó una incubación control en la cual se sembró bacterias en placas con NA en el medio origen

(Figura 16A). Se realizó un cultivo de bacterias en placas con NA desde la sección de llegada del control negativo y el resultado fue una ausencia de células bacterianas.

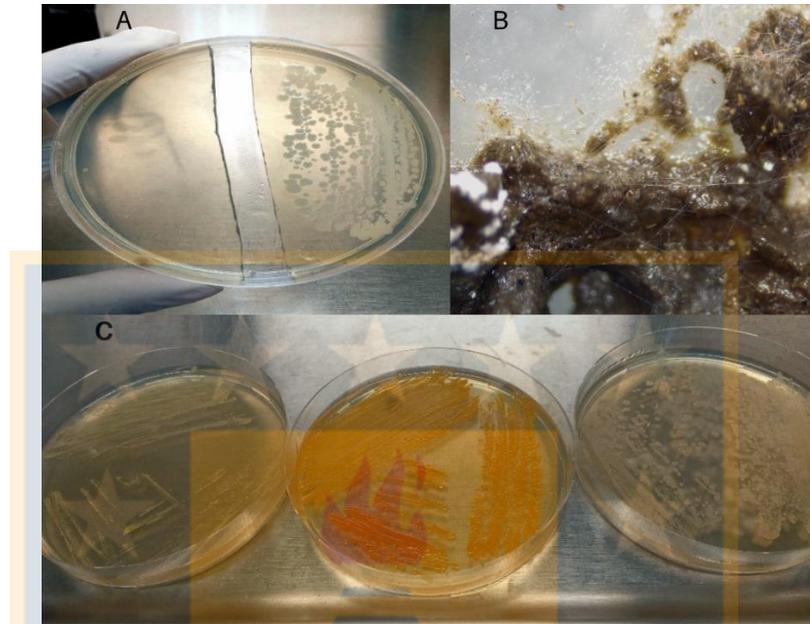


Figura 16. Fotografía placa Petri dividida control negativo (A); fotografía de incubación de sedimento en placa dividida bajo Microscopio estereoscópico, aumento 8X (B); fotografía de aislados bacterianos desde placa dividida sección de llegada (C).

Tabla 1. Número de aislados de hongos y bacterias a través de los diferentes métodos y estaciones.

Método	Estación	Aislamiento hongos	Aislamiento bacterias
Incubaciones de sedimento	18	5	5
	7	4	2
	6	3	4
Placa Petri invertida	18	3	
	7	1	
	6	1	
Placa Petri dividida	7	7	10

3.2 Actividad enzimática extracelular de cepas de hongos y bacterias

3.2.1. AEE en cepas aisladas por método tradicional de incubaciones de sedimento en placas Petri.

En promedio la actividad enzimática extracelular mostró valores más altos para aminopeptidasas que glucosidasas tanto en hongos como en bacterias (Tabla 2), el rango de actividad enzimática en aminopeptidasas varió entre 3058.4-22.8 nM h⁻¹ para hongos, 2333.2-45.3 nM h⁻¹ para bacterias y 2153.7-14.8 nM h⁻¹ para la interacción (hongo-bacteria) (Tabla 2). Para glucosidasas el rango de actividad osciló entre 194.2-4.2 nM h⁻¹ para hongos, 88.6-11.4 nM h⁻¹ para bacterias y 96.9-7.7 nM h⁻¹ en la interacción (Tabla 2). En promedio, la actividad enzimática extracelular fue mayor en cepas de hongos tanto en aminopeptidasas como en glucosidasas (Figura 17A y B). La actividad enzimática de los tratamientos combinados de hongo-bacteria fue menor en aminopeptidasas (Figura 17A) y similar a la actividad enzimática de glucosidasas en bacterias (Figura 17B). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos tanto para aminopeptidasas (valor-p>0.05, Kruskal-Wallis) como para glucosidasas (valor-p>0.05, Kruskal-Wallis).

Para las cepas seleccionadas de bacterias y hongos y las combinaciones hongo-bacteria, las actividades más altas fueron observadas en las provenientes de la estación 18 y 7 tanto para aminopeptidasas como para glucosidasas (Figura 18A y B). El análisis estadístico de la actividad enzimática extracelular por estaciones presentó diferencias significativas entre aminopeptidasas (valor-p<0.05, Kruskal-Wallis) y glucosidasas (valor-p<0.05, Kruskal-Wallis)

En ninguno de los experimentos realizados con cepas provenientes de cultivos en placas tradicionales se observó una actividad hidrolítica mayor en los tratamientos con combinación de cepas (hongo-bacteria) que en los tratamientos de hongos y/o bacterias aisladas, tanto para aminopeptidasas como para glucosidasas (Figura 17A y B).

Tabla 2. Promedio y desviación estándar de tasas de actividad enzimática extracelular de todos los tratamientos realizados en método de placa Petri tradicional. Los valores más altos están resaltados. 18H1, 18B2: El primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente

Cepa evaluada	AEE (V nM h ⁻¹) MCA-leu	AEE (V nM h ⁻¹) MUF-glu	s MCA-leu	s MUF-glu
18H1	55,9	4,2	11,7	3,2E-15
18H5	3058,4	151,4	8,4	17,2
6H1	22,8	31,8	5,2	0,16
7H3	1949,9	194,2	23,9	16,8
18B2	623,8	11,4	29,3	2,2
18B6	1891,9	88,6	17,1	43,1
6B4	45,3	47,2	3,8	3,4
7B1	2333,3	55,4	20,5	5,2
18H118B2	376,0	7,7	24,7	1,7
18H5B6	2153,7	96,9	0,40	9,1
6H1B4	14,8	13,5	0,74	0,88
7H3B1	2128,5	75,6	21,4	17,4

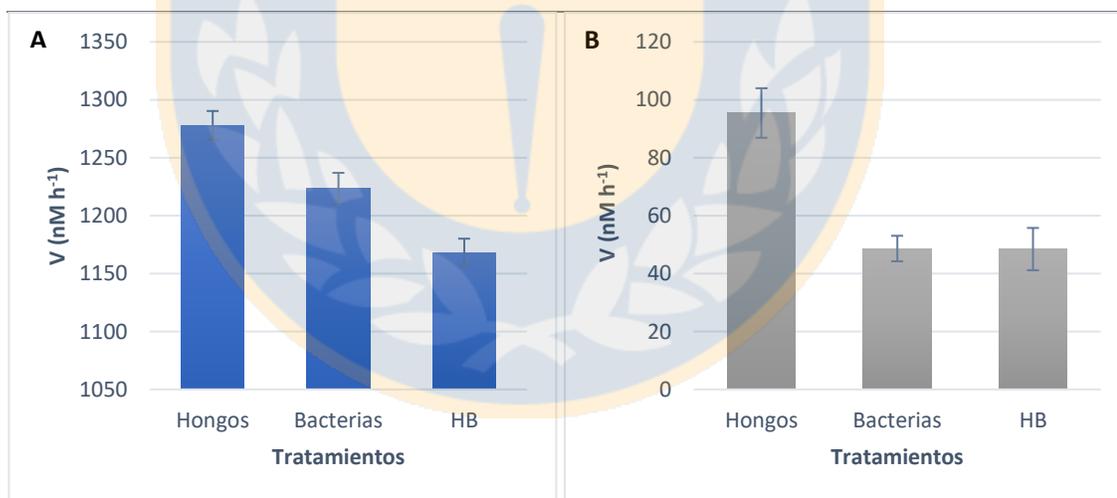


Figura 17. Actividad enzimática promedio de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas de hongos, bacterias y combinación hongo-bacteria aisladas desde placas Petri tradicionales.

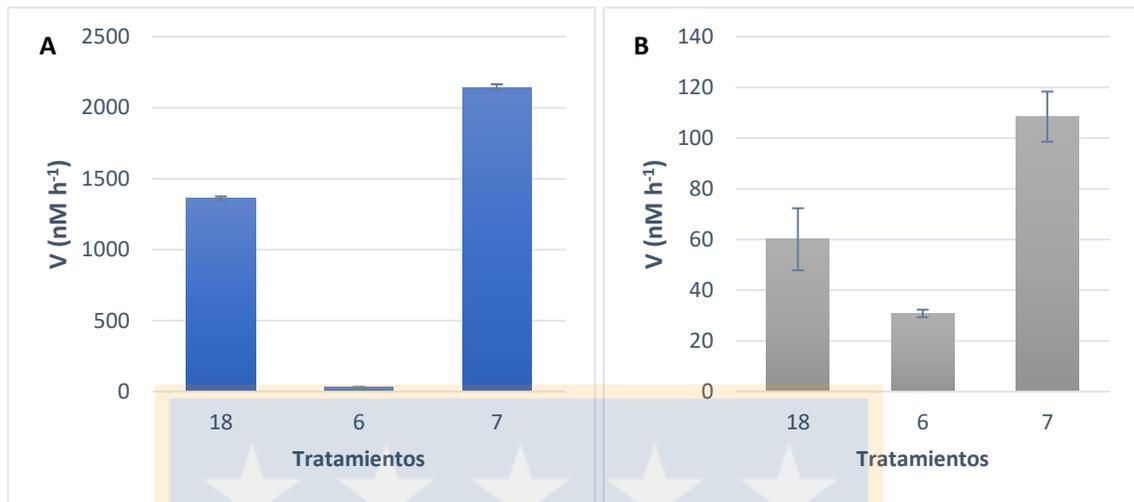


Figura 18. Actividad enzimática promedio de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de todos los tratamientos por estación

En los experimentos con las cepas st-18H5 y st-18B6 aisladas desde la estación 18, se observó mayor actividad enzimática en la cepa de hongos en aminopeptidasas y en glucosidasas, seguida por el tratamiento combinado de hongos y bacterias (Figura 19: A y B). Para las cepas st-18H1 y st-18B2 el tratamiento de hongos en aminopeptidasas y en glucosidasas, presentó una baja actividad, siendo mayor la de bacterias, seguida por las mediciones de combinación hongo-bacteria (Figura 20).

Adicionalmente, en todos los experimentos realizados se evidenció mayor actividad enzimática extracelular en los tratamientos con tejido microbiano que en los controles.

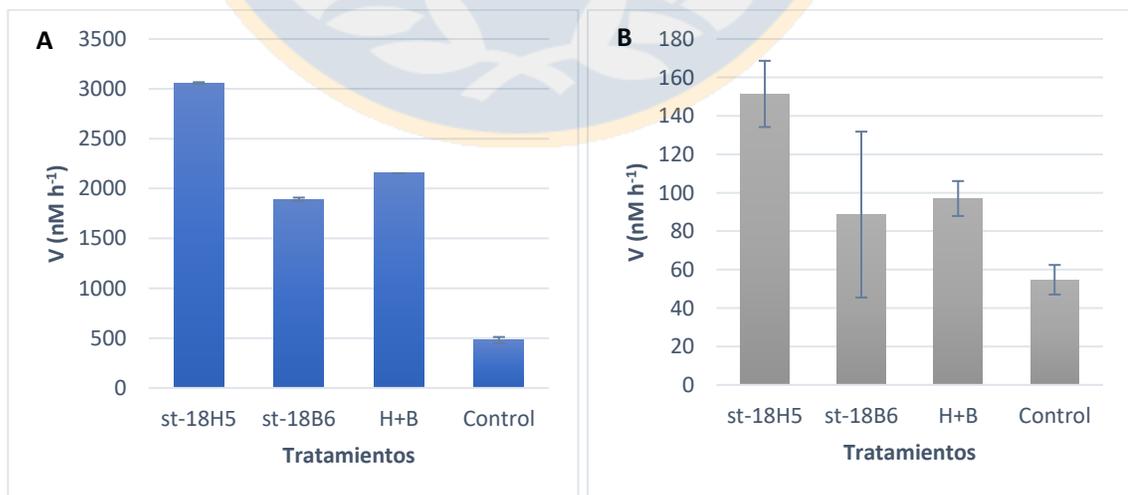


Figura 19. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 18, 18H5, 18B6 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente y el tratamiento de interacción corresponde a H+B.

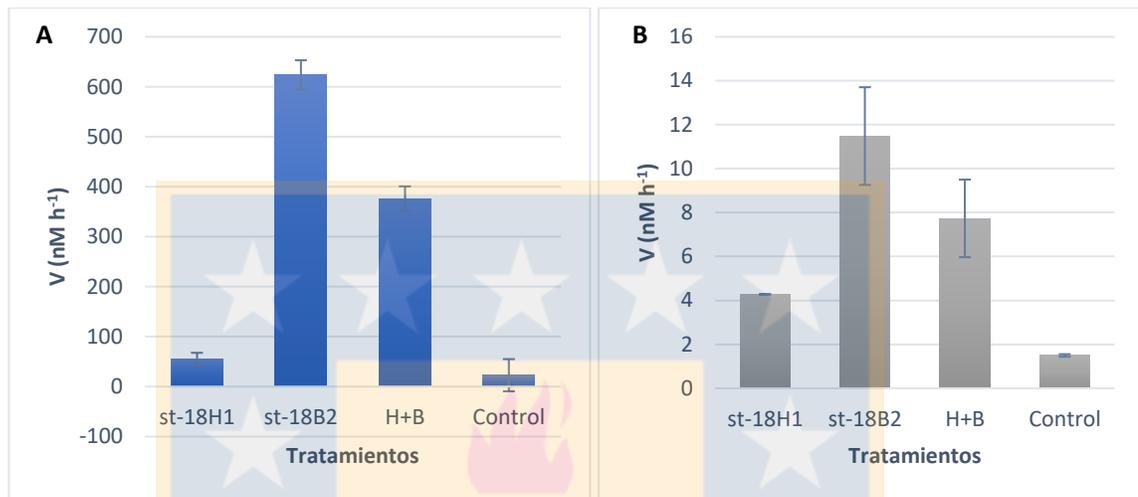


Figura 20. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 18, 18H1, 18B2 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente y el tratamiento de interacción corresponde a H+B.

Para las cepas provenientes de la estación 6, st-6H1 y st-6B4, se observó mayor actividad de bacterias tanto de aminopeptidasas como de glucosidasas. Además, en estas cepas la actividad en la combinación hongo-bacteria fue la más baja (Figura 21). Para la estación 7, las cepas st-7H3 y st-7B1 presentaron una mayor actividad bacteriana de aminopeptidasas, aunque no se observaron mayores diferencias. Al contrario, en la medición de glucosidasas el tratamiento de hongos fue mayor que los tratamientos restantes (Figura 22).

En todos los experimentos realizados se evidenció mayor actividad enzimática extracelular en los tratamientos con tejido microbiano que en los controles.

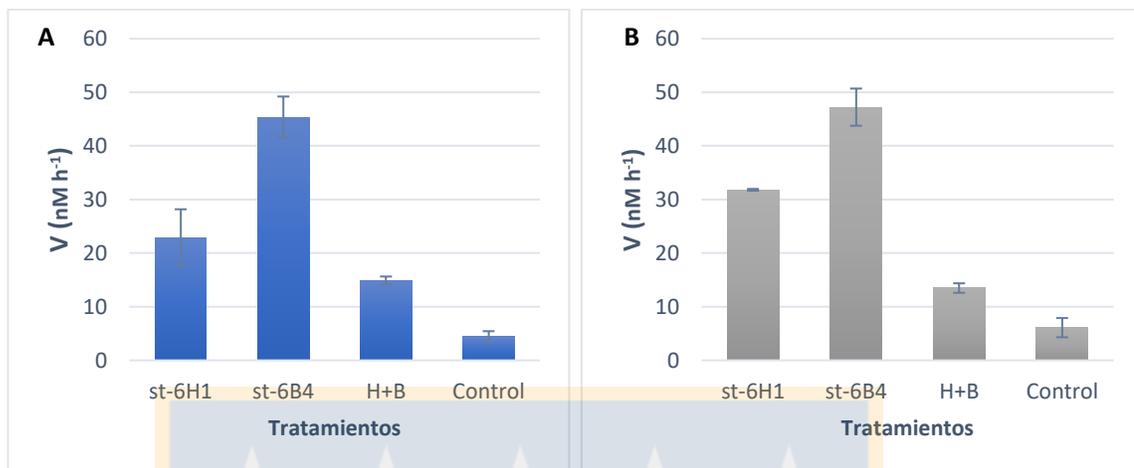


Figura 21. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 18, 6H1, 6B4 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente y el tratamiento de interacción corresponde a H+B.

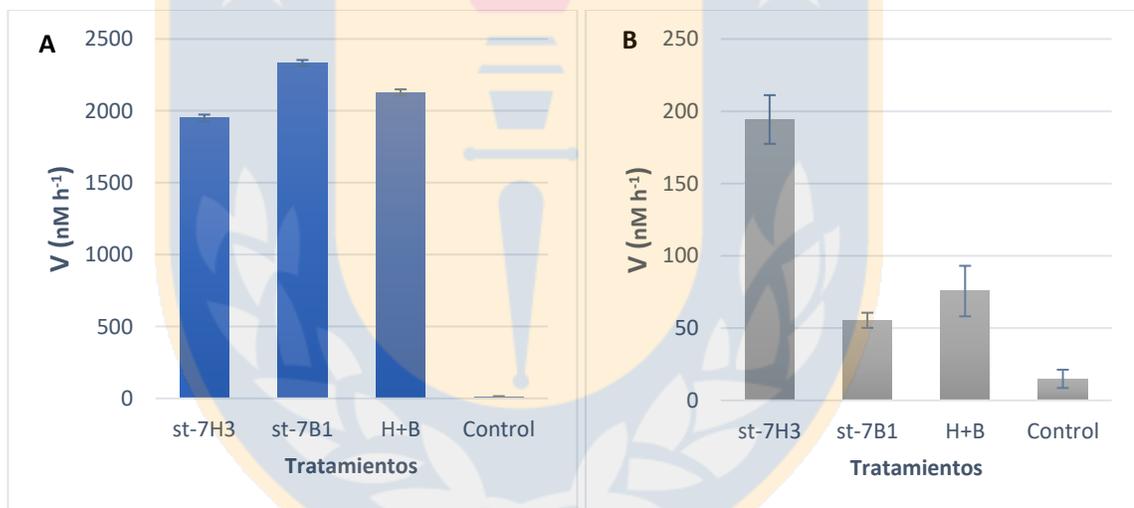


Figura 22. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 18, 7H3, 7B1 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente y el tratamiento de interacción corresponde a H+B.

3.2.2 Actividad enzimática en cepas aisladas a través del método de placa dividida.

En promedio la actividad enzimática extracelular mostró valores más altos para glucosidasas que aminopeptidasas tanto en hongos como en bacterias (Tabla 3). Además, la actividad enzimática extracelular fue mayor en los tratamientos de interacción en las

mediciones con aminopeptidasas seguido por las cepas de bacterias (Figura 23A), en cambio para glucosidasas la actividad enzimática extracelular fue mayor en cepas de hongos, seguido por el tratamiento de interacción (Figura 23B). El rango de actividad de aminopeptidasas varió entre 4844.4-323.4 nM h⁻¹ para hongos, 5533.2-216.8 nM h⁻¹ para bacterias y 6329.4-283.5 nM h⁻¹ en la combinación. Para glucosidasas la tasa de reacción varió entre 11552.5-473.1 nM h⁻¹ en hongos, 5382.8-260.7 nM h⁻¹ en bacterias y 9011.4-586.9 nM h⁻¹ en la interacción (Tabla 3). El análisis estadístico de la actividad de aminopeptidasas para los tratamientos no presentó diferencias significativas (valor- $p > 0.05$, Kruskal-Wallis), en cambio para glucosidasas se presentaron diferencias significativas (valor- $p < 0.05$, Kruskal-Wallis).

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de tasas de actividad enzimática extracelular de todos los tratamientos realizados en método de placa Petri dividida. Valores altos resaltados. 7PDH3, 7PDB3: El primer número corresponde a la estación, el segundo al orden de aparición de la cepa aislada, las siglas PD corresponden al método realizado (placa dividida) y H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente.

Cepa evaluada	AEE (V nM h-1) MCA-leu	AEE (V nM h-1) MUF-glu	s MCA-leu	s MUF-glu
7PDH3	1140,8±82,5	7800,6	82,5	59,8
7PDH1	323,4	8619,5	11,8	249,9
7PDH8	563,9	473,0	125,5	146,8
7PDH9	4844,4	11552,4	503,5	191,5
7PDB3	2348,7	1120,0	116,0	1,1
7PDB2	725,6	3248,2	30,4	173,1
7PDB1	216,8	260,7	25,1	107,2
7PDB4	5533,2	5382,8	528,3	319,2
7PDH3B3	4453,1	9011,4	15,8	1274,5
7PDH1B2	481,6	5871,9	25,6	101,3
7PDH8B1	283,5	586,9	16,3	24,6
7PDH9B4	6329,4	7457,9	66,9	181,4

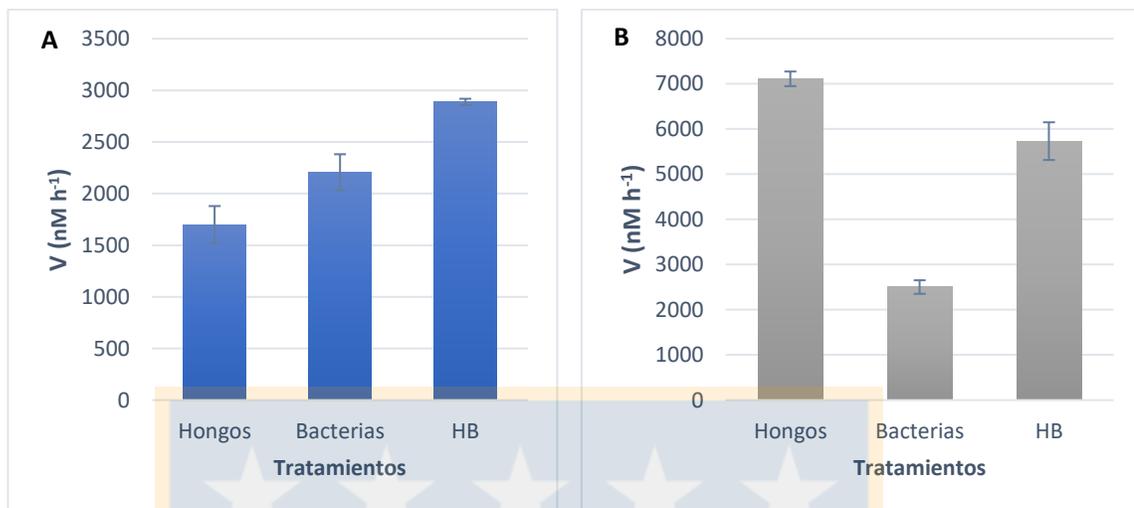


Figura 23. Actividad enzimática promedio de cepas de hongos, cepas de bacterias y combinación hongo-bacteria con aminopeptidasas (A) y con glucosidasas (B).

En los experimentos con cepas aisladas de la estación 7, st-7PDH3 y st-7PDB3 (Figura 24: A y B), se observó que la actividad de aminopeptidasas y de glucosidasas fue mayor en el tratamiento hongo-bacteria. Adicionalmente, en las mediciones de aminopeptidasas, el tratamiento de bacterias fue más alto que el de hongos (Figura 24A), mientras que en las mediciones de glucosidasas el tratamiento de hongos fue mayor que el de bacterias (Figura 24B).

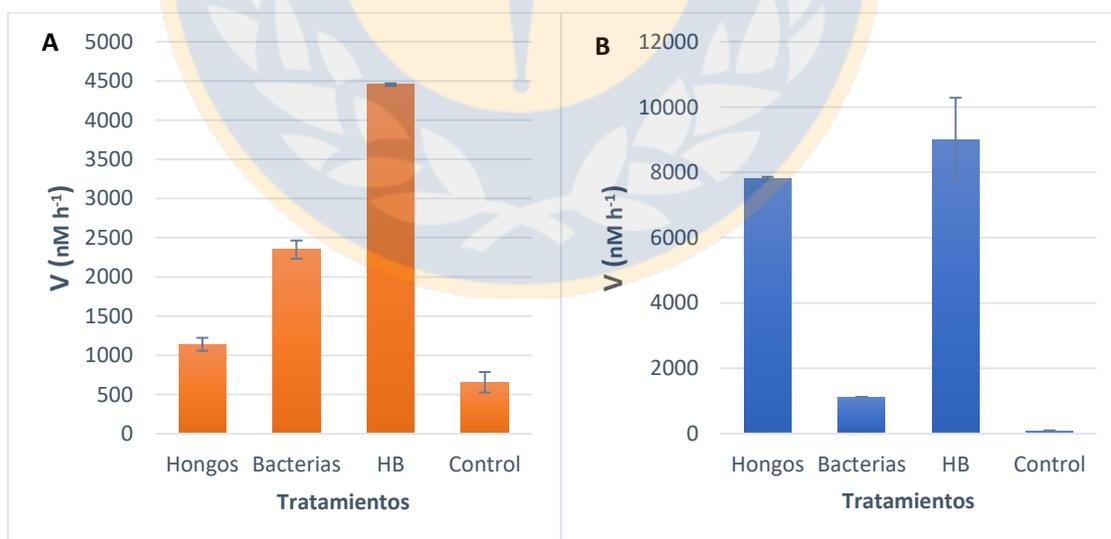


Figura 24. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 7, 7PDH3, 7PDB3 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, las siglas PD corresponden al método realizado (placa

dividida) y H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente. El tratamiento de interacción corresponde a H+B.

En el caso de las cepas st-7PDH1 y st-7PDB2 (Figura 25A y B), se observó que para la actividad de aminopeptidasas el tratamiento de bacterias fue más alto que el de hongos (Figura 25A), mientras que para la actividad de glucosidasas el tratamiento de hongos fue mayor que el de bacterias (Figura 25B).

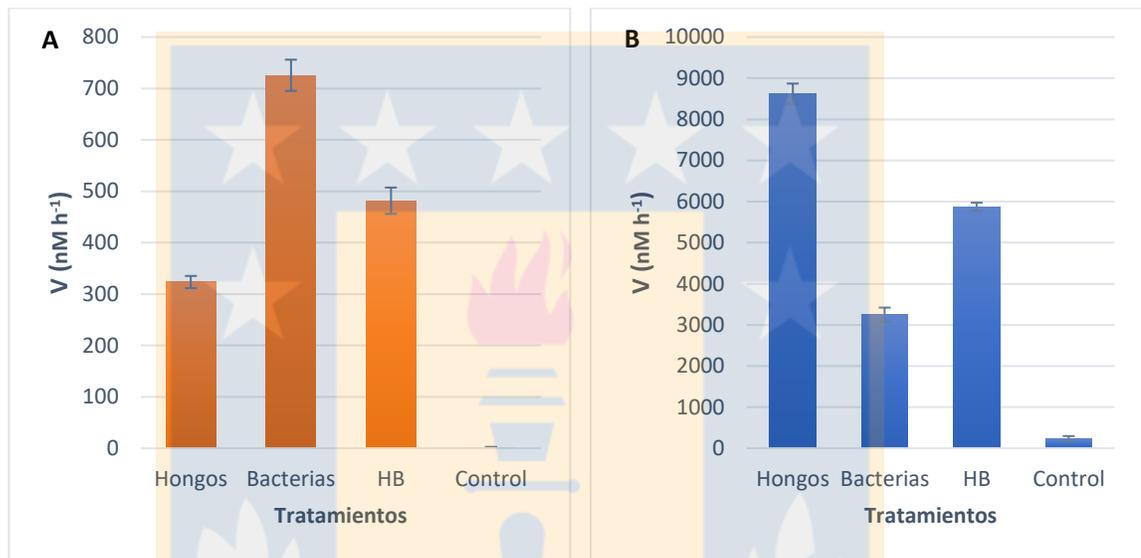


Figura 25. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 7, 7PDH1, 7PDB2 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, las siglas PD corresponden al método realizado (placa dividida) y H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente. El tratamiento de interacción corresponde a H+B.

En los experimentos con las cepas st-7PDH8 y st-7PDB1 (Figura 26A y B), la actividad de glucosidasas mostró valores mayores en el tratamiento hongo-bacteria, y para la actividad de aminopeptidasas y glucosidasas el tratamiento de hongos fue más alto que el de bacterias (Figura 26A y B).

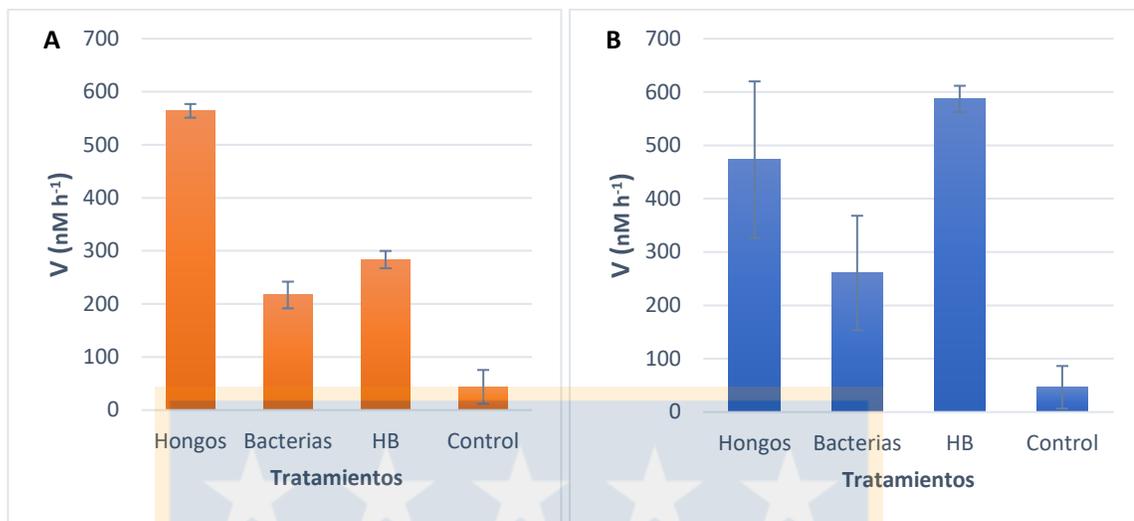


Figura 26. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 7, 7PDH8, 7PDB1 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, las siglas PD corresponden al método realizado (placa dividida) y H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente. El tratamiento de interacción corresponde a H+B.

Para los experimentos con las cepas st-7PDH9 y st-7PDB4 (Figura 27A y B), se observó que la actividad de aminopeptidasas fue mayor en el tratamiento hongo-bacteria. Para glucosidasas el tratamiento de hongos fue el que mostró la actividad más alta (Figura 27B).

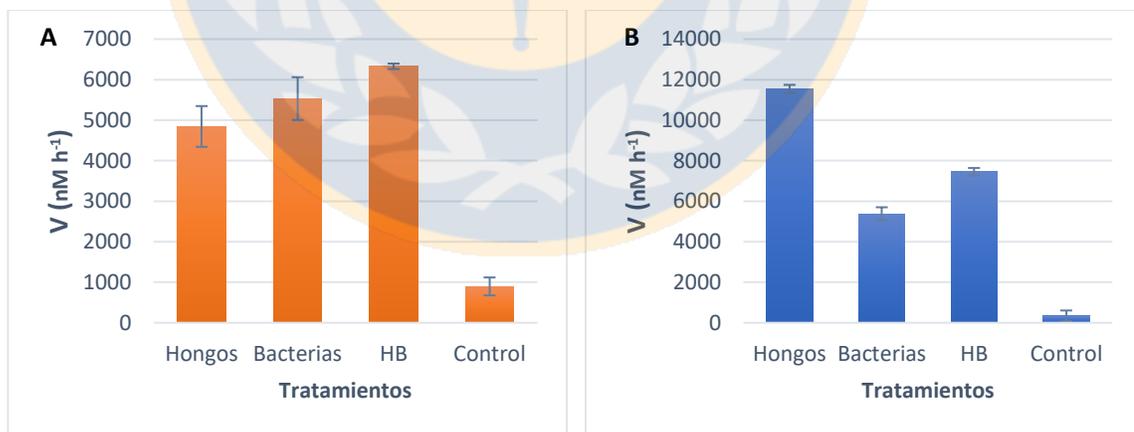


Figura 27. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas (A) y glucosidasas (B) de cepas aisladas desde la estación 7, 7PDH9, 7PDB4 y HB, donde el primer número corresponde a la estación y el segundo número al orden de aparición de la cepa aislada, las siglas PD corresponden al método realizado (placa dividida) y H o B corresponde a hongo y bacteria respectivamente. El tratamiento de interacción corresponde a H+B.

En promedio, la actividad enzimática extracelular en cepas aisladas a través del método de placa dividida presentó valores mayores tanto en las mediciones con aminopeptidasas como en glucosidasas en comparación a las cepas aisladas a través de las incubaciones de sedimento (Figura 28: A y B). El análisis estadístico para aminopeptidasas no presentó diferencias significativas ($0.2415 > 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney) mientras que para glucosidasas si se presentaron diferencias significativas ($7.396e-07 < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney)



Figura 28. Actividad enzimática promedio de cepas aisladas a través de incubaciones de sedimento en placas Petri (método tradicional) y de cepas aisladas a través de método de placa dividida con aminopeptidasas (A) y con glucosidasas (B).

La actividad enzimática extracelular en el tratamiento de interacción (HB) de las cepas aisladas a través del método de placa Petri dividida fue mayor a la actividad enzimática de las cepas aisladas a través del método de placa Petri tradicional tanto para aminopeptidasas como glucosidasas (Figura 29A y B). Diferencias significativas (valor- $p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney) fueron encontradas para la actividad de glucosidasas.



Figura 29. Actividad enzimática promedio de tratamiento de interacción (HB) de cepas aisladas a través de incubaciones de sedimento en placas Petri (método tradicional) y de cepas aisladas a través de método de placa dividida con aminopeptidasas (A) y con glucosidasas (B).

3.2.3. Actividad enzimática en sedimento inoculado con cepas aisladas y enriquecimiento de materia orgánica terrígena

La actividad enzimática extracelular de aminopeptidasas en promedio varió entre 19.3-10.55 nM g⁻¹ h⁻¹ en los experimentos con hongos con y sin adición de MOT, 16.4-12.9 nM g⁻¹ h⁻¹ en los tratamientos con inóculos de bacterias con y sin adición de MOT y 24.8-21.7 nM g⁻¹ h⁻¹ en la interacción hongo-bacteria con y sin adición de MOT. Para glucosidasas, actividades entre 40.6-16.8 nM g⁻¹ h⁻¹ fueron encontradas en el tratamiento con hongos con y sin adición de MOT, 20.8-4.9 nM g⁻¹ h⁻¹ en los experimentos con bacterias con y sin adición de MOT y 41.9-21.3 nM g⁻¹ h⁻¹ en la interacción hongo-bacteria con y sin adición de MOT.

En promedio, la actividad enzimática extracelular fue mayor en los tratamientos con adición de materia orgánica terrígena tanto en aminopeptidasas como en glucosidasas (Figura 30A y B). En el tiempo inicial, la actividad enzimática de aminopeptidasas en el tratamiento hongo-bacteria fue mayor en las incubaciones con y sin adición de materia orgánica terrestre, seguida por el tratamiento con bacteria y hongos (Figura 31A y B). Para la actividad de glucosidasas los tratamientos con adición de MOT presentaron un valor mayor en el tratamiento de hongos, seguido por el tratamiento hongo-bacteria (Figura 32A). En los tratamientos sin adición de MOT, incluidos los controles, se observaron

valores similares, con un valor ligeramente mayor en el tratamiento hongo-bacteria, seguido por el tratamiento de hongos (Figura 32B).

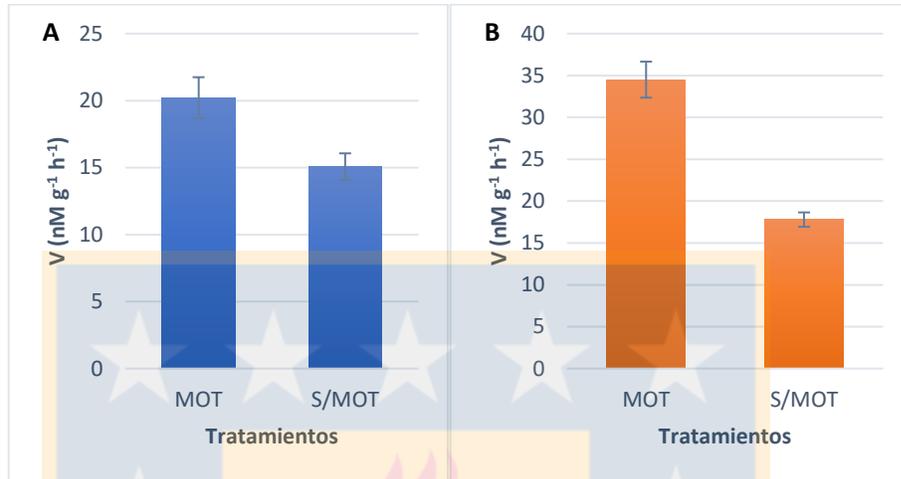


Figura 30. Actividad enzimática promedio de todos los tratamientos de cepas aisladas de hongos, de bacterias y combinación hongo-bacteria con adición de materia orgánica terrígena (MOT) y sin adición (S/MOT) con aminopeptidasas (A) y con glucosidasas (B).

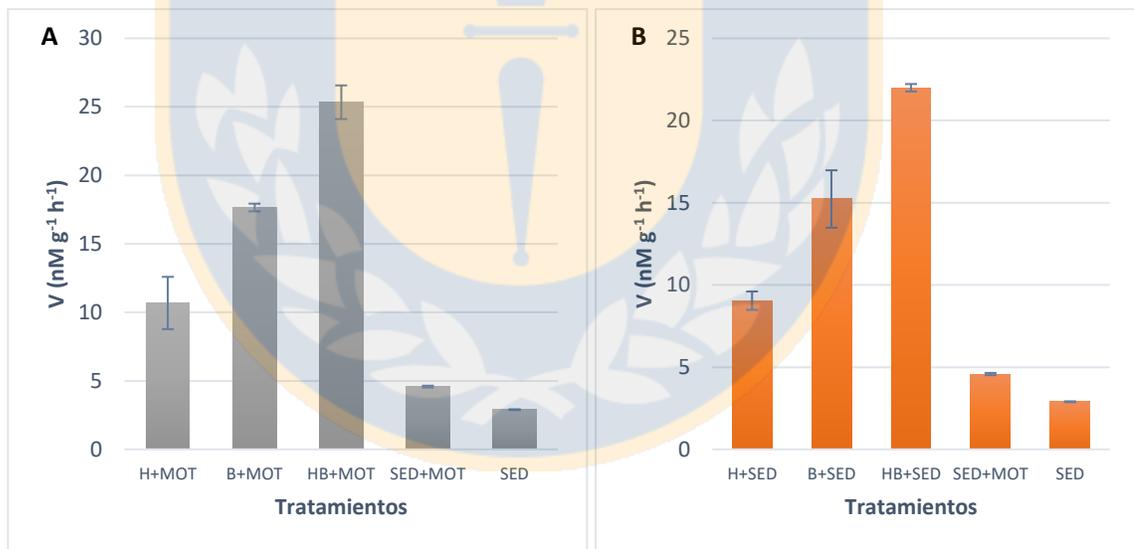


Figura 31. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas de tratamientos con inóculo microbiano más adición de MOT (A) y con inóculo microbiano sin adición de MOT (B) en el tiempo inicial. H+MOT: actividad fúngica más enriquecimiento de MOT; B + MOT: actividad bacteriana más enriquecimiento de MOT; HB + MOT: actividad hongo-bacteria más enriquecimiento de MOT; H + SEDIMENTO: actividad fúngica sin enriquecimiento de MOT; B + SED: actividad bacteriana sin enriquecimiento de MOT; HB + SED: actividad hongo-bacteria sin enriquecimiento de MOT; SED + MOT: sin inóculo microbiano con enriquecimiento de MOT; SED: sin inóculo microbiano ni enriquecimiento de MOT.

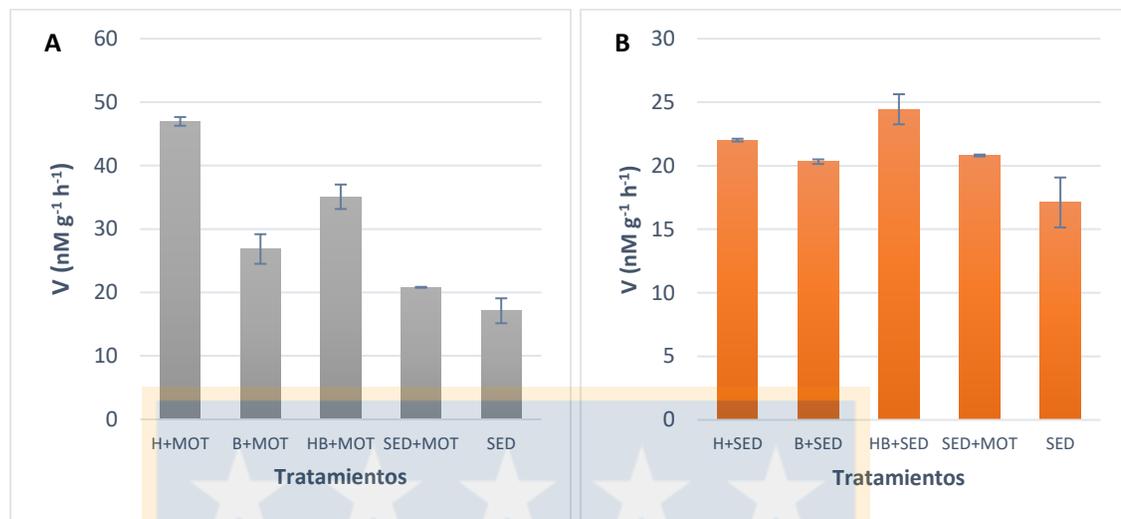


Figura 32. Tasas de degradación enzimática de glucosidasas de tratamientos con inóculo microbiano más adición de MOT (A) y con inóculo microbiano sin adición de MOT (B) en el tiempo inicial. H+MOT: actividad fúngica más enriquecimiento de MOT; B + MOT: actividad bacteriana más enriquecimiento de MOT; HB + MOT: actividad hongo-bacteria más enriquecimiento de MOT; H + SEDIMENTO: actividad fúngica sin enriquecimiento de MOT; B + SED: actividad bacteriana sin enriquecimiento de MOT; HB + SED: actividad hongo-bacteria sin enriquecimiento de MOT; SED + MOT: sin inóculo microbiano con enriquecimiento de MOT; SED: sin inóculo microbiano ni enriquecimiento de MOT.

En el tiempo final, la actividad de aminopeptidasas en los tratamientos con adición de MOT, fue más alta en el tratamiento con hongos, seguido por el tratamiento hongo-bacteria (Figura 33A). Los experimentos sin adición de MOT (Figura 33B) mostraron valores mayores en las incubaciones hongo-bacteria.

Para glucosidasas en el tiempo final, las incubaciones con adición de MOT (Figura 34A) mostraron una mayor actividad enzimática en el tratamiento hongo-bacteria, seguidos por el tratamiento de hongos (Figura 34A). Un patrón similar se observó en los tratamientos sin adición de MOT (Figura 34B).

En las mediciones con glucosidasas el tratamiento aislado de hongos más MOT fue mayor que el de hongo-bacteria y el más alto en el tiempo inicial (Figura 32A), pero en la segunda medición (tiempo final) la tasa de actividad enzimática en hongos bajó y la interacción aumentó (Figura 34A) en un amplio rango.

Para aminopeptidasas, el análisis estadístico de los tratamientos con adición de MOT comparado a sin adición de MOT presentó diferencias significativas (valor- $p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney) al igual que el tratamiento de la interacción hongo-bacteria (HB) con adición de MOT comparado al tratamiento HB sin adición de MOT (valor- $p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney). En el caso de glucosidasas los tratamientos con adición de MOT comparado a sin adición de MOT presentaron diferencias significativas (valor- $p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney), al igual que el tratamiento de la interacción HB con y sin adición de MOT (valor- $p < 0.05$, Wilcoxon-Mann-Whitney).

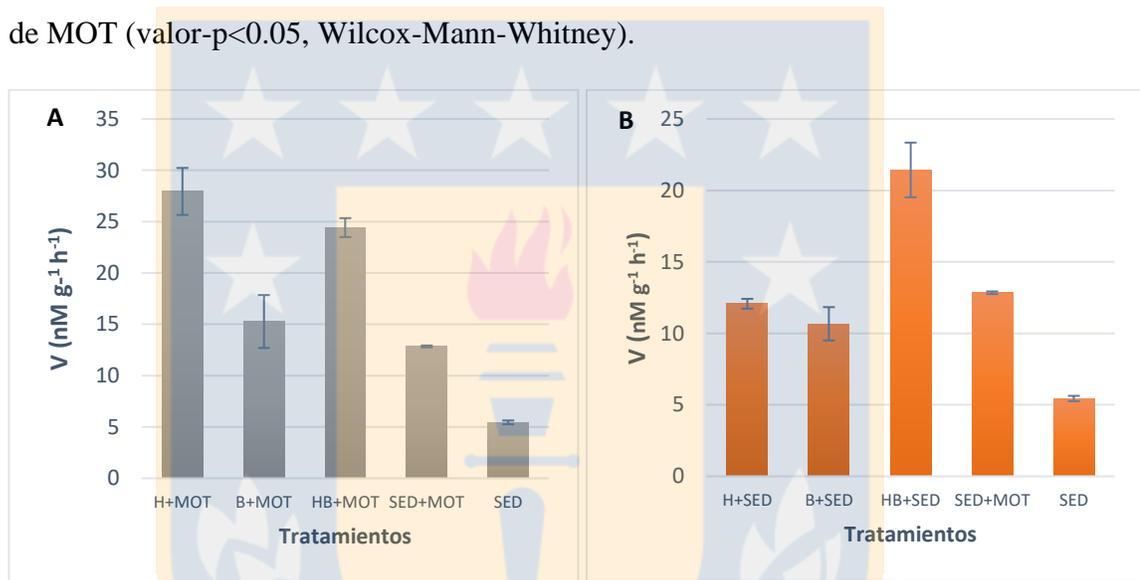


Figura 33. Tasas de degradación enzimática de aminopeptidasas de tratamientos con inóculo microbiano más adición de MOT (A) y con inóculo microbiano sin adición de MOT (B) en el tiempo final. H+MOT: actividad fúngica más enriquecimiento de MOT; B + MOT: actividad bacteriana más enriquecimiento de MOT; HB + MOT: actividad hongo-bacteria más enriquecimiento de MOT; H + SEDIMENTO: actividad fúngica sin enriquecimiento de MOT; B + SED: actividad bacteriana sin enriquecimiento de MOT; HB + SED: actividad hongo-bacteria sin enriquecimiento de MOT; SED + MOT: sin inóculo microbiano con enriquecimiento de MOT; SED: sin inóculo microbiano ni enriquecimiento de MOT

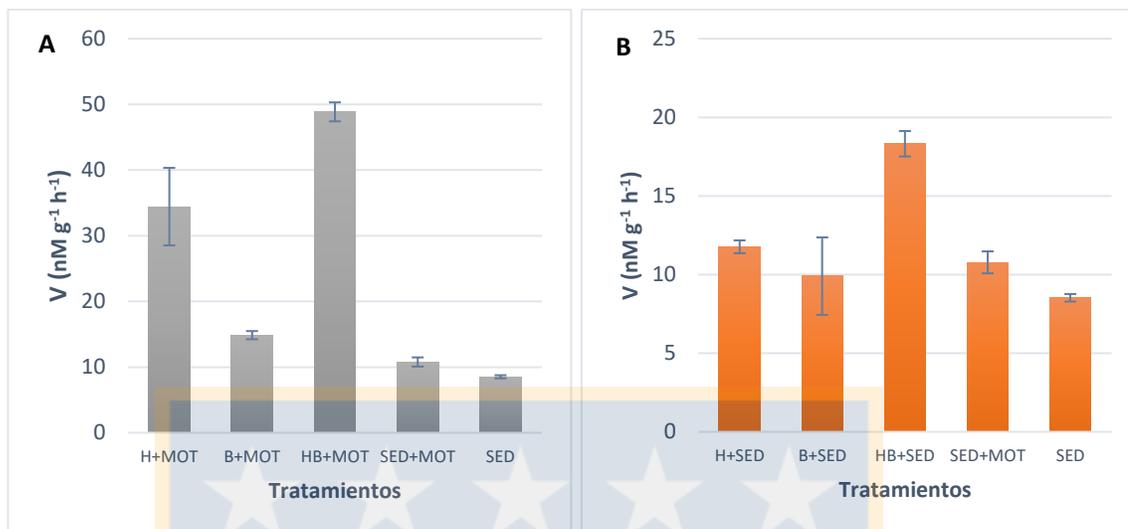


Figura 34. Tasas de degradación enzimática de glucosidasas de tratamientos con inóculo microbiano más adición de MOT (A) y con inóculo microbiano sin adición de MOT (B) en el tiempo final. H+MOT: actividad fúngica más enriquecimiento de MOT; B + MOT: actividad bacteriana más enriquecimiento de MOT; HB + MOT: actividad hongo-bacteria más enriquecimiento de MOT; H + SEDIMENTO: actividad fúngica sin enriquecimiento de MOT; B + SED: actividad bacteriana sin enriquecimiento de MOT; HB + SED: actividad hongo-bacteria sin enriquecimiento de MOT; SED + MOT: sin inóculo microbiano con enriquecimiento de MOT; SED: sin inóculo microbiano ni enriquecimiento de MOT

3.3 Cuantificación de las suspensiones microbianas mediante densidad óptica (DO)

Las suspensiones de tejido de hongos y bacterias presentaron valores de absorbancia similares (Tabla 4) tanto en las cepas aisladas a través incubaciones de sedimento como en las cepas aisladas a través de método de placa dividida. Se observaron diferencias un poco más notorias sólo en 2 cepas de placa dividida (st-7PDH1B2 y st-7PDH8B1).

Tabla 4. Valores de absorbancia de hongos (450 nm) y bacterias (600 nm). Al comienzo de la tabla se presentan las cepas aisladas a través de incubaciones de sedimento tradicional y desde la cuarta columna se presentan las cepas aisladas a través de placa dividida, ambas con su correspondiente identificador.

Cepas	OD hongos	OD bacterias	Cepas	OD hongos	OD bacterias
st-18H1B2	1,85E-02	1,53E-02	st-7PDH3B3	2,30E-02	5,65E-02
st-18H5B6	3,65E-02	3,10E-02	st-7PDH1B2	0,22552	4,70E+02
st-6H1B4	8,59E-03	7,79E-03	st-7PDH8B1	0,27887	4,72E-02
st-7H3B1	4,48E-03	8,80E-03	st-7PDH9B4	4,41E-02	6,06E-02

4. DISCUSIÓN

Del total de las 12 cepas de hongos y 11 cepas de bacterias aisladas desde las 3 estaciones, las cepas provenientes de la estación 7 ubicada al interior de la bahía de Concepción, fueron las que presentaron mayores tasas de actividad enzimática extracelular (AEE) tanto de aminopeptidasas como de glucosidasas (Figura 18). Esto podría tener relación con la presencia de sedimentos ricos en materia orgánica característicos de la bahía de Concepción, los que recibirían una significativa fracción de la producción primaria generada durante temporada de surgencia (c. 25-40%; Farías et al., 1996). Adicionalmente, la bahía de Concepción está fuertemente influenciada por actividades antrópicas que generan importantes aportes de materia orgánica a la zona costera (Rudolph et al., 2002). Los hongos y bacterias aislados desde la estación 18 presentaron las segundas mayores tasas de AEE. La estación 18 se encuentra más alejada de la bahía, presenta mayor influencia oceánica y se encuentra bajo el efecto de una intensa surgencia estacional (Sobarzo et al., 2007) que resulta en importantes aportes de materia orgánica producto de las altas tasas de productividad fitoplanctónica (Ferdelman et al., 1997), lo que podría incrementar el potencial degradativo de los microorganismos del sedimento. Los hongos y bacterias evaluados en este estudio fueron aislados a partir de sedimento superficial, donde la abundancia de materia orgánica es mayor que en estratos más profundos (Arndt et al., 2013), por lo cual cabe esperar una alta actividad degradativa. Además, se ha sugerido que la comunidad microbiana es altamente activa en la degradación de materia orgánica en la interfaz sedimento-agua (Arndt et al., 2013) y según lo documentado por Lee (1992) y Kristensen & Holmer (2001) estas altas tasas de degradación microbiana pueden ser mantenidas en condiciones de bajo oxígeno. En la bahía de Concepción las condiciones anóxicas prevalecen en la interfaz sedimento-agua durante la mayor parte del año (Farías, 1992). Así, potencialmente las cepas aisladas podrían también actuar bajo condiciones de hipoxia.

Los 3 métodos utilizados en este estudio para aislar una potencial interacción hongo-bacteria mostraron diferentes resultados durante las incubaciones de sedimentos en los medios de cultivo. En el método de columnas de vidrio adaptado de Simon et al (2015) no se observó el crecimiento microbiano esperado. Aun así, una de las columnas

pertenecientes a la estación 18 sin perlas de vidrio presentó crecimiento de filamentos de hongos en el medio objetivo, pero no en el de atracción, lo cual puede ser producto de la dispersión de esporas por aire, ya que según Simon et al (2015) uno de los elementos que excluyó la migración bacteriana por dispersión aérea de esporas es la adición de perlas de vidrio al interior de la columna. En el mismo estudio las columnas diseñadas para autopistas fúngicas se dispusieron directamente en el suelo de la zona estudiada, de esta manera, se logró mantener las condiciones ambientales *in situ* (por ej. Humedad, nutrientes, oxígeno, temperatura), en cambio, en este estudio el sedimento fue incubado dentro de las columnas en laboratorio, lo cual dificultó la retención de agua en el sedimento y medios de cultivo y produjo una desecación que podría haber inhibido el crecimiento microbiano. La forma de los dispositivos de aislamiento, dificultaron la observación y seguimiento de filamentos de hongos bajo el microscopio. También, contrario a lo que se realizó en esta investigación, en el sistema de columnas de Kohlmeier et al (2005), se inoculó hongos y bacterias con previo conocimiento de interacción, lo cual fue una manera de asegurar o promover la posibilidad de dispersión bacteriana por hifas.

El método de placas Petri invertidas se realizó de manera similar a Bravo et al (2013), quienes trabajaron con muestras de suelo trasladadas a laboratorio y con microorganismos autóctonos de las muestras ambientales. Sin embargo, a pesar de que se observó filamentos fúngicos en todas las incubaciones, el resultado con este método de cultivo no fue el esperado. Al comienzo del periodo de incubación se observaron hifas creciendo alrededor del sedimento sembrado, pero sobre 30 días de incubación los filamentos de hongos se observaron sobre el medio de cultivo de atracción, pero sin crecimiento vertical en el espacio de aire, ni por los bordes de la placa, de hecho, las hifas alcanzaron los bordes al final del periodo de incubación. Esto podría ser el resultado de una dispersión aérea de esporas de hongos desde la zona de siembra hacia el medio de cultivo, provocado por la manipulación durante las inspecciones microscópicas, ya que se observó una alta densidad de estructuras reproductivas en dicha sección (Figura 11). El diseño de este método favoreció la retención de agua del sedimento y del medio, factor que parece ser esencial para el óptimo crecimiento de microorganismos. En Bravo et al (2013) se logró promover el transporte bacteriano por medio de hifas y fue posible aislar tanto hongos como

bacterias, en cambio, en este estudio se observó un crecimiento abundante de micelio, pero no fue posible aislar bacterias desde el medio de cultivo objetivo.

La placa con medio de cultivo dividido fue el método con mejores resultados, a partir de la sección de llegada fue posible aislar tanto cepas de hongos como de bacterias, además, fue posible visualizar a simple vista la formación de una colonia bacteriana en la sección de llegada. Esto podría significar la posibilidad de movilización de bacterias por medio de las hifas entre el espacio de aire, lo que se apoya en el resultado del control negativo realizado (placa Petri con división del medio NA) donde se sembró una colonia de bacterias aisladas en una de las secciones del medio y no se visualizó presencia de colonias bacterianas en la sección del medio de llegada (Figura 16A). Comparado con el estudio de Bravo et al (2013), donde se inóculo cepas de hongos y bacterias con previo conocimiento de movilización bacteriana por medio de hifas, este estudio muestra evidencia de la utilidad de este diseño para la aislación de cepas de hongos y bacterias desde sedimentos marinos con potencial interacción.

La actividad enzimática extracelular de aminopeptidasas en experimentos con cepas aisladas de incubaciones de sedimento en placa Petri sin intervenir mostró las mayores tasas degradativas principalmente en los tratamientos de bacterias (Figuras 20, 21 y 22). En general, se considera que las bacterias tienen una mayor capacidad para descomponer polisacáridos simples y péptidos siendo principalmente implicadas con la absorción y degradación de aminoácidos y glucosas (Gonzales & Robert-Baudouy., 1996; (Kaplan & Newbold, 2003; Artigas, 2009; Romaní et al., 2009), lo que es consistente con los resultados de las incubaciones con el sustrato L-leucina-4-metil7 cumarinilamida (MCA-leu) que está relacionado con el metabolismo de péptidos (Romaní et al., 2009) y que representaría materia orgánica marina más lábil (Pantoja et al., 2011). Así, se sugiere que los altos valores en las tasas de hidrólisis observada en los tratamientos de bacterias se deben a sus capacidades enzimáticas (Romaní et al., 2009) y a su rol descomponedor. Por otro lado, los resultados de las incubaciones con el sustrato 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside, que representa el metabolismo de materia orgánica más refractaria (Pantoja et al., 2011) tipo celulosa, celobiosa o pequeños oligómeros con enlaces β -D-glucosa (Romaní et al., 2009), mostraron que los hongos alcanzan valores ampliamente mayores

en comparación a los tratamientos HB y B (Figura 17B) siendo consistente con las capacidades degradativas de moléculas más complejas atribuidas a los hongos (Güsewell y Gessner, 2009; Fabian et al., 2017). En los tratamientos hongo-bacteria de cepas aisladas por este método no se observó una actividad hidrolítica mayor que en los tratamientos de hongos y/o bacterias separados (Figuras 19, 20, 21 y 22). Esto sugiere que la aislación de hongos y bacterias desde un mismo medio de cultivo por este método tradicional no asegura la ocurrencia de interacción entre ambos grupos de microorganismos.

Para los experimentos con cepas aisladas a través de la sección de llegada del método de placa dividida se obtuvieron altas tasas de actividad enzimática extracelular comparado a tratamientos de cepas aisladas en placa normal (Figura 23A y B; Figura 28A y B), lo que sugiere una interacción sinérgica que podría implicar una potencial movilización bacteriana como ha sido documentado previamente para ambientes terrestres (Kohlmeier et al., 2005; Warmink et al., 2011; Simon et al., 2015; Bravo et al., 2013; Deveau et al., 2018). Además, los mayores valores observados de actividad de aminopeptidasas y glucosidasas en tratamientos de bacterias y hongos respectivamente, concuerdan con las capacidades degradativas de bacterias que se caracterizan por procesar rápidamente sustratos más lábiles (e.g. péptidos) y de hongos, que procesarían eficientemente materia orgánica más refractaria.

Se observó tasas de hidrólisis enzimática extracelular más altas en el tratamiento hongo-bacteria de cepas aisladas por el método de placa dividida comparado al tratamiento hongo-bacteria de cepas aisladas en placa normal (Figura 29 A y B). Estos resultados proporcionan evidencia adicional que sugiere que la potencial movilización bacteriana por medio de hifas produce una interacción hongo-bacteria que se traduce en un aumento en las tasas de degradación de materia orgánica. Esto es consistente con el análisis de Deveau et al (2018), que indican que este tipo de interacción puede estimular procesos de biodegradación. Adicionalmente, las elevadas tasas de hidrólisis extracelular de glucosidasas (Figura 28B y 29B) podría implicar que las cepas de hongos inoculadas podrían ser altamente activas en el procesamiento de materia orgánica.

Altas tasas de hidrólisis enzimática extracelular fueron también observadas en los tratamientos hongo-bacteria de los experimentos de incubaciones de sedimento con adición de MOT (Figuras 33-34), lo que sugiere un posible efecto sinérgico de ambos grupos microbianos sobre la degradación de material terrígeno y aporta evidencia para la ocurrencia de una interacción beneficiosa entre los diferentes nichos de descomposición de hongos y bacterias que potencie las tasas de degradación de MOT. De hecho, la tasa de hidrólisis más alta se observó en uno de los tratamientos de combinación hongo-bacteria para glucosidasas (Figura 34A) y puesto que la MOT está compuesta principalmente por polímeros rígidos y carbohidratos complejos (Arndt et al., 2013), los resultados obtenidos desde los diferentes ensayos apuntan a que los hongos de sedimentos marinos costeros tendrían un rol primario sobre procesamiento de carbono terrígeno, lo cual se complementaría con la actividad degradativa de bacterias como recicladores rápidos de compuestos nitrogenados y menos complejos (Kaplan & Newbold, 2003; Artigas, 2009; Fabian et al., 2017). Además, estos resultados son consistentes con lo reportado en Bengtsson (1992) donde tratamientos de interacción hongo-bacteria aumentaron la descomposición de hojas de un sistema fluvial y una posible explicación, sería una ausencia de inhibición competitiva, donde compuestos inhibidores pueden ser eliminados simultáneamente cuando bacterias y hongos están juntos. Consistentemente, se ha señalado también que, en ecosistemas acuáticos, los hongos suelen dominar los conjuntos microbianos inicialmente en sustratos orgánicos refractarios, cuando el tejido está prácticamente intacto, mientras que las bacterias tienden a aumentar en las etapas terminales de la descomposición (Bengtsson, 1992; Baldy et al, 1995). Adicionalmente, estos resultados podrían también explicar la mayor utilización de tejidos provenientes de plantas vasculares reportada para sedimentos (Cowie et al., 1992), en vista de que se han sugerido interacciones hongo-bacteria para sedimentos marinos relacionadas al procesamiento de lignocelulosa, en donde hongos y bacterias lignocelulolíticas podrían actuar simultáneamente (Holt y Jones, 1983; Singh & Zaidi, 2002). Así, en sistemas costeros como la bahía de Concepción, que recibe un importante aporte continental a través de diferentes cursos de agua como el río Andalién (Faúndez et al., 2021), y donde además se ha reportado un contenido alto de MOT, así como un incremento en su concentración (i.e., 10%), en un rango de 20 años señalado por Rudolph et al (2002), los

hongos, y su interacción con bacterias, podrían tener un papel fundamental en la remoción de componentes orgánicos terrígenos.

Adicionalmente, los tratamientos con adición de MOT mostraron valores más altos en comparación a los tratamientos sin adición de MOT (Figura 30A y B), lo que apunta a la potencial actividad de hongos en la degradación de este tipo de polímeros y que es también sustentado por la presencia de abundantes ascosporas en las incubaciones, ya que según Newell et al (1996) los hongos ascomicetos son los principales productores secundarios de la descomposición de tejidos provenientes de plantas vasculares como hojas.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación contribuyen a evidenciar una potencial interacción entre hongos y bacterias sobre degradación de materia orgánica en sedimentos marinos costeros. La acción combinada entre ambos grupos de microorganismos es considerada clave para el funcionamiento de los ecosistemas, ya que actúan en procesos tales como, regulación de ciclos biogeoquímicos, remineralización de nutrientes, biorremediación y biocontrol (Deveau et al., 2018). Los resultados obtenidos también sugieren la posible movilización de bacterias por medio de hifas, lo cual representaría beneficios ecosistémicos, como por ejemplo, la estimulación de la biodegradación de contaminantes y otros materiales orgánicos terrígenos, en situaciones en las que dichos sustratos y/o bacterias están distribuidos de forma heterogénea y el movimiento activo de las bacterias hacia sustratos se encuentra limitado (Worrich et al., 2016; Deveau et al., 2018). Lo anterior indica la importancia de complementar el estudio de interacciones microbianas en el océano, y así, avanzar en la comprensión de los mecanismos detrás de la descomposición de diferentes fracciones de materia orgánica en ecosistemas marinos y su influencia en el ciclo del carbono. Finalmente, los resultados de esta investigación entregan una aproximación a una de las mayores preguntas en geoquímica orgánica del océano, que se refiere al destino de la MOT tanto en la columna de agua como en sedimentos. Así, considerando los anteriores reportes que dan cuenta del significativo rol de hongos en el procesamiento de materia orgánica en el océano (Kholmeyer & Kholmeyer, 1979; Gutiérrez et al., 2011; Bochsansky et al., 2016; Cunliffe et al., 2017),

es necesario dar mayor relevancia al rol de hongos como un componente importante de la comunidad microbiana marina que participa en conjunto con bacterias y arqueas en los ciclos biogeoquímicos del océano costero.



6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyasinghe, G., Kuchira, M., Kudo, G., Masuo, S., Ninomiya, A., Takahashi, K., Utada, AS., Hagiwara, D., Nomura, N., Takaya, N., Obana, N., Takeshita, N. (2020). Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism. *Life Sci Alliance*, 3(12).
- Amend A, Burgaud G, Cunliffe M, Edgcomb VP and others (2019) Fungi in the marine environment: open questions and unsolved problems. *MBio* 10, 1–15.
- Arndt, S., Jørgensen, B., LaRowe, D., Middelburg, J., Pancost, R. & Regnier, P. (2013). Quantifying the degradation of organic matter in marine sediments: A review and synthesis. *Earth Science Review*.
- Arnosti, C. (2011). Microbial Extracellular Enzymes and the Marine Carbon Cycle. *Annu. Rev. Mar. Sci*, 3, 401–25.
- Arnosti, C., Bell, C., Moorhead, D., Sinsabaugh, R., Steen, A., Stromberger, M., Wallenstein, M., & Weintraub, M. (2014). Extracellular enzymes in terrestrial, freshwater, and marine environments: perspectives on system variability and common research needs. *Biogeochemistry* 117, 5–21.
- Artigas, J., Romani, A., Gaudes, A., Muñoz, I. & Sabarter, S. (2009). Organic matter availability structures microbial biomass and activity in a Mediterranean stream. *Freshwater Biology*, 54(10), 2025-2036.
- Azam, F. (1998). Microbial Control of Oceanic Carbon Flux: The plot Thickens. *Science*, 280(5364), 694–696.
- Azam, F. Smith, D.C. & Steward, G.F. (1994) Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb Ecol*, 28, 167–179
- Banoub, M., & Williams, P. leB. (1972). Measurements of microbial activity and organic material in the western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*, 19(6), 433–443.
- Baudy, P., Zubrod, J., Kanschak, M., Röder, N., Huyen Nguyen., Schreiner, V., Baschien, C., Schulz, R. & Bundschuh, M. (2021). Environmentally relevant fungicide levels

modify fungal community composition and interactions but not functioning. *Environmental Pollution*, 285.

Baldy, V., Gressner, M., & Chauvet, E. (1995). Bacteria, fungi and the breakdown of leaf litter in a large river. *OIKOS*, 74, 93 – 102.

Bengtsson, G. (1992). Interactions between fungi, bacteria and beech leaves in a stream microcosm. *Oecologia*, 89, 542-449.

Bianchi, T. (2011). The role of terrestrially derived organic carbon in the coastal ocean: A changing paradigm and the priming effect. *PNAS*, 108(49), 19473-19481.

Bochdansky, A., Clouse, M., & Herndl, G. (2017). Eukaryotic microbes, principally fungi and labyrinthulomycetes, dominate biomass on bathypelagic marine snow. *ISME J*, 11, 362–373.

Bongiorni, L. (2012). Thraustochytrids, a neglected component of organic matter decomposition and food webs in marine sediments. *Prog Mol Subcell Biol*, 53, 1 – 13.

Bonugli-Santos, R., C.; dos Santos Vasconcelos, M. Passarini, M., Vieira, G., Lopes, V., Mainardi, P., dos Santos, J., de Azevedo Duarte, L., Otero, I., da Silva Yoshida, A., Feitosa, V., Pessoa, A. & Sette, L. (2015). Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, 269(6).

Burdige, C. (2005). Burial of terrestrial organic matter in marine sediments: A re-assessment. *Global Biogeochem*, 19, 1-7.

Bravo, D., Cailleau, G., Bindschedler, S., Simon, A., Job, D., Verrecchia, E. & Junier, P. (2013). Isolation of oxalotrophic bacteria able to disperse on fungal mycelium. *FEMS Microbiol Lett*, 348, 157–166

Canfield, D. & Thamdrup, B. (2009). Towards a consistent classification scheme for geochemical environments, or, why we wish the term ‘suboxic’ would go away. *Geobiology*, 7, 385-392.

Cowie, G. L., Hedges, J. I., & Calvert, S. E. (1992). Sources and relative reactivities of amino acids, neutral sugars, and lignin in an intermittently anoxic marine environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 56(5), 1963–1978.

Cunliffe, M., Hollingsworth, A., Bain, C., Sharma, V., & Taylor, J. (2017). Algal polysaccharide utilisation by saprotrophic planktonic marine fungi. *Fungal Ecology*, 30, 135–138.

Crowther, T., Boddy, L., & Hefin, T. (2012). Functional and ecological consequences of saprotrophic fungus–grazer interactions. *The ISME Journal*, 6(11), 1992–2001.

Damare, S., Raghukumar, C., & Raghukumar, S. (2006). Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 53(1), 14–27.

Deveau, A., Bonito, G., Uehling, J., Paoletti, M., Becker, M., Bindschedler, S., Hacquard, S., Hervé, V., Labbé, J., Lastovetsky, O., Mieszkin, S., Millet, L., Vajna, B., Junier, P., Bonfante, P., Krom, B., Olsson, S., Dirk van Elsas, J., & Wick, L. (2018). Interacciones bacteria-hongo: ecología, mecanismos y desafíos. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 335 – 352.

Dighton, J. (2007) Nutrient cycling by saprotrophic fungi in terrestrial habitats. *Environmental and Microbial Relationships. The Mycota*, vol 4. Springer, Berlin, Heidelberg.

Fabian, J., Zlatanovic, S. & Mutz, M. (2017). Fungal–bacterial dynamics and their contribution to terrigenous carbon turnover in relation to organic matter quality. *ISME J* 11, 415–425

Farías, L., Chuecas, L. & Salamanca, M. (1996). Effect of Coastal Upwelling on Nitrogen Regeneration from Sediments and Ammonium Supply to the Water Column in Concepcion Bay, Chile. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 43, 137-155.

Farías, L. (1992). Efectos Inducidos por la Contaminación Orgánica Sobre la Macrofauna Bentónica de la Bahía de Concepción, Estimados Mediante el Uso de Trazadores ^{234}Th y ^{210}Pb [Tesis de Magister, Universidad de Concepción].

Faúndez, P., Morales, C. & Arcos, D. (2001). Variabilidad espacial y temporal en la hidrografía invernal del sistema de bahías frente a la VIII región (Chile centro-sur). *Revista Chilena de Historia Natural*, 74, 817-831.

Fenchel, T. (2008). The microbial loop – 25 years later. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 366(1-2), 99–103.

Ferdelman, T., Lee, C., Pantoja, S., Harder, J., Bebout, B. & Fossing, H. (1997). Sulfate reduction and methanogenesis in a *Thioploca*-dominated sediment off the coast of Chile. *Geochimica et Cosmochimica*, 61(15), 3065-3079.

Figueroa, N. & Figueroa, D. (2015). Visión integrada de la bahía de Concepción (Chile) para el fomento del turismo cultural. *REV. GEO. SUR*, 6 (9), 44-54.

Fuentes, M., Quiñones, R., Gutiérrez, M. & Pantoja, S. (2015). Effects of temperature and glucose concentration on the growth and respiration of fungal species isolated from a highly productive coastal upwelling ecosystem. *Fungal Ecology*, 13, 135-149.

Gallardo, V. (1977). Large benthic microbial communities in sulphide biota under Peru–Chile Subsurface Countercurrent. *Nature*, 268, 331-332.

Giampaoli, G., Brandán de Weht, C., Enrico, R., Coll Aráoz, M. & Lencina, V. (2014). Efecto de la esterilización con métodos físicos en suelo, sobre la flora micorrícica y en el cultivo del yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en Horco Molle, Tucumán. *Rev. agron. noroeste argent*, 34 (2), 36-39.

Gonzales, T. & Robert-Baudouy, J. (1996). Bacterial aminopeptidases: Properties and functions. *FEMS Microbiology Reviews*, 18, 319-344.

Gutiérrez, M., Pantoja, S., Tejos, E. & Quiñones, R. (2011). The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Mar Biol*, 158, 205-219.

Gressner, M., Gulis, V., Kuehn, K., Chauvet, E., & Suberkropp, K. (2007). Fungal Decomposers of Plant Litter in Aquatic Ecosystems. *Environmental and Microbial Relationships, The Mycota* 4(2).

Griffiths, M., Garcin, C., Van Hille, R. & Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of microbiological methods*, 85(2), 119-123.

Güsewell, S. & Gessner, M. (2009). N:P ratios influence litter decomposition and colonization by fungi and bacteria in microcosms. *Funct Ecol* 23: 211–219.

Hedges, J. & Keil, R. (1995). Sedimentary organic matter preservation: an assessment and speculative synthesis. *Mar. Chem*, 49, 81–115.

Hedges, J., Keil, R., & Benner, R. (1997). What happens to terrestrial organic matter in the ocean? *Organic Geochemistry*, 27(5-6), 195–212.

Henrichs, S. M. & Reeburgh, W. S. (1987). Anaerobic mineralization of marine sediment organic matter: rates and the role of anaerobic processes in the oceanic carbon economy. *Geomicrobiol. J.* 5, 191–237.

Holmkvist, L., Arning, E., Küster-Heins, K., Vandieken, V., Peckmann, J., Zabel, M. & Jorgensen, B. (2010). Phosphate geochemistry, mineralization processes, and *Thioploca* distribution in shelf sediments off central Chile. *Marine Geology*, 277, 61-72.

Holt, D. & Jones, E. (1983). Bacterial degradation of lignified wood cell walls in anaerobic aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol*, 46(3), 722-7.

Hyde, K., Jones, E., Leñaño, E., Pointing, S., Poonyth, A., & Vrijmoed, L. (1998). Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation*, 7, 1147 – 1161.

Hyde, K. & Alias, S. (2000) Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing. *Biodivers Conserv* 9:393–402.

Kaplan, L. & Newbold, D. (2003). The Role of Monomers in Stream Ecosystem Metabolism. *Aquatic Ecology*, 97-119.

Kirchman, D. (2017). Microbial proteins for organic material degradation in the deep ocean. *PNAS*, 115(3), 445-447.

Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. (1979). *Marine Mycology The Higher Fungi*. Academic Press, New York.

Kohlmeier, S., Smits, T. H. M., Ford, R. M., Keel, C., Harms, H., & Wick, L. Y. (2005). Taking the Fungal Highway: Mobilization of Pollutant-Degrading Bacteria by Fungi. *Environmental Science & Technology*, 39(12), 4640–4646.

Khatoun, H., Solanki, p., Narayan, M., Tewari, L. & Rai., J. (2017). Role of microbes in organic carbon decomposition and maintenance of soil ecosystem. *International Journal of Chemical Studies*. 5(6), 1648-1656.

Kristensen E., & Holmer M. (2001). Decomposition of plant materials in marine sediment exposed to different electron acceptors (O₂, NO₃²⁻, and SO₄²⁻), with emphasis on substrate origin, degradation kinetics, and the role of bioturbation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65, 419–433.

Lee C. (1992). Controls on organic carbon preservation: the use of stratified water bodies to compare intrinsic rates of decomposition in oxic and anoxic systems. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, 3323–3335

Li, E. & De Orduña, M. (2009). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*, 50, 283-288.

Liu, K., Atkinson, L., Chen, C., Gao, S., Hall, J., Macdonald, R., Talaue McManus, L., & Quiñones, R. (2000). Exploring continental margin carbon fluxes on a global scale. *EOS, Transactions, American Geophysical Union*, 81(52), 641–644.

Lopez, G. & Levinton, J. (2011). Particulate Organic Detritus and Detritus Feeders in Coastal Food Webs. *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, 6, 5–21.

Martin, J.-M., & Whitfield, M. (1983). The Significance of the River Input of Chemical Elements to the Ocean. *Trace Metals in Sea Water*, 265–296.

Middelburg, J., Vlug, T., & W.A. van der Nat, J. (1993). Organic matter mineralization in marine systems. *Global and Planetary Change*, 8, 47-58.

Mille-Lindblom, C., & Tranvik, L. (2003). Antagonism between Bacteria and Fungi on Decomposing Aquatic Plant Litter. *Microb Ecol*, 45, 173 – 182.

McDonlad, N., Achterberg, E., Carlson, C., Gledhill, M., Liu, S., Matheson-Barker, J., Nelson, N. & Parsons, R. (2019). The Role of Heterotrophic Bacteria and Archaea in the Transformation of Lignin in the Open Ocean.

McGroddy, M., Daufresne, T. & Hedin, L. (2004). Scaling of C:N:P stoichiometry in forests worldwide: implications of terrestrial redfield-type ratios. *Ecology*, 85(9), 2390-2401.

Nagano, Y., Miura, T., Nishi, S., Lima, A., Nakayama, C., Pellizari, V., & Fujikura, K. (2017). Fungal diversity in deep-sea sediments associated with asphalt seeps at the Sao Paulo Plateau. *Deep sea research part II*, 146, 59-67

Newell, S.Y. (1984) Bacterial and fungal productivity in the marine environment: a contrastive overview. *Colloque Int. Cent. Natn. Rech. Scient*, 331, 133-9.

Newell, S.Y.; Porter, D.; Lingle, W.L. (1996). Lignocellulolysis by ascomycetes (fungi) of a saltmarsh grass (smooth cordgrass). *Microscopy Research and Technique*, 33(1), 32–46.

Pantoja, S., Gutiérrez, M., Ampuero, P., & Tejos, E. (2011) Degradation capability of the coastal environment adjacent to the Itata River in central Chile (36.5 ° S). *Biogeosciences Discuss*, 8, 1335-1367.

Purahong, W., Wubet, T., Lentendu, G., Schloter, M., Pecyna, M., Kapturska, D., Hofrichter, M., Krüger, D. & Buscot, F. (2016). Life in leaf litter: novel insights into community dynamics of bacteria and fungi during litter decomposition. *Molecular Ecology*, 25(16), 4059-4074.

Rojas, K., Peter, H., Corde, E. & Cortés, J. (2020). Fungal Communities in Sediments Along a Depth Gradient in the Eastern Tropical Pacific. *Microbiol*, 11, 575-207.

- Romaní, A., Artigas, J., Camacho, A., Graca, M., & Pascoal, C. (2009). La biota de los ríos: Los microorganismos heterótrofos. *ISBN*, 1, 169-216.
- Rudolph, A., Franco, C., Becerra, J., Barros, Ana. & Ahumada, R. (2002). Evaluación de materia orgánica e hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos superficiales, bahía Concepción-chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 47(4), 403-410.
- Singh, U. & Zaidi, N. (2002). Current status of formulation and delivery of fungal and bacterial antagonists for disease management in India. *Microbial biopesticide formulations and application*, 269.
- Simon, A., Bindschedler, S., Job, D., Wick, L., Filippidou, S., Kooli, W., Verrecchia, E., & Junier, P. (2015). Exploiting the fungal highway: development of a novel tool for the in situ isolation of bacteria migrating along fungal mycelium *FEMS Microbiology Ecology*, 91(11).
- Sobarzo, M., L Bravo, D Donoso, J Garcés-Vargas & W Schneider. (2007). Coastal upwelling and seasonal cycles that influence the water column over the continental shelf off central Chile. *Progress in Oceanography*, 75, 363-382.
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2018). Mediators of mutualistic microbe–microbe interactions. *Natural Product Reports*, 35(4), 303–308.
- Schlesinger, W. & Melack, J. (1981). Transport of organic carbon in the world's rivers. *Tellus*, 33, 172-187.
- Skreslet, S. (1985). The role of freshwater outflow in coastal marine ecosystems. (Vol. 10). Mørkved Bodø, Norway: Nordland college.
- Taylor, J. & Cunliffe, M. (2016). Multi-year assessment of coastal planktonic fungi reveals environmental drivers of diversity and abundance. *ISME J*, 10(9), 2118-28.
- Van der Wal, A., Geydan, T., Kuyper, T., & de Boer, W. (2013). A thready affair: linking fungal diversity and community dynamics to terrestrial decomposition processes. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 477-494.

Warmink, J., Nazir, R., Corten, B. & van Elsas, J. (2011). Hitchhikers on the fungal highway: The helper effect for bacterial migration via fungal hyphae. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 760-765.

Willaert, R., De Backer, D. & Baron, G. (1996). Modelling the immobilisation of cells in a packed bed of porous carriers. *Elsevier Science B.V*, 154-161.

Worrich, A., König, S. & Miltner, A. (2016). Mycelium-like networks increase bacterial dispersal, growth, and biodegradation in a model ecosystem at various water potentials. *Appl Environ Microb*, 82, 2902–8.

Yurchenko, A., Girich, E., & Yurchenko, E. (2021) Metabolites of Marine Sediment-Derived Fungi: Actual Trends of Biological Activity Studies. *Marine drugs*, 19(88).

Zhang, T., Wang, N., Zhang, Y., Liu, H., & Yu, L. (2015). Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic). *Scientific Reports*, 5(14524)

