



**Universidad
Nacional
de San Martín**

Universidad Nacional de San Martín
Escuela de Ciencia y Tecnología- ECyT- UNSAM
Escuela de Bio y Nanotecnologías - EByN- UNSAM

Micorremediación de suelos contaminados con xenobióticos

Leandro Gastón Binda

Directora

Dra. Paola Alejandra Babay

Codirector

Dr. Raúl Fabio Itria



Comisión Nacional
de Energía Atómica

Departamento Química Analítica
Centro Atómico Constituyentes

Laboratorio de Micología
Experimental

Instituto de Micología y Botánica
InMiBo (UBA-CONICET)



CONICET

**Tesis para optar por el grado de Licenciado en Biotecnología
de la Universidad Nacional de San Martín**

Agosto 2024

A mi papá y a mi hermana Tamara

مکتوب

(Maktub)

Resumen

En los últimos años, los esfuerzos por reducir los niveles de polución mundial han llevado al ser humano a desarrollar diversas metodologías, capaces de aplicar desde una perspectiva multidisciplinaria, enfoques químicos, físicos, mecánicos, nanotecnológicos y biológicos, entre otros. Sin embargo, la carga contaminante aumenta a tasas cada vez mayores, debido principalmente al crecimiento demográfico y al desarrollo industrial. Uno de los responsables en este aspecto es el nonilfenol (NP), que es el producto de la degradación incompleta del nonilfenol etoxilado empleado ampliamente en la manufactura de productos del cuidado personal, agroquímicos, adyuvantes y plastificantes. El NP es una sustancia recalcitrante y altamente tóxica, capaz de inducir cáncer, reacciones alérgicas, bioacumularse en tejidos grasos y provocar disrupción endócrina. Su recalcitrancia y toxicidad se originan en su estructura química, ya que se encuentra presente un anillo aromático muy estable.

En este contexto, los hongos de pudrición blanca (WRF) desempeñan un rol crucial, ya que tienen la virtud de secretar enzimas capaces de degradar la lignina, considerada el biopolímero aromático más recalcitrante conocido. Bajo esta premisa, hipotetizamos que estos MO pueden ser capaces de degradar NP y, por lo tanto, emplearlos como herramientas de biorremediación de matrices complejas como el suelo. Para tal fin, se seleccionaron diversas cepas de WRF y se evaluó su capacidad degradativa de NP mediante la técnica de HPLC. Además se seleccionó aquel con mayor actividad ligninolítica y tasas de remoción del xenobiótico. Con el mejor candidato, se simuló condiciones de campo mediante el armado de microcosmos con suelos previamente contaminados, y se midió el nivel de NP remanente luego de 14 y 28 días de incubación, bajo distintas estrategias de micorremediación.

Los resultados indicaron que la presencia del hongo mejoró los niveles de remoción de NP en un 23 % luego de 14 días de incubación, comparado con la estrategia sin el mismo, y de un 33 % con el agregado de hojarasca. A su vez, la brecha se redujo al 4 % y al 15 % en sendas estrategias luego de 28 días de incubación, dando cuenta de que sería factible emplearlos como herramientas prometedoras para la micorremediación de suelos contaminados con NP.

Abstract

In recent years, efforts to reduce global pollution levels had driven the development of several strategies from a multidisciplinary perspective, including chemical, physical, mechanical, nanotechnological and biological approaches, among others. However, the burden of pollution tends to increase at higher rates, primarily due to demographic growth and industrial development. One of the biggest contributors to this issue is nonylphenol (NP), which is a by-product of the incomplete degradation of nonylphenol ethoxylates. These ethoxylates are widely used for the manufacturing of personal care products, agrochemicals, adjuvants and plasticizers.

NP is a very recalcitrant and highly toxic substance, capable of causing cancer, allergic reactions, bioaccumulation within tissues, and provoking endocrine disruption. Its recalcitrancy and toxicity are based on its chemical structure, due to the presence of a very stable aromatic ring.

White rot fungi (WRF) play a crucial role in this context, as they have the virtue to secrete enzymes capable of degrading lignin, the most recalcitrant aromatic biopolymer so far known. Based on this premise, we hypothesized that these microorganisms could also degrade NP, making them potential bioremediation tools in complex matrices like soils. To test this, we selected different WRF strains and assessed their NP degradation capabilities using HPLC analysis. We selected the strain with the highest ligninolytic activity and NP removal rates. Finally, we simulated real field conditions by setting up microcosms containing previously contaminated soils, and measured NP levels after 14 and 28 days of incubation, under different mycoremediation strategies.

The results indicated that the presence of mycelium improved the NP removal rate by 23 % after 14 days of incubation, compared to the strategy without them. Additionally, by adding litter, the improvement reached 33 %. Over 28 days of incubation, the gap narrowed to 4 % and 15 % in both strategies. These findings suggest that fungi could be promising tools for soils mycoremediation, leading to better NP degradation.

ÍNDICE

Contenido

| | |
|---|----|
| Introducción..... | 11 |
| 1.1. Xenobióticos..... | 11 |
| 1.2. Contaminantes emergentes..... | 12 |
| 1.3. Nonilfenol etoxilados..... | 13 |
| 1.4. Nonilfenol | 19 |
| 1.5. Lignina | 25 |
| 1.6. Hongos ligninolíticos | 27 |
| 1.7. Enzimas ligninolíticas..... | 29 |
| 1.7.1. Lignina Peroxidasa (LiP)..... | 29 |
| 1.7.2. Manganese Peroxidasa (<i>MnP</i>) | 29 |
| 1.7.3. Lacasa (Lac)..... | 29 |
| 1.8. Micorremediación..... | 30 |
| 1.9 Métodos analíticos para el estudio de la micorremediación | 31 |
| Hipótesis | 33 |
| Objetivos | 34 |
| 3.1. Objetivo general | 34 |
| 3.2. Objetivos específicos | 34 |
| Metodología | 35 |
| 4.1. Prospección bibliográfica..... | 35 |
| 4.2. Cepas disponibles..... | 35 |
| 4.3. Desarrollo de cultivos fúngicos | 36 |
| 4.3.1. Desarrollo de inóculos en placas MEA..... | 36 |
| 4.3.2. Cultivo de cepas fúngicas en medio Galhaup | 36 |
| 4.3.3. Determinaciones bioquímicas..... | 36 |
| 4.3.3.1. Curva de crecimiento de biomasa y consumo de azúcares reductores..... | 36 |
| 4.3.3.2. Medición de actividades enzimáticas y proteínas totales..... | 37 |
| 4.4. Producción de sobrenadantes para análisis de degradación de NP..... | 37 |
| 4.5. Puesta a punto de HPLC | 37 |
| 4.5.1. Optimización de la separación del NP..... | 37 |
| 4.5.2. Detección de fluorescencia | 38 |
| 4.5.3. Degradación de NP mediada por enzimas fúngicas - incubación en MeOH: cuantificación por HPLC..... | 39 |
| 4.5.4. Degradación de NP mediada por enzimas fúngicas - incubación en agua: cuantificación por HPLC..... | 40 |
| 4.6. Selección y estudio de materiales para microcosmos | 41 |

| | |
|---|----|
| 4.6.1 Muestreo del suelo y hojarasca | 41 |
| 4.6.2 Caracterización del suelo | 42 |
| 4.6.2.1 Humedad | 42 |
| 4.6.2.2 pH..... | 42 |
| 4.6.2.3 Capacidad de campo..... | 42 |
| 4.6.3. Acondicionamiento de muestras de suelo | 43 |
| 4.6.4. Enriquecimiento del suelo con NP | 43 |
| 4.6.5. Micorremediación | 43 |
| 4.7. Análisis de microcosmos | 44 |
| 4.7.1. Extracción de NP del suelo | 44 |
| 4.7.2. Análisis de degradación de NP en suelo | 45 |
| 4.8. Análisis de datos | 45 |
| Resultados | 46 |
| 5.1. Prospección bibliográfica..... | 46 |
| 5.2. Desarrollo de extractos fúngicos | 47 |
| 5.2.1. Ensayos de caracterización de cepas fúngicas en medio Galhaup..... | 47 |
| 5.3. Puesta a punto de HPLC | 48 |
| 5.3.1. Optimización de la separación..... | 48 |
| 5.3.2. Detección de fluorescencia | 51 |
| 5.4. Degradación enzimática del NP: cuantificación por HPLC | 54 |
| 5.5. Caracterización del suelo..... | 56 |
| 5.6. Viabilidad de los microcosmos | 56 |
| 5.7. Análisis de microcosmos | 58 |
| Discusión..... | 61 |
| 6.1. Prospección bibliográfica..... | 61 |
| 6.2. Caracterización de las cepas..... | 61 |
| 6.3. Puesta a punto de HPLC | 62 |
| 6.4. Degradación enzimática de NP | 62 |
| 6.5. Análisis de microcosmos | 65 |
| Conclusiones..... | 66 |
| Perspectivas futuras | 67 |
| Agradecimientos | 69 |
| Referencias..... | 72 |

Abreviaturas

AN: Atenuación natural
ANOVA: Análisis de la varianza
AP_nEO: Alquilfenol polietoxilado
B: Bioaumentación
BASE: Bielefeld Academic Search Engine
BE: Bioaumentación estimulada
BCO: Blanco
CC: Capacidad de campo
CE: Contaminantes emergentes
CV: Coeficiente de variación
D: Condición desnaturalizada
DE: Disruptor endócrino
DF: Detección por fluorescencia
FLD: Detector de fluorescencia
FM: Fase móvil
GC-MS: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
HPLC: Cromatografía líquida de alta presión
HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas
K_{ow}: Coeficiente de partición octanol-agua
K-REACH: *Korea's Act on the Registration and Evaluation of Chemicals*
Lac: Lacasa
LiP: Lignina Peroxidasa
LDF: Hongos descomponedores de hojarasca
LMEs: Enzimas modificadoras de lignina
MEA: Medio de extracto de malta-agar
MeOH: Metanol
MO: Microorganismos
MnP: Manganese Peroxidasa
N: Condición nativa
NP: Nonilfenol
NP_nEO: Nonilfenol polietoxilado
PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCP: Productos del cuidado personal
RA: Receptor de andrógenos
RE: Receptor de estrógenos
REACH: Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas,
ROS: Especies reactivas del oxígeno

sl. aq.: solución acuosa

SM: Solución madre

TEFs: Factores de equivalencia tóxica

TEQ: Equivalente de toxicidad.

TR: Tiempo de retención

t-NP: nonilfenol grado técnico

U: unidades de actividad enzimática en $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

WRF: Hongos de pudrición blanca

Introducción

1.1. Xenobióticos

El término xenobiótico deriva del griego ξένος (xenos) = extraño y βίος (bios) = vida, junto al sufijo griego para adjetivos τικός, -ή, -ό (tico), es decir son sustancias que no se encuentran en la naturaleza o que los organismos vivos no son capaces de sintetizar (Madhukar *et al.*, 2012; Patel & Sen, 2013). Se las considera sustancias típicamente de origen antrópico, sin embargo también se considera xenobiótico a aquellas sustancias que se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas que lo habitual, por ejemplo compuestos naturales pueden pasar a ser xenobióticos si son consumidos por otro organismo, tales como el caso de las hormonas humanas captadas por los peces que viven en ecosistemas río abajo de plantas de tratamiento de desechos, o defensas químicas producidas por algunos organismos como protección contra sus depredadores (Madhukar *et al.*, 2012).

Varios siglos atrás tuvimos la falsa percepción de la abundancia ilimitada respecto a tierras y recursos pero, en la actualidad, la realidad es muy distinta, principalmente debido a nuestro descuido y negligencia a la hora de utilizarlos. El progreso tecnológico, la expansión de los mercados y los estrechos vínculos de comercio internacional han contribuido en los últimos años hacia una de las problemáticas globales que más ha incrementado: la contaminación del ambiente, motivada principalmente por la introducción de nuevas sustancias al mismo debido al uso de productos de higiene personal, pesticidas y fármacos, entre otros (Štefanac *et al.*, 2021). El rápido crecimiento de varias industrias en el último siglo trajo como consecuencia un incremento en la liberación de efluentes de desecho tóxicos en los cuerpos de agua y aguas subterráneas, provocando disrupciones en los ecosistemas. En algunos casos los efluentes industriales están bien regulados (emisiones industriales) mientras que otros son accidentales (derrames químicos o de petróleo) pudiendo ser letales y persistentes en ambientes terrestres y acuáticos (Varsha *et al.*, 2011).

Es por esto que la presencia de los xenobióticos necesita ser estudiada en profundidad, ya que producen efectos adversos a corto y largo plazo en animales y humanos, del tipo inmunológicos, toxicológicos, farmacológicos y carcinogénicos. Los ecosistemas sufren el impacto negativo en cuerpos de agua, suelo y aire, ya sea en presencia de sustancias simples o mezclas complejas de estos compuestos (Zhu *et al.*, 2017; Marc *et al.*, 2018; Pluth *et al.*, 2019; Massanyi *et al.*, 2020; Ramaka *et al.*, 2020).

La contaminación ocurre porque los compuestos antrópicos no se degradan naturalmente en el ambiente o esto lleva demasiado tiempo, y la ciencia aún no ha sido capaz de brindar una única solución eficaz que contribuya con una rápida degradación para satisfacer la demanda actual (Singh, 2017). Uno de los principales problemas de los xenobióticos radica en sus propiedades físico químicas, tales como

su tamaño molecular, su capacidad de ionización, su solubilidad en agua, su lipofilidad, polaridad y volatilidad (de Oliveira *et al.*, 2020), que los hacen sustancias muchas veces difíciles de identificar, cuantificar y remover.

1.2. Contaminantes emergentes

Dentro del vasto universo de los xenobióticos se encuentran los contaminantes emergentes (CE). Se trata de sustancias químicas de diversa naturaleza y origen (sintético o natural) que no suelen ser comúnmente monitoreadas en el ambiente pero que tienen el potencial de ingresar al entorno y causar efectos adversos, conocidos o sospechados, en la ecología y/o la salud humana (Geissen *et al.*, 2015),–y donde lamentablemente la regulación ambiental a nivel gubernamental es escasa o nula.

Ha sido estudiada la ocurrencia y destino de los CE en plantas de tratamiento de efluentes y desechos cloacales, los cuales alcanzan las aguas superficiales y experimentan una atenuación “natural” debido a migraciones (retenciones por adsorción, volatilización o dispersión), provocando que los mismos se transfieran de un compartimiento natural a otro (Gavrilescu *et al.*, 2015).

En los últimos años se han detectado centenares de nuevos CE y se los ha ido sub-clasificando como: productos del cuidado personal (PCP), fármacos, químicos industriales, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), compuestos orgánicos volátiles, pesticidas, micotoxinas, radionucleidos y otros CE como los microbios, los microplásticos y las nanopartículas (figura 1, Egbuna *et al.*, 2021).



Figura 1. Grupos principales de CE, adaptado de *Environmental Toxicology and Pharmacology* (Egbuna *et al.*, 2021).

El hecho de que los CE se encuentren en distintos compartimentos ambientales, provoca que haya interacciones en donde se acumulan en sedimentos y, consecuentemente, son absorbidos por distintos microorganismos (MO), plantas sumergidas o flotantes y peces u otros organismos acuáticos, como así también las aves en busca de comida en los humedales; esta movilización a través de la cadena trófica termina impactando en los seres humanos de manera indirecta causando riesgosas complicaciones en la salud (Tang *et al.*, 2021)

Los CE tienen varias formas de ingreso al ambiente, principalmente a través de las plantas de tratamiento de efluentes que reciben desechos domiciliarios (productos de limpieza, desinfectantes y aguas de tormentas), hospitalarios (fármacos, hormonas, agentes microbianos), industriales, manufacturas químicas, fuentes municipales y agrícolas (escorrentías y lixiviados) (Sanganyado *et al.*, 2017).

La combinación de CE transportados en aguas superficiales, escorrentías o el lixiviado de aguas subterráneas depende de la ecología del paisaje y de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes. Por ejemplo, se han detectado frecuentemente elevados niveles de fármacos y PCP en sistemas de tratamiento próximos a áreas urbanas, mientras que pesticidas y antibióticos son a menudo encontrados en áreas agrícolas (Patel *et al.*, 2019; Muller *et al.*, 2020). En el caso de los pesticidas, se ha demostrado que los de alta solubilidad son transportados en la fase acuosa de las escorrentías agrícolas hacia los sistemas acuáticos, mientras que compuestos de baja solubilidad en agua migran hacia los sedimentos. Los CE con altos coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow} = 5.0$) fácilmente migran de la fase acuosa hacia las partículas sólidas (Sanganyado & Kajau, 2022).

Los tratamientos convencionales de aguas de desecho o potables son muchas veces incapaces de remover CE debido a la estabilidad de su estructura química, así como a su baja biodisponibilidad, lo que afecta a su biodegradación. Además, los lodos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales también son un depósito de estos CE y sólo recientemente ha habido intentos de evaluar su presencia y potencial biotratamiento (Stamatelatos *et al.*, 2011, Babay *et al.*, 2013).

1.3. Nonilfenol etoxilados

Integrando el amplio listado de contaminantes emergentes se encuentran los alquilfenol polietoxilados (AP_nEOs) dentro de los cuales destacan los nonilfenol polietoxilados (NP_nEOs, del inglés *Nonyl Phenol 'n' Ethylene Oxide*, donde “n” denota el número de unidades EO condensadas), siendo estos los surfactantes no iónicos más utilizados a nivel mundial, representando el 85 % del total de los AP_nEOs producidos, estimado en aproximadamente 700.000 toneladas por año (Guitierrez *et al.*, 2022). Dada su gran versatilidad son empleados en la formulación de productos de limpieza, cuidado personal, detergentes industriales y domésticos, emulsionantes, herbicidas, pesticidas, dispersantes, coadyuvantes, agentes de minería, como humectantes de pinturas y cueros o en la producción de pasta de papel, entre otras aplicaciones (Thiele *et al.*, 1997; Ying, 2006; Chokwe *et al.*, 2017; Acir & Guenther,

2018; Lalonde & Garron, 2021; Walker *et al.*, 2022).

Los NP_nEOs son moléculas anfifílicas (del griego, ἀμφί (amphi) = ambos y φίλος (philos) = amor) ya que poseen al menos dos regiones con afinidades diferentes, conformadas por un grupo fenilo unido generalmente en configuración “para” (y en menor medida “orto” y “meta”) a una cadena alquílica de nueve carbonos con diversas ramificaciones, que le confieren el carácter hidrofóbico, mientras que la naturaleza hidrofílica viene dada por la unión de una cadena polietoxilada de largo variable (n) al oxígeno del grupo fenilo (figura 2).

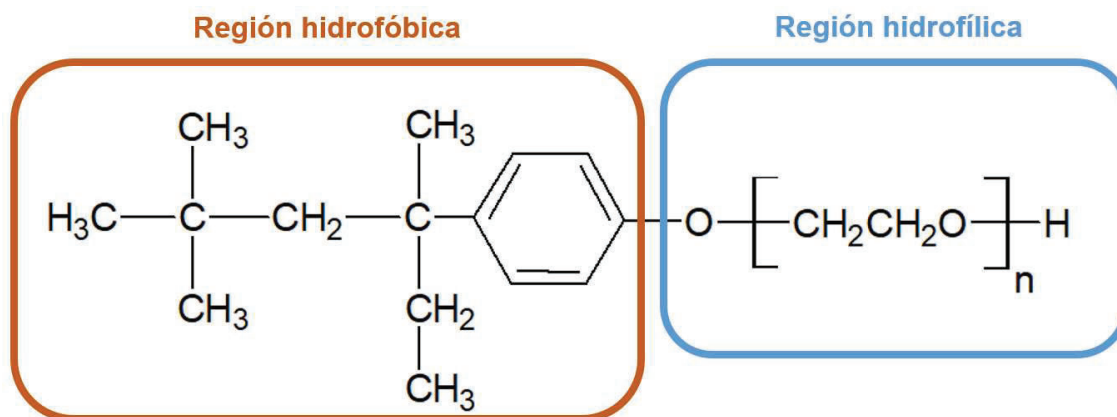


Figura 2. Estructura genérica de los NP_nEOs en configuración “para” (adaptado de Itria, 2016)

La síntesis de los NP_nEOs está dada por la reacción del 4-nonilfenol (4-NP) y el óxido de etileno, empleando hidróxido de potasio (KOH) y etanol como catalizadores. De aquí se obtiene una mezcla de oligómeros homólogos con largos variables en la cadena etoxilada siguiendo una distribución de Poisson (figura 3, Thiele *et al.*, 1997).

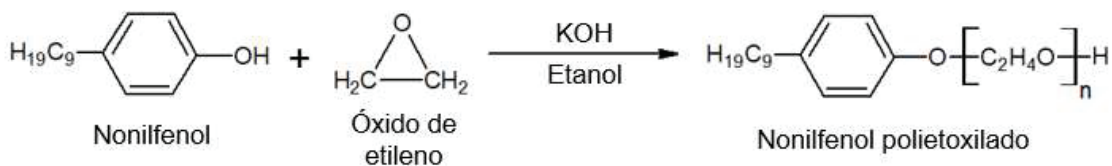


Figura 3. Reacción de síntesis de los NP_nEOs.

El largo de la etoxilación depende de la relación molar entre el NP y el óxido de etileno, por ejemplo, para la síntesis NP₁₀EO se utilizan 10 moles de óxido de etileno y 1 mol de NP. La variabilidad en el largo de la cadena etoxilada es lo que confiere la gran versatilidad y multiplicidad de usos que se resumen en la tabla 1:

Tabla 1: Usos de los NP_nEOs de acuerdo al grado de etoxilación.

| Compuesto | EO Promedio | Uso |
|---------------------|-------------|--|
| NP | 0 | Materia prima p/NP _n EOs |
| NP ₂ EO | 2 | Antiespumante/emulsionante |
| NP ₄ EO | 4 | Emulsionante |
| NP ₁₀ EO | 10 | Emulsionante/tensioactivo |
| NP ₄₀ EO | 40 | Dispersante |
| NP ₇₀ EO | 70 | Emulsionante/detergente a altas temperaturas |

Los NP_nEOs se encuentran presentes en los efluentes de las operaciones de minería, industriales, municipales, hospitalarias, acuicultura o agricultura. Su ingreso al ambiente ocurre debido tanto a la descarga directa de efluentes sin tratamiento como a la descarga de efluentes tratados, en los cuales existen metabolitos parcialmente degradados. Además, las emisiones gaseosas de las industrias productoras de surfactantes contaminan el aire haciendo que los NP_nEOs sean transportados al suelo o el agua a través de las precipitaciones. Así los NP_nEOs son capaces de adsorberse en suelos. Por otro lado, el agua de lluvia puede lixiviar los suelos afectados (lodos, vertederos, suelos agrícolas, sedimentos), y como consecuencia del arrastre, los contaminantes son diluidos por percolación y trasladados hacia aguas subterráneas que *a posteriori* contaminan arroyos, ríos, lagos, lagunas, estuarios, mares e incluso océanos (figura 4, Arora *et al.*, 2022).

La aplicación de agroquímicos que contienen en su formulación NP_nEOs contribuye a la contaminación de los suelos de uso agrícola. En Argentina, por ejemplo, se encuentran registradas oficialmente varias decenas de formulaciones con NP_nEOs como adyuvante, lo que representa un 35 % de productos formulados con este surfactante (Infocampo, 2016; SENASA, 2023). Adicionalmente, el uso de enmiendas en suelos agrícolas a base de barros y sedimentos provenientes de plantas de tratamiento biológico introduce directamente los xenobióticos mencionados en el suelo. Estos pueden pasar a cultivos, pasturas para el ganado y, consecuentemente, al ganado que lo consume. En última instancia, las personas que ingieren los productos ganaderos contaminados adquieren una nueva vía de ingreso (Domene *et al.*, 2009; De Bruin *et al.*, 2019).

Los productos alimenticios constituyen una fuente de exposición importante de NP_nEOs en humanos (González *et al.*, 2018), Sin embargo, la percepción y el riesgo a través del consumo de alimentos es, de hecho, aún descuidada o ignorada en muchos países del mundo. Considerando que estos compuestos muestran elevada lipofilicidad, la exposición humana a estos químicos está asociada con la ingesta dietética de alimentos ricos en lípidos. Además, la habilidad de bioacumularse en los ecosistemas provoca que las concentraciones de dichas sustancias se incrementen no sólo en la cadena trófica terrestre, sino también en la acuática (Souza *et al.*, 2021).

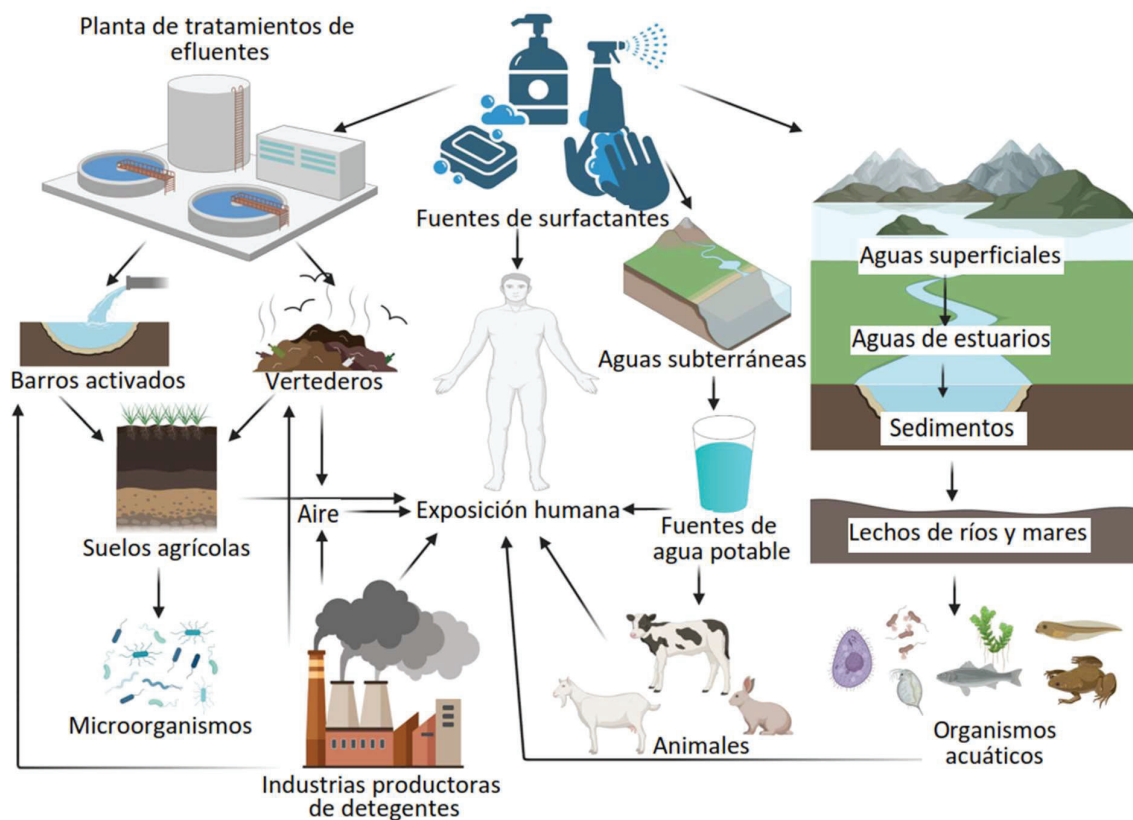


Figura 4. Destino de los NPnEOs y sus metabolitos en el ambiente, adaptado de *International Journal of Environmental Science and Technology* (Arora et al., 2022).

Los NPnEOs son sometidos a una degradación primaria que puede ser del tipo aeróbico o anaeróbico donde los MO cortan rápidamente la cadena de polietoxilatos; esto provoca que la solubilidad en agua disminuya de manera drástica y que aumente exponencialmente su toxicidad (CCME, 2002). Aunque no constituyen la vía principal de degradación pueden producirse metabolitos carboxilados, como los ácidos nonilfenoxi acéticos (NP₁EC) o nonilfenoxietoxi (NP₂EC) acéticos (Mallerman et al., 2019).

El NP, sus etoxilatos y sus derivados carboxílicos, están presentes en los ecosistemas acuáticos, y a la hora de determinar los niveles de aceptación mínimos, en aguas, sedimentos y suelos, es de suma importancia poder consensuar cuáles son los niveles basales que tengan en cuenta la sumatoria de los efectos combinados. Para tal fin, el Consejo Canadiense de Ministros del Ambiente propuso en 2002 el concepto de *equivalencia de toxicidad*, y así en una mezcla de compuestos nonilfenólicos se caracteriza su toxicidad inherente, lo que implica expresar las toxicidades individuales de cada uno de los constituyentes para luego sumarlas. Los valores de toxicidad relativa, o *factores de equivalencia tóxica* (TEFs, del inglés *Toxic Equivalent Factors*) al NP han sido estimados para varios compuestos nonilfenólicos (tabla 2). Estos factores fueron obtenidos sobre un amplio conjunto de datos que incluyó estudios agudos y crónicos para especies acuáticas vertebradas e invertebradas (CCME, 2002).

Luego, se expresa la concentración total de sustancias nonilfenólicas como equivalentes tóxicos de nonilfenol (TEQ), según la siguiente fórmula:

$$\text{TEQ} = \sum_{i=1}^n (C_i \times \text{TEF}_i)$$

donde n es el número de compuestos alquilfenólicos, C_i es la concentración del compuesto i y TEF_i es el factor de equivalencia de toxicidad del compuesto i.

Tabla 2: Factores de equivalencia tóxica relativos al NP, para NP_nEOs, sus derivados y NP, adaptado de *Canadian Environmental Quality Guidelines* (CCME, 2002).

| Químico | TEFs (relativos a NP) |
|--|-----------------------|
| NP | 1 |
| NP _n EO ($1 \leq n \leq 8$) | 0,5 |
| NP _n EO ($n \geq 9$) | 0,005 |
| NP ₁ EC | 0,005 |
| NP ₂ EC | 0,005 |

En la vía principal de degradación (figura 5) tanto en ecosistemas naturales como en plantas de tratamiento de efluentes los compuestos detectados mayoritariamente son el nonilfenol dietoxilado (NP₂EO) y el nonilfenol monoetoxilado (NP₁EO), cuyas tasas de degradación son superiores a los 30 días (Arora *et al.*, 2022). Debido a su fuerte carácter hidrofóbico se ha observado a estos metabolitos lipofílicos como los más recalcitrantes al ataque microbiano y se acumulan en tejidos de organismos acuáticos, en barros activados, sedimentos y suelos agrícolas (Ying, 2006; Soares *et al.*, 2008; Hermabessiere *et al.*, 2017; de Bruin *et al.*, 2019; De la Parra-Guerra & Acevedo-Barrios, 2023). A partir de este punto las velocidades de degradación son extremadamente lentas y se ha detectado principalmente la presencia de NP como producto mayoritario de la degradación final de los NP_nEOs (Babay, 2007; Raju *et al.*, 2018; Sharma & Chadha, 2018), siendo éste el xenobiótico de interés en el presente trabajo.

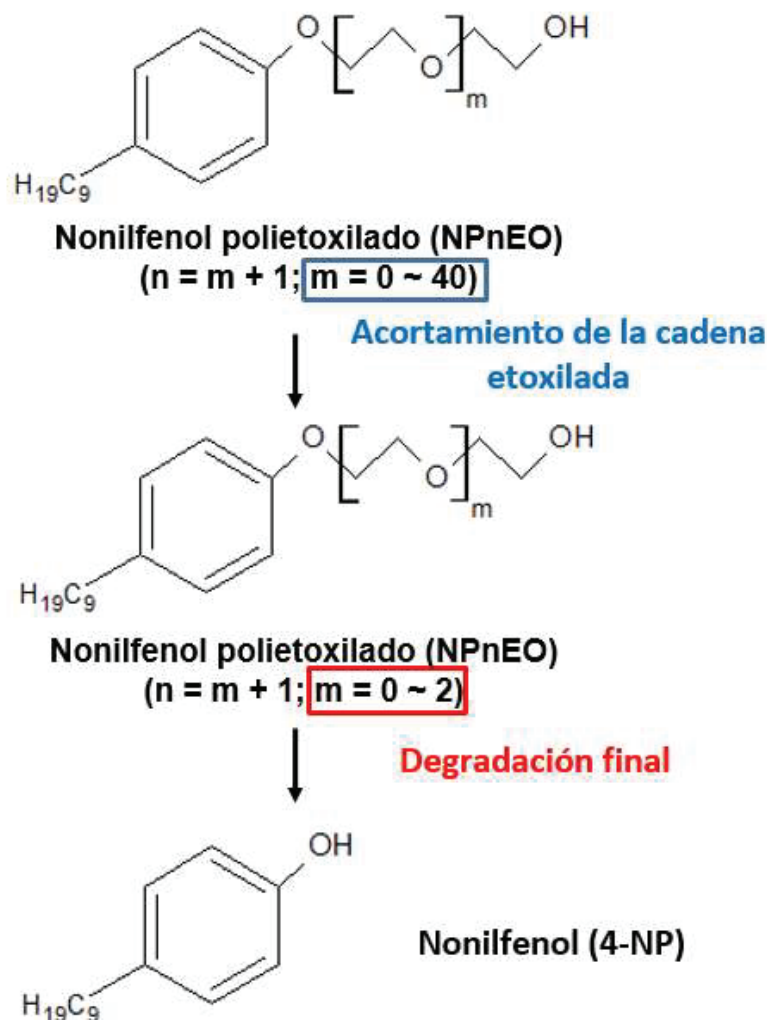


Figura 5. Vía principal de degradación de los NPnEOs.

Debido a los efectos peligrosos de sus productos de degradación, su naturaleza tóxica, ubicua y persistente en los ecosistemas, el uso y producción de los NPnEOs ha sido prohibido en Canadá y la Unión Europea (CE, 2003; CEPA, 2003). Además, están siendo regulados bajo el anexo XVII de REACH (del inglés, *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*), el Acta de Control de Sustancias Tóxicas de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), K-REACH (Corea de Sur), y la Convención de Rotterdam para compuestos severamente restringidos (Lalonde & Garron, 2021). Sin embargo, la versatilidad, simplicidad y bajos costos de producción, sumado a la falta de regulaciones a nivel mundial, hacen que la demanda de estos surfactantes siga siendo elevada (Babay *et al.*, 2013). Por otra parte, en los países de América Latina, la información sobre su impacto es hasta el momento muy escasa (Vargas-Berrones *et al.*, 2020). En la Argentina, al corroborar la regulación de residuos en mg/kg de dichos compuestos de acuerdo con el Registro Nacional de Terapéutica Vegetal (SENASA, 2023) su estado figura como "Exento". Sin embargo, en las provincias de Santa Fé y Córdoba se advirtió sobre los trastornos que producen los NPnEOs y la

justicia ratificó la ordenanzas (N° 965 y N° 5531, respectivamente) que prohíben el uso de productos fitosanitarios de banda roja y de coadyuvantes, aceleradores y optimizadores de los efectos de los agroquímicos a base de nonilfenol etoxilado (Arturi, 2018).

Si bien los NPnEOs son degradados, el continuo ingreso en los distintos compartimientos ambientales hace que a estos compuestos, al ser hallados constantemente, se los considere como pseudopersistentes. En palabras de Sumpter & Johnson, 2008:

(...) Podemos conceptualizar esto como una pluma perpetua, cuyas dimensiones son modificadas por dilución, pero permanecen aguas abajo de cada planta de tratamiento de efluentes como una 'llama eterna'. Este fenómeno es bonitamente descrito por la frase 'pseudopersistencia'.

1.4. Nonilfenol

El NP es un líquido viscoso, de color amarillo pálido producido de forma industrial a través del proceso de alquilación de fenoles (Raju *et al.*, 2018). El NP es encontrado fundamentalmente en el ambiente debido a la degradación parcial de los NPnEOs más que al descarte del NP como tal (Bhandari *et al.*, 2021). Algunas de sus propiedades fisicoquímicas se encuentran enumeradas en la tabla 3.

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas del nonilfenol (Soares *et al.*, 2008; De Araujo *et al.*, 2017; De La Parra-Guerra & Acevedo-Barrios, 2023).

| | |
|---|--|
| Nombres | Nonilfenol, 4-n-nolnilfenol |
| Clase química | Alquilfenol |
| Fórmula química | C ₁₅ H ₂₄ O |
| Densidad a 25 °C | 0,952 g/cm ³ |
| Peso molecular | 220,34 g/mol |
| Solubilidad en agua | 4,9 mg/L |
| Solubilidad en solventes orgánicos | Soluble en la mayoría de los solventes |
| pKA | 10,3 - 10,7 |
| Coefficiente de partición | 3,8 - 4,8 |
| Octanol/Agua (log Kow) | |
| Presión de vapor a 25 °C | (20,7 - 1330) mPa |
| Punto de fusión | -10 °C |
| Punto de ebullición | 304 °C |

El NP ha sido detectado persistentemente en amplios rangos de concentraciones en cuerpos de agua dulce, salada, estuarios, lagos y lagunas. También en otros ambientes como suelos, lodos, sedimentos y aire, en mamíferos terrestres y organismos acuáticos, e incluso en cultivos comestibles (Soares *et al.*, 2008; Babay *et al.*, 2013; Careghini *et al.*, 2014; Lu & Gan, 2014; Ömeroğlu *et al.*, 2015; de Bruin *et al.*, 2019; Bhandari *et al.*, 2021; Klančič *et al.*, 2022; De La Parra-Guerra & Acevedo-Barrios, 2023).

Principalmente debido a su elevada hidrofobicidad (elevado K_{OW}), a su baja solubilidad en agua y a su semi volatilidad, el NP en aguas superficiales tiende a adsorberse rápidamente en las partículas de sedimento, lo que induce la acumulación preferencial del NP en el sedimento con una vida media estimada mayor a 60 años (Soares *et al.*, 2008). Esta acumulación es dependiente de varios factores como la naturaleza del suelo, el clima y la microfauna en los sedimentos. Por ejemplo, suelos fangosos o arcillosos en estuarios tienden a acumular más NP debido a sus características adsorptivas, baja tasa de degradación y movilidad en sedimentos no porosos; por el contrario, los suelos arenosos son pobres acumuladores de NP ya que permiten la movilidad del mismo debido a su naturaleza porosa (Raju *et al.*, 2018).

A su vez, por ser ubicuo en alimentos y agua potable, el consumo de NP es considerado como un riesgo potencial para la salud de las personas (De la Parra-Guerra & Acevedo-Barrios, 2023).

La principal vía de ingreso del NP al medio ambiente es a través del descarte de las aguas de desechos de las plantas de tratamientos (Soares *et al.*, 2008). Otra de las vías es mediante el uso de biosólidos o abono en tierras enmendadas para la agricultura, las escorrentías de los pesticidas y fertilizantes empleados en cultivos y en operaciones de engorde de ganado (figura 6). Además, el NP puede ser introducido en el aire por diversas fuentes y retornar a la superficie a través de lluvias o nevadas (Bhandari *et al.*, 2021).

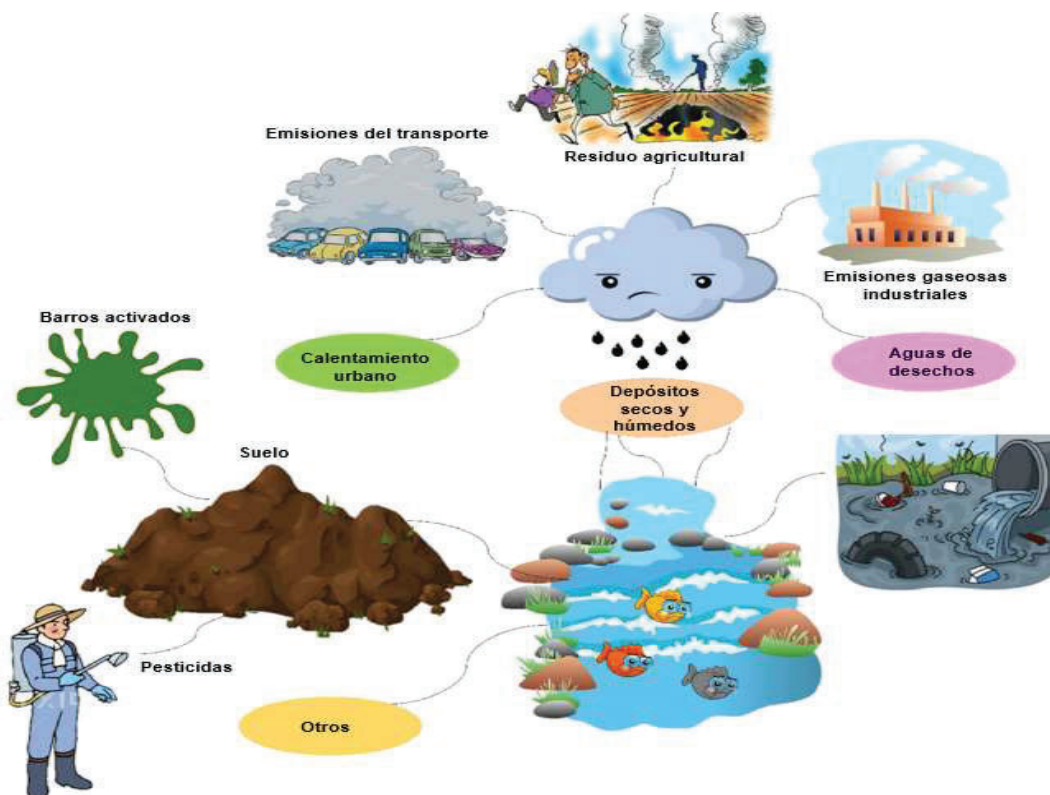


Figura 6: Vías de ingreso del NP al ambiente, adaptado de *Chemosphere* (Bhandari et al., 2021).

El NP es generalmente evaluado como un compuesto simple en el análisis de su presencia en el ambiente, destino, transporte, tratamientos para su remoción y toxicidad (Lu & Gan, 2014). Sin embargo, el NP técnico (t-NP) que es lo que se obtiene de la síntesis industrial es, de hecho, una mezcla con más de 100 isómeros y congéneres debido a variaciones en el largo y ramificación de la cadena lateral y posición de sustitución sobre el anillo fenólico. Alrededor del 90 % del t-NP es *para*-NP (4-NP, figura 7), el resto de los isómeros constitucionales son teóricamente 211, que teniendo en cuenta el estereoisomerismo se elevarían a 550 (Guenther *et al.*, 2006). De hecho, varios estudios han mostrado que los isómeros del NP tienen distintos potenciales de estrogenicidad, biodegradabilidad y presencia en el ambiente, destacando así la importancia de tener un mejor entendimiento en la isomería del NP en cuanto a riesgos y destino final en el medio ambiente (Lu & Gan, 2014)

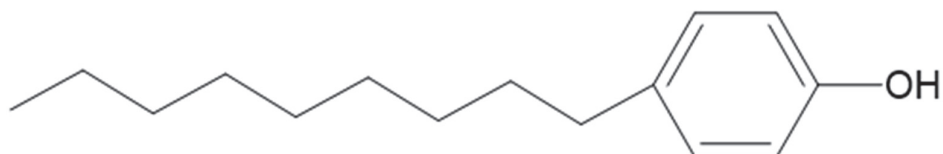


Figura 7: Estructura genérica del NP.

El NP tiene numerosos efectos adversos y tóxicos para los humanos y el medio ambiente (figura 8). La exposición elevada al NP provoca un marcado aumento en el riesgo progresivo de padecer cáncer (mamario, de riñón, de ovarios, uterino, pituitario y testicular). Si la exposición es crónica, en machos provoca reducción de los testículos, disminuye los niveles de testosterona y el número de espermatozoides en el epidídimo junto con su actividad enzimática antioxidante, provoca una disminución del diámetro del túbulo seminífero, aumenta la apoptosis de las células de Sertoli pudiendo inducir estrés oxidativo al generar especies reactivas del oxígeno, ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*), tales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido (O_2^-). Esto rompe el balance pro-oxidante/antioxidante, al dañar a los componentes celulares, culminando con la muerte celular. Las ROS atacan la membrana plasmática de los espermatozoides rica en ácidos grasos poliinsaturados lo cual puede causar fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y pérdida de esperma (Noorimotlagh *et al.*, 2016; Noorimotlagh *et al.*, 2018). El NP puede inducir infertilidad en machos al causar impactos negativos en la espermatogénesis y la calidad del esperma (Noorimotlagh *et al.*, 2016). Ha sido reportado que el NP interfiere con los sistemas reproductivos de roedores, mamíferos, y de especies acuáticas provocando la feminización de las mismas, causando muerte celular en las gónadas y cambios en los parámetros reproductivos, y finalmente una elevada disminución de la fecundidad y fertilidad (Huang *et al.*, 2012; Noorimotlagh *et al.*, 2016; Bhandari *et al.*, 2021).

Como consecuencia de su hidrofobicidad, el NP puede acumularse en el ambiente acuático y luego bioacumularse en los tejidos lipídicos de dichas especies para ingresar en la cadena trófica afectando a las personas. Puede provocar múltiples efectos tóxicos a nivel del crecimiento y del desarrollo, reacciones alérgicas y enfermedades cutáneas (Bhandari *et al.*, 2021).

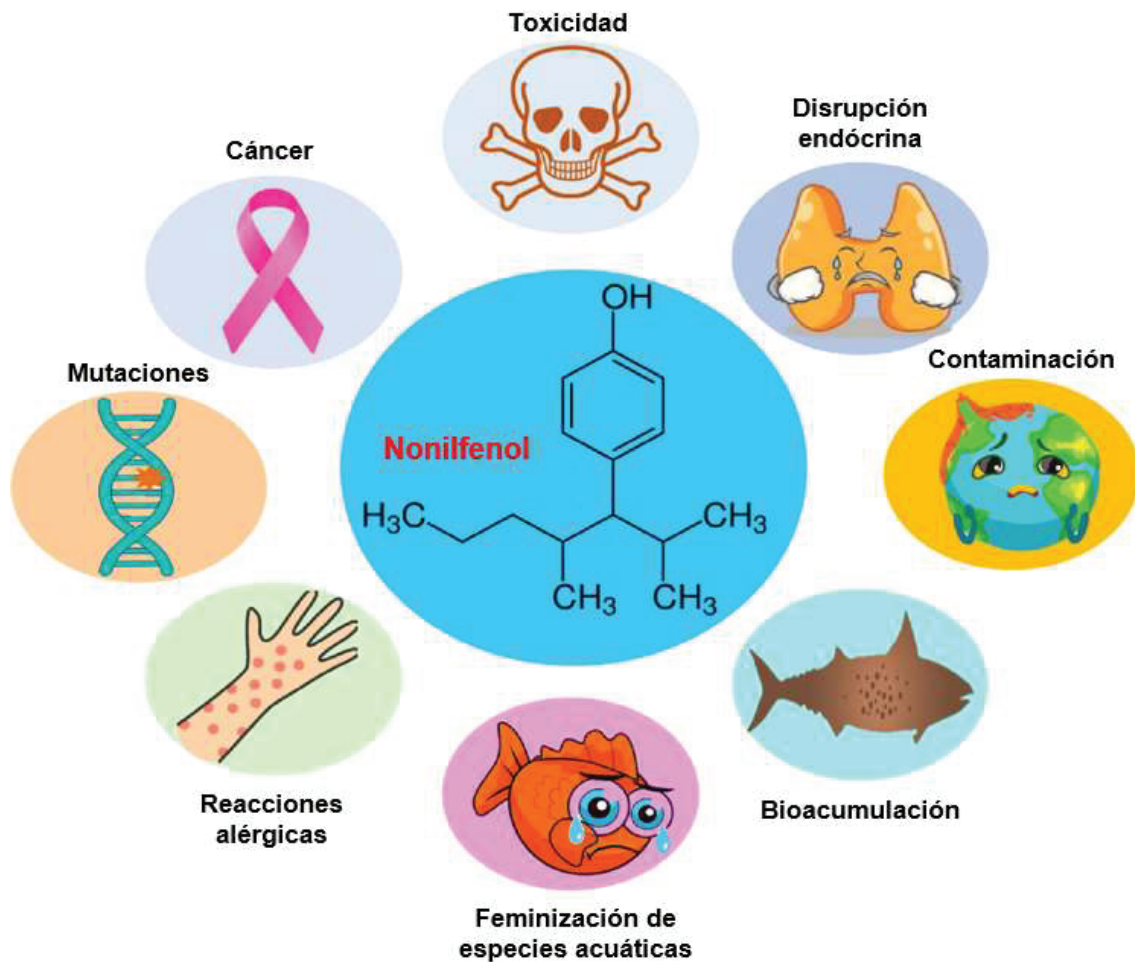


Figura 8: Efectos adversos para la salud y el medio ambiente debido a la presencia de nonilfenol, adaptado de *Chemosphere* (Bhandari *et al.*, 2021).

El NP es un disruptor endócrino (DE) capaz de imitar estrógenos, que son hormonas relacionadas con la función sexual (Noorimotlagh *et al.*, 2020). La USEPA, define un disruptor endócrino como “un agente externo que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión o eliminación de hormonas naturales del cuerpo, las cuales son responsables de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento” (USEPA, 2014).

La primera evidencia de que los alquifenoles podían ser estrogénicos fue publicada en 1938 por Dodds & Lawson (1938), pero fueron Soto y colaboradores (Soto *et al.*, 1991) quienes accidentalmente observaron que el NP, el cual fue empleado en la fabricación de los tubos de ensayo en sus experimentos, era capaz de iniciar la proliferación de células de cáncer de mama como si los estrógenos estuviesen presentes (Soares *et al.*, 2008).

El NP es considerado un xenoestrógeno capaz de interactuar con los receptores de estrógenos (RE) y por lo tanto alterar las vías de señalización dependientes de estrógenos (Noorimotlagh *et al.*, 2020). Los RE sexuales tales como los α -RE y β -RE y los receptores de andrógenos (RA) son factores de transcripción dependientes de ligando. Las vías genómicamente mediadas por NP a través de RE

y RA incluyen etapas como la unión del ligando al receptor, translocación al núcleo y un complejo receptor-ligando que se une a un elemento de respuesta de ADN específico (figura 9 A), lo que lleva a la expresión de ciertos genes (Noorimotlagh *et al.*, 2020). El NP, al poseer similitud estructural con la hormona natural 17 β -estradiol, compite por los sitios de unión al RE (figura 9 B). Dado que hay numerosos isómeros de NP, se ha determinado que es fundamental la posición *para* de la cadena alquílica en el grupo fenólico, para que el NP sea capaz de inducir actividad endócrina. El 17 β -estradiol tiene influencia sobre el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales femeninas, y la maduración y función de los órganos sexuales accesorios, también se conoce que está involucrado en los sistemas neuroendócrino y esqueléticos, siendo capaz de promover la carcinogénesis de tejidos clave. Por esta razón se espera que el NP inicie una amplia variedad de respuestas en los organismos, por ejemplo, actividades del tipo antiandrogénicas, interfiriendo en el funcionamiento apropiado de los andrógenos, esenciales para el normal desarrollo de los machos y sus sistemas reproductivos (Soares *et al.*, 2008). Aquí no habría una vía de competencia directa, sino más bien una activación en varias etapas del RA.

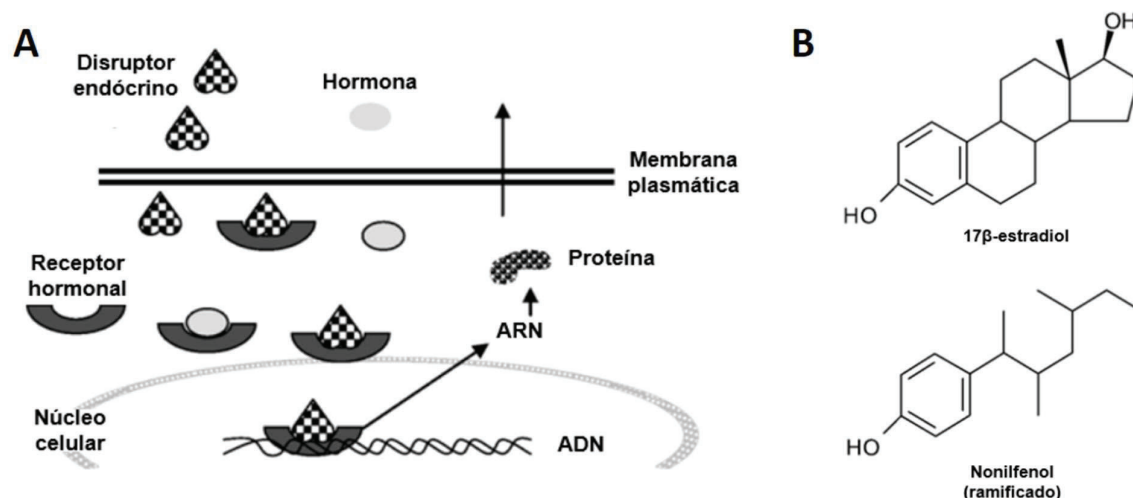


Figura 9: (A) - Competencia del DE (NP) y la hormona natural (17 β -estradiol) por la unión al receptor estrogénico en la célula, uno de los mecanismos de acción del NP. (B) - Comparación de estructuras químicas del 17 β -estradiol y el NP ramificado. Adaptado de *Environment International* (Soares *et al.*, 2008).

Las plantas también se ven afectadas por la presencia de NP. Uno de los efectos fitotóxicos más comunes es la inhibición general del crecimiento; esto se manifiesta por una reducción en la biomasa, el largo del tallo y una reducción en la capacidad germinativa, atribuyendo esto último a una disminución en la actividad mitocondrial, provocando que la interrupción del sitio principal de síntesis de adenosin trifosfato (ATP) esté asociada con una disminución del crecimiento vegetal (Esteban *et al.*, 2016; de Bruin *et al.*, 2019). El daño provocado a los cloroplastos explicaría la reducción de los niveles de clorofila y la falta de eficiencia en la fotosíntesis, lo que en última instancia conduce a un retraso en el crecimiento de las plantas expuestas a NP (Zhang *et al.*, 2016; De Bruin *et al.*, 2017).

El NP es un compuesto que contiene un núcleo fenólico, y pertenece al grupo de sustancias químicas orgánicas más recalcitrantes y persistentes en el ambiente (Itria, 2016). Imaginando un conjunto de moléculas de NP adsorbidas a una partícula de suelo, se puede encontrar una gran similitud estructural con la lignina, que es el biopolímero natural recalcitrante más abundante del planeta (figura 10, Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

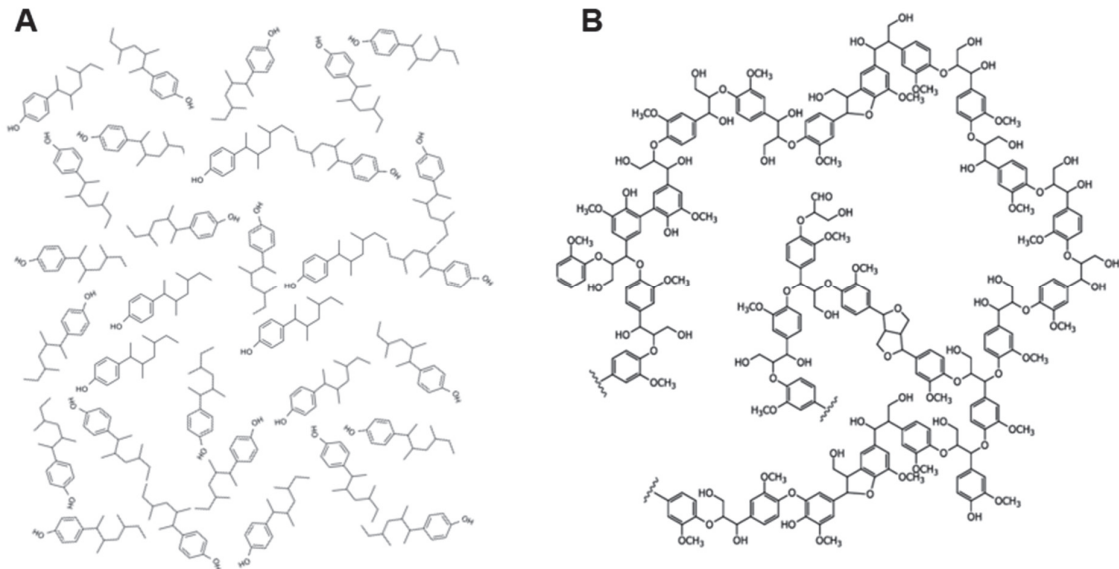


Figura 10: Comparativa estructural de un conjunto de moléculas de NP adsorbidas a una partícula de suelo **(A)** y la estructura parcial de la lignina **(B)**, Adaptado de *Avances en Ciencias e Ingeniería* (Chávez-Sifontes & Domine, 2013).

1.5. Lignina

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza y junto con la celulosa, la hemicelulosa, la pectina y proteínas accesorias conforma la pared celular de las plantas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono (figura 11, Chávez-Sifontes & Domine, 2013; Itria, 2016).

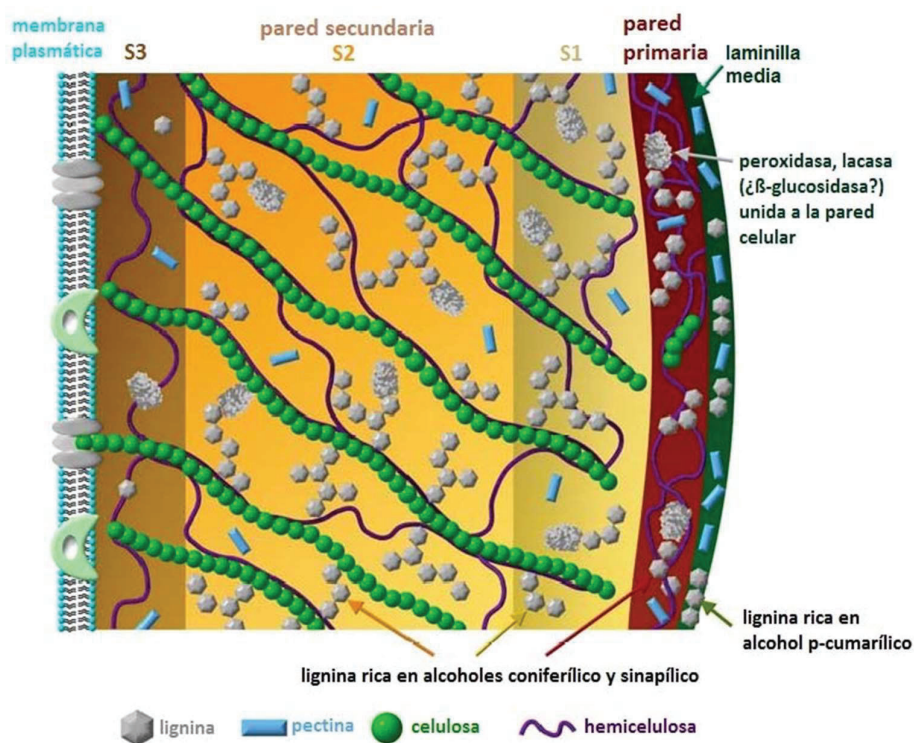


Figura 11: Modelo de la estructura de la pared celular vegetal, adaptado de *Molecules* (Achyuthan *et al.*, 2010). Se muestran la abundancia relativa y localización específica de varios de los componentes de la pared celular (pectina, celulosa, hemicelulosa, lignina y proteínas).

Es un polímero amorfo ramificado, insoluble en agua y ópticamente inactivo, formado principalmente por reacciones oxidativas mediante la unión de radicales libres de sus 3 precursores hidroxicinamil-alcohólicos: p-cumaril-alcohol, y sus derivados metoxi-sustituidos, el coniferil-alcohol y el sinapil-alcohol (figura 12 A-C), dando como resultado una estructura de elevada complejidad y variabilidad (Chávez-Sifontes & Domine, 2013; Gargulak *et al.*, 2015; Mallerman, 2017; Chio *et al.*, 2019).

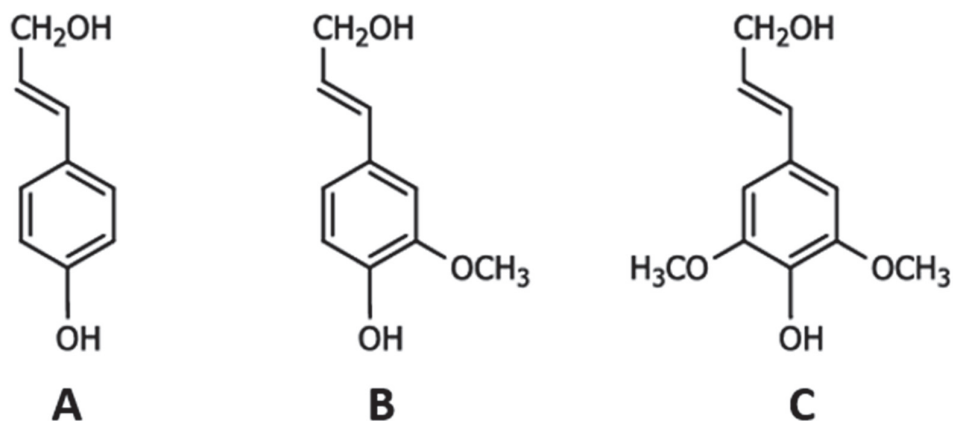


Figura 12: Estructura molecular de los monolignoles mayoritarios de la lignina. (A) - Alcohol p-cumarílico. (B) - Alcohol coniferílico. (C) - Alcohol sinapílico, adaptado de *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (Gargulak *et al.*, 2015).

La composición o distribución de los tres componentes en esas redes varía dependiendo del tipo de planta. Este biopolímero fenólico es recalcitrante, debido a la elevada presencia de estructuras aromáticas (Itria, 2016). Sus enlaces éter (C-O-C) y alquílicos (C-C) lo hacen poco susceptible a la degradación por ataques hidrolíticos (Mallerman, 2017).

La lignina tiene múltiples funciones que son fundamentales para la vida de las plantas. Al disminuir la permeabilidad del agua a través de la pared celular en los tejidos conductores del xilema, la lignina juega un rol esencial en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos. Esta da rigidez a la pared celular y actúa como un aglutinante entre las células vegetales, creando un material compuesto extraordinariamente resistente a la compresión, la flexión y el impacto. Además, imparte resistencia a la degradación biológica debido a la inserción de fibras de celulosa y hemicelulosa entrecruzadas que proporcionan una barrera física adicional de resistencia contra el ataque de patógenos, dificultando así el acceso a las unidades de glucosa (Gargulak *et al.*, 2015; Kües, 2015; Itria, 2016; Wang *et al.*, 2021).

1.6. Hongos ligninolíticos

Sin embargo, a lo largo de la evolución han surgido MO capaces de degradar lignina y celulosa. Estos MO son conocidos como hongos de pudrición blanca (WRF, del inglés *White Rot Fungi*), su nombre deriva del proceso específico del blanqueamiento que sufre la madera durante el fenómeno de degradación (figura 13, Grelska & Noszczyńska 2020).



Figura 13: Madera de árbol debilitada por la acción degradadora de los WRF; se destaca el color blanquecino adoptado debido a la pudrición, luego de la despolimerización de los componentes lignocelulósicos.

Los hongos que presentan este tipo de pudrición son hongos filamentosos del *Phylum Basidiomycota* que, gracias a su rápido crecimiento y expansión micelial en forma de túbulos ramificados, constituyen uno de los organismos vivos más grandes sobre la Tierra, ya que las redes hifales podrían extenderse cientos de hectáreas

(Harms *et al.*, 2011). Con mucha menor frecuencia se encuentran ascomicetes, principalmente del orden *Xylariales* (Grassi *et al.*, 2014). La figura 14 muestra un ejemplo de las hifas constituyendo un desarrollo miceliar. Gracias a este tipo de desarrollo tienen la habilidad de colonizar los sustratos que invaden con mayor eficiencia y ser capaces de movilizar metabolitos. Esto les permite mantener una organización celular interna altamente polarizada debido al crecimiento apical e incluso desarrollarse en zonas de escasos nutrientes (Harms *et al.*, 2011; Mallerman, 2017; Mayans *et al.*, 2021). Si bien su hábitat natural reside en estructuras leñosas, el suelo también facilita su desarrollo porque este experimenta sólo pequeñas turbulencias mecánicas por fuerzas de cizallamiento que potencialmente podrían desorganizar el micelio fúngico (Baldrian, 2008; Harms *et al.*, 2011). De hecho, algunos estudios han mostrado que los WRF pueden sobrevivir en el suelo y hábilmente colonizarlo al utilizar los materiales lignocelulósicos disponibles y otros sustratos presentes (Mayans *et al.*, 2021).

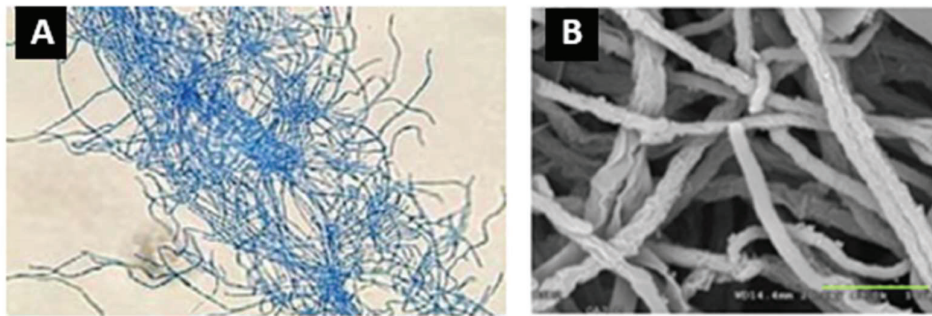


Figura 14: (A) - Microscopía de contraste de fase de hifas fúngicas de *Pleurotus ostreatus*, tinción con azul de algodón (azul de lactofenol) (40X). Adaptado de *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Bhatnagar *et al.*, 2021). (B) - Microscopía electrónica de barrido de micelio de *P. ostreatus* (1000X). Adaptado de *Applied Sciences* (Mayans *et al.*, 2021).

La habilidad para degradar la madera proviene de la secreción de enzimas modificadoras de lignina (LMEs, del inglés *Lignin-Modifying Enzymes*) o enzimas ligninolíticas, que trabajan con distintos potenciales redox y baja especificidad, de las cuales destacan la lignina peroxidasa (*LiP*), la manganeso peroxidasa (*MnP*) y las lacasas (*Lac*), entre otras últimamente nombradas, como la peroxidasa versátil (VP), las aril-alcohol oxidasas (AAO), las aril-alcohol deshidrogenasas, las glioxal-oxidasas (GLOX) y las quinona reductasas (Harms *et al.*, 2011; Itria, 2016; Grelska & Noszczyńska 2020; Echezonachi, 2022). Sin embargo, aunque los WRF son capaces de expresar todas las LMEs, hay cepas en particular que no liberan todas las clases en simultáneo. Estas son enzimas exclusivas del metabolismo secundario, ya que se secretan principalmente durante la idiofase, como consecuencia de la falta de nutrientes del medio, como ser carbono o nitrógeno, así como durante los estadios hipóxicos (Grelska & Noszczyńska 2020).

1.7. Enzimas ligninolíticas

A continuación, se brindan más detalles de la LMEs antes mencionadas:

1.7.1. Lignina Peroxidasa (LiP)

La LiP [1,2-bis (3,4-dimetoxifenil) propano-1,3-diol:peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.14] es una glicoproteína que contiene un grupo prostético del tipo hemo (un complejo de hierro con la protoporfirina IX) y cataliza la despolimerización oxidativa de la lignina, dependiente de H₂O₂. Fue descubierta a mediados de 1980 en *Phanerochaete chrysosporium*. Su tamaño molecular varía entre 38 kDa - 46 kDa, tiene un alto potencial redox (1,4 V - 1,5 V) y su pH de trabajo óptimo se encuentra entre 3 - 4,5 (Harms *et al.*, 2011; Itria, 2016; Grelska & Noszczyńska 2020). Puede catalizar la degradación de una amplia variedad de componentes de la lignina, y xenobióticos fenólicos y no fenólicos, independientemente de la presencia de un mediador. No obstante, una elevada concentración de H₂O₂, acetona, dietil éter o dioxano funcionan como inhibidores de LiP en muchos de los hongos (Manavalan *et al.*, 2015).

1.7.2. Manganeso Peroxidasa (MnP)

La MnP [Mn (II):peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.13] es una glicoproteína extracelular que al igual que la LiP es una hemo-peroxidasa. Su tamaño molecular se encuentra comprendido entre 32 kDa - 75 kDa (Chowdhary *et al.*, 2019; Qiu *et al.*, 2019) y muestra diferentes características dependiendo de la fuente e isoforma. Fue descubierta en 1986 por Glenn & Gold y Paszcznski *et al.* en *P. chrysosporium* (Suryadi *et al.*, 2022). Es la única hemo-peroxidasa que cataliza la oxidación de Mn²⁺ a Mn³⁺ mediante H₂O₂ como aceptor de electrones en un mecanismo de electrón-simple (Pollegioni *et al.*, 2015), donde se requiere la presencia de ácido oxálico, fumárico o málico, que actúan como quelantes necesarios para la estabilidad de los iones, e influyen en el potencial redox que se encuentra en el rango de 1,0 V - 1,2 V, y es por esta razón que se considera a la MnP como una verdadera ligninasa (Harms *et al.*, 2011; Mallerman, 2017; Chowdhary *et al.*, 2019). Los iones Mn³⁺ generados actúan como mediadores difusibles, siendo capaces de penetrar la estructura lignocelulósica y permitiendo la oxidación de una gran variedad de sustratos fenólicos monoméricos como fenoles simples, aminas, colorantes y monolignoles mayoritarios de la lignina (Mallerman, 2017).

1.7.3. Lacasa (Lac)

La Lac [bencenodiol:oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2] cataliza la oxidación directa (potencial redox 0,4 - 0,8 V, Harms *et al.*, 2011) de orto y para difenoles, amino fenoles, polifenoles, poliaminas, aril-diaminas y de algunos iones inorgánicos (Itria, 2016). A su vez, participa de forma indirecta en la despolimerización

de la lignina, ya que es fundamental la presencia de una molécula mediadora que actúe como carrier electrónico entre la Lac y el sustrato a ser oxidado (Munk *et al.*, 2015); como consecuencia, aumenta el potencial redox a valores superiores de 1,5 V, pudiendo generar radicales libres que actúen sobre la lignina iniciando el proceso de despolimerización.

Fue detectada por primera vez del árbol de laca japonés *Toxicodendron vernicifluum*, y entre las LMEs es la más común. Es producida por varias plantas, insectos, bacterias y hongos; producidas por hongos resultan interesantes para aplicaciones biotecnológicas por su baja especificidad de sustrato (Itria, 2016; Grelska & Noszczyńska, 2020). Esta es una glicoproteína de gran tamaño que puede variar entre 50 kDa - 150 kDa, dependiendo del tipo de hongo (Suryadi *et al.*, 2022). Perteneciente a la familia de las fenol-oxidasas, emplea O₂ como aceptor de electrones para ser subsecuentemente reducido a H₂O₂ (Grelska & Noszczyńska, 2020; Suryadi *et al.*, 2022). Presentan un color azul característico debido a que pueden contener de 1 a 4 átomos de cobre en su interior, el cual es empleado como cofactor enzimático. Sus funciones más importantes son de deslignificación, esporulación, producción de pigmentos, formación del cuerpo fructífero y patogénesis de plantas. Se las ha encontrado principalmente como estructuras monoméricas, pero también como homodímeros, heterodímeros o multímeros.

1.8. Micorremediación

Hasta aquí es clara la necesidad de encontrar estrategias que permitan reducir al máximo la contaminación ambiental producto de la actividad antrópica. Si bien con el correr de las décadas se han ido desarrollando nuevas tecnologías basadas en procesos físicos, químicos o biológicos (bacterias o plantas), algunas de estas sólo tienen resultados factibles en escala de laboratorio, son costosas, generan subproductos que potencialmente podrían ser más tóxicos que aquellos que se espera que degraden, o son procesos que demandan tiempos exageradamente largos para obtener resultados aceptables (Mahjoubi *et al.*, 2018; Mohammed *et al.*, 2018; Dhaka & Chattopadhyay, 2021; Kumar *et al.*, 2021; Garrido *et al.*, 2023). Sin embargo, la mirada es prometedora cuando el foco está puesto sobre el reino Fungi. Este proceso de biorremediación fue denominado micorremediación por Paul Stamets (Mycoremediation, n.d.). En síntesis, la idea es emplear a los MO fúngicos, explotando su capacidad de secretar enzimas degradativas para disminuir la polución orgánica en suelos. Estos organismos tienen la capacidad de bioacumular o transformar biológicamente las sustancias presentes, abarcando tanto compuestos naturales orgánicos -como los hidrocarburos- como inorgánicos -como los metales pesados- (Mishra & Srivastava, 2020; Nevedrov *et al.*, 2020; Echezonachi, 2022; Hidalgo *et al.*, 2023). Los hongos pueden crecer con una amplia variedad de fuentes de carbono, por lo general en residuos agrícolas que funcionan como sustrato (figura 15). Estos sustratos son impregnados de micelio fúngico incluyendo otros MO benéficos actuando de forma sinérgica, a tal punto de poder ser aplicados en suelos contaminados para luego ser biodegradados o biotransformados en otros productos

biológicos útiles, generando así un ambiente más seguro (Echezonachi, 2022). La micorremediación, en comparación con otras técnicas de remediación, es ventajosa debido a que ocurre naturalmente, no es tóxica, no requiere mantenimiento, es reciclable, rentable y menos laboriosa (Bhatnagar *et al.*, 2021)

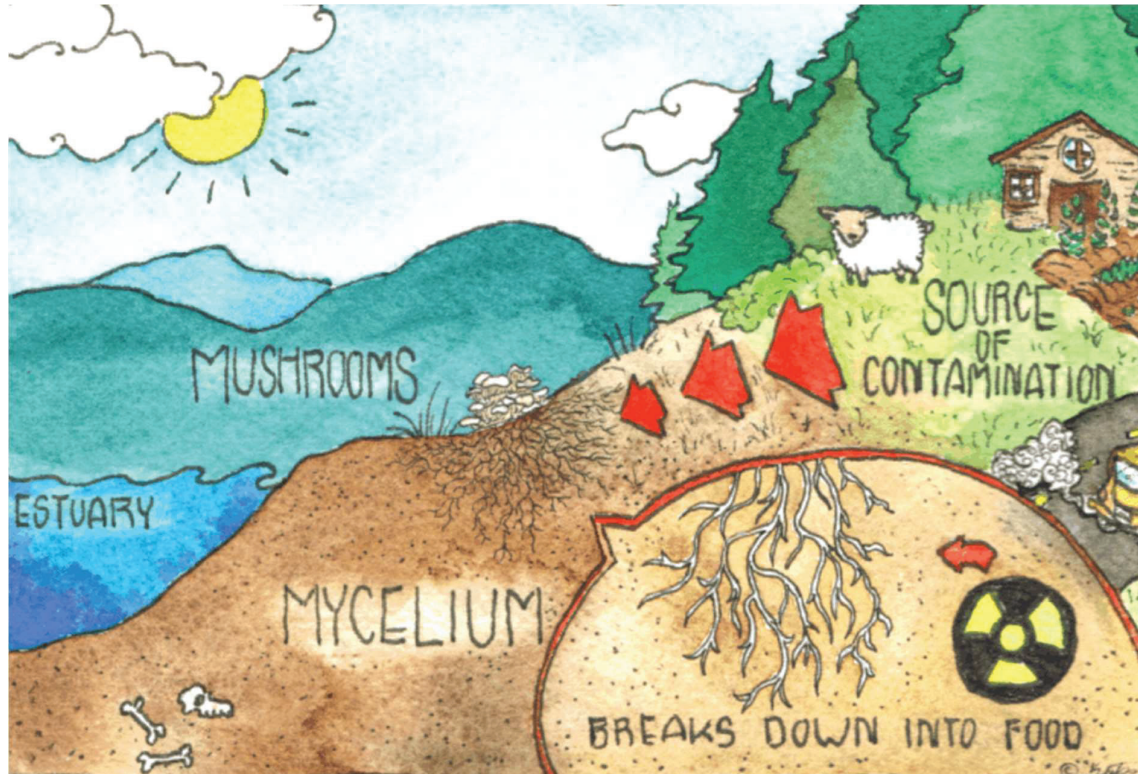


Figura 15: Los hongos colonizan el sustrato contaminado (por ejemplo un suelo agrícola con pesticidas) mediante la extensión del micelio, a través de la secreción de enzimas de baja especificidad se degrada el contaminante de interés a estados donde puede ser aprovechado como fuente de nutrientes, o hacia un estadio final de mineralización, devolviendo la pristinidad e inocuidad al ecosistema. Adaptado de *The Alchemist's Kitchen* (Helfend, 2021).

1.9 Métodos analíticos para el estudio de la micorremediación

Para poder determinar el desempeño de la microbiota utilizada en los procesos de micorremediación, resulta fundamental contar con metodologías analíticas adecuadas para cuantificar los compuestos bajo estudio. Para esto, una de las herramientas más empleadas es la técnica separativa conocida como HPLC (del inglés, *High Pressure Liquid Chromatography*). Esta consiste en hacer pasar el analito disuelto en un líquido (fase móvil, FM) a través de una columna (fase estacionaria, FE). Respecto a la FE, se presentan dos posibilidades para realizar la determinación, los análisis se pueden realizar por fase normal o fase reversa.

Esto tiene que ver con las polaridades relativas de la FM y la FE. En las aplicaciones de fase normal se utiliza una FE de elevada polaridad, tal como el agua o el trietilenglicol, adsorbida sobre partículas de sílice o alúmina. En la cromatografía en fase reversa, la FE es no polar (en general se emplea un hidrocarburo) y la FM es

relativamente polar (como el agua, metanol o acetonitrilo). En cromatografía de fase normal, el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la FM. Por contraste, en los métodos en fase reversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la FM aumenta el tiempo de elución.

En cuanto a los compuestos de interés de este trabajo, las sustancias más hidrofílicas, como los NPnEOs, son generalmente separadas mediante fase normal de acuerdo a la longitud de la cadena etoxilada. Mientras que aquellas hidrofóbicas, como el NP, suelen ser analizadas en fase reversa. Para la cuantificación del NP puede utilizarse detección UV. Si se desea ganar mayor sensibilidad, se puede emplear la detección de fluorescencia.

En este tipo de detectores la muestra es expuesta a una determinada longitud de onda de excitación. La muestra excitada emite luz a una longitud de onda mayor (emisión). Un fotomultiplicador es colocado a 90° respecto de la fuente de luz (figura 16 A) y detecta la luz emitida por las sustancias fluorescentes. A diferencia de los detectores UV/Vis, los detectores de fluorescencia pueden medir señales de emisión muy débiles, en lugar de la diferencia entre intensidades de luz (absorbancia) (figura 16 B, Thermo Fisher Scientific Inc., 2013).

La fluorescencia es usada para medir sustancias ricas en estructuras aromáticas que son fuertemente fluorescentes como, por ejemplo, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), colorantes y algunos aminoácidos.

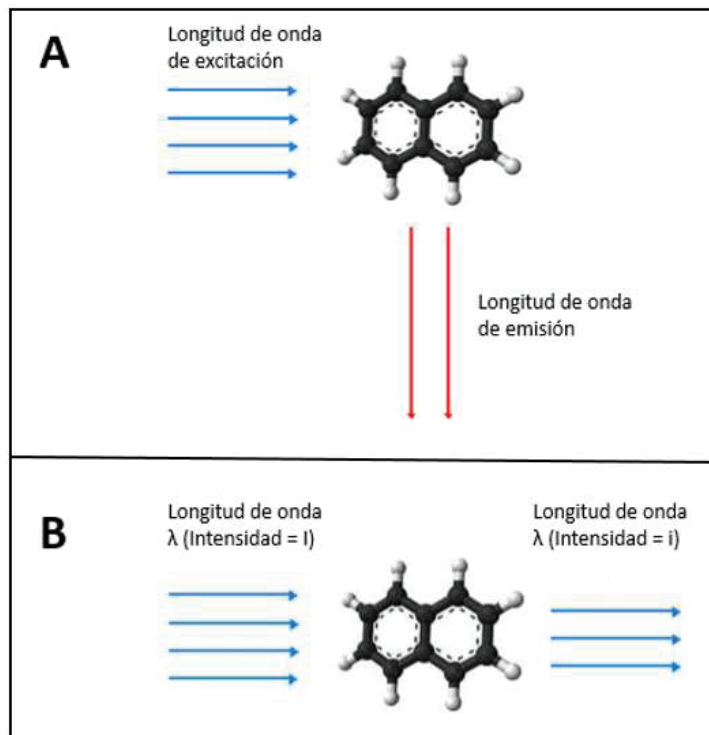


Figura 16: (A) - Representación simplificada de la luz emitida por una molécula, principio de trabajo de los detectores de fluorescencia. (B) - Representación simplificada de la luz absorbida por una molécula, principio de trabajo de los detectores UV/Vis, adaptado de *Thermo Scientific* (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013)

Hipótesis

Existen hongos de pudrición blanca (WRF) que, al secretar enzimas ligninolíticas, poseen la capacidad de degradar NP en condiciones no axénicas, dentro de una matriz compleja como el suelo, con potencial uso para su biorremediación.

Objetivos

3.1. Objetivo general

Investigar la capacidad de los hongos ligninolíticos para degradar NP y biorremediar los suelos contaminados en condiciones no axénicas.

3.2. Objetivos específicos

Realizar una prospección bibliográfica de los mejores candidatos para biorremediar los suelos.

Seleccionar las cepas disponibles en el cepario de BAFC en base a su potencial degradador.

Desarrollar cultivos fúngicos con las cepas seleccionadas.

Producir sobrenadantes en un medio inductor de actividad ligninolítica (*MnP*, *Lac*) y caracterizar los extractos producidos.

Seleccionar las mejores cepas candidatas en base a la caracterización.

Poner a punto la técnica de cuantificación de NP por HPLC con detección UV y de fluorescencia.

Evaluar la capacidad degradativa de los extractos fúngicos sobre el NP mediante la técnica de HPLC.

Seleccionar la mejor cepa candidata en base a la capacidad de remoción de NP determinada por HPLC.

Con la cepa seleccionada, establecer microcosmos que simulen a menor escala condiciones reales de campo para evaluar las estrategias de biorremediación: atenuación natural, bioaugmentación y bioaugmentación estimulada.

Realizar extractos metanólicos de los microcosmos y determinar por HPLC las tasas de degradación de NP para cada uno de los tratamientos.

Metodología

4.1. Prospección bibliográfica

La estrategia de búsqueda de cepas consistió en elegir palabras clave específicas y algunos términos en base de datos como Scopus, PubMed, BASE y Google Scholar. Los trabajos seleccionados fueron publicados en los últimos 20 años. Se ha empleado un rango de tiempo considerable con el fin de encontrar el mayor número de especies estudiadas en la degradación de compuestos recalcitrantes. Los grupos y palabras clave combinadas con los operadores booleanos fueron los siguientes:

- Bioremediation OR Mycoremediation AND nonylphenol AND soils
- White-Rot Fungi AND alkylphenol AND sediments
- White-Rot Fungi OR WRF AND PAHs AND remediation
- Fungal AND degradation AND dyes AND Environment
- Fungal OR Mushroom AND detoxification AND soils OR sediments
- Fungi AND degradation AND nonylphenol OR PCBs OR dyes
- Fungal AND nonylphenol AND sewage sludge
- Biodegradation AND dyes OR Lignocellulosic AND Fungi

Las palabras clave se encuentran basadas en las matrices ambientales, tipos de contaminantes y sustratos.

Sólo trabajos publicados en lengua inglesa donde haya habido un adecuado número de análisis realizados y cuya metodología analítica estuviesen claramente descripta han sido incluidos.

Se han descartado trabajos duplicados de diferentes bases de datos, cepas fúngicas fuera del grupo WRF y contaminantes de otras índoles como los metales pesados, radionucleidos, nanomateriales o microplásticos.

4.2. Cepas disponibles

El cepario de BAFCCult de la FCEyN-UBA presenta varias especies de WRF y el criterio de selección de las mismas se correspondió con aquellas que tuviesen distintos potenciales de degradación de complejos aromáticos y PAHs (Abo-State *et al.*, 2021).

4.3. Desarrollo de cultivos fúngicos

4.3.1. Desarrollo de inóculos en placas MEA

Se disolvieron 12,7 g de extracto de malta, 20 g de agar y 10 g de glucosa en un litro de agua destilada. Este medio fue luego autoclavado durante 15 min a 120 °C.

Se utilizaron placas de vidrio, que fueron previamente esterilizadas por calor seco a 180 °C en estufa por 2,5 hs. Luego se colocaron aproximadamente 20 mL en cada caja del medio estéril. Con la finalidad de obtener inóculo en fase exponencial de crecimiento, se inocularon las placas de Petri con un taquito de agar miceliado con las cepas de interés seleccionadas. Se incubó en oscuridad a 28 °C hasta antes de que el borde de la colonia fúngica llegara al borde de la caja.

4.3.2. Cultivo de cepas fúngicas en medio Galhaup

Se preparó medio de crecimiento inductor de *Lac* siguiendo el protocolo modificado de Galhaup (Galhaup *et al.*, 2002). Brevemente, se disolvieron 40 g de glucosa, 5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona, 1 g de sulfato de magnesio heptahidrato y 247 mg de sulfato cúprico pentahidratado en un litro de agua destilada en agitación continua (100 rpm) y eventual calentamiento para favorecer la disolución de la peptona; se ajustó el pH a 6,5 con NaOH 1 N.

En frascos *Erlenmeyer* de 250 mL se colocaron 50 mL de medio Galhaup modificado y se inoculó con tres tacos del mismo diámetro obtenidos del borde de crecimiento activo de cultivos en MEA, bajo flujo laminar. Esto fue con el fin de garantizar la misma cantidad de micelio en cada unidad de estudio. El cultivo fue realizado en forma estacionaria en oscuridad a 28 °C. Se prepararon frascos por triplicado de cada cepa para ser sacrificados cada 48 - 72 h.

4.3.3. Determinaciones bioquímicas

4.3.3.1. Curva de crecimiento de biomasa y consumo de azúcares reductores

La biomasa obtenida en cada frasco *Erlenmeyer* se filtró mediante papel Whatman N° 42, previamente secado y tarado, con embudo Büchner bajo vacío. El conjunto biomasa/papel fue luego llevado a sequedad en estufa a 80 °C hasta peso constante. La diferencia entre el papel con biomasa seco y el papel solo seco representó la biomasa de la cepa a cada tiempo; ésta fue representada en un gráfico de biomasa en función del tiempo de incubación. Además, se determinó el consumo de sustrato, mediante la cuantificación espectrofotométrica de azúcares reductores con el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) empleando un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu modelo UV-mini 1240 (Kioto, Japón) a 540 nm. Cada determinación se realizó por triplicado y los valores informados correspondieron al promedio de las réplicas.

4.3.3.2. Medición de actividades enzimáticas y proteínas totales

Luego de filtrar la biomasa en cada tiempo, los sobrenadantes obtenidos representaron los extractos enriquecidos en enzimas ligninolíticas. Los mismos fueron conservados en freezer a -20 °C hasta el momento de realizar los análisis. En el momento de realizar las determinaciones, estos fueron descongelados en baño de agua a 30 °C y homogeneizados mediante vortexeado a 2500 rpm durante 5 segundos. Tanto las actividades enzimáticas como las proteínas totales fueron medidas mediante espectrofotometría UV-Vis, por triplicado. La actividad enzimática *MnP* se determinó por el método del rojo fenol a 610 nm (Paszczyński *et al.*, 1988) y la actividad Lac fue determinada con dimetoxi fenol como sustrato a 469 nm (Jaouani *et al.*, 2005). Por otra parte, se cuantificaron las proteínas de los sobrenadantes por el método de Bradford (1976), a 595 nm. Se informó en cada caso el promedio de los triplicados.

4.4. Producción de sobrenadantes para análisis de degradación de NP

Se tomaron tacos de agar miceliado en crecimiento exponencial de *T. trogii* y *P. ostreatus* que fueron colocados en frascos *Erlenmeyer* con medio Galhaup de acuerdo al punto 4.3.2., por quintuplicado, y se los dejó incubar de forma estática a 28 °C por 15 días. Los extractos fueron filtrados mediante papel Whatman N° 42, se decartó la biomasa fúngica y los sobrenadantes fueron resguardados a -20 °C hasta posteriores análisis de degradación de NP.

4.5. Puesta a punto de HPLC

4.5.1. Optimización de la separación del NP

El sistema instrumental empleado consistió en un equipo de HPLC modelo *Accela 600* (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA) compuesto por una bomba cuaternaria, un automuestreador con compartimento de columna y un detector UV-Vis de arreglo de diodos. Los datos fueron obtenidos y procesados mediante el software ChromQuest 5.0 versión 3.2.1 (Thermo Fisher Scientific Inn., California, USA). Se empleó agua MilliQ y MeOH calidad HPLC o superior, distintas columnas cromatográficas, distintos flujos de FM en modo isocrático, diversos tiempos de análisis (ver Tabla 10 en sección 5.3) y un estándar de 10 mg/L de NP. El volumen de inyección fue de 10 µL y la temperatura de la columna fue de 30 °C. Se evaluaron tres longitudes de onda para la detección en base al espectro de absorción obtenido con el PDA: 200, 223 y 277 nm.

Para evaluar la linealidad del método seleccionado, se utilizaron los estándares de calibración correspondientes a 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 25 y 50 mg/L, preparados a partir de solución madre (SM) de t-NP de 1000 mg/L en MeOH.

4.5.2. Detección de fluorescencia

Ya avanzada la puesta a punto del método de HPLC, al sistema instrumental descrito se le acopló un detector de fluorescencia marca Thermo Scientific modelo FLD-3100.

Al incorporar el nuevo método de detección se respetaron los parámetros cromatográficos iniciales, variando los implicados en el desempeño del FLD con la finalidad de obtener una relación señal-ruido óptima y evitando saturar al detector.

Se fijaron las longitudes de onda de excitación y de emisión en 230 y 300 nm, respectivamente, en base al trabajo de Babay (2009). Como se observa en la figura 17, en esos valores se obtienen los máximos de excitación y emisión.

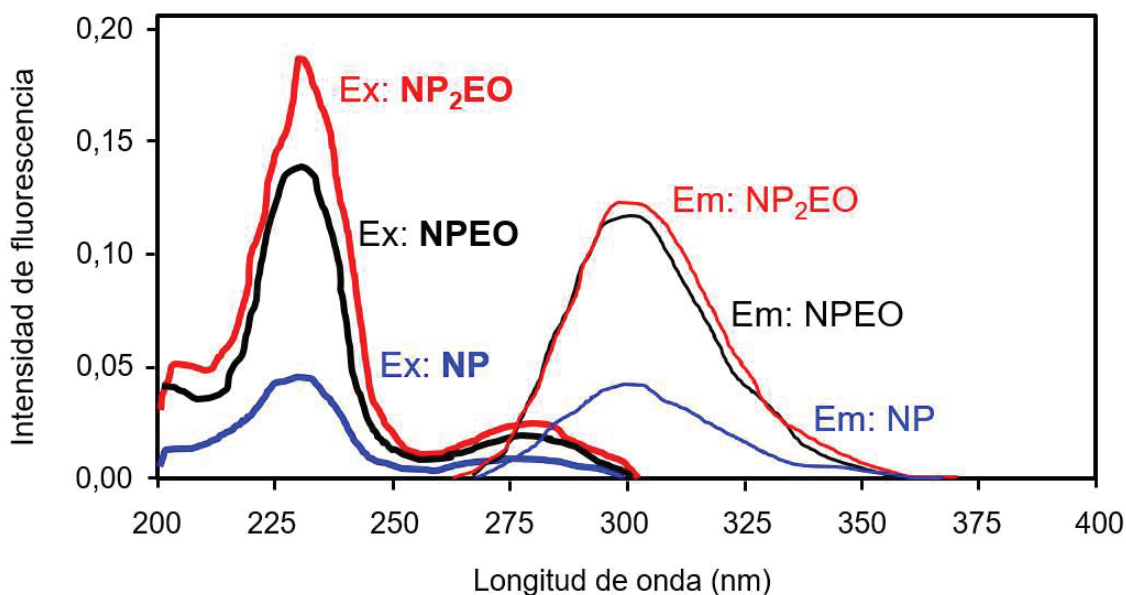


Figura 17: Espectros de excitación (a, b y c) y emisión (d, e y f) para NP₂EO, NP₁EO y NP, respectivamente. En los 3 compuestos se obtiene el máximo de intensidad de fluorescencia a 230 nm en excitación y a 300 nm en emisión. Imagen tomada con el permiso de Babay (2009).

Además se probaron distintas sensibilidades del tubo fotomultiplicador y modos de la lámpara, variables propias del detector. En cada una de las pruebas se inyectó por duplicado un estándar de NP de 2 mg/L en MeOH. A continuación, la tabla 5 muestra las distintas condiciones metodológicas ensayadas para optimizar la detección de NP. Cada vez que se aumentó la sensibilidad en un punto, la respuesta obtenida fue del doble. Los 3 modos de lámpara impactaron principalmente en la intensidad del pico que se desea obtener y en la vida útil de la misma.

Tabla 5: Variación de los parámetros analíticos del detector FLD-3100.

| Método | λ excitación (nm) | λ emisión (nm) | Sensibilidad | Modo de lámpara |
|--------|---------------------------|------------------------|--------------|-----------------|
| 1 | 230 | 300 | 1 | Standard |
| 2 | 230 | 300 | 1 | LongLife |
| 3 | 230 | 300 | 1 | HighPower |
| 4 | 230 | 300 | 2 | Standard |
| 5 | 230 | 300 | 2 | LongLife |
| 6 | 230 | 300 | 2 | HighPower |
| 7 | 230 | 300 | 3 | Standard |
| 8 | 230 | 300 | 3 | LongLife |
| 9 | 230 | 300 | 3 | HighPower |
| 10 | 230 | 300 | 4 | Standard |
| 11 | 230 | 300 | 4 | LongLife |
| 12 | 230 | 300 | 4 | HighPower |

Al acoplar un nuevo módulo de detección fue necesario reemplazar el software de procesamiento de datos cromatográficos, de este modo es que a partir de este punto, todos los análisis realizados por HPLC fueron procesados a través del software Thermo Scientific™ Dionex™ Chromeleon™ 7 Chromatography Data System versión 7.3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA).

4.5.3. Degradación de NP mediada por enzimas fúngicas - incubación en MeOH: cuantificación por HPLC

Se utilizaron como fuente de enzimas las alícuotas con mayor actividad lacasa para llevar a cabo incubaciones a 24 y 96 h. Se incubaron alícuotas de los sobrenadantes bajo dos condiciones: nativa (N) y desnaturalizada (D), usándose como control abiótico los extractos desnaturalizados a 100 °C por 15 min en un termobloque Hach DRB 200. La ausencia de actividad enzimática se corroboró mediante la medición rojo fenol para *MnP* y dimetoxi fenol para *Lac*.

En viales para HPLC se colocaron, por triplicado, 1000 μ L de un estándar de 5 mg/L de NP en MeOH, junto con: 1) 200 μ L del extracto de *P. ostreatus* (N o D); 2) En el caso de *T. trogii* se colocaron 100 μ L (N o D) y se adicionaron 100 μ L de agua MilliQ. Luego se repitió esto reemplazando el estándar de NP por MeOH puro, se agregó un control abiótico de NP más agua (1000 μ L + 200 μ L) y controles de contaminación basal (blancos) de NP, que incluyeron MeOH más agua (1000 μ L + 200 μ L) y MeOH más extractos N o D (1000 μ L + 200 μ L extracto de *P. ostreatus* o 1000 μ L + 100 μ L de extracto de *T. trogii* + 100 μ L agua MilliQ). La tabla 6 muestra el esquema de preparación de los viales.

Tabla 6: Preparación de viales para cuantificar la degradación de NP por HPLC (incubación en solvente orgánico). La primera fila corresponde al control abiótico del análisis, la segunda y tercera filas corresponden a los análisis de degradación y controles de actividad enzimática, y las últimas filas representan los blancos de NP. NP: estándar de NP 5 mg/L en metanol; PO: *P. ostreatus*; TT: *T. trogii*; N: extracto nativo; D: extracto desnaturalizado.

| NP (μL) | MeOH (μL) | H ₂ O (μL) | PO N o D (μL) | TT N o D (μL) | Total (μL) |
|---------|-----------|-----------------------|---------------|---------------|------------|
| 1000 | - | 200 | - | - | 1200 |
| 1000 | - | - | 200 | - | 1200 |
| 1000 | - | 100 | - | 100 | 1200 |
| - | 1000 | 200 | - | - | 1200 |
| - | 1000 | - | 200 | - | 1200 |
| - | 1000 | 100 | - | 100 | 1200 |

Cada uno de los viales fue cerrado herméticamente, agitado en vortex a 2500 rpm durante 5 segundos y finalmente puesto en baño de agua a 30 °C durante 24 o 96 h, según correspondiera. Cumplido el tiempo de incubación los viales fueron nuevamente agitados en vortex a 2500 rpm durante 5 segundos, se les cambió el septo hermético a uno del tipo precortado, apropiado para la inyección, y se los midió por HPLC. Para cuantificar el NP remanente post-incubación se construyó una curva de calibración de NP en MeOH con estándares de 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L.

4.5.4. Degradación de NP mediada por enzimas fúngicas - incubación en agua: cuantificación por HPLC

Se repitió el ensayo manteniendo las condiciones de incubación y los controles de la sección anterior, sustituyendo el MeOH por H₂O. Se empleó la SM (NP 1000 mg/L en metanol) de manera tal que al concluir con los agregados de H₂O, extracto enzimático y SM, la concentración final de NP fuera de 5 mg/L, encontrándose el analito en un medio netamente acuoso. La tabla 7 muestra el esquema de preparación de los viales.

Tabla 7: Preparación de viales para cuantificar la degradación de NP por HPLC (incubación en medio acuoso), la primera fila corresponde al control abiótico del análisis, la segunda y tercera filas corresponden a los análisis de degradación y controles de actividad enzimática, y las últimas filas representan los blancos de NP. SM: estándar de NP 1000 mg/L en metanol; PO: *P. ostreatus*; TT: *T. trogii*; N: extracto nativo; D: extracto desnaturalizado.

| SM (μL) | MeOH (μL) | H ₂ O (μL) | PO N o D (μL) | TT N o D (μL) | Total (μL) |
|---------|-----------|-----------------------|---------------|---------------|------------|
| 50 | - | 1150 | - | - | 1200 |
| 50 | - | 950 | 200 | - | 1200 |
| 50 | - | 1050 | - | 100 | 1200 |
| - | 50 | 1150 | - | - | 1200 |
| - | 50 | 950 | 200 | - | 1200 |
| - | 50 | 1050 | - | 100 | 1200 |

La cuantificación del NP remanente post-incubación en medio acuoso se realizó construyendo una curva de calibración a partir de la SM y, por dilución en agua, se obtuvieron los estándares de NP de 1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L y 10 mg/L.

4.6. Selección y estudio de materiales para microcosmos

4.6.1 Muestreo del suelo y hojarasca

Se colectó suelo de las inmediaciones del Edificio Tandar del Centro Atómico Constituyentes (CAC) hasta una profundidad máxima de 20 cm. Se tamizó a través de una malla de 2 mm y se guardó a 4 °C en oscuridad hasta posteriores caracterizaciones. La hojarasca se encontraba en las adyacencias de la zona de muestreo del suelo y fueron principalmente hojas secas de álamo (*Populus spp.*, figura 18 A) y hojas secas de ciprés calvo (*Taxodium distichum*, figura 18 B); las mismas se molieron (figura 18 C) y homogeneizaron en relación 3,5:1, respectivamente.

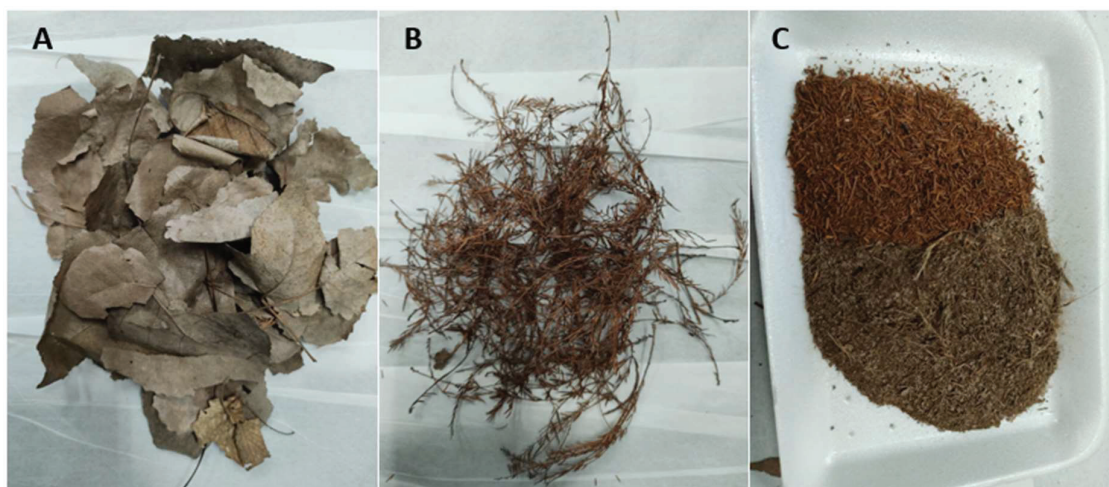


Figura 18: Hojarasca muestreada para los ensayos de microrremediación. (A) - Hojas secas de álamo. (B) - Hojas secas de ciprés calvo. (C) - Componentes A y B molidos, previo a su homogeneización.

4.6.2 Caracterización del suelo

4.6.2.1 Humedad

Se secó un pesafiltros en estufa por 30 min y se dejó enfriar para pesarlo (*tara*). Luego se pesó 1 g de suelo en el pesafiltro (*muestra*) y se secó en estufa a 105 °C durante 2 h, se dejó enfriar en un desecador por 15 min y se pesó el conjunto (*final*).

El porcentaje de humedad se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = 100 - \frac{(\text{final-tara}) \times 100}{\text{muestra}}$$

El valor informado de humedad es el promedio de 3 determinaciones.

4.6.2.2 pH

Se secaron 20 g de suelo durante 4 horas en estufa a 40 °C y luego se dispusieron en un vaso de precipitados de 100 ml. A esto se agregaron 50 mL de agua milliQ el conjunto se agitó por 5 min y se filtró a través de papel Whatman N° 1. Al filtrado obtenido se le midió el pH en un pHmetro digital calibrado (Cole Palmer, mod. 05669-20). Se informó el promedio de 3 determinaciones.

4.6.2.3 Capacidad de campo

Se dispusieron 30 g de suelo, que constituyeron la muestra húmeda (*muestra(h)*), en un embudo con un tapón de algodón previamente tarado (*tara*). Se agregó agua destilada hasta inundar el suelo, se dejó drenar el exceso de agua y se pesó todo el conjunto (*final*).

Se realizó un blanco del tapón de algodón a fin de determinar el peso de agua retenida por el mismo y así descontarlo del cálculo (*blanco*).

La capacidad de campo fue calculada como la masa de agua retenida por el suelo, descontando la humedad obtenida en el punto 3.6.1, por gramo de suelo seco, según la siguiente fórmula:

$$CC = \frac{\text{final} - \text{tara} - \text{blanco} - \text{muestra(s)}}{\text{muestra(s)}}$$

Donde CC es la capacidad de campo, y *muestra(s)* es la equivalencia en peso seco de la *muestra(h)* aplicando el cálculo obtenido en la determinación de humedad. La CC informada es el promedio de 3 determinaciones

4.6.3. Acondicionamiento de muestras de suelo

En dos bandejas de vidrio de 40 cm x 25 cm x 6 cm (largo, ancho y altura, respectivamente) se colocó una capa de suelo de 3 cm (figura 19). Los suelos fueron impregnados ya sea con agua destilada (*blanco*), o con una solución acuosa de 4 mg/L de NP (*NP*). Ambas bandejas fueron regadas periódicamente cada 48/72 h manteniendo una humedad cercana al 60 % de la CC durante 45 días y dejadas en el exterior a resguardo de la luz solar.



Figura 19: Bandejas de vidrio conteniendo el suelo muestreado. A la izquierda, suelo humectado con agua destilada; a la derecha, suelo embebido con solución acuosa de NP 4 mg/L.

4.6.4. Enriquecimiento del suelo con NP

Se tomó una porción de suelo *blanco* y otra de suelo *NP*; el *blanco* fue embebido con MeOH, y el *NP* fue enriquecido con el agregado de SM 1000 mg/L NP en MeOH, para obtener una concentración final en el suelo de 100 mg de NP por kg de suelo seco (mg/kg_{SS}). Ambas porciones se dejaron durante 24 h bajo campana hasta la evaporación total del MeOH.

4.6.5. Micorremediación

Se utilizaron como reactores frascos de vidrio de 6,5 cm de diámetro y 8 cm de altura con tapa plástica. El total de suelo empleado fue aproximadamente un 15 % del volumen del reactor y la humedad se mantuvo en un 60 % de la CC, mediante el agregado de agua destilada en forma de spray, de acuerdo con la diferencia de peso entre una semana y otra. Se confeccionaron 2 conjuntos experimentales: el primero tuvo el suelo *blanco* mezclado con suelo embebido en MeOH, en una relación 9 a 1 respectivamente, y fue empleado como control de contaminación basal de NP, denominado BCO_{MeOH}. El segundo conjunto, fue dispuesto con suelo *NP* homogeneizado con la porción enriquecida en 100 mg/kg_{SS} de NP, denominado NP_{SS}, respetando la relación anterior.

Para poner a prueba las distintas estrategias de micorremediación (atenuación natural (AN), bioaumentación (B) y bioaumentación estimulada (BE)) se dispusieron las configuraciones mostradas en la tabla 8:

Tabla 8: Configuración de microcosmos para cada grupo experimental. **Control:** determinación basal de NP. **AN:** estrategia de atenuación natural. **B:** estrategia de bioaumentación. **BE:** estrategia de bioaumentación estimulada. **NP:** Suelo acondicionado con una solución 4 mg/L de NP. **NPss:** Suelo NP suplementado con SM, con concentración final de NP 100 mg/kgss.

| Tratamiento | Determinación | Blanco | BCO _{MeOH} | NP | NP _{ss} | Hojarasca (g) | Hongo |
|-------------|---------------|--------|---------------------|----|------------------|---------------|---------|
| A | Control | 9 | 1 | - | - | - | - |
| B | Control | 9 | 1 | - | - | - | 5 tacos |
| C | Control | 9 | 1 | - | - | 1 | 5 tacos |
| D | AN | - | - | 9 | 1 | - | - |
| E | B | - | - | 9 | 1 | - | 5 tacos |
| F | BE | - | - | 9 | 1 | 1 | 5 tacos |

El agregado de *T. trogii* tanto para B como para BE, se realizó tomando 5 tacos de agar miceliado de 7 mm de diámetro del borde de una colonia incubada en medio MEA a 25 °C. Adicionalmente, para el tratamiento BE se agregó 1 g de hojarasca.

Cada uno de los tratamientos fue preparado por triplicado, para ser analizados luego de 14 ó 28 días de incubación a 20 °C en oscuridad (figura 20). La tapa plástica fue colocada con el fin de disminuir la evaporación. No fue cerrada a presión para permitir el intercambio gaseoso del sistema.



Figura 20: Microcosmos puestos en incubación a 20 °C en oscuridad. Se encuentran ambos grupos de análisis, y el agua destilada empleada en mantener la humedad requerida semanalmente.

Transcurridos los períodos de incubación, cada microcosmos fue homogeneizado mecánicamente mediante varilla de vidrio y conservado en freezer a -20 °C hasta posteriores análisis.

4.7. Análisis de microcosmos

4.7.1. Extracción de NP del suelo

Se colocó 1 g de suelo seco en un tubo de ensayo, se adicionaron 5 mL de MeOH y se agitó en vortex a 5000 rpm por 30 segundos. Luego se sonicó por 20 min y se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se colocó en un matraz aforado de 25 mL. Se repitieron estos pasos 2 veces más, modificando el tiempo del último ciclo de sonicación a 5 min. Las tres alícuotas de sobrenadante se

unificaron en el mismo matraz y se llevaron a 25 mL con MeOH. Se realizaron dos réplicas por cada extracción.

4.7.2. Análisis de degradación de NP en suelo

Se inyectaron en el HPLC 10 µL de cada uno de los extractos metanólicos por duplicado, empleando detección de fluorescencia. Las áreas obtenidas fueron cuantificadas mediante la construcción de una curva de calibración compuesta por estándares de NP en MeOH de 10, 50, 100, 200 y 500 µg/L, que se inyectaron por duplicado.

4.8. Análisis de datos

El análisis de la varianza (ANOVA) junto con el test de Tukey de múltiples comparaciones cuya significancia estadística fue establecida como $p < 0.05$, fue llevado a cabo con el software GraphPad Prism versión 8.0.2 (263) para comparar los valores obtenidos entre todos los tratamientos en los ensayos de degradación de NP por extractos enzimáticos en MeOH o agua, y para el análisis del NP remanente en los microcosmos.

Resultados

5.1. Prospección bibliográfica

Según los criterios de selección propuestos, se identificaron 10 potenciales candidatos de los cuales se seleccionaron los 3 disponibles en el cepario de BAFcult (Tabla 9).

Tabla 9: Cepas candidatas a ser evaluadas como agentes de degradación de NP. Estas fueron analizadas en diversos soportes de laboratorio e incluso en suelos, degradando múltiples sustratos y compuestos. (§) Cepas seleccionadas en el presente trabajo para caracterizar y evaluar el potencial de degradación de los extractos fúngicos. **EDCs:** Disruptor endócrino químico. **PAHs:** Hidrocarburos poliaromáticos. **NP:** nonilneol.

| Organismo | Sistema de estudio | Escala | Analito | Referencia |
|--|----------------------|-------------|---------------|----------------------------------|
| <i>Ganoderma lucidum</i> | Suelo | Campo | Hojarasca | Geethanjali & Jayashankar (2016) |
| <i>Irpex lacteus</i> | Líquido | Laboratorio | Alquifenoles | Moon & Song (2012) |
| <i>Marasmius quercophilus</i> | Líquido | Laboratorio | Alquifenoles | Farnet <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (§) | Líquido | Laboratorio | PAHs | Abo-State <i>et al.</i> (2021) |
| <i>Phlebia radiata</i> | Semisólido / Líquido | Laboratorio | Lignocelulosa | Mattila (2020) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | Suelo | Laboratorio | PAHs | Byss <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> (§) | Líquido | Laboratorio | EDCs | Křesinová <i>et al.</i> (2018) |
| <i>Punctularia strigosozonata</i> | Sólido | Laboratorio | PAHs | Young <i>et al.</i> (2015) |
| <i>Trametes trogii</i> (§) | Líquido | Laboratorio | PAHs | Levin <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Trametes trogii</i> | Líquido | Laboratorio | Colorantes | Yang <i>et al.</i> (2020) |
| <i>Trametes versicolor</i> | Líquido | Laboratorio | NP | Soares <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Trichaptum bifforme</i> | Sólido | Laboratorio | Colorantes | Eshghi <i>et al.</i> (2011) |

Una de las cepas seleccionadas fue *P. chrysosporium*, que es el hongo modelo de estudio de la pudrición blanca (Kirk 1988); luego *P. ostreatus*, previamente reportado en la remoción de PAHs y alquifenoles y finalmente *T. trogii*, cuya característica principal es que secreta elevados niveles de lacasas y ha sido previamente evaluado para la remoción de PAHs y colorantes (figura 21, A - C).



Figura 21: (A) - Micelio de *P. chrysosporium* (BKM-F 1767) colonizando hojarasca. (B) – Basidioma de *P. ostreatus* cuya morfología semejante a las ostras le otorga su nombre característico. (C) - Esporocarpio de *T. trogii* en forma de estantería.

5.2. Desarrollo de extractos fúngicos

5.2.1. Ensayos de caracterización de cepas fúngicas en medio Galhaup

Las curvas de crecimiento para las tres cepas describieron un comportamiento similar, ya que a medida que aumenta la biomasa disminuyen los azúcares (figura 22, A-C).

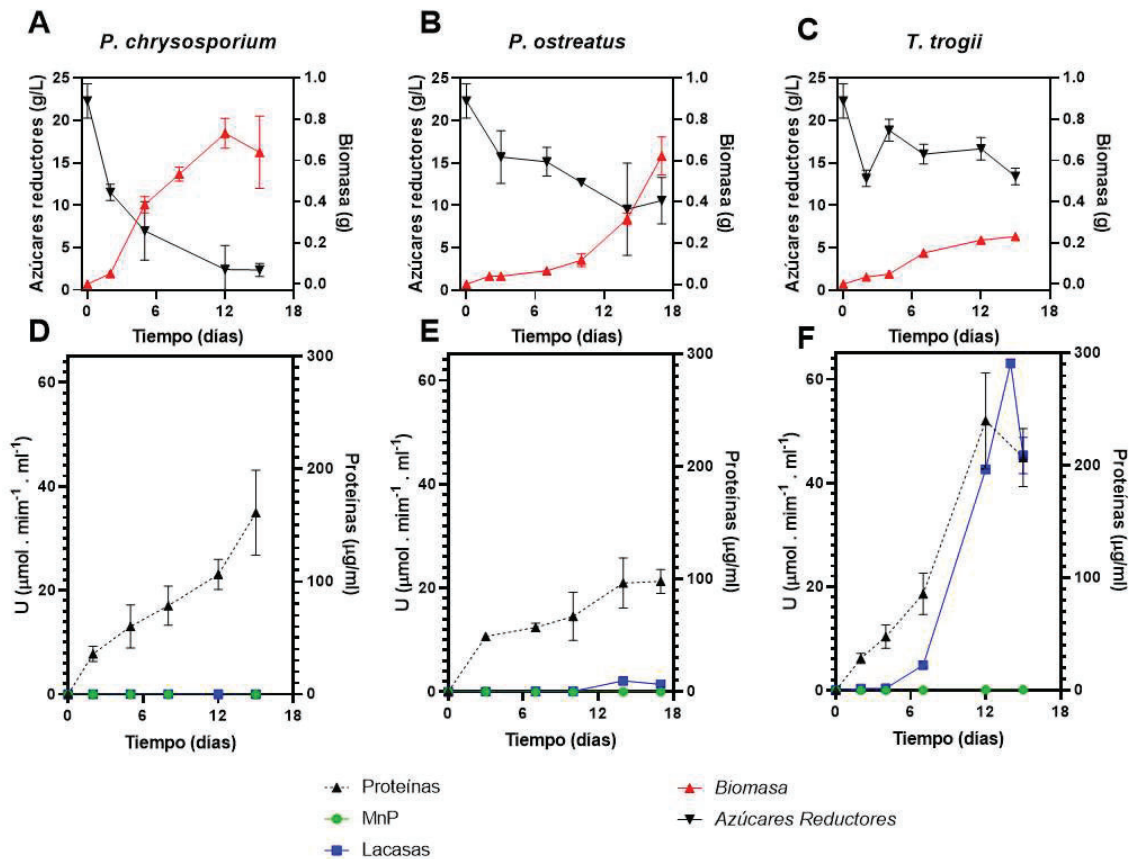


Figura 22: Caracterización de los extractos enzimáticos de *P. chrysosporium*; *P. ostreatus* y *T. trogii*. **A-C:** Curvas de biomasa y de azúcares reductores. **D-F:** Curvas de actividades *MnP*, lacasas y proteínas totales.

La mayor biomasa fue obtenida en el cultivo de *P. chrysosporium*, seguida de *P. ostreatus* y por último *T. trogii*; el mayor consumo de azúcares se ordenó de la misma forma.

P. chrysosporium presentó las actividades enzimáticas más bajas, siendo la de *MnP* casi nula (figura 22 D); la actividad lacasa presentó su máximo valor en el octavo día de incubación (0,032 U) y a partir de allí los valores disminuyeron, coincidiendo con la entrada a la fase de muerte. Los niveles de proteínas tuvieron su valor máximo al finalizar el último período de colección de los extractos (161 μg/mL). *P. ostreatus* - al igual que *P. chrysosporium*- no tuvo actividad *MnP*, pero presentó una actividad lacasa de 1,3 U en su pico máximo (figura 22 E), siendo ésta unas 40 veces más alta respecto del hongo modelo de estudio de pudrición blanca. Las proteínas

cuantificadas por el método de Bradford acusaron un valor de 98 µg/mL, un 40 % menos de lo medido con *P. chrysosporium*. Finalmente, *T. trogii* fue el que menos biomasa desarrolló (alrededor de un 70 % menos que *P. chrysosporium*); sin embargo, sus títulos máximos de *MnP* y lacasa fueron de 0,11 U y 53 U respectivamente (figura 22 F), unas 1650 veces más en lacasa respecto de *P. chrysosporium*. *T. trogii* fue además la cepa que presentó los mayores niveles de proteínas en el extracto fúngico (240 µg/mL).

5.3. Puesta a punto de HPLC

5.3.1. Optimización de la separación

La tabla 4 describe las condiciones experimentales ensayadas en la puesta a punto de la técnica:

Tabla 10: Distintas condiciones experimentales (flujo y composición de fase móvil; columna empleada) y resultados (tiempo de retención del analito) durante la puesta a punto del método de cuantificación de NP por HPLC.

| Método | Flujo (µL/min) | % Agua | % Metanol | t NP (min) | Columna |
|--------|----------------|--------|-----------|------------|---|
| 1 | 500 | 0 | 100 | 0,55 | Hypersil Gold C18 (50 mm x 2.1 mm x 3 µm) |
| 2 | 500 | 25 | 75 | 9,75 | Hypersil Gold C18 (50 mm x 2.1 mm x 3 µm) |
| 3 | 750 | 30 | 70 | 7,15 | Hypersil Gold C18 (50 mm x 2.1 mm x 3 µm) |
| 4 | 1000 | 30 | 70 | 5,45 | Phenyl 1100A C6 (100 mm x 4,6 mm x 3 µm) |
| 5 | 1000 | 10 | 90 | 2,05 | Supelco C8 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) |
| 6 | 1000 | 20 | 80 | 2,55 | Supelco C8 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) |
| 7 | 1000 | 25 | 75 | 3,05 | Supelco C8 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) |
| 8 | 1000 | 30 | 70 | 4,03 | Supelco C8 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) |
| 9 | 1000 | 35 | 65 | 5,70 | Supelco C8 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) |
| 10 | 1350 | 32 | 68 | 3,35 | Supelco C8 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) |

De las 3 columnas ensayadas, la que cumplió con los objetivos preestablecidos fue la Supelco C8. Todos los análisis posteriores fueron realizados con esta columna y bajo las condiciones instrumentales detalladas en el método número 10.

Se seleccionó para la cuantificación del analito la longitud de onda de 223 nm, ya que presentó una buena separación del frente de solvente y una relación señal/ruido adecuada (figura 23).

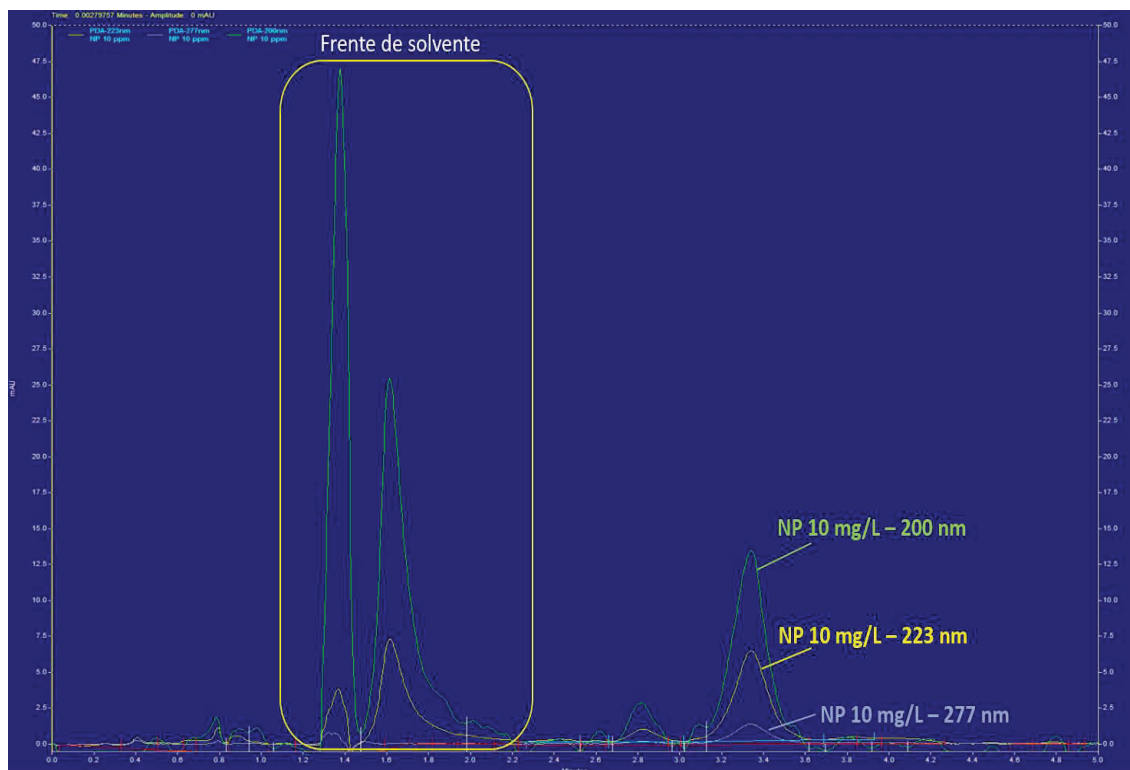


Figura 23: Comparativa de los cromatogramas de una inyección de estándar de 10 mg/L de NP en MeOH obtenidos a 200, 223 y 277 nm.

Al realizar las inyecciones por duplicado para construir la curva de calibración no fue posible detectar el pico de NP para el patrón de 0,1 mg/L. El estándar de 0,5 mg/L sí pudo ser detectado al nivel de línea de base (figura 24), estableciéndose esta concentración como límite de detección. En base a esto se estableció el límite de cuantificación en 1 mg/L. El resto de las inyecciones dieron cromatogramas acordes a las concentraciones analizadas (figura 25); además fue posible visualizar la presencia de los isómeros -para-, -orto y -meta (se tomó como referencia el trabajo de Babay (2009), aunque en ese caso el orden de elución de los isómeros se encuentra invertido debido a que el análisis se realizó en fase normal). Al procesar las áreas se obtuvo una recta con un R^2 : 0,9991 (figura 26).

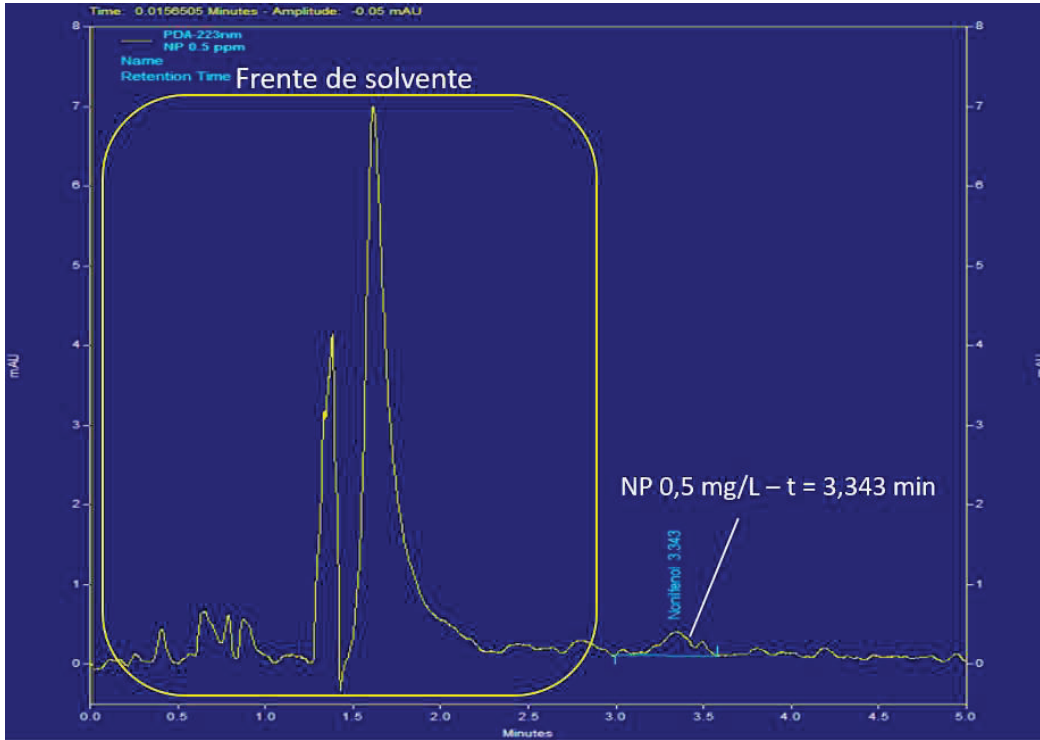


Figura 24: Cromatograma de un estándar 0,5 mg/L de NP en MeOH. Se aprecia la separación del pico de NP con su tiempo de retención del frente de solvente.

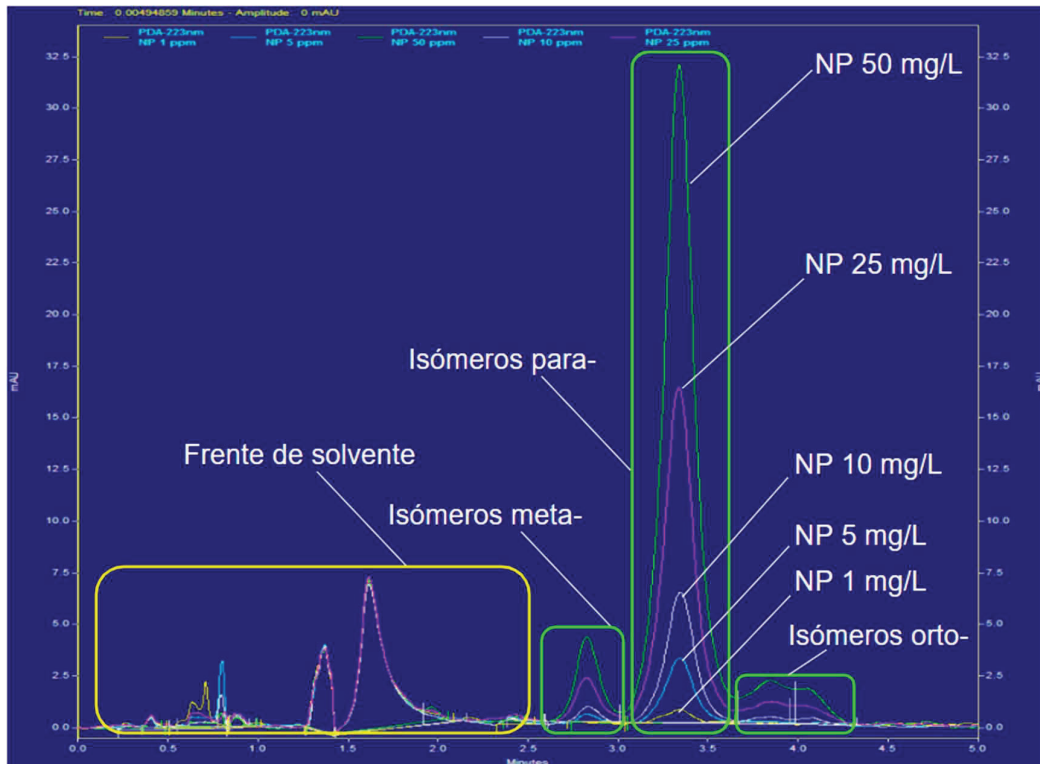


Figura 25: Cromatogramas obtenidos para los estándares de NP de 1, 5, 10, 25 y 50 mg/L en MeOH a 223 nm. Se distinguen los distintos isómeros y la separación del frente de solvente incluso en las concentraciones más altas.

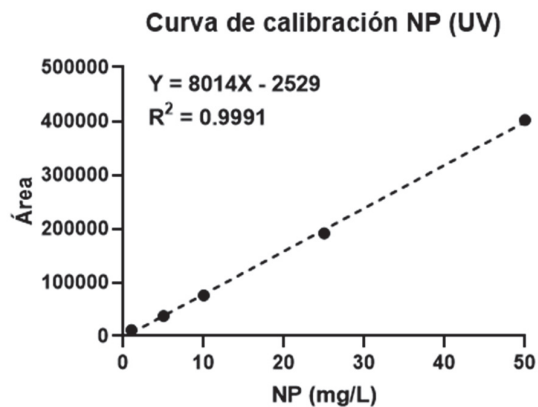


Figura 26: Curva de calibración de NP para las áreas cromatográficas en función de la concentración de cada estándar.

5.3.2. Detección de fluorescencia

El método seleccionado luego de la puesta a punto fue el número 4 (ver Tabla 5 en la sección 4.5.2.), ya que nos permitió tener una excelente relación señal-ruido y no se puso en juego la vida útil de la lámpara de xenón y del tubo fotomultiplicador.

Con este método se construyeron dos curvas de calibración de NP partiendo de la SM. La primera curva constó de patrones de 0,1, 0,5, 1, 2 y 5 mg/L (para la determinación de NP inicial), mientras que la segunda se construyó a partir de patrones de 10, 50, 100, 200, 500 µg/L (para la determinación de NP remanente), que en ambos casos fueron inyectados por duplicado.

Con la detección de fluorescencia (DF) fue posible detectar y cuantificar el estándar de menor concentración de NP, de 10 µg/L, tomándose este como límite de cuantificación de NP en MeOH. La DF bajo estas condiciones analíticas resultó al menos dos órdenes de magnitud más sensible que la detección UV. En las figuras 27 y 28 se comparan los cromatogramas obtenidos para un estándar de 500 µg/L con ambos módulos de detección. Como se observa en la figura 29, con la DF es posible distinguir los isómeros en configuración meta- y orto- del NP incluso para una concentración tan baja como 10 µg/L.

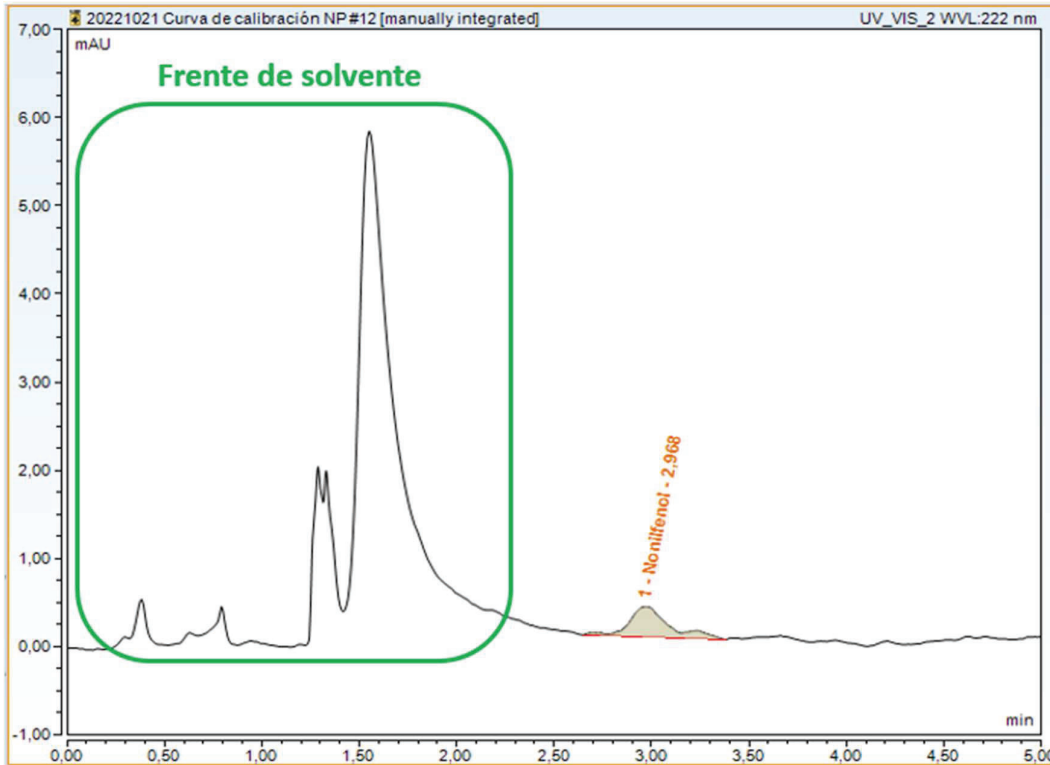


Figura 27: Cromatograma de un estándar 500 µg/L de NP en MeOH con detección UV obtenido a través del software Chromeleon 7.3.1.

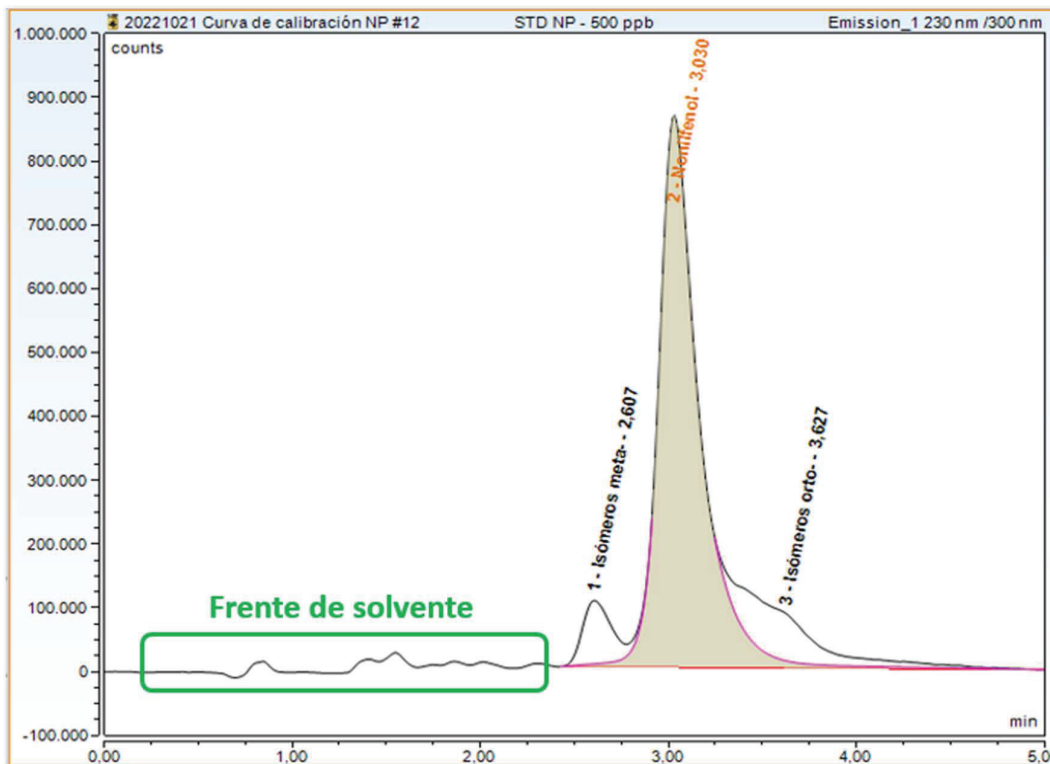


Figura 28: Cromatograma de un estándar 500 µg/L de NP en MeOH con DF obtenido a través del software Chromeleon 7.3.1., es posible distinguir las tres clases de isómeros.

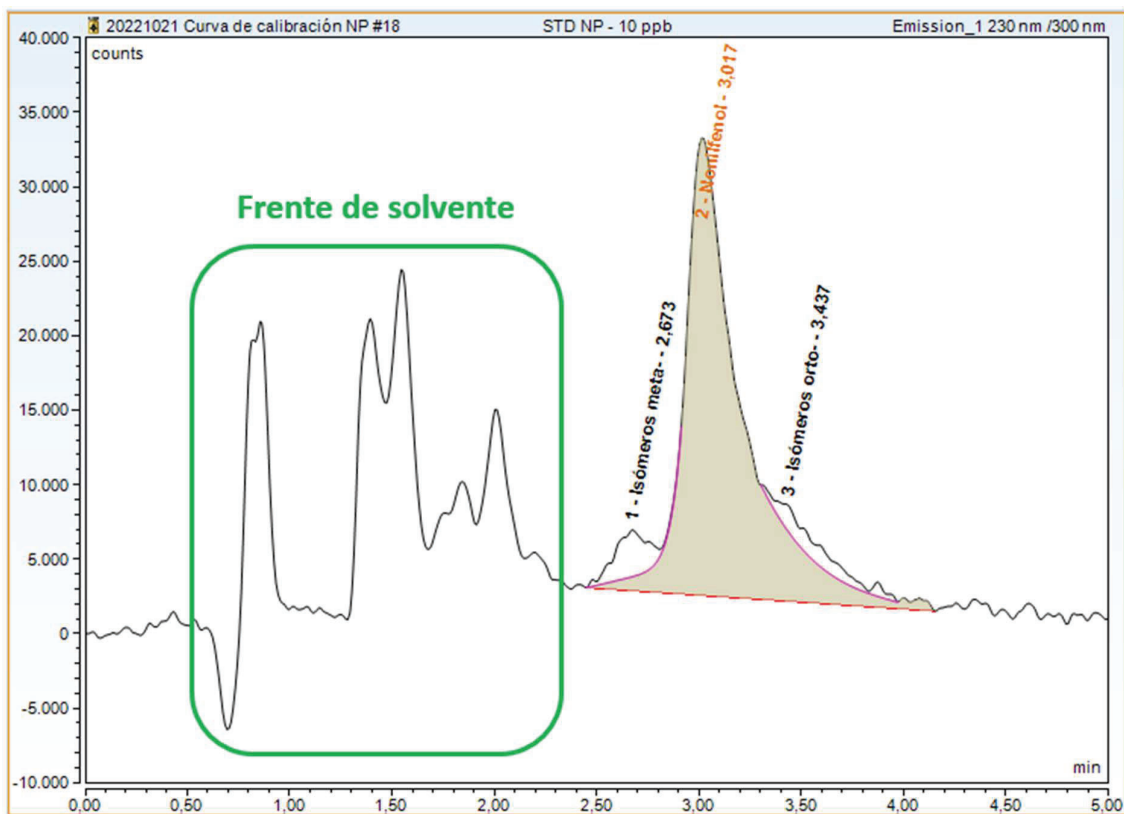


Figura 29: Cromatograma de un estándar 10 µg/L de NP en MeOH con DF

Ambos grupos de cromatogramas para las curvas de calibración (NP inicial y NP remanente, figuras 30 y 31) dieron correlaciones cercanas a 1, lo que deja ver la robustez del los método analítico en ambos rangos de trabajo (figuras 32 A y B).

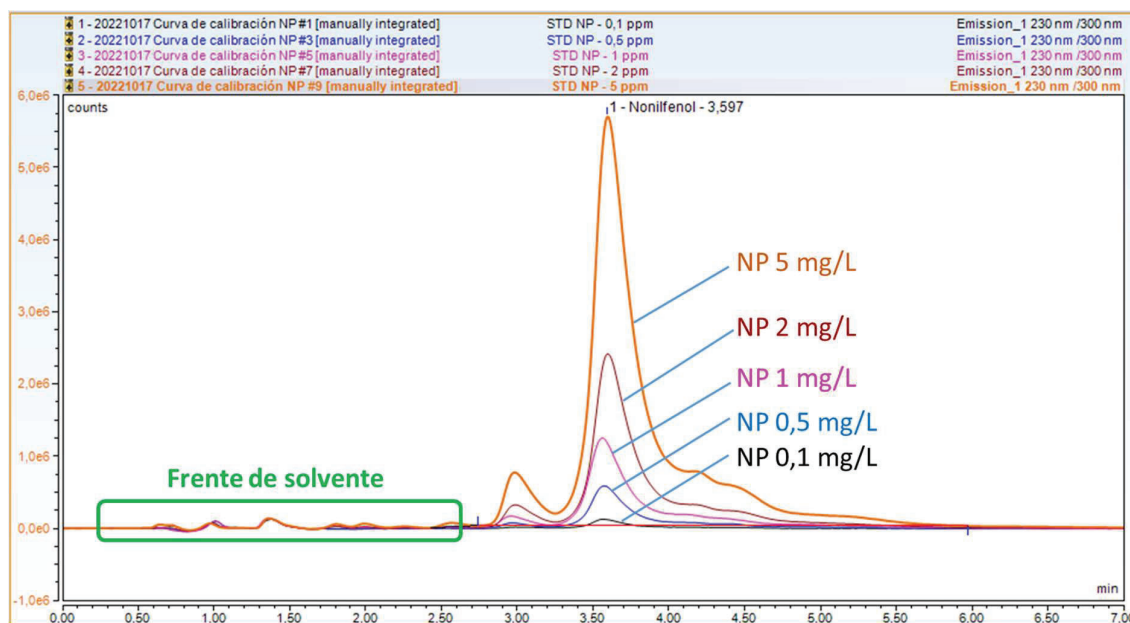


Figura 30: Cromatogramas obtenidos por DF para los estándares de 0,1, 0,5, 1, 2 y 5 mg/L de NP en MeOH necesarios para la construcción de la curva de calibración de NP inicial.

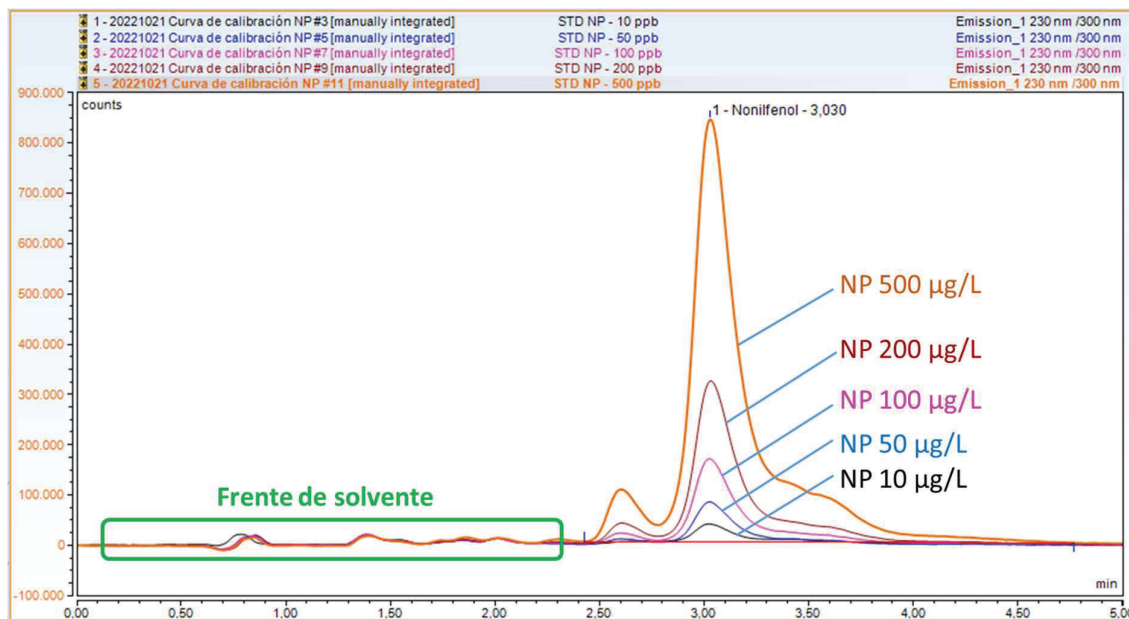


Figura 31: Cromatogramas obtenidos por DF para los estándares de 10, 50, 100, 200 y 500 µg/L de NP en MeOH necesarios para la construcción de la curva de calibración de NP residual.

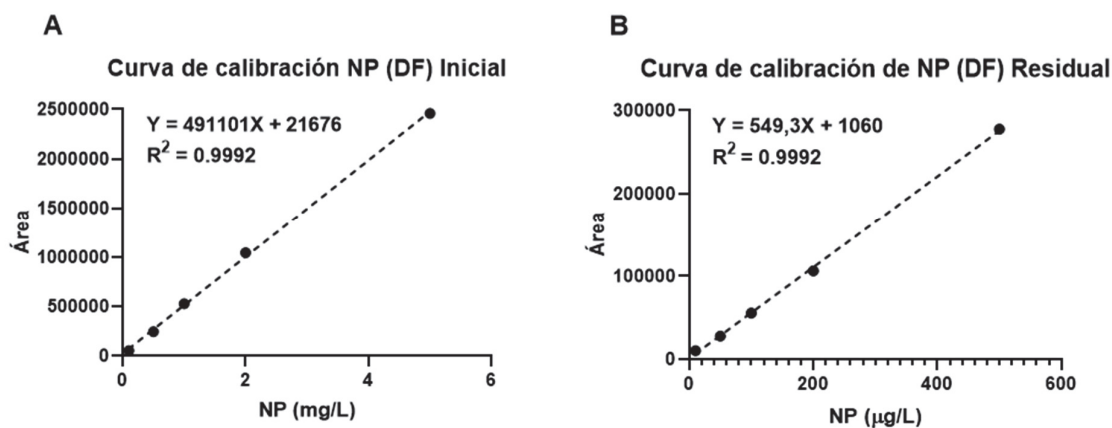


Figura 32: Curvas de calibración de NP (A) – Determinación de NP inicial. (B) - Determinación de NP remanente.

5.4. Degradación enzimática del NP: cuantificación por HPLC

Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas respecto al control abiótico (NP 5 mg/L) a las 24 h y a las 96 h, tanto en medio metanólico como en medio acuoso (figura 33 A-D).

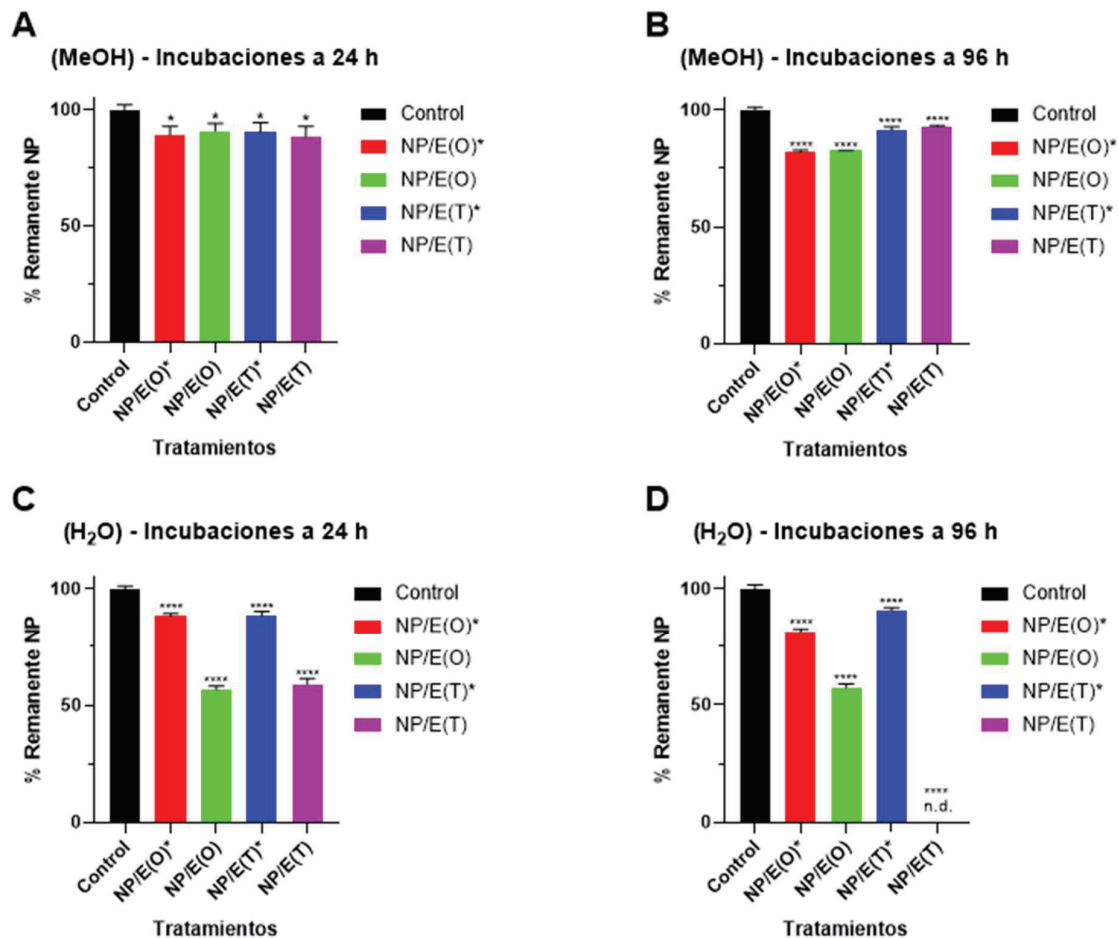


Figura 33: Análisis de la remoción de NP luego de incubar los extractos enzimáticos en solución metanólica a 24 y 96 h (A y B, respectivamente) y en medio acuoso a 24 y 96 h (C y D, respectivamente). **Control:** estándar de NP 5 mg/L. **NP/E(O)*:** Incubación del extracto de *P. ostreatus* desnaturalizado con NP. **NP/E(O):** Incubación del extracto de *P. ostreatus* nativo con NP. **NP/E(T)*:** Incubación del extracto de *T. troglia* desnaturalizado con NP. **NP/E(T):** Incubación del extracto de *T. troglia* nativo con NP. *: $p < 0.05$. ****: $p < 0.0001$. n.d.: no detectable.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas cuando se compararon los extractos desnaturalizados de ambas cepas tanto en un medio como en otro. Además, tampoco se observó una mejora en la remoción en los extractos nativos en medio orgánico al ser equiparados con los extractos desnaturalizados y nativos en medio acuoso.

En agua, el extracto nativo de *P. ostreatus* removió un 44 % de NP luego de 24 h de incubación (figura 33 C), mientras que alcanzadas las 96 h el valor fue de 43 % (figura 33 D). Por el lado del extracto nativo de *T. troglia*, el nivel de remoción de NP luego de 24 h fue similar al de *P. ostreatus*, con un valor cercano al 41 % (Figura 31 C); transcurridas las 96 h de incubación, no fue posible detectar el NP (figura 33 D), con lo cual se estimó que la remoción fue de al menos un 99,8 %.

Finalmente, fue posible observar que los extractos nativos en agua removieron más NP que los controles de inactividad enzimática acuosos y que todos los tratamientos en metanol.

A partir de estos datos, fue posible determinar que el extracto nativo de *T. trogii* tuvo mayor capacidad degradativa que el de *P. ostreatus*. Junto al hecho de que haya secretado los mayores niveles de lacasas (figura 22 F) es que se decidió seleccionar *T. trogii* como la cepa candidata a degradar NP en microcosmos en condiciones no axénicas.

5.5. Caracterización del suelo

La tabla 10 resume los resultados obtenidos para cada uno de los ensayos de caracterización del suelo muestreado en el CAC con su respectivo coeficiente de variación (CV).

Tabla 10: Ensayos de caracterización del suelo que será empleado en los ensayos de degradación de NP en condiciones no axénicas en microcosmos.

| Ensayo | Resultado | CV |
|--|-----------|-------|
| Humedad | 23,4 % | 1,4 % |
| pH | 7,4 | 0,5 % |
| Capacidad de campo (g H ₂ O / kg suelo seco) | 839 | 1,6 % |

5.6. Viabilidad de los microcosmos

Pasados los primeros 14 días de incubación, fue posible observar a simple vista que en cada uno de los microcosmos hubo desarrollo biológico. A modo de ejemplo se muestran los biorreactores de los tratamientos de suelo BCO con MeOH, y BCO con MeOH junto con los tacos de *T. trogii* (figuras 34 A y B, respectivamente).

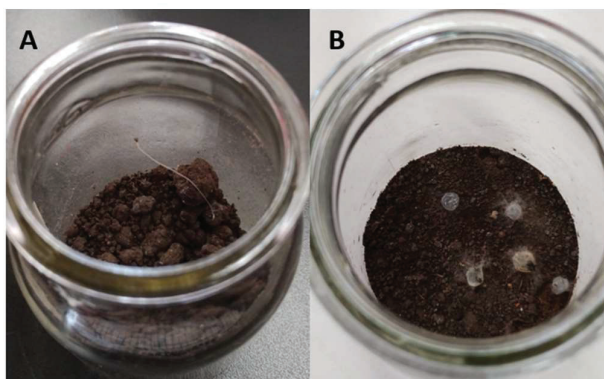


Figura 34: Microcosmos. (A) - Tratamiento del suelo BCO y MeOH, se puede observar crecimiento biológico en el mismo. (B) - Tratamiento del suelo BCO con MeOH e inóculos fúngicos a partir de los cuales se observa desarrollo micelial radial.

A lo largo del experimento fue posible evidenciar un aumento de la biomasa, en todos los tratamientos (figura 35 A-F). *T. trogii* creció en la condición de suelo con NP y sin hojarasca, y en aquellas donde se esperó que la presencia de material lignocelulósico favoreciera el crecimiento del hongo ligninolítico (C: Control de bioaumentación estimulada y F: Bioaumentación estimulada).

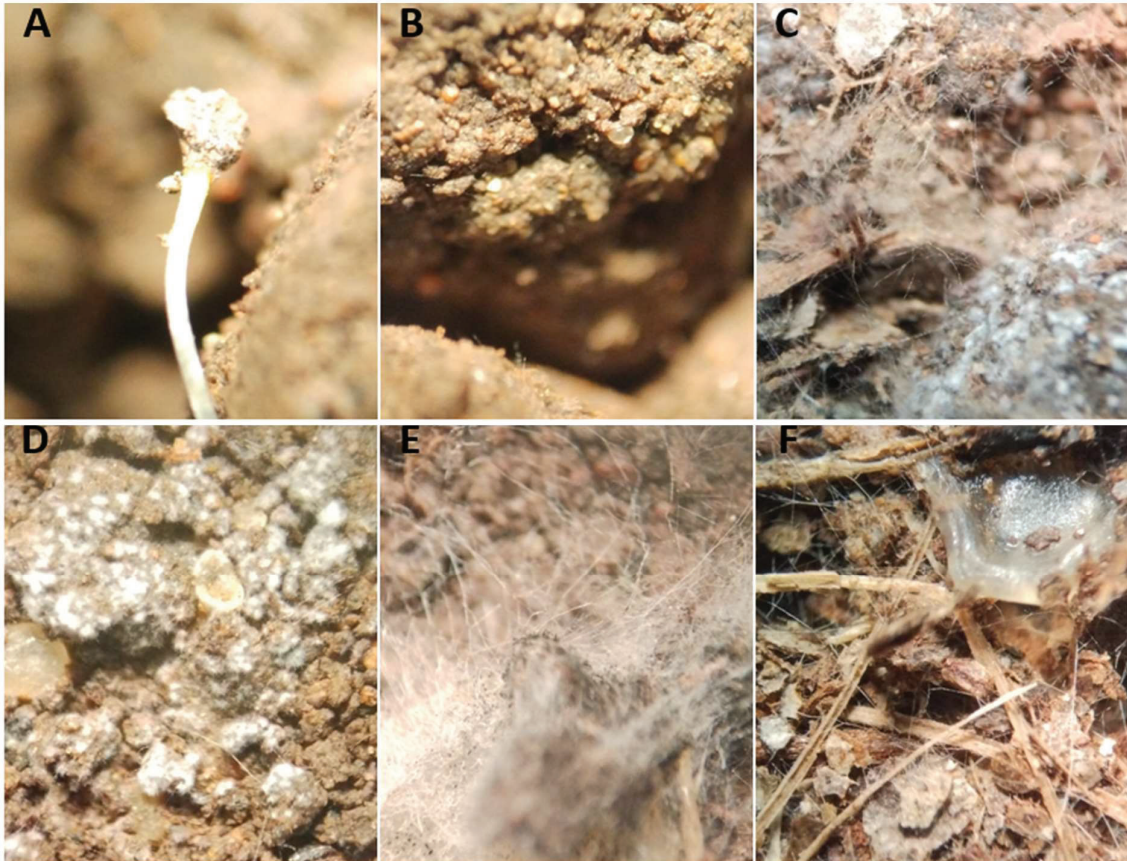


Figura 35: Fotografías del set de 14 días de incubación a 20 °C para los tratamientos A a F (20X). **A-** Control de atenuación natural. **B-** Control de bioaumentación. **C-** Control de bioaumentación estimulada. **D-** Atenuación natural. **E-** Bioaumentación. **F-** Bioaumentación estimulada.

Luego de 28 días de incubación, se observó un desarrollo preponderante de morfología filamentosa radial (figura 36 A-F). El desarrollo biológico de *T. trogii* destaca en los tratamientos B (Control de bioaumentación) y E (Bioaumentación). En los tratamientos C y F (ambos con hojarasca), no se ven, al menos de forma cualitativa, diferencias de crecimiento fúngico en MeOH o en NP.

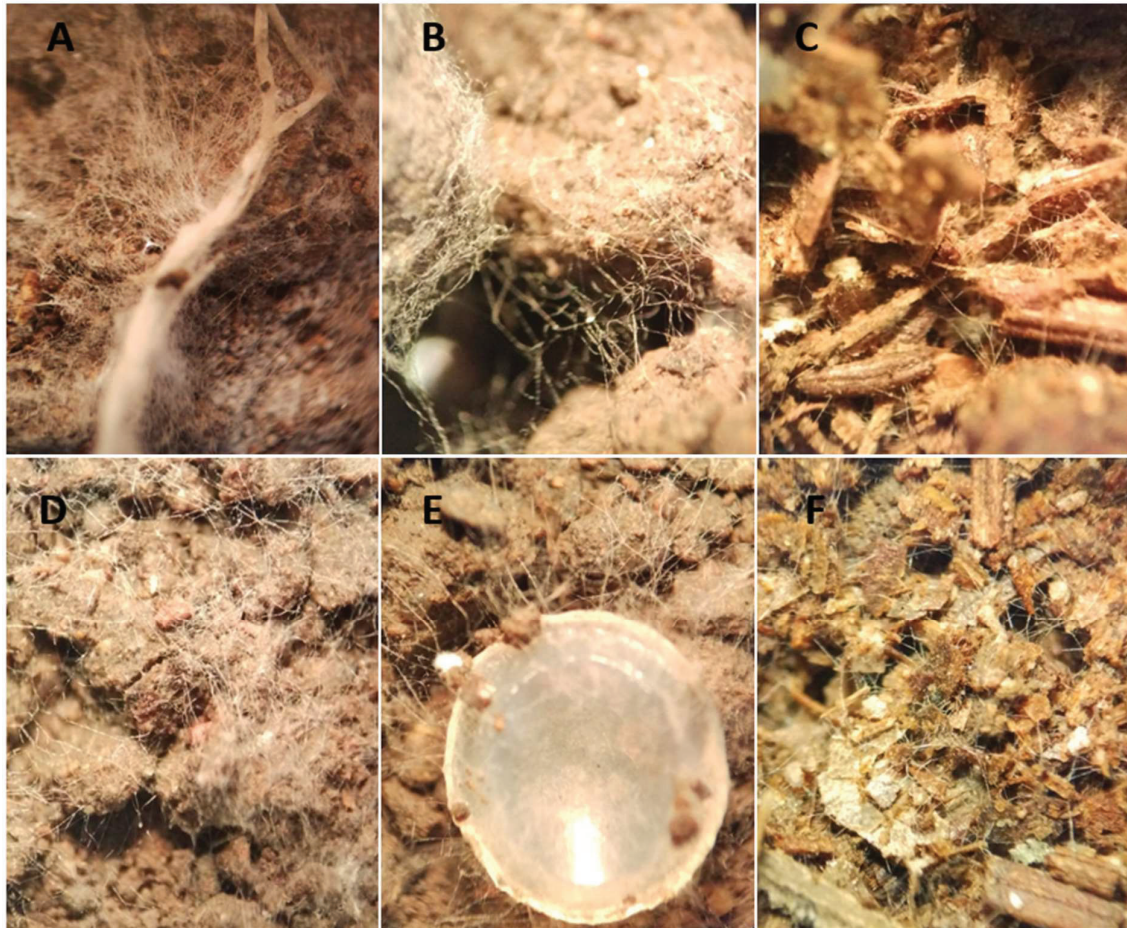


Figura 36: Fotografías del set de 28 días de incubación a 20 °C para los tratamientos A a F (20X). **A-** Control de atenuación natural. **B-** Control de bioaumentación. **C-** Control de bioaumentación estimulada. **D-** Atenuación natural. **E-** Bioaumentación. **F-** Bioaumentación estimulada.

5.7. Análisis de microcosmos

Todos los tratamientos mostraron diferencias significativas con los niveles de NP iniciales (T0, figura 37, $p < 0,0001$). A su vez, hubo diferencias significativas entre la AN versus los tratamientos de B y BE a 14 días ($p < 0,0001$), y se encontraron diferencias significativas al comparar B y BE en el mismo lapso ($p < 0,05$). Los tratamientos a 28 días evidenciaron una mejora en la degradación respecto de aquellos analizados luego de 14 días de incubación ($p < 0,0001$); Por otro lado, no se evidenciaron diferencias significativas al comparar todos los tratamientos entre sí luego de finalizar el experimento.

Extracciones a 14 y 28 días

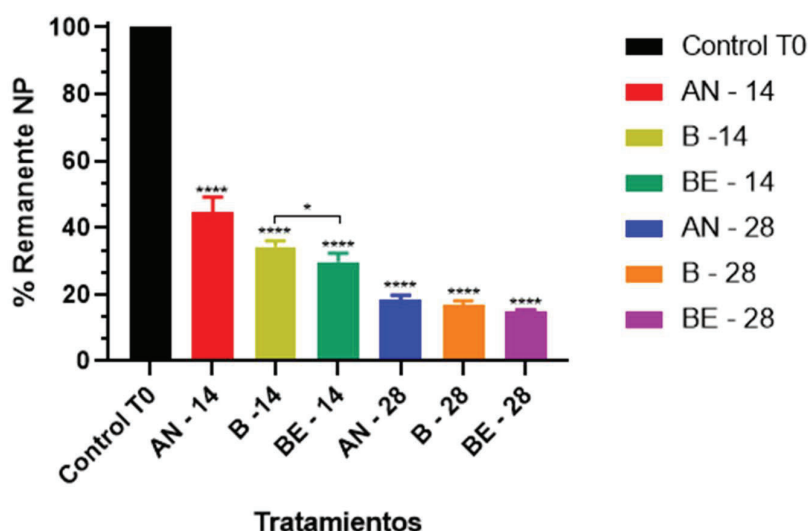


Figura 37: Cuantificación de NP remanente de microcosmos en condiciones no axénicas. Los tratamientos de AN (atenuación natural), B (bioaumentación) y BE (bioaumentación estimulada), fueron incubados por 14 y 28 días a 20 °C. *: $p < 0,05$, ****: $p < 0,0001$.

El análisis de los cromatogramas de los controles para AN y B, no mostraron la presencia de NP en ninguno de los períodos. En los controles de BE fue posible distinguir un pico a nivel de ruido (denominado como Hojarasca - 1) en la ventana del tiempo de retención característica del NP; no obstante, no es posible asegurar la identidad de este compuesto cuyo tiempo de retención es de 2,387 min (figura 38, cromatograma azul).

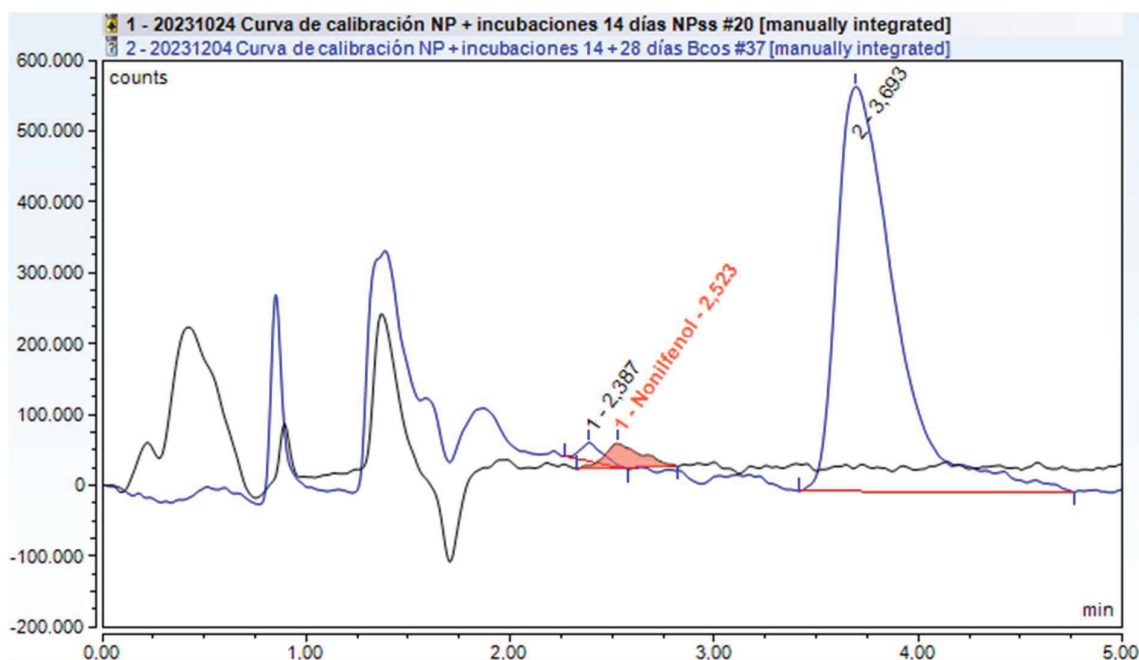


Figura 38: Comparación de cromatogramas del blanco de BE a 14 días (curva azul) versus un patrón de NP 10 ppb (curva negra).

A su vez, en la zona de los 3,7 min fue posible visualizar un pico de gran área (Hojarasca - 2), de identidad desconocida y presuntamente originado en la presencia de hojarasca, que creció con el tiempo de incubación (figura 39).

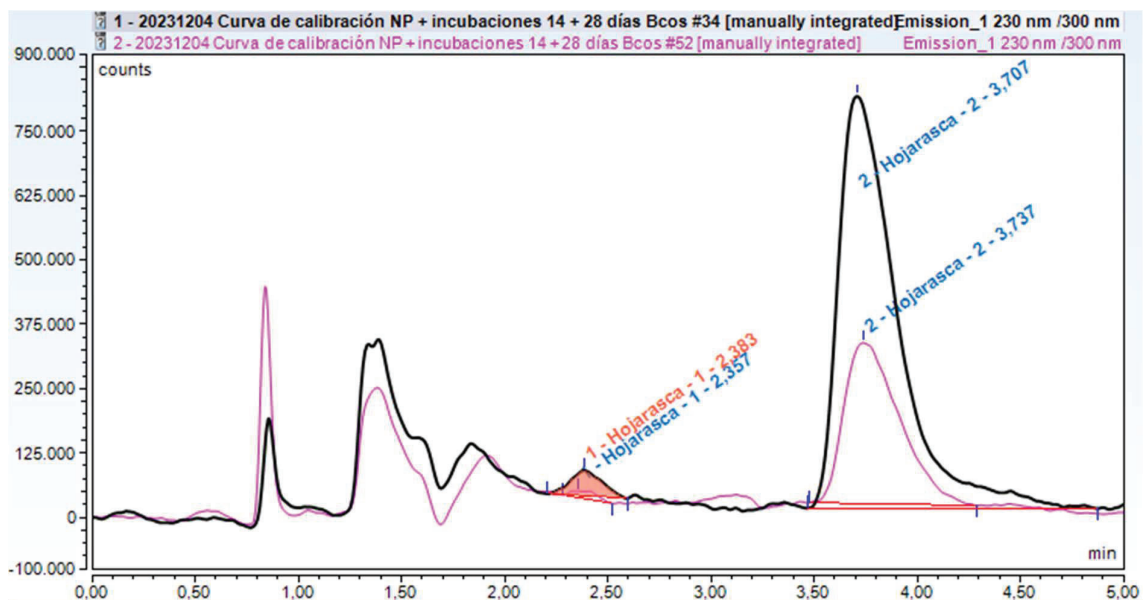


Figura 39: Comparación de cromatogramas del blanco de BE a 14 días (curva negra) versus blanco de BE a 28 días (curva rosa).

Los datos procesados de las incubaciones para cada tratamiento luego de 14 días, mostraron que la B promovió una degradación de NP de un 23 % superior comparado a la AN. Así mismo, el tratamiento BE degradó un 33 % más NP que la AN, e incluso hubo significancia estadística al comparar B contra BE, siendo que este último degradó un 13 % más de NP. Finalizada la incubación a 28 días, los valores de mejora en la degradación de NP en los tratamientos fúngicos disminuyeron al 4 % y 15 % para B y BE, respectivamente, comparada con la AN. No hubo diferencias significativas al comparar B y BE ya que la mejora fue de un 12 %. Todos estos resultados se resumen en la tabla 11.

Tabla 11: Comparación entre las capacidades degradativas de NP para cada tratamiento. Los valores positivos indican que en la comparación el segundo tratamiento es mejor que el primero, por ejemplo: AN vs B, aquí B degrada un 23, % más NP que AN.

| Incubación (días) | Mejora relativa entre tratamientos | | |
|-------------------|------------------------------------|----------|---------|
| | AN vs B | AN vs BE | B vs BE |
| 14 | 23 % | 33 % | 13 % |
| 28 | 4 % | 15 % | 12 % |

Discusión

6.1. Prospección bibliográfica

Es notable la variedad de los trabajos analizados en donde se evalúan las capacidades degradativas *P. chrysosporium* (Tien & Kirk, 1983; Roldan-Carrillo *et al.*, 2001), hongo modelo de estudio de pudrición blanca, seguido por *P. ostreatus* (Adenipekun & Lawal, 2012), hongo que además es ampliamente empleado en la industria gastronómica por sus destacadas características nutricionales, y en la industria medicinal debido a sus propiedades antibacteriales, antivirales, antitumorales, antihipercolesterolémicas, antidiabéticas e inmunomoduladoras (Deepalakshmi & Sankaran, 2014). Se los puede obtener fácilmente y a su vez su cultivo y recolección no presentan mayores dificultades.

Siguen otras especies como *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma lucidum* que expresan lacasas termoestables (Campos *et al.*, 2016) y otras, dentro del género *Trametes*, conocidas por secretar altos niveles de lacasas (Bautista *et al.*, 2015). Si bien otras especies de WRF dan cuenta de características deseables para procesos de biorremediación, *P. chrysosporium* y *P. ostreatus* siguen siendo por lejos las especies más reportadas y utilizadas frente a diversas situaciones como deslignificación (Abdel-Hamid *et al.*, 2013), biorremediación de aguas residuales (Grelska & Noszczyńska, 2020), remoción de metales pesados (Kapahi & Sachdeva, 2017), eliminación de PAHs (Byss *et al.*, 2008), promocionando el gran potencial de estas especies para la micorremediación de suelos o incluso del agua. Es por esto que fueron seleccionadas para el presente trabajo. Por otra parte, si bien no existe un extenso reporte de *Trametes trogii* en micorremediación, su capacidad de producir enzimas ligninolíticas en altos niveles (Levin *et al.*, 2003; 2010) lo convirtió en candidato para el estudio.

6.2. Caracterización de las cepas

Los hallazgos realizados en la caracterización de los extractos enzimáticos en este trabajo son congruentes con la información recabada durante la prospección bibliográfica, tomando en consideración la actividad *MnP*, las curvas de crecimiento, azúcares reductores y proteínas totales. Sin embargo, la actividad lacasa medida en *P. chrysosporium*, reveló que no hubo una mejora en la expresión de las mismas, pese a que el medio de cultivo Galhaup modificado fuera inductor de la expresión de estas últimas. Esto se contrapone con los resultados obtenidos por Rodríguez *et al.*, (1999) en donde reportaron el doble de la actividad aún en medios de cultivo no inductores de la expresión. En comparación con *P. ostreatus* y *T. trogii* los niveles fueron muy bajos, para *P. ostreatus* fueron intermedios y para *T. trogii* muy elevados en sintonía por lo reportado por Levin *et al.* (2003).

Los mayores niveles de proteínas de *T. trogii* son un indicio de una mayor producción de enzimas, entre las cuales podrían encontrarse otras enzimas

ligninolíticas no determinadas en el presente trabajo. Estas podrían contribuir al objetivo de degradar el xenobiótico. No se detectaron actividades de *MnP* ni en *P. chrysosporium* ni en *P. ostreatus*. Si bien *T. trogii* no se caracteriza por tener elevadas actividades *MnP*, durante la idiofase fue capaz de secretar la enzima, aunque en niveles más bajos que los de lacasa.

Por estas razones, se seleccionaron los extractos enzimáticos cuyas actividades Lac y *MnP* acusaron los niveles más altos de actividad; estos se correspondieron con la idiofase de la curva de crecimiento (comienzo de la fase estacionaria), donde se alcanza el máximo de biomasa posible y disminuye el metabolismo primario (fase exponencial, final de la trofofase) para dar paso al metabolismo secundario que es donde se expresan las enzimas de interés.

6.3. Puesta a punto de HPLC

Al realizar la puesta a punto de la técnica de cuantificación de NP por HPLC, la longitud de onda seleccionada para la detección fue la de 223 nm, ya que presentó una relación señal/ruido adecuada, conservando una buena resolución del frente del solvente. Si bien a 270 nm es donde el frente de solvente interfiere menos, ocurre también que la sensibilidad del pico de NP disminuye de forma notoria. Por otro lado, a 200 nm se encuentra la mayor sensibilidad, pero aquí el frente de solvente podría interferir con el pico de NP por solapamiento de áreas en muestras con matrices más complejas. El agregado de la DF, permitió ganar al menos dos órdenes de magnitud en sensibilidad, en comparación a la detección UV.

6.4. Degradación enzimática de NP

Se ha estudiado que la actividad enzimática de diversas lacasas se ve aumentada si las mismas son preincubadas en solventes orgánicos como la acetona, el metanol, el etanol, el dimetilsulfóxido y la N,N-dimetilformamida (Wu *et al.*, 2019). El plegamiento de las proteínas es el resultado de complejas interacciones entre residuos, las cuales llevan a una estructura nativa termodinámicamente estable. Una gran variedad de experimentos ha indicado que no hay resultados binarios, sino que las proteínas atraviesan estados transientes que hacen que adquieran su estado nativo en menor tiempo (Yu *et al.*, 2016). Yu *et al.* demostraron que la presencia de MeOH ayudó al plegado adecuado de estructuras α -hélices o los β -giros en proteínas desnaturalizadas, debido a que fue capaz de disminuir la barrera de energía libre de plegado.

Con estos antecedentes, sumado a la alta solubilidad del NP en solventes orgánicos, fue que se decidió realizar un estudio en MeOH y otro en agua por ser este el medio natural de las proteínas y de crecimiento de los MO. En el tratamiento con MeOH se observó una remoción de alrededor del 10 % para ambas cepas, tanto en el caso del extracto nativo (N) como el desnaturalizado (D) a las 24 h, mientras que luego de 96 h, se observó una remoción del 18 % con los extractos N y D de *P. ostreatus* y no se observaron cambios significativos de remoción para *T. trogii*.

Si bien existen casos reportados de un incremento en la actividad enzimática debido a la presencia de MeOH (Wu *et al.*, 2019), posteriores incubaciones con MeOH de los extractos enzimáticos en estudio realizadas en nuestro laboratorio mostraron una inhibición completa de la actividad lacasa y *MnP* en presencia de MeOH (datos no mostrados). En el trabajo de Wu *et al.* se obtuvieron incrementos de hasta 4 veces en las actividades enzimáticas de lacasas comerciales que fueron preincubadas por períodos mucho más cortos (30 ó 60 min) y hasta una concentración máxima de MeOH del 30 % (v/v). En nuestro caso no sólo el tiempo de incubación fue mucho mayor (24 o 96 h), sino que además la concentración de MeOH fue del 83 %; es por esto que consideramos que probablemente sometimos a los extractos enzimáticos a condiciones extremadamente adversas.

A pesar de la baja solubilidad del NP en medio acuoso (Soares *et al.*, 2008) y la limitación que esto conlleva para mantener al analito en solución, especialmente a elevadas concentraciones, se optó por realizar la incubación en estas condiciones. Se observó un sensible aumento en la remoción de NP a las 24 h, tanto en *P. ostreatus* (44 %) como en *T. troglia* (41 %). A las 96 h, *P. ostreatus* no mostró aumento de la remoción (43 %), mientras que para *T. troglia* no fue posible detectar la presencia del analito al estar por debajo de su límite de detección (10 µg/L). Esto muestra que hubo una remoción de al menos un 99,8 % debida principalmente a la actividad enzimática.

En el caso de *P. ostreatus*, los niveles de remoción no variaron luego de 96 h de incubación. Esto puede haberse debido a que la actividad Lac no fue suficiente para terminar de remover todo el NP en solución. También es posible que hubiera un “reservorio” de NP adsorbido a las paredes del vial –debido a su baja solubilidad- y que, a medida que transcurría la acción enzimática, el NP se fuera desorbiendo de las paredes y pasara a integrar parte de la solución, subestimando la capacidad de remoción de *P. ostreatus*.

Por otro lado, no debe despreciarse el efecto de adsorción en la remoción de NP. El mismo fue de alrededor del 10 % luego de 24 y 96 h y fue evidenciado en los controles sin actividad enzimática. La remoción de NP observada con los extractos D, tanto en MeOH como en agua, pudo haberse debido a un fenómeno de adsorción en la superficie de las enzimas desnaturalizadas y/o de otras proteínas presentes en el extracto. La desnaturalización térmica del extracto de *P. ostreatus* (O) provocaría que la superficie expuesta de las proteínas genere una mayor adsorción de NP, ya que se pudo apreciar que tanto el extracto enzimático en condición N incubado 96 h en MeOH (O96M) como los extractos en condición D en MeOH o agua (O*96M/A) pudieron remover más NP que el extracto nativo en metanol incubado 24 h (O24M), congruente con un proceso de adsorción física.

Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre O96M y O*96M. Esto podría explicarse de la siguiente manera: en un primer momento, la presencia del MeOH podría favorecer la formación de cuerpos de inclusión con menor superficie para la adsorción del NP en el extracto O nativo. A medida que transcurre el tiempo de incubación es probable que haya un replegamiento de los cuerpos de

inclusión hacia la forma del O*96M y es por esto que hay similitud en los niveles de remoción de ambos tratamientos (figura 40).

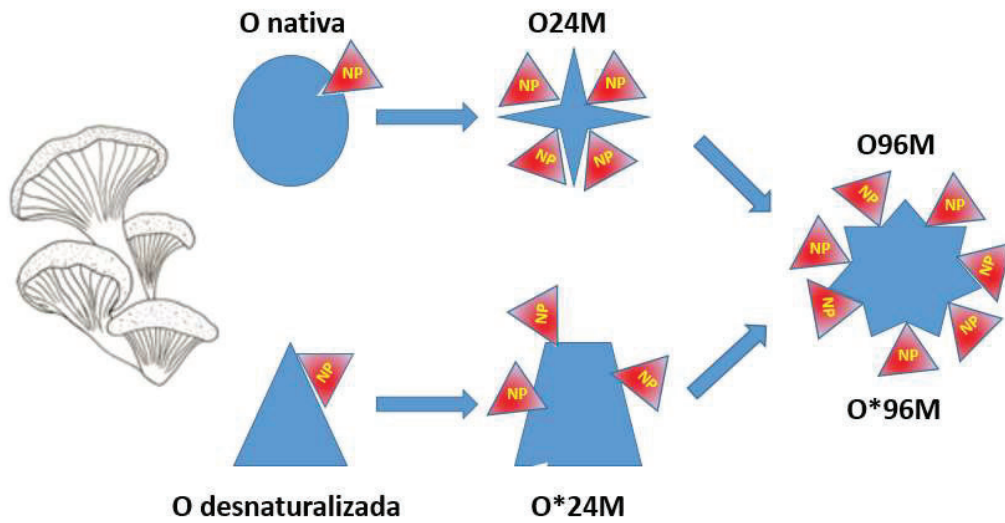


Figura 40: Mecanismo comparativo propuesto para la remoción de NP en medio metanólico para el extracto de *P. ostreatus*.

En el caso de *T. trogii*, al parecer, una vez producida la desnaturalización térmica del extracto, la capacidad de remoción de NP se mantiene similar, indistintamente si la incubación se da en A o M o del tiempo transcurrido. El comportamiento de T* (extracto enzimático de *T. trogii* luego de la desnaturalización térmica) parecería indicar que independientemente de la condición (M o A), T* exhibiría menor superficie disponible o menor cantidad de sitios afines al NP para que este pueda adsorberse, ya que se pudo ver que T*A/M removi6 menos NP que O*96M y que no hubo diferencias significativas entre T*24A y T*96A (figura 41).

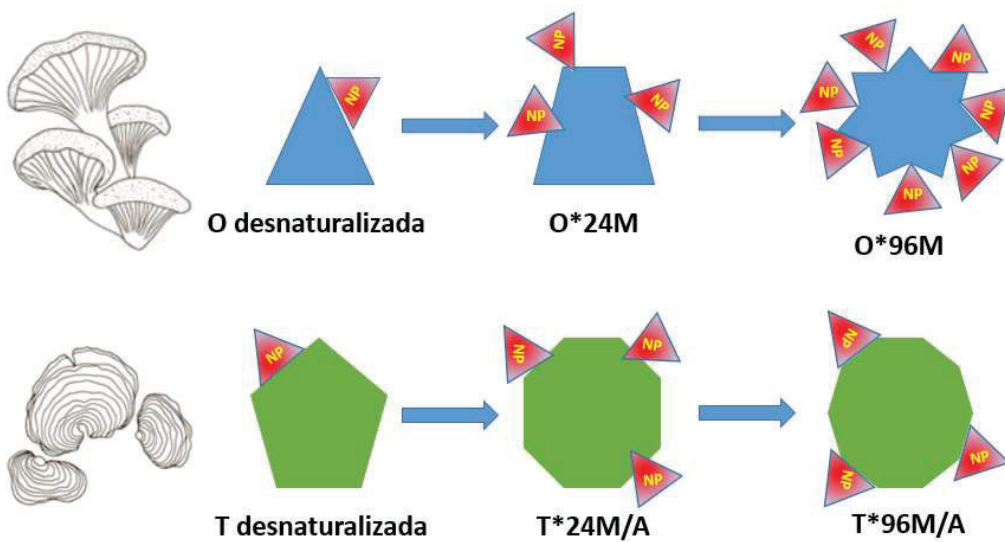


Figura 41: Mecanismo comparativo propuesto para la remoción de NP para los extractos desnaturalizados de *P. ostreatus* y *T. trogii*.

En las condiciones de T96A no se detectó NP, a diferencia de las condiciones de O24A y O96A que no difirieron significativamente entre sí. Por ello, consideramos que la capacidad de remoción del extracto T96A fue preponderante sobre todos los tratamientos. Es por este motivo, sumado a haber detectado en *T. trogii* actividades lacasa y *MnP* entre 2 y 3 órdenes de magnitud mayor que en *P. ostreatus*, que dicha cepa fue seleccionada para llevar a cabo los experimentos en condiciones no axénicas.

6.5. Análisis de microcosmos

El armado de los microcosmos se realizó con suelo previamente acondicionado con NP. Para esto, se regó el mismo con una solución acuosa de NP. Con esto se buscó simular las condiciones a las cuales está sometido un suelo agrícola por el uso constante de agrotóxicos, coadyuvantes y emulsionantes y adaptar la microbiota existente.

Para la fase de enriquecimiento con NP fue necesario utilizar una solución metanólica de NP, con una concentración elevada. El metanol es capaz de disolver las membranas biológicas, lo cual nos llevaría a una eventual condición de esterilidad del suelo (Mattana *et al.*, 2019), situación no deseada. Para minimizar este efecto, una porción de suelo fue enriquecido con la solución metanólica antes mencionada y homogeneizada con el resto del lote para alcanzar una concentración de 10 mg NP/kg suelo seco. Como control se realizó el mismo procedimiento sólo con metanol. De esta forma se ejerce una presión de selección donde se favorece el desarrollo de la microbiota capaz de soportar el estrés químico a la aplicación de la solución metanólica de 100 mg/L de NP.

Luego de transcurridos los primeros 14 días de incubación, los 3 tratamientos (atenuación natural, AN; bioaumentación, B y bioaumentación estimulada, BE) difirieron del control. Esto es importante porque nos demostró que luego de interrumpir el flujo continuo de contaminación, la naturaleza por sí misma (microflora autóctona, AN) tuvo la capacidad de degradar el contaminante. Partiendo de una concentración inicial de NP de 10 mg/ kg_{ss} se logró una remoción del 55 %, alcanzando los estándares propuestos por el Consejo Canadiense de Ministros del Ambiente (< 5 mg NP/kg_{ss}).

La presencia de *T. trogii* en el suelo (B) evidenció una mejoría del 23 % en la degradación de NP. Hubo una tasa mayor de degradación de NP (33 %) cuando el hongo estuvo estimulado por la presencia de hojarasca (BE), sustrato lignocelulósico similar al del soporte natural leñoso. *T. trogii* fue capaz de adaptarse a las condiciones reales de un campo contaminado con NP, ya que en todos los microcosmos donde fue inoculado, fue posible observar crecimiento fúngico.

Al final del experimento, luego de 28 días, se observó que los porcentajes de NP remanente en el suelo fueron del 18 % para la AN, 17 % para la B y 15 % para la BE, dando cuenta de una paridad entre estos. Estos hallazgos podrían indicar que, a partir del día 14, *T. trogii* detuvo su crecimiento y preponderó el metabolismo secundario, siendo que entre los días 12 y 15 de la curva de crecimiento se observó

el pico máximo de expresión de Lac. Es en la idiofase cuando se produce la secreción máxima de enzimas ligninolíticas para luego decaer; por ello, es probable que la degradación de NP entre las semanas 2 y 4, se deba más a una acción de los MO autóctonos del microcosmos que a la acción de *T. trogii* con o sin estimulación. También pudo haber ocurrido que la competencia con la microflora local haya puesto en detrimento dicha capacidad de crecer en sustratos complejos, favoreciendo el desarrollo biológico hacia los MO locales debido a la disputa trófica por los nutrientes, permitiéndoles degradar NP en niveles similares luego de dos semanas extra de incubación. Por otra parte, puede haber sucedido que el suelo empleado tuviera la suficiente cantidad de nutrientes disponibles como para que *T. trogii* no invirtiese energía y recursos en la síntesis de las exoenzimas y a raíz de esto, los niveles de NP remanente en los 3 tratamientos resultaron prácticamente iguales. Finalmente, podría proponerse que metabolitos o desechos generados por los MO locales hayan dificultado el desarrollo de *T. trogii* (Schalchli *et al.*, 2021). Se podría en un futuro analizar por cromatografía líquida de alta performance acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) o cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) estos desechos para identificar y cuantificar los productos del metabolismo de los MO y ver si existe alguna correlación con las tasas de degradación de NP.

La presencia de hojarasca a lo largo del experimento no produjo mejoras significativas en la degradación luego de 28 días de incubación, esto podría deberse a que la presión de inóculo no fue la suficiente. Como ejemplo, se puede mencionar que para el cultivo de hongos comestibles como *P. ostreatus*, se utilizan semillas miceliadas (“spawn”) formadas por el crecimiento micelial en cascara de avena u otro grano, que son las que *a posteriori* son sembradas en el sustrato, partiendo de mayor biomasa fúngica que en el presente estudio (niveles de gramos de micelio por unidad de semilla). Se podrían probar distintos tipos de hojarasca y de inoculación, para apreciar si hay o no mejoras en la degradación respecto a este punto. El análisis de los blancos nos ha permitido corroborar la importancia de los mismos, ya que pudimos comprobar que la hojarasca aportaba una matriz de analitos compleja al aumentar la absorbancia en los rangos de tiempo de retención donde no había analito de interés. La disminución en los niveles de la línea de base en BE a 28 días denota la acción degradativa, en principio, tanto de los MO autóctonos como de *T. trogii*.

Conclusiones

Se demostró que resulta de suma importancia contar con una técnica analítica como la HPLC, que permita la detección y análisis preciso del xenobiótico que se desea cuantificar. El desarrollo del método analítico permitió cumpliera las premisas de separación de pico respecto al frente de solvente y tiempos cortos de análisis; esto se tradujo en curvas de calibración con coeficientes de correlación de Pearson próximos a 1, lo que implica que hay un ajuste muy bueno en el modelo lineal comparando los valores reales con los ajustados, y explicaría la variabilidad en los resultados aproximadamente en un 99,9 % de los casos.

La actividad de las enzimas ligninolíticas juega un rol fundamental en la remoción de xenobióticos. La elevada actividad encontrada en *T. trogii* va en consonancia con los resultados de remoción obtenidos.

Por otra parte, es de destacar que fue posible el desarrollo miceliar del organismo en condiciones no axénicas, aún con una baja presión de inóculo.

Adicionalmente se pudo concluir que:

- En los controles no se detectó NP, por lo tanto, el NP cuantificado provino solamente de las incubaciones donde el suelo fue enriquecido con el xenobiótico.
- El MeOH, en las concentraciones estudiadas, inhibe la actividad enzimática tanto en *P. ostreatus* como en *T. trogii*.
- Los extractos desnaturalizados de ambas cepas no mostraron diferencias de remoción tanto en agua como en MeOH.
- *P. ostreatus* exhibió una remoción del 57 % luego de 96 h.
- Los extractos nativos en agua fueron más eficientes para remover NP, que los controles de inactividad enzimática acuosa y que todos los tratamientos realizados en MeOH.
- *T. trogii* pudo remover al menos un 99,8 % de NP, dando cuenta de su gran capacidad de remover compuestos aromáticos.

Perspectivas futuras

- *A priori*, otro grupo ecofisiológico de hongos como los descomponedores de hojarasca (LDF, del inglés *Litter-Decomposing Fungi*) tienen un buen potencial degradador principalmente debido a su capacidad innata de competir con la microflora natural del suelo. Por este motivo, sería interesante realizar un nuevo proceso de selección de cepas LDF, teniendo en cuenta su capacidad ligninolítica, rango estable de pH, tolerancia al estrés hídrico e iónico, tolerancia estacional (horas luz/noche, temperatura) y rango de tolerancia al contaminante, incluso combinándolas con WRF, explorando estrategias de cocultivo.
- Utilizar compostaje u otro medio de anclaje apropiado para los hongos, como cáscaras de avena, arroz u otro grano, que proporcionen los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo previa inoculación en el suelo.
- Emplear plantas que ayuden a mitigar efectos competitivos entre los hongos alóctonos y la microbiota residente.
- Medir índices de Shannon para bacterias y hongos, antes y después de cada tratamiento, con el fin de dilucidar la composición de cada consorcio, y entender si hay especies más capacitadas que otras para desarrollarse.

- El agregado de biosurfactantes sumado a la presencia de algunos cofactores tales como cobre o manganeso que estimulen la expresión de LMEs, y aumenten la biodisponibilidad del NP.
- Medir el contenido de ergosterol, ya que es el “Gold Standard” empleado para cuantificar el cambio en la biomasa fúngica, y así evaluar cómo es el desarrollo a lo largo de las incubaciones.
- Poner a punto técnicas de cuantificación por HPLC-MS y GC-MS, para analizar si los desechos generados en el suelo podrían afectar negativamente el desarrollo fúngico, y además dilucidar si finalmente el NP luego de la degradación enzimática queda en forma de quinonas o si es completamente mineralizado a CO₂.
- Durante el transcurso de las incubaciones, se podría airear el suelo y mantener un régimen estricto de adición de agua y nutrientes, y así favorecer el desarrollo fúngico.
- Medir actividades Lac, *MnP* y LiP, con las nuevas configuraciones propuestas, observando si se aprecian cambios considerables luego de las mejoras propuestas.

Deberíamos aceptar la idea de que hay mayores posibilidades de éxito, al emplear un consorcio de hongos que tenga la capacidad de brindar una completa restauración de una matriz contaminada, que una única especie foránea. Es por esto que los trabajos enfocados en la adición de enmiendas tales como compostaje o el uso de residuos fúngicos agotados como los provenientes del cultivo de hongos comestibles, no deben ser desestimados, ya que los hongos, así como las bacterias y las raíces de las plantas introducidas en el suelo, están influenciadas por el tipo y la actividad de otros MO residentes que tienen gran impacto sobre dicha capacidad de colonización.

En este trabajo fue posible comprobar que hay un beneficio tangible debido al tratamiento planteado. La inoculación de *T. trogii* en suelos contaminados con NP, al menos en esta primera aproximación, mostró que al cabo de dos semanas de tratamiento hubo diferencias apreciables en los niveles de NP remanente. Si bien quedan interrogantes a dilucidar, siguiendo con el enfoque actual y nuevas herramientas analíticas será posible optimizar condiciones donde el potencial fúngico sea explotado al máximo y así sacarle el mayor provecho posible. El descubrimiento de nuevas cepas fúngicas benéficas, la secuenciación genética y el aislamiento de enzimas útiles es por demás deseado para fortalecer la biodegradación de suelos contaminados. Un conocimiento más detallado de la ecología fúngica en su ambiente natural, y un entendimiento más profundo de la fisiología del proceso de

micorremediación, con especial énfasis en aquellas condiciones cuando los hongos entran en contacto con los contaminantes orgánicos recalcitrantes, podría permitirnos dar un paso más hacia la aplicación de tecnologías basadas en hongos para el tratamiento de matrices ambientales contaminadas.

Agradecimientos

En primer lugar quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a Paola, ya que sin la aceptación de ella, esto jamás se hubiera gestado, quiero agradecerle todos los conocimientos que me ha compartido, y todo lo que me ha hecho crecer como persona. Es una gran mujer, justa y generosa, y porque no, una especie de pulpo ahí en el CAC, ya que desde que la conozco no para de tener más y más responsabilidades. Gracias a ella también lo conocí a Raúl.

En segundo lugar quiero agradecer a Raúl, otra persona maravillosa, ¿Quién no quisiera tener un amigo como Raúl? La respuesta es simple, nadie. Raúl, tiene una forma muy particular de hablar, me recuerda a Gabriel Rolón, es suave, didáctico y apacible, si tiene que explicarte algo ochenta veces lo va a hacer y desde ochenta enfoques distintos. Muchas veces me he quedado tan obnubilado por su retórica que hasta de tomar apuntes me olvidaba, porque no quería perder un segundo de cada exquisito monólogo (menos mal que ponía la grabadora de audio a funcionar).

Infinitamente gracias, gracias, gracias a mis dos madres judías como tantas veces me lo han dicho, creo que no pude haber tenido mejores directores para este camino lento, vertiginoso y plagado de dificultades a sortear, aunque de satisfacción plena una vez superado cada desafío interpuesto.

Gracias a Marcela, tremenda compañera de laboratorio encontré, la encargada muchas veces de retratar los momentos de cansancio, frustración y gloria en los laboratorios (Qca. Analítica o MEx). Siempre bien dispuesta a darte una mano en lo que se necesite. Una genia, siempre de buen humor, con un carisma envidiable y su inseparable compañero de distracción, Dj Spotify quien pasaba de una canción de Gustavo Cerati a Los Palmeras con total impunidad. Marce, más que compañera, te considero una gran amiga.

La expresión en árabe de la página 3 "*Maktub*", significa "estaba escrito", y esto para mí es muy importante, porque de alguna manera todo pasa por algo, nada sucede por casualidad, todo tiene una planificación, aunque de buenas a primeras no seamos capaces de verlo. ¿A qué viene todo este preámbulo? A que una vez más, los planes de Dios son maravillosos e incomprensibles para nosotros. Sinceramente, ¿a quién se le ocurriría pensar, que la persona que en un futuro fuera su directora de tesis, fue al principio un cliente de la empresa donde trabajó? ¿Un poco rebuscado verdad? Es por esto que también quiero agradecer a Edgardo, quien me permitió entrar al mundo de soporte técnico y gracias a ello, fue posible conocer a Paola. Gracias también por haberme dado el espacio y el tiempo para poder avanzar no solo en la parte práctica sino también en el escrito de este trabajo.

Quiero agradecer a todo el *staff* del laboratorio de MEx, Magui, Ana, Agus, Pilar, Leo, Marisa, quienes siempre con infinita paciencia me ayudaron con todas las dudas que tuve, y fueron un excelente jurado a la hora de brindarme las mejores críticas para acomodar mejor mi primer seminario de avance en la UNSAM.

Agradezco a la CNEA y a la FCEyN - UBA, por permitir que desarrolle mis tareas en cada sitio.

Por supuesto que no me olvido de la UNSAM, que desde el vamos fui parte de la primera camada que estrenó el que ahora es el plan “viejo”, y creo que debo ser el último que se recibe bajo esta órbita. Doy las gracias porque es una excelente universidad, plena de profesores increíbles de altísimo nivel y con un abanico de herramientas que más de una alta casa de estudios debe de envidiar. Y gracias a la UNSAM encontré a Romina, la madre de mis hijas, con quien hace casi 10 años comparto mi vida, gracias por todo, TE AMO.

Quiero agradecer a mis suegros y a mis cuñados, que desde su lado siempre me alentaron a seguir, perseverar y esforzarme. Muchas gracias a todos, los quiero muchísimo.

A Susana Giambiagi, por su inagotable paciencia, y claridad para resolver mis dudas en cuanto al período de transición entre planes y por su puesto, en el asesoramiento para esta parte final de la carrera.

A la Comisión de Tesinas UNSAM por las enriquecedoras devoluciones de cada informe de avance y por recibir este manuscrito final.

Agradezco a cada uno de los jurados haber aceptado mi propuesta, y de haberse tomado el tiempo de leer y evaluar este escrito el día de mi defensa.

Quiero agradecer a mi familia que desde un lado u otro siempre me apoyó, incluso en aquellas ocasiones donde seguir adelante parecía imposible. A mi mamá, que muchas de las cosas que he hecho en mi vida fueron para que ella se sienta orgullosa de mí, más de una vez pensé en dejar todo, y ahí estuvo ella apuntalándome, dándome consejos de madre y de amiga. A mis hermanos, que por cuestiones de la vida misma, no nos hemos podido ver tanto como me gustaría, pero quiero que sepan que siempre están en mi corazón. A mi papá y a mi adorada hermana Tamara. Gorda te me fuiste es un momento clave de la vida, sabes todo lo que hubiésemos compartido con los chicos, no sabes como me hubiese gustado que conozcas a Leonella, Luana y Brianna que son la luz de mis ojos y el motor de mi vida. Extraño tus carcajadas interminables, las reuniones, las charlas en privado, el dolor muy de a poco se diluye, pero siempre estás ahí, tan cerca que incluso cuando sueño te siento a mi lado, no sabés lo que te extraño, o sí, la verdad no lo sé, tengo la esperanza de que allí donde te encuentres si me estás esperando y deba partir, pueda volver a verte y abrazarte tan fuerte que no permita que nos separemos nunca más, ¿sabes qué es lo que más me duele? El hecho de saber que el día que me reciba no voy a tener ese tan ansiado pasacalles que diga “*Felicitaciones Licenciado*” porque conociéndote como eras, seguro me lo hubieras encargado. Viejo querido, fue difícil lo nuestro, nunca supe porqué, lamento no haber podido compartir más tiempo, charlas y asados con vos, mirá que el amor que le tenías a mami era fuerte eh, pero lo de Tamara fue inmenso y no lo pudiste soportar (no debe ser fácil perder un hijo,

mucho menos dos). Siempre me preguntabas “¿y Willy, cuándo vas a terminar de estudiar?” “¿Cuándo vas a terminar la carrera?”, bueno viejo acá estoy, ya no me falta nada. Estoy tranquilo porque en nuestro último tiempo nos pudimos poner en paz, lloré como un condenado durante tus últimos días (como estoy ahora) y vos me decías “ya está Willy, ya está, no pasa nada, no llores, no te pongas mal” te aguantaste todo hasta el final, siempre de frente. Me viste crecer, independizarme, pudiste venir a mi casa, conociste a mi primer hija “La rusita” como te gustaba decirle a Leonella, si vieras lo que es ella ahora, “es un misil” dirías, se me clava un puñal en el corazón cada vez que me pregunta por vos, como duele viejo, como duele que no estés y no poder compartir este logro con vos. Te amo, te extraño, te sueño, ya nos volveremos a ver, hasta luego.

No deseo olvidarme de mis grandes amigos universitarios con los que fundamos *El lado oscuro*, a muchos ya nos los veo porque tomaron otros caminos, pero siempre están en mi recuerdo, los mates, las charlas, las partidas de truco, las juntadas hasta altas horas de la madrugada estudiando análisis matemático, química inorgánica o genética, preparando informes de laboratorio, parcialitos o parciales. Millones de gracias amigos, Amel, Maxi, Martins, Juje, Dan, Borso, Javi, Pupu y mi querido hermano Juancito. Tampoco me olvido de otros grandes colegas como Nicolas Rosas, Javier De Rosa, Gonzalo Eckert, Daniela Monea y Daniela Militello.

Seguramente me esté olvidando de alguien, pero sepan que no es adrede, sino que no me acuerdo, trato de estar la mayoría de las veces al pie del cañón, pero otras veces se me pasa. Me estoy haciendo adulto, tengo 35 años y empecé la carrera con 19, y sí, se estiró, bastante, pero la verdad no me arrepiento de nada, entre el estudio, el trabajo, la familia y la casa, uno se divide como puede. Algo que ya para mi es una máxima en mi vida es que “*Cuando hay ganas, no hay excusas*”, y esto es aplicable a todos los ámbitos de la vida.

¡Gracias!

Referencias

- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. (2013). Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*, 1–28. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407679-2.00001-6>
- Abo-State, M., Osman, M., Khattab, O., El-Kelani, T., & Abdel-Rahman, Z. (2021). Degradative pathways of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Phanerochaete chrysosporium* under optimum conditions. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 14(1), 507–520. <https://doi.org/10.1080/16878507.2021.2001247>
- Achyuthan, K. E., Achyuthan, A. M., Adams, P. D., Dirk, S. M., Harper, J. C., Simmons, B. A., & Singh, A. K. (2010). Supramolecular Self-Assembled Chaos: Polyphenolic Lignin's Barrier to Cost-Effective Lignocellulosic Biofuels. *Molecules*, 15(12), 8641–8688. <https://doi.org/10.3390/molecules15118641>
- Acir, I. H., & Guenther, K. (2018). Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Science of the Total Environment*, 635, 1530–1546. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079>
- Adenipekun, C. O., & Lawal, R. (2012). Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 7(3). <https://doi.org/10.5897/bmbr12.006>
- Arora, U., Khuntia, H. K., Chanakya, H. N., & Kapley, A. (2022). Surfactants: combating the fate, impact, and aftermath of their release in the environment. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04549-2>
- Arturi T. S., (2018). Remoción del disruptor endócrino Nonilfenol Polietoxilado de aguas residuales empleando sistemas combinados (Biológicos y Físicoquímicos). [Tesis de doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/70395/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Babay, P. A., (2009). Determinación de poli-etoxilatos de nonilfenol y sus productos de degradación. [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. <https://catalogo.exactas.uba.ar/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=44192&querydesc=kw %2Cwrdl%3A%20babay>
- Babay, P. A., Itria, R. F., Romero Ale, E. E., Becquart, E. T., & Gautier, E. A. (2013). Ubiquity of Endocrine Disruptors Nonylphenol and Its Mono- and Di-Ethoxylates in Freshwater, Sediments, and Biosolids Associated with High and Low Density Populations of Buenos Aires, Argentina. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 42(6), 731–737. <https://doi.org/10.1002/clen.201300230>
- Baldrian, P. (2008). Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology*, 1(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2008.02.001>
- Bautista, L. F., Morales, G., & Sanz, R. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by laccase from *Trametes versicolor* covalently immobilized on amino-functionalized SBA-15. *Chemosphere*, 136, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.071>
- Bhatnagar, A., Tamboli, E., & Mishra, A. (2021). Wastewater treatment and Mycoremediation by *P. ostreatus* mycelium. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 775(1), 012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/775/1/012003>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Byss, M., Elhottová, D., Tříška, J., & Baldrian, P. (2008). Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere*, 73(9), 1518–1523. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.030>

Campos, P. A., Levin, L. N., & Wirth, S. A. (2016). Heterologous production, characterization and dye decolorization ability of a novel thermostable laccase isoenzyme from *Trametes trogii* BAFC 463. *Process Biochemistry*, 51(7), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.015>

Careghini, A., Mastorgio, A. F., Saponaro, S., & Sezenna, E. (2014). Bisphenol A, nonylphenols, benzophenones, and benzotriazoles in soils, groundwater, surface water, sediments, and food: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(8), 5711–5741. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3974-5>

CCME, Canadian Council of Ministers of the Environment. (2002). Canadian water quality guidelines for the protection of aquatic life: Nonylphenol and its ethoxylates. Canadian environmental quality guidelines, 1999, *Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg*. <https://ccme.ca/en/res/nonylphenol-and-its-ethoxylates-en-canadian-water-quality-guidelines-for-the-protection-of-aquatic-life.pdf>

CE (2003). Directiva 2003/53/CE Parlamento y Consejo Europeo. Luxemburgo. 2003/53. <https://www.boe.es/doue/2003/178/L00024-00027.pdf>

CEPA, Canadian Environmental Protection Act, (2003). Proposed Notice Requiring the Preparation and Implementation of Pollution Prevention Plans in Respect of Nonylphenol and Its Ethoxylates Contained in Products, Minister of Public Works and Government Services, *Canada Gazette*. <https://ec.gc.ca/planp2-p2plan/default.asp?lang=Fr&n=B2D19B6D-1>

Chávez-Sifontes, M. & Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: Métodos de despolimerización para la obtención de derivados de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46. <https://www.researchgate.net/publication/285633177>

Chio, C., Sain, M., & Qin, W. (2019). Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 232–249. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.03.008>

Chokwe, T., Okonkwo, J., & Sibali, L. (2017). Distribution, exposure pathways, sources and toxicity of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in the environment. *Water SA*, 43(4), 529. <https://doi.org/10.4314/wsa.v43i4.01>

Chowdhary, P., Shukla, G., Raj, G., Ferreira, L. F. R., & Bharagava, R. N. (2019). Microbial manganese peroxidase: a ligninolytic enzyme and its ample opportunities in research. *SN Applied Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.1007/s42452-018-0046-3>

de Bruin, W., Kritzinger, Q., Bornman, R., & Korsten, L. (2019). Occurrence, fate and toxic effects of the industrial endocrine disrupter, nonylphenol, on plants - A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 419–427. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.009>

de Bruin, W., van der Merwe, C., Kritzing, Q., Bornman, R., & Korsten, L. (2017). Ultrastructural and developmental evidence of phytotoxicity on cos lettuce (*Lactuca sativa*) associated with nonylphenol exposure. *Chemosphere*, 169, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.020>

Deepalakshmi, K., & Sankaran, M. (2014). Pleurotus ostreatus: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), 718-726. <https://jbiochemtech.com/storage/models/article/NG23jvirki6MsPU83nHuA6CbEMW8XcyYx1abn0BuLtgBOKsnuWPknyki9rj5/pleurotus-ostreatus-an-oyster-mushroom-with-nutritional-and-medicinal-properties.pdf>

De la Parra-Guerra, A. C., & Acevedo-Barrios, R. (2023). Studies of Endocrine Disruptors: Nonylphenol and Isomers in Biological Models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(7), 1439–1450. <https://doi.org/10.1002/etc.5633>

de Oliveira, M., Frihling, B. E. F., Velasques, J., Filho, F. J. C. M., Cavalheri, P. S., & Migliolo, L. (2020). Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 705, 135568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135568>

Dhaka, A., & Chattopadhyay, P. (2021). A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills. *Journal of Environmental Management*, 288, 112428. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112428>

Dodds, E. C., & Lawson, W. (1938). Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. Proceedings of the Royal Society of London. *Series B - Biological Sciences*, 125(839), 222–232. <https://doi.org/10.1098/rspb.1938.0023>

Domene, X., Ramírez, W., Solà, L., Alcañiz, J. M., & Andrés, P. (2009). Soil pollution by nonylphenol and nonylphenol ethoxylates and their effects to plants and invertebrates. *Journal of Soils and Sediments*, 9(6), 555–567. <https://doi.org/10.1007/s11368-009-0117-6>

Echezonachi, S. O. (2022). The role of white rot fungi in bioremediation. *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*, 305–320. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90452-0.00034-7>

Egbuna, C., Amadi, C. N., Patrick-Iwuanyanwu, K. C., Ezzat, S. M., Awuchi, C. G., Ugonwa, P. O., & Orisakwe, O. E. (2021). Emerging pollutants in Nigeria: A systematic review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 85, 103638. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103638>

Eshghi, H., Alishahi, Z., Zokaei, M., Daroodi, A., & Tabasi, E. (2011). Decolorization of methylene blue by new fungus: *Trichaptum bifforme* and decolorization of three synthetic dyes by *Trametes hirsuta* and *Trametes gibbosa*. *European Journal of Chemistry*, 2(4), 463–468. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.2.4.463-468.425>

Esteban, S., Llamas, P., García-Cortés, H., & Catalá, M. (2016). The endocrine disruptor nonylphenol induces sublethal toxicity in vascular plant development at environmental concentrations: A risk for riparian plants and irrigated crops? *Environmental Pollution*, 216, 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.086>

Farnet, A., Gil, G., & Ferre, E. (2008). Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Chemosphere*, 70(5), 895–900. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.086>

Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., & Haltrich, D. (2002). Increased production of laccase by

the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 529–536. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(01\)00522-1](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(01)00522-1)

Gargulak, J. D., Lebo, S. E., & McNally, T. J. (2015). Lignin. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1–26. <https://doi.org/10.1002/0471238961.12090714120914.a01.pub3>

Garrido, I., Martínez, C. M., Flores, P., Hellín, P., Contreras, F., & Fenoll, J. (2023). Remediation of amide pesticides polluted soils by combined solarization and ozonation treatment. *Pedosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.pedsph.2023.03.003>

Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., & Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New Biotechnology*, 32(1), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.01.001>

Geethanjali, P., & Jayashankar, P. (2016). A Review on Litter Decomposition by Soil Fungal Community. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(04), 01–03. <https://doi.org/10.9790/3008-1104030103>

Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., van de Zee, S. E., & Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.03.002>

González, N., Marquès, M., Nadal, M., & Domingo, J. L. (2018). Levels of PCDD/Fs in foodstuffs in Tarragona County (Catalonia, Spain): Spectacular decrease in the dietary intake of PCDD/Fs in the last 20 years. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.035>

Grassi, E., Pildain, M. B., Levin, L. & Carmaran, C. (2014). Studies in Diatrypaceae: the new species *Eutypa microasca* and investigation of ligninolytic enzyme production. *Sydowia* 66 (1): 99–114. <https://www.verlag-berger.at/detailview?no=2489>

Grelska, A., & Noszczyńska, M. (2020). White rot fungi can be a promising tool for removal of bisphenol A, bisphenol S, and nonylphenol from wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(32), 39958–39976. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10382-2>

Guenther, K., Kleist, E., & Thiele, B. (2006). Estrogen-active nonylphenols from an isomer-specific viewpoint: a systematic numbering system and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(2), 542–546. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0181-8>

Gutiérrez, J. E. V., Camargo, F. P., Sakamoto, I. K., & Varesche, M. B. A. (2022). Expanded granular sludge bed reactor technology feasibility for removal of nonylphenol ethoxylate in co-digestion of domestic sewage and commercial laundry wastewater: Taxonomic characterization and biogas production. *Process Safety and Environmental Protection*, 161, 556–570. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.03.055>

Halim, A. A. A., Zaroog, M. S., Kadir, H. A., & Tayyab, S. (2017). Alcohol-induced structural transitions in the acid-denatured *Bacillus licheniformis* α -amylase. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, S349–S358. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2014.04.002>

Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9(3), 177–192. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>

- Helfend, M. (2021). Living Soil: Why Mycoremediation is Needed Now | The Alchemist's Kitchen. *The Alchemist's Kitchen*. <https://wisdom.thealchemistskitchen.com/living-soil-why-mycoremediation-is-needed-now/>
- Hidalgo, J., Epelde, L., Anza, M., Becerril, J. M., & Garbisu, C. (2023). Mycoremediation with *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus* growth substrates versus phytoremediation with *Festuca rubra* and *Brassica* sp. for the recovery of a Pb and γ -HCH contaminated soil. *Chemosphere*, 327, 138538. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138538>
- Huang, W., Tang, J., Chen, Y., Pan, X-h, Liu, D-y, Zhang, G. (2012). Distribution characteristics of alkylphenols and bisphenol A in surface waters from typical bays around Shandong Peninsula. *Marine Environmental Science*, 31(3), 358-363. <https://www.researchgate.net/publication/270823339>
- Infocampo. Los productos formulados con nonilfenol ocupan un 35% del mercado (2016). *Infocampo*. <https://www.infocampo.com.ar/los-productos-formulados-con-nonil-fenol-ocupan-un-35-delmercado>
- Itria, R. F., (2016). Biodegradación secuencial bacteriana y fúngica de dos compuestos fenólicos frecuentes en efluentes textiles. [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. <https://catalogo.exactas.uba.ar/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=48650>
- Jaouani, A., Guillén, F., Penninckx, M. J., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2005). Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.enzmitec.2004.11.011>
- Jahan, I., & Nayeem, S. M. (2018). Effect of Urea, Arginine, and Ethanol Concentration on Aggregation of 179CVNITV184 Fragment of Sheep Prion Protein. *ACS Omega*, 3(9), 11727–11741. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00875>
- Kirk, T. K. (1988). Lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *ISI Atlas of science: biochemistry*, 1(1), 71-76. <https://www.fpl.fs.usda.gov/documnts/pdf1988/kirk88b.pdf>
- Khabiri, M., Minofar, B., Brezovský, J., Damborský, J., & Etrich, R. (2012). Interaction of organic solvents with protein structures at protein-solvent interface. *Journal of Molecular Modeling*, 19(11), 4701–4711. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1507-z>
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017). Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0162-8>
- Klančič, V., Gobec, M., & Jakopin, I. (2022). Environmental contamination status with common ingredients of household and personal care products exhibiting endocrine-disrupting potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(49), 73648–73674. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22895-z>
- Křesinová, Z., Linhartová, L., Filipová, A., Ezechiáš, M., Mašín, P., & Cajthaml, T. (2018). Biodegradation of endocrine disruptors in urban wastewater using *Pleurotus ostreatus* bioreactor. *New Biotechnology*, 43, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2017.05.004>
- Kües, U. (2015). Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.03.006>
- Kumar, G., Bhatt, P., & Lal, S. (2021). Phytoremediation: A Synergistic Interaction between Plants and Microbes for Removal of Petroleum Hydrocarbons. *Soil Contamination - Threats and Sustainable*

Solutions. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93764>

Lalonde, B., & Garron, C. (2021). Nonylphenol, Octylphenol, and Nonylphenol Ethoxylates Dissemination in the Canadian Freshwater Environment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(2), 319–330. <https://doi.org/10.1007/s00244-020-00807-x>

Levin, L., Viale, A., & Forchiassin, A. (2003). Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(02\)00091-4](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(02)00091-4)

Levin, L., Malignani, E., & Ramos, A. M. (2010). Effect of nitrogen sources and vitamins on ligninolytic enzyme production by some white-rot fungi. Dye decolorization by selected culture filtrates. *Bioresource Technology*, 101(12), 4554–4563. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.102>

Madhukar, A., Swathi, E., Pranathi, S., Devi, V., & Reddy, K. S. (2013). Analysis of xenobiotics: a review. *Journal of Pharmaceutical Research*, 1, 5–11. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1098647>

Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A., & Cherif, A. (2018). Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon– Contaminated Marine Environments. *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72207>

Mallerman, J. (2017). Degradación de restos vegetales y nonilfenol etoxilado por hongos lignocelulolíticos de hojarasca. [Tesis de doctorado, Universidad de Buenos Aires]. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6150_Mallerman.pdf

Mallerman, J., Itria, R., Babay, P., Saparrat, M., & Levin, L. (2019). Biodegradation of nonylphenol polyethoxylates by litter-basidiomycetous fungi. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(5), 103316. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103316>

Manavalan, T., Manavalan, A., & Heese, K. (2015). Characterization of Lignocellulolytic Enzymes from White-Rot Fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485–498. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0743-0>

Marć, M., Śmiełowska, M., Namieśnik, J., & Zabiegała, B. (2017). Indoor air quality of everyday use spaces dedicated to specific purposes—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(3), 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0839-8>

Massanyi, P., Lukac, N., Massanyi, M., Massanyi, P., Stawarz, R., Formicki, G., & Danko, J. (2020). Effects of Xenobiotics on Animal Reproduction in Vivo: Microscopical Examination. *Microscopy and Microanalysis*, 26(S1), 63–63. <https://doi.org/10.1017/s1431927620000550>

Mattana, S., Chelinho, S., Sousa, J. P., Alcañiz, J. M., & Domene, X. (2019). Nonylphenol causes shifts in microbial communities and nitrogen mineralization in soil microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.032>

Mattila, H. (2020). *Phlebia radiata* as an ethanol producing fungus: conversion of lignocelluloses and metabolic regulation under hypoxia. *Helsingin yliopisto*. <http://hdl.handle.net/10138/319498>

Mayans, B., Camacho-Arévalo, R., García-Delgado, C., Alcántara, C., Nägele, N., Antón-Herrero, R., Escolástico, C., & Eymar, E. (2021). Mycoremediation of Soils Polluted with Trichloroethylene: First Evidence of *Pleurotus* Genus Effectiveness. *Applied Sciences*, 11(4), 1354. <https://doi.org/10.3390/app11041354>

Mohammed S, S., Muslih Naj, L., & Mohammed S, M. (2018). Biological Treatment of Carcinogenic

- Acrylonitrile Using *Pseudomonas aeruginosa* in Basra City. *Journal of Biological Sciences*, 18(8), 415–424. <https://doi.org/10.3923/jbs.2018.415.424>
- Moon, D. S., & Song, H. G. (2012). Degradation of Alkylphenols by White Rot Fungus *Irpex lacteus* and Its Manganese Peroxidase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(3), 542–549. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9795-4>
- Müller, A., Österlund, H., Marsalek, J., & Viklander, M. (2020). The pollution conveyed by urban runoff: A review of sources. *Science of the Total Environment*, 709, 136125. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136125>
- Munk, L., Sitarz, A. K., Kalyani, D. C., Mikkelsen, J. D., & Meyer, A. S. (2015). Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? *Biotechnology Advances*, 33(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.008>
- Mycoremediation. (n.d.). <https://www.ffungi.org/why-fungi/mycoremediation>
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 153(2), 375–380. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)71980-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)71980-7)
- Nemergut, M., Žoldák, G., Schaefer, J. V., Kast, F., Miškovský, P., Plückthun, A., & Sedlák, E. (2017). Analysis of IgG kinetic stability by differential scanning calorimetry, probe fluorescence and light scattering. *Protein Science*, 26(11), 2229–2239. <https://doi.org/10.1002/pro.3278>
- Nevedrov, N. P., Protsenko, E. P., Balabina, N. A., & Balabina, I. P. (2020). Accumulation of Heavy Metals by Fungi in the Cities of Central Black Earth Region. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 534(1), 012005. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/534/1/012005>
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N., & Kalogerakis, N. (2013). Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 72(1), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.04.007>
- Noorimotlagh, Z., Haghighi, N. J., Ahmadimoghadam, M., & Rahim, F. (2016). An updated systematic review on the possible effect of nonylphenol on male fertility. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3298–3314. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7960-y>
- Noorimotlagh, Z., Mirzaee, S. A., Ahmadi, M., Jaafarzadeh, N., & Rahim, F. (2018). The possible DNA damage induced by environmental organic compounds: The case of Nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.023>
- Noorimotlagh, Z., Mirzaee, S. A., Martinez, S. S., Rachoń, D., Hoseinzadeh, M., & Jaafarzadeh, N. (2020). Environmental exposure to nonylphenol and cancer progression Risk—A systematic review. *Environmental Research*, 184, 109263. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109263>
- Nwankwegu, A. S., & Onwosi, C. O. (2017). Microbial cell immobilization: a renaissance to bioaugmentation inadequacies. A review. *Environmental Technology Reviews*, 6(1), 186–198. <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1356877>
- Padariya, M., Baginski, M., Babak, M., & Kalathiya, U. (2022). Organic solvents aggregating and shaping structural folding of protein, a case study of the protease enzyme. *Biophysical Chemistry*, 291, 106909. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2022.106909>
- Patel, D., & Sen, D. J. (2013). Xenobiotics: An essential precursor for living system. *American Journal*

of *Advanced Drug Delivery*, 1, 262-270. <https://www.primescholars.com/articles/xenobiotics-an-essential-precursor-for-living-system.pdf>

Patel, M., Kumar, R., Kishor, K., Mlsna, T., Pittman, C. U., & Mohan, D. (2019). Pharmaceuticals of Emerging Concern in Aquatic Systems: Chemistry, Occurrence, Effects, and Removal Methods. *Chemical Reviews*, 119(6), 3510–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00299>

Paszczyński, A., Crawford, R. L., & Huynh, V. B. (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. *Methods in Enzymology*, 264–270. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61028-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61028-7)

Pimmata, P., Reungsang, A., & Plangklang, P. (2013). Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.07.009>

Pluth, T. B., Zanini, L. A. G., & Battisti, I. D. E. (2019). Pesticide exposure and cancer: an integrative literature review. *Saúde Em Debate*, 43(122), 906–924. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201912220>

Pollegioni, L., Tonin, F., & Rosini, E. (2015). Lignin-degrading enzymes. *FEBS Journal*, 282(7), 1190–1213. <https://doi.org/10.1111/febs.13224>

Qiu, W., Zhan, H., Hu, J., Zhang, T., Xu, H., Wong, M., Xu, B., & Zheng, C. (2019). The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.114>

Raju, S., Sivamurugan, M., Gunasagaran, K., Subramani, T., & Natesan, M. (2018). Preliminary studies on the occurrence of nonylphenol in the marine environments, Chennai—a case study. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-018-0063-1>

Ramaka, S., Srinivas, R., Vasudeva, M. S., & Raghuram Rao, A. (2020). Xenobiotics in Health and Disease: The Two Sides of a Coin: A Clinician's Perspective. *Open Access Journal of Toxicology*, 4, 555641. <https://doi.org/10.19080/OAJT.2020.04.555641>

Roldán-Carrillo, T. G., Rodríguez-Vázquez, R., Vázquez-Torres, H., & Cardoso-Martínez, J. (2001). Remoción de estireno por *Phanerochaete chrysosporium* en cultivo líquido. <http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-18442001001200006&script=sciabs+tract&lng=es>

Sanganyado, E., Lu, Z., Fu, Q., Schlenk, D., & Gan, J. (2017). Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes. *Water Research*, 124, 527–542. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.08.003>

Sanganyado, E., & Kajau, T. A. (2022). The fate of emerging pollutants in aquatic systems: an overview. *Emerging Freshwater Pollutants*, 119-135. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822850-0.00002-8>

Schalchli, H., Hormazábal, E., Astudillo, L., Briceño, G., Rubilar, O., & Diez, M. C. (2021). Bioconversion of potato solid waste into antifungals and biopigments using *Streptomyces* spp. *PLoS One*, 16(5), e0252113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252113>

SENASA (2023). Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Argentina.gob.ar. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>

- Sharma, M., & Chadha, P. (2018). Toxicity of non-ionic surfactant 4-nonylphenol an endocrine disruptor: A review. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2), 190-197. <https://www.fisheriesjournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartC/6-1-53-441.pdf>
- Singh, R. (2017). Biodegradation of xenobiotics-a way for environmental detoxification. *International Journal of Development Research*, 7(1), 14082-14087. <https://www.journalijdr.com/sites/default/files/issue-pdf/9508.pdf>
- Soares, A., Guieysse, B., & Mattiasson, B. (2006). Influence of Agitation on the Removal of Nonylphenol by the White-rot Fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera* sp. BOL 13. *Biotechnology Letters*, 28(3), 139–143. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-5326-5>
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., & Lester, J. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34(7), 1033–1049. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.01.004>
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 19–23. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50870-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50870-5)
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., & Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from “modified” polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, 92, 167–173. <https://doi.org/10.1289/ehp.9192167>
- Souza, M. C. O., Rocha, B. A., Souza, J. M. O., Jacinto Souza, J. C., & Barbosa, F. (2021). Levels of polybrominated diphenyl ethers in Brazilian food of animal origin and estimation of human dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 150, 112040. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112040>
- Stamatelatou, K., Pakou, C., & Lyberatos, G. (2011). Occurrence, Toxicity, and Biodegradation of Selected Emerging Priority Pollutants in Municipal Sewage Sludge. *Comprehensive Biotechnology*, 473–484. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00496-7>
- Štefanac, T.; Grgas, D.; Landeka Dragičević, T. (2021). Xenobiotics - Division and Methods of Detection: A Review. *Journal of Xenobiotics*, 11, 130–141. <https://doi.org/10.3390/jox11040009>
- Suryadi, H., Judono, J. J., Putri, M. R., Eclessia, A. D., Ulhaq, J. M., Agustina, D. N., & Sumiati, T. (2022). Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*, 8(2), e08865. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865>
- Tang, Y., Liu, Y., Chen, Y., Zhang, W., Zhao, J., He, S., Yang, C., Zhang, T., Tang, C., Zhang, C., & Yang, Z. (2021). A review: Research progress on microplastic pollutants in aquatic environments. *Science of the Total Environment*, 766, 142572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142572>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2013). *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series Fluorescence Detectors FLD-3100 and FLD-3400RS Operating Instructions*. Thermo Scientific, revisión 1.3. [https://knowledge1.thermofisher.com/Manual_Repository/4820.7850-EN - Rev 1.3 -
_Thermo_Scientific_Dionex_UltiMate_3000_Series_Fluorescence_Detectors_FLD-3100_and_FLD-3400RS_Operating_Instructions](https://knowledge1.thermofisher.com/Manual_Repository/4820.7850-EN_-_Rev_1.3_-_Thermo_Scientific_Dionex_UltiMate_3000_Series_Fluorescence_Detectors_FLD-3100_and_FLD-3400RS_Operating_Instructions)
- Thiele, B., Günther, K., & Schwuger, M. J. (1997). Alkylphenol Ethoxylates: Trace Analysis and Environmental Behavior. *Chemical Reviews*, 97(8), 3247–3272. <https://doi.org/10.1021/cr970323m>

- Tien, M., & Kirk, T. K. (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221(4611), 661–663. <https://doi.org/10.1126/science.221.4611.661>
- USEPA, 2014. Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) . <https://www.epa.gov/endocrine-disruption>
- Vargas-Berrones, K., Bernal-Jácome, L., Díaz de León-Martínez, L., & Flores-Ramírez, R. (2020). Emerging pollutants (EPs) in Latin América: A critical review of under-studied EPs, case of study - Nonylphenol-. *Science of the Total Environment*, 726, 138493. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138493>
- Varsha, Y., Deepthi CH, N., & Chenna, S. (2011). An Emphasis on Xenobiotic Degradation in Environmental Clean up. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 02(04). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.s11-001>
- Walker, E. K., Brock, G. N., Arvidson, R. S., & Johnson, R. M. (2022). Acute Toxicity of Fungicide–Insecticide–Adjuvant Combinations Applied to Almonds During Bloom on Adult Honey Bees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 41(4), 1042–1053. <https://doi.org/10.1002/etc.5297>
- Wang, F., Ouyang, D., Zhou, Z., Page, S. J., Liu, D., & Zhao, X. (2021). Lignocellulosic biomass as sustainable feedstock and materials for power generation and energy storage. *Journal of Energy Chemistry*, 57, 247–280. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2020.08.060>
- Wu, M. H., Lin, M. C., Lee, C. C., Yu, S. M., Wang, A. H. J., & Ho, T. H. D. (2019). Enhancement of laccase activity by pre-incubation with organic solvents. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45118-x>
- Yadav, J. S., Quensen, J. F., Tiedje, J. M., & Reddy, C. A. (1995). Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2560–2565. <https://doi.org/10.1128/aem.61.7.2560-2565.1995>
- Yanagi, K., Ashizaki, M., Yagi, H., Sakurai, K., Lee, Y. H., & Goto, Y. (2011). Hexafluoroisopropanol Induces Amyloid Fibrils of Islet Amyloid Polypeptide by Enhancing Both Hydrophobic and Electrostatic Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), 23959–23966. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.226688>
- Yang, X., Wu, Y., Zhang, Y., Yang, E., Qu, Y., Xu, H., Chen, Y., Irbis, C., & Yan, J. (2020). A Thermo-Active Laccase Isoenzyme From *Trametes trogii* and Its Potential for Dye Decolorization at High Temperature. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00241>
- Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International*, 32(3), 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>
- Young, D., Rice, J., Martin, R., Lindquist, E., Lipzen, A., Grigoriev, I., & Hibbett, D. (2015). Degradation of Bunker C Fuel Oil by White-Rot Fungi in Sawdust Cultures Suggests Potential Applications in Bioremediation. *PLOS ONE*, 10(6), e0130381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130381>
- Yu, Y., Wang, J., Shao, Q., Shi, J., & Zhu, W. (2016). The effects of organic solvents on the folding pathway and associated thermodynamics of proteins: a microscopic view. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep19500>
- Zhang, Q., Wang, F., Xue, C., Wang, C., Chi, S., & Zhang, J. (2016). Comparative toxicity of

nonylphenol, nonylphenol-4-ethoxylate and nonylphenol-10-ethoxylate to wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131, 7–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.035>

Zhu, Y., Boye, A., Body-Malapel, M., & Herkovits, J. (2017). The Toxic Effects of Xenobiotics on the Health of Humans and Animals. *BioMed Research International*, 2017, 1–2.
<https://doi.org/10.1155/2017/4627872>

Esta es la versión final del presente manuscrito conteniendo las correcciones y/o sugerencias propuestas por los jurados.



Dr. Raúl Fabio Itria
Codirector de tesis



Leandro Gastón Binda
Tesisista



Dra. Paola Alejandra Babay
Directora de tesis