



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Remediación de un suelo crónicamente contaminado con
hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) combinando la oxidación
química y la inoculación de un hongo ligninolítico***

Tesista: Lic. Natalia Andrea Di Clemente

Directores: Dra. María Teresa Del Panno y Dr. Mario C. N. Saparrat

Año: 2021

El presente trabajo, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Del Panno y el Dr. Mario C. N. Saparrat.



“Bosque interior”

Yolanda J. Ruiz (2020)

La obra fue inspirada en la película Nausica del Valle del Viento¹, si no la han visto se las recomiendo. La misma narra la historia de un mundo devastado por la actividad antrópica y en guerra por los últimos recursos naturales. He aquí un bosque oscuro y contaminado, que alberga grandes insectos, plantas y hongos que liberan esporas tóxicas para los humanos. Sin saber que en realidad están detoxificando suelos, agua y aire para dar paso nuevamente a la vida. La codicia e ignorancia del ser humano, y su desconexión con la naturaleza lo hacen olvidar que allí está solución para remediar los daños ocasionados. La película presenta las primeras ideas de la biorremediación y el importantísimo rol de los hongos como descomponedores, con su diversidad de formas y colores, transforman la materia orgánica muerta y los desechos generados por la humanidad, en nuevos soportes para la vida.

¹ Nausicaä del Valle del Viento (Kaze no Tani no Naushika). Hayao Miyazaki (1984).

Hay un mundo debajo del mundo

¿Cuál de los dos es real?

Lo que no se nombra también existe y

tiene su andar, en el silencio vive...²

² Adrián Berra. (2017). Mundo. En *Mundo debajo del mundo*. CD.

A mis padres

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las instituciones educativas y científicas que han patrocinado el presente proyecto de tesis doctoral, así como también a todas las personas que han colaborado para su satisfactoria culminación.

Al CONICET por otorgarme la beca doctoral.

A la Universidad Nacional de La Plata, casa de estudios desde mis inicios como estudiante de grado hasta hoy como futura investigadora y docente en formación continua. A la Facultad de Ciencias Exactas, al Departamento de Ciencias Biológicas por evaluar mi plan de tesis y hacerme las respectivas sugerencias para alcanzar los objetivos propuestos. Al Departamento de Química que ha apoyado la finalización de esta tesis durante la pandemia.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) por brindarme las instalaciones para llevar a cabo mi trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias.

Al PLAPIMU-LASEICIC, especialmente a Jorge, Norma y Gabriela por su buena predisposición al momento de trabajar en conjunto.

Al Dr. Mauricio Erben y las Dras. Yanina Bava y Mariana Geronés por el trabajo colaborativo que ha permitido profundizar en las caracterizaciones químicas.

A las Dras. Alejandra Bosch y Cecilia Figoli por el análisis de los espectros FT-IR que ha posibilitado elucidar el alcance de los tratamientos.

A la Dra. Sonia Wirth del Laboratorio de Agrobiotecnología de la FCEN-UBA por compartir sus resultados, fundamentales para la elaboración de primers específicos.

Al Dr. Lukas Wick y al grupo de Biodisponibilidad del Departamento de Microbiología Ambiental del UFZ (Helmholtz Centre for Environmental Research) donde realicé mi estadía de investigación en Leipzig. Muchas gracias por su colaboración, fue una experiencia sumamente enriquecedora tanto en lo profesional como en lo personal.

A los jurados, Dra. Diana L. Vullo (CONICET-UNGS), Dra. Marcela Ferrero (CONICET-YTEC) y Dr. Gustavo Curutchet (CONICET-III A-UNSAM), por dedicar su tiempo a las revisiones y generar aportes para el enriquecimiento de este manuscrito.

A mis directores, Tere y Mario por darme esta gran oportunidad de formación. Con humildad, cariño y paciencia me han brindado su conocimiento académico y profesional a lo largo de este recorrido. Gracias por otorgarme la posibilidad de trabajar con otros investigadores en el exterior y generar nuevos vínculos para continuar investigando. Gracias al espíritu innovador de Tere y entusiasta de Mario que este hermoso proyecto se inició. Ahora este micelio está activo para seguir creciendo y expandiéndose en busca de nuevas oportunidades, siempre conectado a su origen. ¡Infinitamente agradecida!

Gracias gracias a todo el L5 por los momentos compartidos!

A Marina por acompañarme en este proceso desde el comienzo, gracias por sus conocimientos, consejos y paciencia en mis momentos de ansiedad. Compañera del mate de las 10. Queda mucho por hacer Mari Mari!

A Vivi por su ayuda incondicional, entre placas, geles, sedimentos, pasos de zumba, chistes, charlas existenciales y frases célebres pasamos largas jornadas en el lab.

A Lina, hermanita menor, gracias por el apoyo, especialmente en este tiempo de escritura y aislamiento. Se extraña la pinta after lab modo catarsis.

A Marian, por esta linda amistad que se fue dando, entre salidas, mensajes y audios largos. Gracias por sus palabras de aliento y confianza en todo momento!

A Esteban y Marinita por contagiarme su espíritu inquieto. Siempre predispuestos a ayudarme. Gracias por las charlas y tardes compartidas.

A Sol, por su dedicación y compromiso que se vieron reflejados en los resultados obtenidos. Gracias por esta instancia de aprendizaje mutuo.

A Marti por su compañerismo y palabras de aliento. Y obviamente por las exquisiteces compartidas, junto a Marina han endulzado las mañanas y las tardes en el box. Sin dudas, gracias a ustedes los mejores ágapes son del L5!

A Caro y Sabri por su ayuda en el análisis bioinformático y asesoramiento permanente.

A Irma, gran partenaire en los eventos científicos, gracias por su generosidad.

A Pau, por sus abrazos energéticos y alegría contagiosa.

A Lau, Vero y Bibi por sus charlas y asesoramiento.

A Celeste por recibirme cada mañana con un mate calentito y por sus charlas tan agradables, compartiendo alguna cosita rica que preparaban con Andrea.

A Marina y Julio por su predisposición en ayudar con la esterilización del material de laboratorio.

A Esteban HPLC por su buena predisposición para trabajar y las charlas filosóficas que surgían espontáneamente en el laboratorio.

A lxs becarixs del CINDEFI por los momentos compartidos en el box, siempre dispuestos a colaborar, entre risas, mates, pochoclos y catarsis grupal.

A Inés y Rocío por ayudarme en mis comienzos cuando iba a trabajar al INFIVE y Agronomía.

A Alexandra Elbakyan por su gran aporte a la ciencia abierta.

A mis compañerxs de cátedra, por cubrirme cuando lo necesité.

A Alejandra Vidal por su compromiso y ética profesional. Gracias por su cálidez, escucha y guía durante este proceso de desarrollo personal y profesional.

A Constanza, por sus clases de inglés y ayuda cuando la necesité.

A Mika por el gran trabajo de fotografía y edición en las carátulas.

A Cami y Fla, por hacerme sentir como en casa en todo momento. Gracias por las charlas científicas y filosóficas. Eternamente agradecida por su ayuda!

A Andre, por su gran amistad y a Juan, soporte técnico, que permitió que ésta tesis se termine de escribir y yo no colapse =)

A mis amigas incondicionales, Colo, Maru y Mumi por estar presente en todo momento, aún a la distancia. Por motivarme a seguir incluso cuando todo se nubla. Las quiero muchísimo!!!!

A Vane, mi hermana del alma, por tantos momentos compartidos.

A toda mi familia que me ha apoyado incondicionalmente.

A mis padres, que confiaron en mí desde siempre. Por darme la oportunidad de formarme y ser la persona que soy. Por todo el amor recibido. Gracias infinitas.

A mis hermanos y hermana por sus palabras de apoyo en todo momento.

A mis sobris, Cata, Cami y Pedri, por llenarme de amor y felicidad.

A Mate, por su gran compañía en estos tiempos de tesis y aislamiento. Por su ternura, energía y amor incondicional.

Finalmente mi reconocimiento especial a la gran artista plástica Yolanda J. Ruiz, mi madre.

¡Gracias, gracias y miles de gracias! Soy una privilegiada de contar con tanta gente hermosa a mí alrededor.

INDICE

ABREVIATURAS.....	20
I INTRODUCCIÓN.....	25
I.1 PROBLEMÁTICA AMBIENTAL	25
I.2 MARCO LEGAL.....	29
I.3 TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN.....	32
<i>I.3.1 Descripción de las tecnologías aplicadas en esta Tesis</i>	<i>34</i>
I.3.1.1 Tecnología de remediación basada en la oxidación química	34
I.3.1.2 Tecnologías de biorremediación	35
I.3.1.3 Combinación de técnicas de oxidación química y procesos de biorremediación.....	41
I.4 HONGOS SAPRÓTROFOS DESCOMPONEDORES DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS COMO AGENTES DE BIOAUMENTO	42
I.5 METABOLISMO MICROBIANO DE HIDROCARBUROS.....	50
<i>I.5.1 Biodegradación bacteriana de PAH.....</i>	<i>52</i>
<i>I.5.2 Biodegradación fúngica de PAH.....</i>	<i>53</i>
II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
II.1 HIPÓTESIS	57
II.2 OBJETIVO GENERAL	57
II.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
III.1 MATERIALES UTILIZADOS	60
<i>III.1.1 Cepas fúngicas</i>	<i>60</i>
<i>III.1.2 Medios de cultivo</i>	<i>61</i>
<i>III.1.3 Buffers y soluciones.....</i>	<i>63</i>
<i>III.1.4 Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH).....</i>	<i>65</i>
<i>III.1.5 Sustrato lignocelulósico</i>	<i>65</i>
<i>III.1.6 Suelo de zona industrial.....</i>	<i>66</i>
<i>III.1.7 Barro de fondo de pileta API.....</i>	<i>67</i>
III.2 METODOLOGÍAS PARA CULTIVOS FÚNGICOS.....	68
<i>III.2.1 Producción de biomasa fúngica</i>	<i>68</i>
<i>III.2.2 Screening del potencial degradador de los hongos saprótrofos</i>	<i>68</i>
III.2.2.1 Potencial degradador de PAH de los hongos ligninolíticos	68
III.2.2.2 Capacidad celulolítica.....	69
III.2.2.3 Co-inoculación de hongos con capacidad degradadora de PAH	70
III.2.2.4 Potencial degradador de PAH de LPSC 232 y LPSC 436 como única fuente de carbono	70

III.2.3	<i>Tolerancia a hidrocarburos</i>	71
III.2.3.1	<i>Tolerancia a una mezcla de PAH</i>	71
III.2.3.2	<i>Tolerancia a PAH específicos</i>	71
III.2.3.3	<i>Tolerancia al barro FP antes y después del tratamiento de oxidación química</i>	72
III.2.3.4	<i>Tolerancia al barro FP+PSA pos neutralización del pH</i>	72
III.2.4	<i>Efecto de PAH seleccionados sobre el perfil de FAME en hongos seleccionados y la relación isotópica ¹³C/¹²C de ácidos grasos específicos utilizando glucosa ¹³C</i>	73
III.2.5	<i>Efecto del pireno y el barro FP en el crecimiento de Corioloopsis rigida LPSC 232 y Grammothele subargentea LPSC 436 en diferentes medios de cultivo</i>	75
III.2.6	<i>Habilidad de C. rigida LPSC 232 en la remoción de pireno en cultivo líquido</i>	76
III.2.7	<i>Ensayo de mineralización en sistemas biometers (Bartha & Pramer, 1965)</i>	78
III.2.8	<i>Preparación de microcosmos</i>	80
III.2.8.1	<i>Microcosmos con suelo contaminado artificialmente con fenantreno</i>	80
III.2.8.2	<i>Microcosmos con suelo contaminado artificialmente con barro de fondo de pileta API</i> (FP)	82
III.2.8.3	<i>Microcosmos con barro de fondo de pileta API oxidado y sin oxidación previa</i>	83
III.3	<i>DETERMINACIONES FÍSICAS Y QUÍMICAS</i>	85
III.3.1	<i>Porcentaje de humedad del suelo</i>	85
III.3.2	<i>Determinación de humedad del residuo FP por destilación azeotrópica</i>	85
III.3.3	<i>Determinación de pH y conductividad eléctrica</i>	85
III.3.4	<i>Determinación de la concentración residual de persulfato de amonio</i>	86
III.3.5	<i>Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) por FT-IR</i>	86
III.3.6	<i>Determinación de hidrocarburos alifáticos (HA) y policíclicos aromáticos (PAH) por GC-FID</i>	87
III.3.7	<i>Determinación de PAH por HPLC-UV</i>	87
III.3.8	<i>Fraccionamiento SARA del residuo FP</i>	88
III.3.9	<i>Análisis espectral FT-IR de la fracción soluble en pentano</i>	89
III.4	<i>TÉCNICAS DE RECUENTOS BACTERIANOS</i>	90
III.4.1	<i>Recuento de bacterias heterótrofas cultivables</i>	90
III.4.2	<i>Recuento de bacterias degradadoras de HA</i>	90
III.4.3	<i>Recuento de bacterias degradadoras de PAH</i>	91
III.4.4	<i>Recuento de bacterias sulfato reductoras</i>	91
III.4.5	<i>Recuento de hongos</i>	91
III.5	<i>ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LOS MICROCOSMOS</i>	92
III.5.1	<i>Actividad enzimática lacasa</i>	92
III.5.2	<i>Actividad deshidrogenasa (Thalmann, 1968)</i>	93
III.5.3	<i>Actividad hidrolasas mediante hidrólisis de diacetato de Fluoresceína (FDA) (Schnürer & Thomas, 1982)</i>	94
III.6	<i>ESTUDIOS GENÓMICOS</i>	94

III.6.1	<i>Extracción, purificación y cuantificación de ADN fúngico</i>	94
III.6.2	<i>Identificación de los hongos alóctonos</i>	95
III.6.3	<i>Extracción de ADN de las comunidades microbianas presentes en los microcosmos</i>	95
III.6.4	<i>Determinación de la estructura microbiana</i>	96
III.6.4.1	<i>Amplificación de segmentos de rADN bacteriano y fúngico mediante técnicas de PCR</i>	96
III.6.4.2	<i>Electroforesis en gel con gradiente desnaturante DGGE</i>	97
III.6.5	<i>Estudio de la diversidad microbiana</i>	97
III.6.6	<i>Cuantificación de poblaciones microbianas por PCR cuantitativa en tiempo real</i> <i>(qPCR)</i>	99
III.7	ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON SEMILLAS DE LECHUGA (<i>LACTUCA SATIVA</i>)	100
III.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	102
IV	TRATAMIENTO OXIDATIVO DEL BARRO PETROQUÍMICO FP	106
IV.1	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL BARRO DE FONDO DE PILETA API (FP) ANTES Y DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE PSA	106
IV.1.1	<i>Determinación de Hidrocarburos Totales (HT) por FT-IR</i>	107
IV.1.2	<i>Determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por GC-FID</i>	109
IV.1.3	<i>Determinación de las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos, resinas</i> <i>y asfaltenos (SARA) del barro FP y FP PSA</i>	110
IV.3	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL FP	113
IV.4	ANÁLISIS TAXONÓMICO DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS Y FÚNGICAS NATIVAS DEL BARRO FP Y FP+PSA	114
IV.5	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL FP: TEST DE FITOTOXICIDAD SOBRE SEMILLAS DE LECHUGA	118
IV.6	DISCUSIÓN	120
IV.7	CONCLUSIONES.....	127
V	ESTUDIO DEL POTENCIAL DE HONGOS SAPRÓTROFOS PARA SU APLICACIÓN EN ESTRATEGIAS DE REMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS	131
V.1	CULTIVO FÚNGICO SOBRE MEDIO AGARIZADO	133
V.1.1	<i>Tolerancia y potencial degradador de PAH de hongos seleccionados</i>	133
V.1.1.1	<i>Mezcla de PAH en presencia de carboximetilcelulosa (CMC)</i>	133
V.1.1.2	<i>Actividad enzimática celulolítica y oxidativa de los hongos seleccionados</i>	136
V.1.1.3	<i>Crecimiento y potencial degradador de hongos saprótrofos en cultivos duales sobre</i> <i>una mezcla de PAH</i>	136
V.1.1.4	<i>Tolerancia de <i>Coriopsis rigida</i> LPSC 232 y <i>Grammothele subargentea</i> LPSC 436 frente</i> <i>a cristales de PAH</i>	138
V.1.1.5	<i>Cultivo de <i>C. rigida</i> LPSC 232 y <i>G. subargentea</i> LPSC 436 en medio agarizado con PAH</i> <i>como única fuente de carbono</i> 141	

V.1.1.6	Efecto de PAH seleccionados sobre el perfil de FAME en cultivos de LPSC 232 y LPSC 436 y la relación isotópica ¹³ C/ ¹² C de ácidos grasos específicos utilizando glucosa ¹³ C	142
V.1.2	<i>Efecto del barro petroquímico FP oxidado sobre el crecimiento de Corioloipsis rigida LPSC 232 y Grammothele subargentea LPSC 436 sobre medio agarizado</i>	152
V.2	CULTIVO FÚNGICO EN MEDIO LÍQUIDO	154
V.2.1	<i>Efecto del pireno sobre el crecimiento de Corioloipsis rigida LPSC 232 y Grammothele subargentea LPSC 436 en diferentes medios de cultivo</i>	154
V.2.2	<i>Efecto del barro FP sobre el crecimiento de Corioloipsis rigida LPSC 232 y Grammothele subargentea LPSC 436 en diferentes medios de cultivo</i>	157
V.2.3	<i>Evaluación de la habilidad de Corioloipsis rigida LPSC 232 para la remoción de pireno en cultivo líquido</i>	158
V.3	CULTIVO FÚNGICO SOBRE RASTROJO BAJO CONDICIONES DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO: ACTIVIDAD RESPIRATORIA Y SU RESPUESTA FRENTE AL BARRO FP	160
V.4	DISCUSIÓN	163
V.5	CONCLUSIONES	185
VI	MICORREMEDIACIÓN Y SU COMBINACIÓN CON EL TRATAMIENTO OXIDATIVO	188
VI.1	CAPACIDAD DEGRADADORA DE <i>G. SUBARGENTEA</i> LPSC 436 Y <i>G. SEPIARIUM</i> LPSC 735 EN SUELO CONTAMINANDO ARTIFICIALMENTE CON FENANTRENO	190
VI.1.1	<i>Cultivos en microcosmos en condición axénica</i>	190
VI.1.2	<i>Cultivos en microcosmos en presencia de la comunidad nativa del suelo</i>	191
VI.2	CAPACIDAD DEGRADADORA DE <i>C. RIGIDA</i> LPSC 232 EN SUELO CONTAMINANDO ARTIFICIALMENTE CON FENANTRENO	192
VI.2.1	<i>Cultivos en microcosmos en condición estéril y no estéril</i>	192
VI.3	EFFECTO DE LOS HONGOS LPSC 232 Y LPSC 436 EN MICROCOSMOS DE SUELO CONTAMINADO CON BARRO DE FONDO DE PILETA API (S-FP)	194
VI.3.1	<i>Efecto sobre la remoción de HT del barro</i>	194
VI.3.2	<i>Efecto sobre la actividad de la microbiota nativa y la actividad enzimática oxidativa</i>	195
VI.3.3	<i>Efecto sobre la toxicidad en L. sativa</i>	198
VI.4	CAPACIDAD DEGRADADORA DE LOS HONGOS LPSC 232 Y LPSC 436 EN MICROCOSMOS DE BARRO DE FONDO DE PILETA API (FP) TRATADO POR OXIDACIÓN CON PERSULFATO DE AMONIO (PSA)	204
VI.4.1	<i>Efecto sobre la remoción de hidrocarburos del barro</i>	206
VI.4.2	<i>Efecto del bioaumento con LPSC 232 pos tratamiento oxidativo del barro FP analizado por espectroscopia FT-IR</i>	210
VI.4.3	<i>Efecto sobre actividad enzimática microbiana</i>	220
VI.4.4	<i>Estimación de la biomasa microbiana mediante PCR cuantitativa</i>	222
VI.4.5	<i>Efecto de los tratamientos sobre las comunidades bacterianas y fúngicas</i>	226
VI.5	DISCUSIÓN	239

VI.6	CONCLUSIONES.....	260
VII	CONCLUSIONES GENERALES.....	265
VIII	BIBLIOGRAFÍA	268
IX	ANEXO	293

Abreviaturas

A: Axénico/a

ABTS: [2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)]

ANT: Antraceno

API: *American Petroleum Institute*

CMC: Carboximetilcelulosa

DBT: Dibenzotiofeno

DGGE: Electroforésis en gel con gradiente desnaturalizante. *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DyPs: Peroxidasas decolorizantes de tintes

EM: Extracto de malta

FAME: Ésteres metílicos de ácidos grasos. *Fatty Acids Methyl Esters*.

FAS: *Fatty Acids Synthase*

FBCC: *Fungal Biotechnology Culture Collection*

FC: Factor carcinogénico humano.

FDA: Diacetato de fluoresceína

FEN: Fenantreno

FLU: Fluoreno

FP: Barro fondo de pileta API

FT-IR: Espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier

G: Glucosa

GC: Cromatografía de gases

HA: Hidrocarburos Alifáticos

HMWH: Hidrocarburo de alto peso molecular. *High Molecular Weight Hydrocarbon*

HPB: Hongos causantes de pudrición blanca

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Presión

HTP: Hidrocarburo totales de petróleo

I_{Eh}%: Índice porcentuales de Inhibición en la elongación del hipocótilo

I_{Er} %: Índice porcentual de inhibición en la elongación radicular

I_G%: Índice porcentual de germinación

IRM-GC-C-MS: *Isotope Ratio Monitoring-Gas Chromatography-Combustion- Mass Spectrometry.*

ITS: Espacios Transcritos Internos del ADN ribosomal. *Internal Transcribed Spacer*

K_{ow}: coeficiente de partición octanol/agua

Lac I: Isoenzimas lacasa I

Lac II: Isoenzimas lacasa II

lcc1: Gen Lac I

LiP: lignina peroxidasa

LMWH: Hidrocarburo de bajo peso molecular. *Low Molecular Weight Hydrocarbon*

LPSC: Colección de cultivos del Instituto Spegazzini de la ciudad de La Plata

MB: medio mineral sólido con agarosa 0,8%

ME: Caldo con extracto de malta y levadura

MML: Medio Mineral Líquido

MMS: Medio Mineral Sólido

MnP: Manganeso peroxidasa

NAF: Naftaleno

NE: No Estéril

NMP: Número Más Probable

OTU: Unidades Taxonómicas Operacionales

P₄₅₀: Sistema enzimático citocromo intracelular P₄₅₀

PAH: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos.

PCBs: Policlorobifenilos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Polymerase Chain Reaction

qPCR: PCR cuantitativa. Quantitative PCR

PI: punto isoeléctrico

PIR: Pireno

PM: Peso molecular.

PSA: Persulfato de amonio

rADN: Ácido Desoxiribonucleico ribosomal

rARN: Ácido ribonucleico ribosomal

RB: Rosa de Bengala

SARA: S: Saturados; A: Aromáticos; R: Resinas y A: Asfaltenos

SL: Sustrato Lignocelulósico

TPF: Trifenilformazan

TTF: Triclorofeniltetrazolio

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

VP: peroxidasa versátil

Capítulo I

Introducción



I Introducción

I.1 Problemática ambiental

La explotación de hidrocarburos en la Argentina comenzó con el hallazgo de petróleo el 13 de diciembre de 1907 en la ciudad de Comodoro Rivadavia durante una perforación en busca de agua. A partir de allí comenzó la explotación petrolera en nuestro país. Después de 15 años de su descubrimiento, el Poder Ejecutivo durante la Presidencia de Hipólito Yrigoyen, crea la Dirección General de Yacimientos Petrolíferos Fiscales (YPF), a cargo del General Enrique Mosconi. Así surgieron localidades referentes de la actividad petrolera como Comodoro Rivadavia en la provincia de Chubut, Las Heras, Cañadón Seco, Caleta Olivia en la de Santa Cruz y Plaza Huincul en Neuquén.

Actualmente las reservas de petróleo y gas se encuentran distribuidas en las cuencas sedimentarias: Austral marina, Golfo San Jorge, Ñirihuau, Neuquina, Cuyana, Noreste, General Levalle, Los Bolsones y Cañadón asfalto. La Cuenca del Golfo San Jorge, la cual se extiende desde el sur de la provincia de Chubut y norte de la provincia de Santa Cruz, alberga muchos de los yacimientos de explotación petrolera ubicados en la Patagonia. Es una de las más importantes del país en la producción de petróleo y gas, debido a su potencial crecimiento tanto en lo referente a recuperación secundaria, y a la explotación de hidrocarburos no convencionales³. Sin embargo, la gran demanda de hidrocarburos a nivel mundial y el desafío del autoabastecimiento han posicionado a nuestro país en el segundo puesto de la lista de países poseedores de los mayores recursos técnicamente recuperables en lo que hace al gas almacenado en las rocas generadoras, también conocidas como *shale* (según la Agencia de Información de Energía de los Estados Unidos). Desde el 2010 a la fecha, se ha registrado una creciente actividad petrolera en la Formación Vaca Muerta (Cuenca Neuquina) con alrededor de 500 pozos (López Anadón, 2015), con las consecuencias ambientales que esta gran

³Los hidrocarburos "convencionales", que se han explotado tradicionalmente desde hace más de un siglo, son exactamente los mismos que los llamados no convencionales. La principal diferencia es la forma en que se encuentran almacenados, tanto el gas como el petróleo. Cuando hablamos de "no convencionales", nos referimos específicamente a dos tipos de hidrocarburos: los de las formaciones de roca generadora impermeables "*shale*", como por ejemplo Vaca Muerta, y los de las formaciones de baja permeabilidad "*tight*", Las Lajas inferior. Fuente: Instituto Argentino del Petróleo y el Gas.

actividad genera impactando tanto en suelo como en agua. Todas las actividades involucradas en la exploración y explotación del petróleo provocan impactos potencialmente negativos en suelos, agua y aire. La extracción, transporte y procesamiento de crudo generan grandes volúmenes de residuos como ripios, lodos petrolizados, agua de perforación y petróleo crudo. Así mismo, las roturas de líneas de conducción, la pérdida en las empaquetaduras de los pozos, las roturas en oleoductos, poliductos de interconexión, los derrames en baterías y las pérdidas en los tanques de almacenamiento (en tierra o en barcos) son algunas de las causas de derrame que llevan a la contaminación con hidrocarburos tanto del suelo como del agua. En nuestro país, el 15 de enero de 1999 se produjo el derrame de hidrocarburos más impactante en aguas del Río de La Plata tras la colisión de dos buques frente a las costas bonaerenses de Magdalena, generando un volumen estimado en 5000m³ de hidrocarburos (Leturia & Nugoli, 2013).

Entre los residuos de petróleo generados a lo largo de la industria petroquímica durante la extracción, el transporte, el almacenamiento (*upstream*) y el refinado (*downstream*), se encuentran los barros oleosos que se depositan en los fondos de tanques de almacenamiento, los provenientes de unidades de floculación-flotación, flotación por aire disuelto, separadores gravitacionales API (*American Petroleum Institute*), lodos de limpieza y exceso de lodo activado de la planta de tratamiento biológico de aguas residuales en el sitio. Siendo los barros de fondo de tanques los más estudiados en la literatura (Hu *et al.*, 2013).

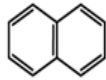
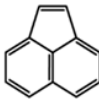
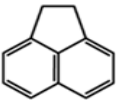
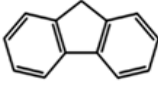
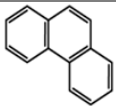
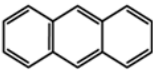
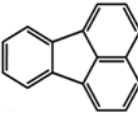
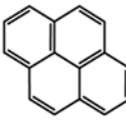
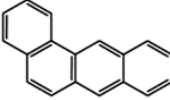
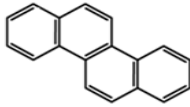
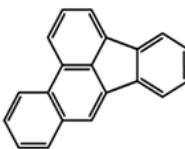
Los barros constituyen una emulsión compleja de hidrocarburos del petróleo (HP), agua, metales pesados y partículas sólidas. Los HP son generalmente clasificados en alifáticos, aromáticos, heterociclos del N-S-O; resinas y asfaltenos (Mrayyan & Battikhi, 2005). Las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos incluyen derivados alcanos, cicloalcanos, bencenos, toluenos, xilenos, fenoles y varios policíclicos aromáticos (PAH). La fracción de heterociclos del N-S-O contiene compuestos polares como ácidos nafténicos, tiofenos y piridinas. Las resinas son la fracción del crudo constituida por agregados de anillos poliaromáticos, soluble en *n*-heptano, a diferencia de la fracción de asfaltenos. Su estructura es similar a la de los asfaltenos, pero de menor PM, y con una mayor proporción de cadenas alifáticas/anillos aromáticos que los

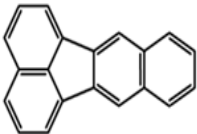
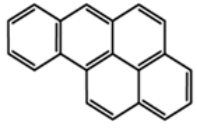
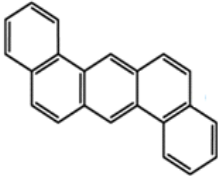

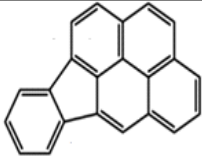
asfaltenos, constituyendo una interfase entre el núcleo de asfalto y el resto de la matriz del crudo, la cual tiene usualmente una relación alta de parafinas/aromáticos. Ambas fracciones son los responsables de la estabilidad de la emulsión debido a que sus constituyentes contienen grupos funcionales pudiendo actuar como emulsificantes lipofílicos (Lehmann & Rondon, 2006).

Los PAH están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, desde volcanes, incendios forestales, quema de vegetación natural y combustibles fósiles (Bamforth & Singleton, 2005), hasta los generados en actividades antropogénicas, como derrames de petróleo y combustión de derivados (Meckenstock *et al.*, 2004; Johnsen *et al.*, 2005). Estos compuestos y los derivados de su transformación son potencialmente peligrosos para todos los organismos vivos en términos de su distribución dentro de la biosfera, sus características relacionadas con el riesgo y la capacidad de acumularse en el suelo y en los tejidos animales y vegetales (Sverdrup *et al.*, 2002). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) analiza y menciona 16 PAH como contaminantes importantes (**Tabla I. 1**). Siete de ellos: DBA-dibenzo [a, h] antraceno, BaA-benzo [a] antraceno, BaP-benzo [a] pireno, BbF-benzo [b] fluoranteno, BkF-benzo [k] -fluoranteno, Cri-criseno e IP-indeno [123-c, d] pireno se priorizan debido a sus características teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas (Samanta *et al.*, 2002; USEPA, 2008; Zhang *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018).

Cuando los PAH se depositan en la superficie terrestre interactúan con las partículas del suelo, siendo la adsorción uno de los principales mecanismos involucrados, cuya intensidad depende del tipo de PAH y de las propiedades del suelo, como el contenido de materia orgánica, su composición y su estructura (Tsibart, 2013). Durante su biodegradación estos compuestos aromáticos son progresivamente secuestrados en la matriz contaminada resultando menos disponibles para los microorganismos (Puglisi *et al.*, 2007). La reducción de la biodisponibilidad de los PAH con el tiempo representa uno de los mayores desafíos en la biorremediación de suelos contaminados.

Tabla I. 1. Características de los 16 PAH incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la USEPA (USEPA, 2008)(USEPA, 2008).

PAH	Formula molecular	Estructura	PM	Solubilidad	
				en agua ($\mu\text{g/l}$)	FC
Naftaleno	C_{10}H_8		128,2	$\sim 3,5 \times 10^{-2}$	-
Acenafteno	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}$		154,2	$3,4 \times 10^{-3}$	-
Acenaftileno	C_{12}H_8		152,2	$\sim 4 \times 10^{-3}$	-
Fluoreno	$\text{C}_{13}\text{H}_{10}$		166,2	$\sim 2 \times 10^{-3}$	-
Fenantreno	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}$		178,2	$\sim 1 \times 10^{-3}$	-
Antraceno	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}$		178,2	$4-7 \times 10^{-5}$	-
Fluoranteno	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}$		202,2	$2,7 \times 10^{-4}$	-
Pireno	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}$		202,2	$0,9-1,4 \times 10^{-4}$	-
Benzo[a]antraceno	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}$		228,3	$0,9-1,3 \times 10^{-5}$	2
Criseno	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}$		228,3	$2-1,6 \times 10^{-6}$	1
Benzo[b]fluoranteno	$\text{C}_{20}\text{H}_{12}$		252,3	$\sim 1,5 \times 10^{-6}$	3

Benzo[k]fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂		252,3	~1 x10 ⁻⁶	-
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂		252,3	1,4-3,8 x10 ⁻⁶	4
Dibenzo[a,h] Antraceno	C ₂₂ H ₁₄		278,3	~1 x10 ⁻⁶	4
Benzo[g,h,i] Perileno	C ₂₂ H ₁₂		276,3	1,8-2,6 x10 ⁻⁷	-
Indeno[1,2,3,c,d] Pireno	C ₂₂ H ₁₂		276,3	~2 x10 ⁻⁷	2

Datos tomados de Fingas (2018). PM: Peso molecular. FC: Factor carcinogénico humano.

I.2 Marco legal

Desde el año 1972, en que se desarrolló la primera reunión de la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Humano (Estocolmo, Suecia), y luego se creara el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), se han venido celebrando y aprobando una serie de conferencias y tratados internacionales que conforman lo que podemos denominar el derecho ambiental internacional. La República Argentina ha colaborado en la elaboración y es parte en un gran número de estos tratados internacionales los cuales, al haber sido ratificados por leyes nacionales, resultan de aplicación a nivel interno (conf. art. 41 y art. 75, inc. 22 de la Constitución Nacional). Gran parte de estos tratados han servido de antecedente jurídico para la elaboración de normas ambientales nacionales. En este sentido, podemos mencionar a modo de ejemplo la Declaración de Naciones Unidas de Río '92 sobre Medio Ambiente

y Desarrollo y su influencia sobre el texto de la Ley General del Ambiente, Ley Nacional N° 25.675; y el Convenio Internacional de Basilea sobre Movimiento Transfronterizo de Desechos Peligrosos (ratificado por Ley Nacional N° 23.922) y su recepción en la Ley Nacional de Residuos Peligrosos N° 24.051.

Tras la Declaración de NU de Río del 92', se produce una reforma de la Constitución Nacional en el año 1994 y se incorpora a su texto, entre otras modificaciones, el artículo 41, mediante el cual se recepta el derecho de todo habitante a gozar de un ambiente sano y se establecen una serie de obligaciones y mandatos tanto a nivel general, como específicamente en relación con las autoridades. Además, se adoptó un sistema de distribución de competencias entre el Estado Nacional y los Estados Provinciales. La Nación, a partir de allí, tendría la facultad de dictar las denominadas "normas de presupuestos mínimos de protección ambiental" y las provincias, la facultad de complementar dichas normas.

El concepto de normas de presupuestos mínimos tiene como antecedente las leyes de base del derecho español y conforman, de acuerdo con la interpretación de parte de la doctrina con la que coincide un piso de regulación (un mínimo de protección ambiental) de carácter uniforme para todo el país, que debe ser aplicado por las Provincias, que han delegado en el Congreso Nacional la potestad de dictar estas normas, y se han reservado la potestad de complementarlas pudiendo ser más exigentes en post de la protección ambiental, pero no menos que el mínimo establecido a nivel federal.

De esta manera, fueron sancionadas por el Congreso Nacional una serie de leyes de presupuestos mínimos (9 en total) desde el año 2002 hasta la fecha. Estas son: la Ley N° 25.612 Presupuestos Mínimos para la Gestión Integral de los Residuos Industriales y de Actividades de Servicio; la Ley N° 25.670 Presupuestos Mínimos para la Gestión y Eliminación de PCBs; la Ley N° 25.675 , Ley General del Ambiente; la Ley N° 25.688 Régimen de Gestión Ambiental de Aguas; la Ley N° 25.831 Información Pública Ambiental; la Ley N° 25.916 Gestión de Residuos Domiciliarios; la Ley N° 26.331 Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental de los Bosques Nativos; la Ley N° 26.562 Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental para el Control de las Actividades de

Quema y la Ley N° 26.639 Régimen de Presupuestos Mínimos para la Preservación de los Glaciares y del Ambiente Periglacial.

El conjunto de estas leyes de presupuestos mínimos y los decretos y resoluciones nacionales que las han reglamentado parcialmente en el marco de las competencias del Gobierno Federal, constituyen lo que podemos denominar normativa ambiental de carácter nacional.

A partir de la publicación en el Boletín Oficial, la Ley Nacional N° 24.051 de tratamiento de residuos peligrosos cambió radicalmente el modo de operar de las empresas; por ejemplo, éstas han aplicado la metodología de perforación de pozos con "locación seca", sin pileta. Consiste en utilizar equipos especiales de tratamiento de lodos que hacen un uso más eficiente de los mismos al separar mejor la fase líquida de la sólida, con lo cual el volumen final de esta última se reduce sustancialmente y facilita el tratamiento y disposición final de ambas fases.

Con el posterior decreto reglamentario N° 831/93 (Ley Nacional N° 24.051) quedan establecidos los niveles guía de calidad de suelos para los hidrocarburos alifáticos y PAH (mg/ kg suelo seco), según el uso diferencial de los mismos (agrícola, residencial e industrial). Luego comenzaron a sucederse leyes, decretos reglamentarios, disposiciones y resoluciones que obligaron a las empresas y a las provincias a ocuparse del problema ambiental que ocasionaba la actividad hidrocarburífera.

Por su parte, los gobiernos provinciales adhieren a las leyes de presupuestos mínimos ambientales nacionales, estableciendo sus límites aceptables de PAH totales en suelo y en residuo petrolero. Para el caso de las Provincias de Buenos Aires (Ley Provincial N°11720. Decreto N° 806/97), de Santa Cruz (Ley Provincial N° 2567 Decreto N° 712/02. ANEXO X), de Chubut (Ley Provincial N° 5439. Decreto N° 993/2007), y de Neuquén (Ley Provincial N° 2863. Decreto N° 776/2017. Resolución N° 052/11) este valor es contemplado por las normas y procedimientos seguidos en la actividad de exploración y explotación.

En cambio, los componentes más complejos del crudo de petróleo, como las resinas y asfaltenos, no han sido considerados como fracciones individuales en las normas nacionales y provinciales para el establecimiento de niveles de concentración

guía. Probablemente la alta recalcitrancia de estos compuestos, la metodología requerida para su monitoreo y escasa evidencia científica de su biodegradación hayan sido motivo de la falta de definición de los valores guía.

Dada la peligrosidad de la naturaleza e incrementada generación de estos residuos con alto contenido en hidrocarburos, su impropia disposición o insuficiente tratamiento puede significar una seria amenaza para la salud humana y para el ambiente.

I.3 Tecnologías de remediación

El término “tecnología de tratamiento” implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones que altera la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (USEPA, 2007). Las tecnologías de remediación representan una alternativa a la disposición de desechos peligrosos en tierra que no han sido previamente tratados, siendo la capacidad o posibilidad de éxito ampliamente variable y dependiente de las condiciones específicas bajo las cuales se realiza (Volke Sepúlveda & Velasco Trejo, 2002).

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios: (i) estrategia de remediación; (ii) lugar en que se realiza el proceso de remediación, y (iii) tipo de tratamiento (Teefy, 1997; USEPA, 2007).

i- Estrategia de remediación

Son tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto:

- *Destrucción o modificación de los contaminantes.* Este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.

- *Extracción o separación.* Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica).

- *Aislamiento o inmovilización del contaminante.* Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

ii- Lugar de realización del proceso de remediación.

En general, se distinguen dos tipos de tecnología:

- *In situ.* Son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del mismo, sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.

- *Ex situ.* La realización de este tipo de tecnologías requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado y trasladarlo al lugar donde será tratado. Cuando el tratamiento de remediación se realiza en el mismo predio/sitio se denomina *on site* (Ej.: biocelda construida en el predio del generador del residuo), y si se realiza fuera de él se denomina *off site* (Ej.: tratamiento en bioreactor).

iii- Tipos de tratamiento:

- *Tratamientos fisicoquímicos.* Este tipo de tratamiento utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación. Por ejemplo, extracción con solventes, ventilación de suelo, ultrasonido, etc.

- *Tratamientos químicos.* Incluyen por ejemplo, la aplicación de corrientes eléctricas y el uso de oxidantes químicos fuertes (Lim *et al.*, 2016). La electrocinética, es una herramienta basada en la aplicación de una corriente eléctrica al suelo, empleando un ánodo y un cátodo, que promueve la migración del contaminante hacia el cátodo (Ranjan *et al.*, 2006). Mientras que el uso de oxidantes químicos se basa en su característica electrofílica, es decir su afinidad por dobles enlaces como los presentes en los PAH.

- *Tratamientos térmicos.* Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), combustión, descomposición o inmovilización los contaminantes en un suelo u otra matriz sólida.

- *Tratamientos biológicos (biorremediación)*. Aprovechan e incentivan los procesos de biodegradación natural del suelo. Utilizan las actividades metabólicas de organismos específicos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.

I.3.1 Descripción de las tecnologías aplicadas en esta Tesis

I.3.1.1 *Tecnología de remediación basada en la oxidación química*

Las técnicas de oxidación química utilizan oxidantes fuertes para producir la degradación de contaminantes recalcitrantes presentes en aguas o suelos lo que genera especies químicas menos tóxicas o hasta incluso su mineralización. Entre los oxidantes químicos más utilizados se encuentran el peróxido de hidrógeno (Gan, *et al.*, 2013; Pardo *et al.*, 2015), el anión persulfato (Tsitonaki *et al.*, 2010; Vicente *et al.*, 2011; Monrroy *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015), el permanganato de potasio (de Souza *et al.*, 2009) y el ozono (Rivas *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2014).

El anión persulfato es un oxidante fuerte con un potencial de reducción (E^0) de +2,1 V. Puede presentarse en forma de sales en combinación con cationes como sodio, amonio y potasio, cuyas solubilidades (a 20 °C) son de 55,6 g/100ml, 58,2 g/100ml y 5,29 g/100ml, respectivamente. Si bien el anión persulfato presenta un potencial de oxidación alto, la velocidad de reacción con contaminantes es lenta.

La velocidad de reacción se puede incrementar tras la utilización de activantes generando el radical sulfato, $SO_4^{\cdot-}$ ($E^0 = +2,6$ V). Ejemplo de activantes son el incremento de la temperatura de reacción (Mora *et al.*, 2009), la exposición a la luz UV (Lin & Lee, 2015), el pH alcalino (Furman *et al.*, 2011), la suplementación de metales de transición como hierro (II) (Kolthoff & Miller, 1951; Peluffo *et al.*, 2016). En respuesta al elevado potencial de reducción del radical sulfato, éste rápidamente reacciona con compuestos orgánicos e inorgánicos conduciendo a una efectiva remediación (Usman *et al.*, 2012).

En general las técnicas de oxidación química requieren un relativamente corto tiempo de tratamiento para degradar el contaminante, y sus productos de reacción son

usualmente más biodegradables que la matriz original (Jing *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando se tratan grandes volúmenes de la matriz contaminada (suelo/barro), la oxidación puede requerir una gran cantidad del agente oxidante, cuando no, un equipamiento especial y considerable gasto energético lo que podría incrementar el costo del tratamiento (Cui *et al.*, 2009; Fujii *et al.*, 2011).

1.3.1.2 Tecnologías de biorremediación

Durante el proceso de biodegradación, la transformación del contaminante puede ser impulsada por las necesidades energéticas de los microorganismos, o puede ser de naturaleza fortuita, en el caso de cometabolismo.

Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras. El proceso de biorremediación incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción a la materia orgánica (secuestro del contaminante), de intercambio iónico, e incluso reacciones de complejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales (Chukwunonso *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2020).

La estructura y la composición del contaminante es uno de los factores más importantes que condicionan la estrategia de biorremediación a aplicar, por lo que su caracterización es el primer paso en la evaluación de la tratabilidad (Morelli *et al.*, 2001).

Por otro lado, factores físicos como la temperatura, el pH, la disponibilidad de oxígeno, la salinidad y la humedad deben ser considerados, ya que afectan directamente las características químicas de los compuestos contaminantes, como su solubilidad en agua, así como a la fisiología y diversidad de la microbiota autóctona del suelo (Das & Chandran, 2011).

En suelos contaminados con hidrocarburos, donde la presencia de carbono orgánico suele ser alta, otros nutrientes disponibles pueden agotarse rápidamente (Breedveld & Sparrevik, 2000). Las proporciones molares de C:N:P descritas en la bibliografía respecto al contenido de carbono a degradar son muy variadas. La EPA

recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos (US-EPA, 1995).

Está ampliamente aceptado que la biodisponibilidad de un contaminante (compuesto libremente disponible para cruzar membrana del organismo, Semple *et al.*, 2004) está determinada por su sorción y desorción en suelos, y controlados por interacciones biológicas, químicas y físicas que resultarán diferentes según el tipo de suelo y biota asociada. Esta propiedad puede ser una limitante del éxito de un proceso de biorremediación (Bamforth & Singleton, 2005). Tanto los hidrocarburos alifáticos de cadena larga como los PAH especialmente los de elevado peso molecular (HMW-PAH), tienen una baja solubilidad en agua lo cual se asocia con una baja biodisponibilidad, resultando resistentes a la degradación (Semple *et al.*, 2003).

Además, los hidrocarburos tienen tendencia a adsorberse rápidamente a superficies minerales, como las arcillas del suelo, y a la materia orgánica, como los ácidos húmicos. Cuanto mayor sea el tiempo de contacto del hidrocarburo en suelo, mayor será su adsorción y menor su extractabilidad, ya sea química o biológica. Este proceso es conocido como envejecimiento o “*ageing*”, en inglés, y es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la tecnología de la biorremediación en suelos crónicamente contaminados, ya que está íntimamente relacionado con la persistencia de los contaminantes en el medio ambiente.

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTP), solventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), plaguicidas (2,4-D), conservadores de madera (creosota) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Semple *et al.*, 2001; Teefy, 1997).

Las estrategias de biorremediación descriptas a continuación buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano y la degradación del contaminante.

Bioestimulación

La bioestimulación implica el aporte de nutrientes (N, P, aporte de oxígeno, entre otros) para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos (metales pesados) *in situ* (Carberry & Wik, 2001). Sin embargo, para mantener el control de una tasa de degradación eficiente la formulación de nutrientes y estrategia de aplicación deben adaptarse al sitio y contaminante (Megharaj *et al.*, 2011).

Bioaumentación

Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microbiota autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora para llevar a cabo la bioremediación. Consiste en la adición de organismos con capacidad para degradar los contaminantes en cuestión y para promover su biodegradación o biotransformación.

Los microorganismos son seleccionados en función de su capacidad de colonización de la matriz y degradación del contaminante. El inoculante puede ser una sola cepa bacteriana o en un consorcio bacteriano con diferentes capacidades metabólicas (Festa *et al.*, 2016). La colonización incluye la capacidad de hacer biodisponible al contaminante. Entre las estrategias promotoras de la biodisponibilidad se describen la capacidad de adhesión al sustrato (Wick *et al.*, 2002), mayor afinidad específica por el sustrato (Johnsen *et al.*, 2005) y la producción de biosurfactantes (Semple *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2014). La concentración de inóculo a utilizar es dependiente del área de la zona contaminada, la distribución de los contaminantes en la matriz, y de la concentración de microorganismos autóctonos (Riser-Roberts 1998).

La estrategia de bioaumentación ha sido aplicada en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando inoculantes bacterianos, como cepa pura (Waigi *et al.*, 2015) o consorcio (Roy *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2018), así como también inoculantes fúngicos (Lladó, *et al.*, 2013; Rhodes, 2014; Winquist *et al.*, 2014; Covino *et al.*, 2016; Al-Dhabaan, 2021). Sin embargo, de la revisión de artículos científicos y patentes realizada por

Quintella y colaboradores (2019), se aprecia que la estrategia de bioaumentación utilizando bacterias es la principal tecnología de biorremediación desarrollada hasta el momento.

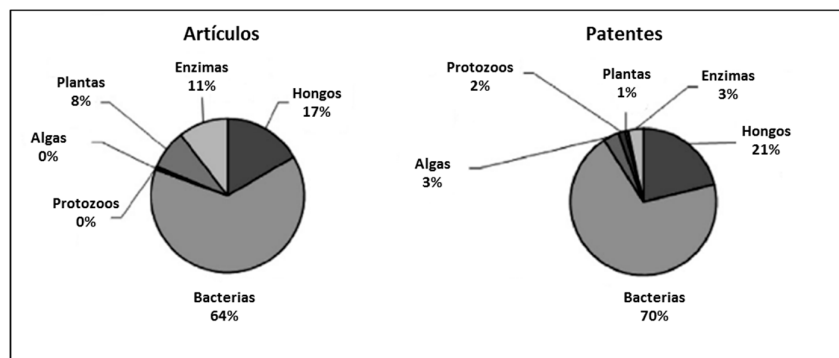


Figura 1.1. Agentes de biorremediación utilizados en suelos contaminados con crudo en artículos científicos (izquierda) y patentes (derecha). Tomado de Quintella, 2019.

Considerando que el suelo contaminado con hidrocarburos fue la matriz más referenciada y que los hongos como agentes de biorremediación ocuparon el segundo lugar tanto en artículos como patentes, los autores resaltaron el gran potencial tecnológico de los hongos en biorremediación. Otra observación muy interesante realizada por Quintella y colaboradores (2019), es la tendencia actual de utilizar la combinación de hongos y bacterias en el mismo proceso de biorremediación de suelo, haciendo más robusto el tratamiento .

Micorremediación

La micorremediación es otro aspecto de la biorremediación, donde se utilizan a los hongos como agentes de bioaumentación. Como fue descrito más arriba, aunque esta técnica ha sido explorada por años, no ha sido exhaustivamente analizada como para alcanzar resultados eficientes en la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos (Dickson *et al.*, 2019; Quintella *et al.*, 2019).

La capacidad metabólica de hongos pertenecientes a diferentes grupos ecofisiológicos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos, e incluso

mineralizarlos, ofrece una alternativa prometedora en estrategias de descontaminación de suelos y otros matrices sólidas. El metabolismo fúngico presenta varias ventajas sobre el metabolismo bacteriano en respuesta a la habilidad distintiva de los hongos para sintetizar sistemas extracelulares con acción en la detoxificación de diferentes contaminantes y su capacidad para mineralizar compuestos aromáticos recalcitrantes como lignina, ácidos húmicos y PAH (Gadd, 2001; Harms, Schlosser, & Wick, 2011; Morelli *et al.*, 2013).

Los hongos nativos de suelo, taxonómicamente correspondientes principalmente a los *phylum* Ascomycota y Mucoromycota, contribuyen en término medio al 75% de la biomasa microbiana en suelos (Harms *et al.*, 2011). Sin embargo, tienen una limitada habilidad en la degradación de PAH y otros contaminantes recalcitrantes, comparado con otros hongos asociados a sustratos leñosos como madera y hojarasca y que tienen un potencial prometedor como agentes para la biorremediación.

Investigaciones recientes han demostrado que, en ciertas ocasiones, las bacterias pueden aprovechar el crecimiento fúngico para diseminarse a través del suelo y acceder a nuevos hábitats donde crecer a expensas de fuentes de carbono como posibles contaminantes (Wick *et al.*, 2007; Banitz *et al.*, 2011). Los microhábitats del suelo que rodean y se ven afectados por hifas y micelio de hongos se denominan *micosfera* (Warmink *et al.*, 2009), la cual juega un papel importante en la dispersión bacteriana y la colonización de las interfaces y hábitats del subsuelo. La red miceliar puede actuar como “autopistas fúngicas” conectando poros llenos de agua a través de espacios del suelo lleno de aire e inaccesibles para las bacterias, que de otra forma estarían restringidas en su movilidad (**Figura I. 2 A**). La dispersión de bacterias a lo largo del micelio dependerá de las características de los hongos y las bacterias, así como también de las propiedades de las hifas, siendo la hidrofobicidad de éstas un factor clave. En condiciones de laboratorio, Kohlmeier y colaboradores (2005) plantean la hipótesis que hifas con superficies más hidrófilas forman películas líquidas más gruesas alrededor de éstas que sirven como vías continuas para el movimiento bacteriano.

Posteriores estudios, demostraron que la dispersión puede estar impulsada por la quimiotaxis hacia los puntos de contaminación, por crecimiento y posiblemente por

un movimiento mediado por *biofilm* junto con las hifas en crecimiento (Warmink *et al.*, 2009; Furuno *et al.*, 2010; Nazir *et al.*, 2010).

Los procesos de transporte de recursos esenciales (agua y nutriente) e incluso contaminantes a través de las hifas (tuberías fúngicas) son muy relevantes para la accesibilidad y biotransformación de éstos para aquellas bacterias inactivas por inanición (**Figura I. 2 B**), así como también son claves para lograr la estabilidad funcional de los ecosistemas microbianos (Worrich *et al.*, 2018). Si bien la transformación de contaminantes por parte de los hongos tiene lugar fuera del micelio a través de la secreción de enzimas extracelulares, pueden acumular pasivamente contaminantes orgánicos hidrófobos en vesículas lipídicas en su micelio (Verdin *et al.*, 2005). El transporte de vesículas enriquecidas con PAH en las hifas del oomiceto *Pythium ultimum*, que no degrada estos hidrocarburos, condujo a una dispersión espacial de los mismos en sistemas contaminados (Furuno *et al.*, 2012).

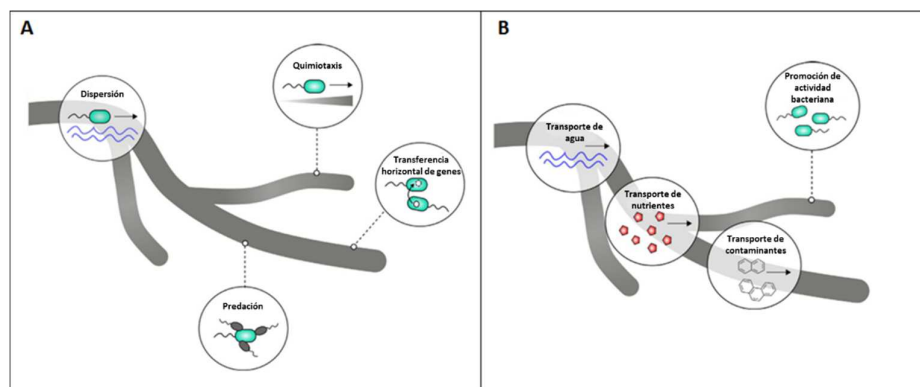


Figura I. 2. Procesos de transporte y biotransformación en la micosfera. A. Dispersión bacteriana a través de las “autopistas fúngicas” involucrando procesos ecológicos como la dispersión por quimiotaxis, transferencia horizontal de genes y predación por bacterias. B. Transporte y translocación de agua, nutrientes y contaminantes a través del micelio como “tuberías fúngicas”. Esto favorece a la biodisponibilidad de nutrientes y contaminantes para las bacterias, mejorando la actividad bacteriana y la biotransformación de contaminantes. Tomado de Worrich y colaboradores (2018).

Los alcances de las distintas estrategias de biorremediación antes descritas pueden presentar varias limitaciones, como la incapacidad de los microorganismos

alóctonos degradadores para competir con la microbiota autóctona, actividad microbiana insuficiente, reducida biodisponibilidad del contaminante, la presencia de inhibidores o de compuestos tóxicos en la mezcla contaminante, las que podrían ser superadas por la combinación con otras tecnologías de remediación (Medina *et al.*, 2020).

1.3.1.3 Combinación de técnicas de oxidación química y procesos de biorremediación

Investigaciones recientes han demostrado que la combinación de técnicas de oxidación química seguido de biorremediación no solamente es factible, sino que provee una mayor eficiencia y eliminación de los contaminantes (Mora *et al.*, 2014; Martínez-Pascual *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2020). La aplicación de un pre-tratamiento con oxidantes químicos parece mejorar la eficiencia de la degradación a partir de: (i) disminuir la concentración de los contaminantes a niveles que no sean tóxicos para los microorganismos (Chapelle *et al.*, 2005), (ii) mejorar la biodisponibilidad de los contaminantes, como en el caso de promover el desecuestramiento de los PAH de la matriz de suelo (Kulik *et al.*, 2006), (iii) generar intermediarios reactivos que están disponibles a la biodegradación (Nam *et al.*, 2001), (iv) incrementar la alteración de la estructura de la matriz y así propiciar el flujo de oxígeno necesario para la degradación biológica de los contaminantes (Kulik *et al.*, 2006), o (v) degradar PAH de alto peso molecular, los cuales son difícilmente removidos en los procedimientos de biorremediación (Qiao *et al.*, 2016).

La acción del oxidante químico también afectará a la microbiota autóctona del suelo (Sutton *et al.*, 2014). Sin embargo, trabajos recientes indican que, si se controlan el tipo y concentración del oxidante, se puede influir en la recuperación del suelo y la resiliencia por parte de los microorganismos endógenos para poder continuar con éxito la biorremediación (Medina *et al.*, 2018). La aplicación de una estrategia de biorremediación posterior a la oxidación química de un suelo artificialmente contaminado con PAH, resultó favorable al mejorar la degradación del hidrocarburo, disminuyendo la toxicidad generada por la aplicación oxidante, permitiendo alcanzar la

posterior revegetación del suelo (Palmroth *et al.*, 2006; Sirguey *et al.*, 2008). Diferentes estrategias como la bioestimulación (Valderrama *et al.*, 2009; Venny *et al.*, 2012), el bioaumentación (Xie & Barcelona, 2003) y compostaje (Medina *et al.*, 2020) han sido acopladas luego del pre-tratamiento químico de suelos crónicamente contaminados logrando un éxito variable.

Comparativamente, ha sido menos explorada la combinación de estrategias para el tratamiento de matrices más complejas y recalcitrantes como los barros petroquímicos. La posibilidad de un tratamiento químico más drástico y reacondicionamiento posterior mediante estrategias de bioestimulación y bioaumentación podría favorecer los procesos de transformación de la matriz contaminada.

1.4 Hongos saprótrofos descomponedores de sustratos lignocelulósicos como agentes de bioaumentación

En la naturaleza existen diferentes hongos saprótrofos que se alimentan de materia orgánica muerta, principalmente de polisacáridos de la pared celular de plantas (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina) y hongos (quitina), y de reserva (almidón), así como también de proteínas. Entre los hongos saprótrofos se pueden destacar cinco grupos según su ecofisiología: los hongos que colonizan madera y que pueden ser causantes de pudriciones I) blancas, II) castañas (pardas) o III) blandas; IV) los hongos descomponedores de hojarasca y V) los hongos coprófilos crecen sobre estiércol animal (Boddy, 2008).

Los hongos que colonizan la madera atacan árboles en pie, tocones o restos leñosos involucrando diferentes estrategias según mecanismo de acción, patrones específicos de degradación y el espectro de polímeros que ellos atacan, lo que permite distinguir los diferentes tipos de pudriciones (**Tabla I. 2**). Los hongos de hojarasca y coprófilos están asociados a la superficie de los suelos (Blanchette, 1995; Dix & Webster, 1995; Hatakka & Hammel, 2010; Sutherland & Crawford, 1981).

Los hongos que causan pudrición blanca (HPB) son los más frecuentes dentro de los hongos de pudrición de la madera. Son los únicos que tienen la habilidad de degradar y mineralizar la celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo la degradación extensiva de esta última la característica más apreciable, lo cual le da un aspecto de blanqueamiento a la madera. Atacan tanto maderas blandas como duras y este tipo de pudrición es característico de hongos pertenecientes al *phylum* Basidiomycota, aunque también algunos representantes del *phylum* Ascomycota de las familias Diatrypaceae y Xylariaceae fueron reportados como agentes también causales de pudrición blanca (Eriksson *et al.*, 1990; Pointing *et al.*, 2003). Estos hongos ligninolíticos, a través de la síntesis de complejos enzimáticos oxidativos y la producción de radical hidroxilo, son capaces de degradar la lignina, un polímero aromático presente en la pared vegetal, y otros aromáticos como los PAH (Martínez *et al.*, 2005; Saparrat *et al.*, 2010). La actividad inespecífica de estos sistemas ligninolíticos amplía el potencial de estos hongos y sus enzimas (lacasas y peroxidasas) en la transformación y detoxificación de contaminantes orgánicos de suelos y aguas (Morelli *et al.*, 2013). Aunque éstos no utilizan la lignina como fuente de carbono y energía, sino que la degradación de este polímero es un proceso cometabólico, se interpreta que su habilidad ligninolítica está relacionada con el acceso a los polisacáridos de los materiales leñosos (Hammel, 1995).

Se pueden distinguir dos patrones generales de pudriciones blancas que se diferencian en el tipo de ataque y velocidad relativa de degradación de los diferentes polímeros de la madera: (i) delignificación simultánea y (ii) delignificación selectiva. No obstante, es variable el tipo de pudrición blanca que un hongo puede producir, siendo dependiente del tipo de sustrato y de las condiciones ambientales.

Los hongos causantes de pudrición castaña o parda (HPP) también corresponden al *phylum* Basidiomycota y atacan principalmente maderas blandas de coníferas y sólo degradan la celulosa y la hemicelulosa. No son capaces de despolimerizar la lignina, aunque algunas especies pueden modificarla por medio de reacciones de demetilación (Eriksson *et al.*, 1990). Ellos representan sólo el 7% de las especies de basidiomicetes que generan pudrición sobre madera (Gilbertson, 1980), entre los que se incluyen representantes del Orden Gloeophyllales. Estos hongos originan un ataque inicial de la madera despolimerizando oxidativamente a la celulosa, seguido de la completa

degradación de todos los polisacáridos (incluyendo hemicelulosa). Como resultado de este proceso, la madera remanente consiste casi enteramente de lignina oxidada, la cual tiene una coloración marrón rojiza, y suele partirse en piezas con forma cúbica. En este sentido, la actividad de los hongos de pudrición parda se ha relacionado a su rol en la formación de humus (Lundell *et al.*, 2010).

La pudrición blanda es característica de hongos pertenecientes al *phylum* Ascomycota, que generan una degradación localizada de partes periféricas de la pared celular vegetal pobres en lignina e involucrando microhifas especializadas (0,3-0,4 μm) que colonizan sectores de la pared secundaria. Las únicas enzimas sintetizadas por este grupo de hongos son celulasas y hemicelulasas (Kubicek, 2012). Luego de ser colonizada y degradada, la madera adquiere una apariencia blanda, la superficie del material resultante tiene una textura esponjosa. Aunque existen trabajos donde afirman que este tipo de pudrición sólo se produce en ambientes húmedos, actualmente se sabe que también puede ocurrir en ambientes secos.

La habilidad para descomponer la madera y los tipos de pudrición ocasionada por los hongos depende no sólo de su capacidad para sintetizar diferentes enzimas y especies reactivas sino también de la estructura de la madera y de las dimensiones de la maquinaria implicada en su degradación (Baldrian, 2008). La actividad de las enzimas extracelulares de estos hongos está limitada al lumen celular vegetal y a los espacios generados durante el proceso de degradación. Se sugiere que compuestos de bajo peso molecular son los que inician el ataque ya que limitaciones de exclusión molecular de las enzimas fúngicas por tamaño impiden su rol en la trama de la pared celular (Hammel *et al.*, 2002; Reading *et al.*, 2003). Debido a esto, y a que muchas de estas enzimas están asociadas a la pared de las hifas, la mayoría de las reacciones de degradación están restringidas en torno a las hifas, tal como es revelado en la consecuente erosión de las células de la madera atacada en cercanía a las hifas, que resulta en un adelgazamiento gradual de la pared vegetal.

La selección de los sustratos lignocelulósicos es clave para estimular la producción de enzimas ligninolíticas, el crecimiento de hongos y la degradación de contaminantes (Walter *et al.*, 2004; Boran & Yeşilada, 2011) . El rastrojo de trigo es uno de los sustratos más utilizados para la aplicación de los hongos de pudrición blanca en

estrategias de bioaumentación para la remediación de suelos contaminados con PAH (Lladó *et al.*, 2013).

Estos hongos tienen baja habilidad competitiva en suelo, comparado a los hongos nativos del suelo (Saparrat & Hammer, 2006) y pueden limitar su crecimiento al interactuar con las poblaciones microbianas autóctonas. Se ha descrito que los hongos de pudrición blanca pueden inhibir a las poblaciones autóctonas aunque también pueden resultar inhibidos por ellas (Boddy, 2008).

Tabla 1. 2. Características estructurales y químicas de los diferentes tipos de pudrición de la madera (Baldrian, 2008).

	Pudrición Blanca		Pudrición Castaña	Pudrición Blanda
	Degradación Simultánea	Degradación Selectiva		
Propiedades de la madera atacada	Apariencia de blanqueado, coloración más clara que la madera sana, húmeda, suave, esponjosa. Pérdida de fuerza en estadios avanzados	Fractura por fragilidad	Marrón, seca, quebradiza, polvorienta, frágil, ruptura en forma de cubos. Pérdida drástica de la fuerza en estadios iniciales. Ontogenia del decaimiento de la madera muy uniforme	Consistencia suave en ambientes húmedos. En ambientes secos, marrón y quebradizo. Generalmente con una ontogenia uniforme del decaimiento de la madera
Hospedador (Tipo de madera)	Angiospermas, raramente gimnospermas	Aspecto fibroso	Angiospermas y gimnospermas	Generalmente angiospermas (gimnospermas muy levemente degradadas), ecosistemas boscosos, maderas anegadas
Componentes de pared celular degradados	Celulosa, lignina y hemicelulosa	Ataque inicial selectivo de hemicelulosas y lignina, más tarde también celulosa	Celulosa y hemicelulosa, lignina poco modificada, en algunos casos una extendida descomposición de la madera de angiospermas (incluyendo laminilla media)	Celulosa y hemicelulosa, lignina ligeramente alterada
Características anatómicas	Pared celular atacada desde el lumen hacia laminilla media. Surcos de erosión cercanos a las hifas	Descomposición comienza desde laminilla media y pared secundaria. Laminilla media degradada por mecanismos de difusión (no en contacto con las hifas). Cavidades radiales en la pared celular	Descomposición a una gran distancia de las hifas (difusión), pared celular entera atacada rápidamente, con grietas y hendiduras	Pared celular atacada en la proximidad de las hifas empezando por el lumen, cavidades cilíndricas longitudinales en pared secundaria (tipo 1) o pared secundaria erosionada desde el lumen (tipo 2)
Agentes causales	Basidiomicetes (ej. <i>Trametes versicolor</i> , <i>Irpex lacteus</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Heterobasidion annosum</i>) y algunos ascomicetes xylariales (ej. <i>Xylaria hypoxylon</i>)	Basidiomicetes (ej. <i>Ganoderma australe</i> , <i>Phlebia tremellosa</i> , <i>Ceriporiopsis subvermispora</i> , <i>Pleurotus</i> spp., <i>Phellinus pini</i>)	Basidiomicetes exclusivamente (ej. <i>Gloeophyllum</i> spp., <i>Loetiporus sulphureus</i> , <i>Piptoporus betulinus</i> , <i>Postia placenta</i> , <i>Serpula lacrymans</i> , <i>Coniophora puteana</i>)	Mayormente ascomicetes (ej. <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Ustilina deusta</i>) y algunas bacterias. Los basidiomicetes causan pudrición blanda facultativamente (ej. el hongo de pudrición blanca <i>Inonotus hispidus</i> y el de pudrición castaña <i>Rigidoporus crocatus</i>).

El sistema ligninolítico fúngico

La degradación de la lignina se ha descrito también en otros microorganismos que no son los hongos de pudrición blanca, tales como procariontes y hongos

ascomicetos, aunque su capacidad parece limitada (Zimmermann, 1990; Tian *et al.*, 2014).

La lignina es el segundo polímero más abundante después de la celulosa presente en la pared celular de la mayoría de las plantas vasculares (Boudet, 1998), formando una matriz compleja que se incrusta sobre las fibras de celulosa y hemicelulosa, confiriendo rigidez a la pared y por lo tanto protegiendo las células del ambiente externo, incluido el ataque microbiano y aportando hidrofobicidad. Su polimerización es al azar y su estructura es heterogénea e irregular, produciendo una macromolécula altamente compleja, amorfa e insoluble en agua (**Figura I. 3**) (Leonowicz *et al.*, 1999).

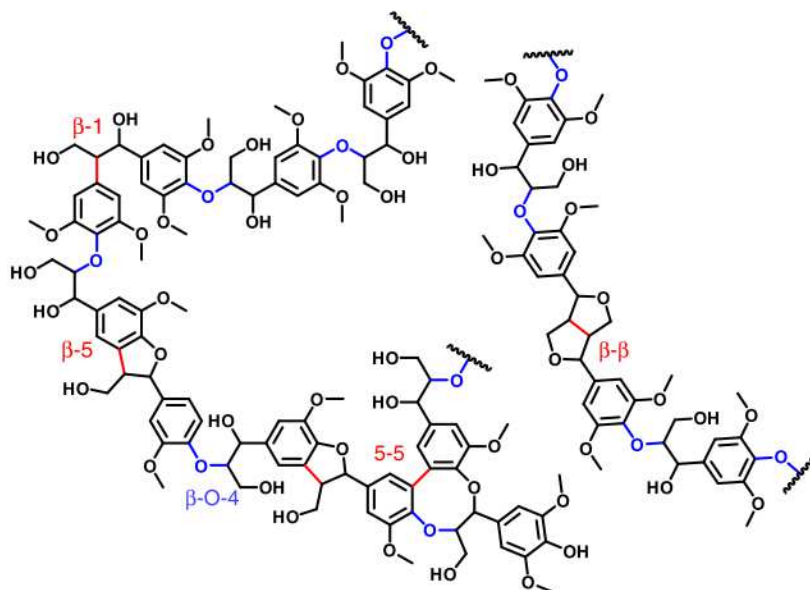


Figura I. 3. Estructura de la lignina (Anderson *et al.*, 2019)

Los hongos causantes de pudrición blanca sintetizan principalmente dos tipos de enzimas ligninolíticas, las lacasas y las peroxidasas, de las cuales la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa (MnP) son las más importantes. La principal diferencia entre las lacasas y las peroxidasas recae en la naturaleza del aceptor electrónico, ya que las lacasas utilizan O_2 , mientras que las peroxidasas necesitan H_2O_2 . Otras enzimas producidas por los mismos hongos, como la aril-alcoholoxidasa y glioxal oxidasa, son las

encargadas de generar el H_2O_2 requerido para las peroxidases y las reacciones en cadena que llevan al ataque oxidativo.

La producción de enzimas ligninolíticas se ha asociado mayoritariamente con el metabolismo secundario y se ha descrito que puede estar afectada tanto por el Mn^{2+} como el Cu^{2+} que actúan como factores transcripcionales, así como activadores enzimáticos y mediadores de reacción (Dittmer *et al.*, 1997; Scheel *et al.*, 2000; Galhaup *et al.*, 2002). Aunque hay variaciones según las condiciones de cultivo, cada especie de hongo está caracterizado por un espectro de enzimas que ha sido aprovechado para establecer diferentes grupos de hongos según las enzimas ligninolíticas que producen (Hatakka, 2001).

La lacasa (bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa) es la enzima ligninolítica más descrita y conocida y que se encuentra más ampliamente distribuida entre los hongos. En general, se expresa en forma de diferentes isoenzimas, que pueden ser constitutivas y/o inducibles, con una masa molecular típica de entre 60 y 80 kDa. La lacasa contiene cuatro átomos de cobre por molécula y éstos se encuentran directamente implicados en el ciclo catalítico de la enzima (Leonowicz *et al.*, 1999).

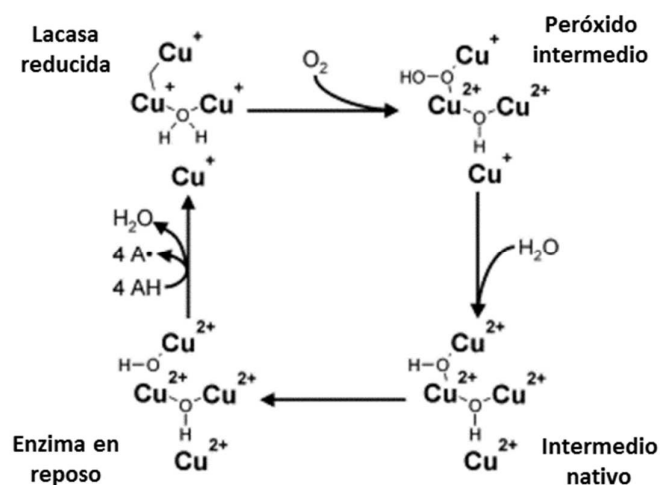


Figura I. 4. Ciclo catalítico de la lacasa (Wesenberg *et al.*, 2003).

Las lacasas son, característicamente, enzimas con baja especificidad de sustrato y mediante su ciclo catalítico pueden oxidar diferentes compuestos como sustrato reductor, por ejemplo, fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, así como compuestos orgánicos no fenólicos, generando radicales altamente reactivos que pueden conducir a nuevas oxidaciones, ya sean espontáneas o por vía enzimática (Thurston, 1994).

Las lacasas, además de la degradación de la lignina, pueden estar involucradas en otros procesos fúngicos que no están necesariamente relacionados con la ligninólisis como la morfogénesis, síntesis de pigmentos, reacciones de detoxificación, eventos de patogenicidad y humificación (Leonowicz *et al.*, 2001), incluso existiendo también formas intracelulares. Además, su expresión se puede inducir con la adición de Cu^{2+} , que regula su expresión a nivel transcripcional (Saparrat *et al.*, 2002), o incluso con otros compuestos como el alcohol veratrílico y guaiacol (Quarantino *et al.*, 2007).

La lignina peroxidasa (diarilpropano: peróxido de hidrogeno oxidoreductasa) fue la primera peroxidasa descubierta implicada en la degradación de la lignina (Tien & Kirk, 1988) y su masa molecular es de entre 40-45 kDa. LiP se caracteriza por un alto potencial redox que permite la oxidación compuestos aromáticos no fenólicos difícilmente biodegradables, como alcohol veratrílico y bencenos metoxilados (Camarero *et al.*, 1999).

La manganeso peroxidasa (Mn(II):peróxido de hidrogeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.13) es una peroxidasa extracelular, normalmente producida en varias isoformas diferentes con un peso molecular de entre 45-55 kDa. Estas isoformas se diferencian en el punto isoeléctrico, normalmente en rango ácido (pH 3-4) (Ha *et al.*, 2001). La expresión de la MnP en hongos está regulada a nivel transcripcional por peróxido de hidrógeno, así como otros compuestos químicos y por las concentraciones de Mn^{2+} (Li *et al.*, 1995; Scheel *et al.*, 2000).

La peroxidasa versátil (VP, EC 1.11.1. 16) es un tercer tipo de peroxidasa ligninolítica que combina las propiedades catalíticas de las LiP y MnP para oxidar compuestos fenólicos (Martinez *et al.*, 1996; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009). A diferencia de estas dos enzimas, también es capaz de oxidar hidroquinonas y colorantes de potencial

redox alto y bajo, debido a una arquitectura molecular híbrida que involucra múltiples sitios de unión para sustratos.

Además, existen otras peroxidasa denominadas peroxidasa decolorizantes de tintes (DyPs, EC 1.11.1.19; (Kim & Kim, 1995; Liers *et al.*, 2011)). Dicha denominación se debe a su capacidad de oxidar colorantes sintéticos de alto potencial redox del tipo antraquinónico (Kubicek, 2012), además de todos los sustratos típicos de peroxidasa. Si bien su función fisiológica no ha sido completamente elucidada, se cree que serían importantes en la bioconversión y detoxificación de compuestos orgánicos con los que se encuentran los hongos en su hábitat natural (Liers *et al.*, 2011). Numerosas especies causantes de la pudrición blanca han sido ampliamente estudiadas en la degradación de xenobióticos, como por ejemplo *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* (Camarero *et al.*, 1999; Baldrian, 2003; Valentín *et al.*, 2007; Anastasi *et al.*, 2010; S. Lladó *et al.*, 2012; Winquist *et al.*, 2014; Ariste *et al.*, 2020).

Coriopsis rigida LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436 han revelado potencial en la degradación de compuestos aromáticos (Saparrat *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2010; Saparrat *et al.*, 2010).

Coriopsis rigida es un hongo modelo en el estudio de la habilidad de los hongos causantes de pudrición blanca en procesos de aplicación como la biorremediación (Saparrat *et al.*, 2014). La cepa LPSC 232, aislada de la selva subtropical de Misiones, Argentina, pertenece a la colección del Instituto Spegazzini de La Plata y se encuentra íntimamente relacionada con el género *Trametes*, otro hongo modelo en biorremediación de suelos contaminados. En el año 2013, Zmitr & Malysheva, lo renombran con el nombre de *Funalia floccosa*, aunque en la presente tesis se decidió continuar con el sinónimo *Coriopsis rigida*.

A diferencia de la mayoría de los hongos de pudrición blanca, que utilizan diferentes enzimas extracelulares para la degradación de lignina, *C. rigida* presenta dos lacasas extracelulares como única y principal maquinaria ligninolítica (Saparrat *et al.*, 2011) para degradar lignina a partir de sustratos lignocelulósicos, como el rastrojo de trigo o avena, e incluso una gran variedad de desechos agroindustriales

(Gómez *et al.*, 2005; Troncozo *et al.*, 2019) como hidrocarburos alifáticos y aromáticos provenientes del petróleo o suelos contaminados (Colombo *et al.*, 1996), convirtiéndola en una especie prometedora para la biorremediación.

La síntesis y actividad de este complejo enzimático depende de una serie de factores que incluyen la composición del medio de cultivo, como la fuente de nitrógeno y / o carbono y si el organismo se cultiva en sistemas de estado sólido o en fase líquida (fermentación sumergida), que también están relacionados con el oxígeno disponibilidad, pH y temperatura (Strong, 2011). El sistema enzimático está compuesto por dos isoenzimas Lac I y Lac II, ambas monoméricas que comparten el mismo punto isoeléctrico (PI) que varía entre 3.3 y 3.9 de acuerdo con las condiciones de cultivo, codificadas por el gen de lacasa *lcc1* (número de acceso del Gen-Bank GQ377839). Una de las características más importantes de estas lacasas es la amplia gama de sustratos reductores que pueden degradar, convirtiéndose en herramientas biológicas para tratar desechos industriales, pudiendo reemplazar procesos convencionales para remediar áreas contaminadas y reducir costos, a través de procesos biotecnológicos sostenibles.

I.5 Metabolismo microbiano de hidrocarburos

La transformación microbiana de los compuestos orgánicos va ligada a dos procesos principales, el crecimiento y el cometabolismo. La utilización de un sustrato para el crecimiento por parte de catabolismo microbiano siempre implica el mismo principio básico: una degradación gradual de la molécula para formar al final uno o más fragmentos capaces de pasar a metabolismo central. Durante el proceso conocido como mineralización, una parte de los elementos que constituyen la materia orgánica son convertidos en productos inorgánicos como CO₂ o H₂O. En algunos casos, sólo una parte del sustrato es degradado, mientras que el resto del compuesto persiste en forma parcialmente oxidada. Por su parte, el cometabolismo se basa en la transformación o metabolización de un compuesto orgánico por un microorganismo que no es capaz de utilizarlo como fuente de carbono y energía. De hecho, la mayoría de las transformaciones cometabólicas y las de degradación parcial son producto de la baja

especificidad de algunas enzimas presentes en las rutas metabólicas de degradación. Recientemente, nuevas rutas de biodegradación anaeróbica, por bacterias sulfato reductoras, han sido propuestas para el fluoreno y el fenantreno (Tsai *et al.*, 2009). En cambio, las rutas aeróbicas para hidrocarburos alifáticos y PAH de hasta tres anillos están bien caracterizadas. En presencia de oxígeno, las reacciones clave para la biodegradación de hidrocarburos están catalizadas por oxigenasas tanto en hongos como en bacterias, que actúan incorporando átomos de oxígeno, procedentes de oxígeno molecular (O₂), al sustrato. Las monooxigenasas incorporan un solo átomo de oxígeno y el otro es reducido a agua, mientras que las dioxigenasas incorporan ambos átomos de oxígeno. Como consecuencia, se entiende que los microorganismos degradadores de hidrocarburos, en condiciones aeróbicas, requieren la presencia de oxígeno tanto para realizar la oxidación inicial del sustrato como al final de la cadena respiratoria, donde su papel es de aceptor final de electrones.

Degradación de PAH

En general, los compuestos aromáticos se degradan con más dificultad respecto a los hidrocarburos alifáticos, debido a la mayor estabilidad de los enlaces entre carbonos presentes en su estructura. Como en los alcanos, la degradabilidad de los aromáticos disminuye al aumentar el número de carbonos o anillos aromáticos (Prince *et al.*, 2003). A pesar de su elevada estabilidad, la capacidad de degradar compuestos aromáticos se ha descrito en una gran variedad de microorganismos, entre ellos, bacterias y hongos capaces de degradar compuestos de entre 1 y 5 anillos aromáticos (Cerniglia, 1992; Kanaly & Harayama, 2000). Estos hidrocarburos mono y poliaromáticos, son estructuralmente similares a la lignina (Dagley, 1981).

Para desestabilizar el anillo aromático, los microorganismos han desarrollado una estrategia común que consiste en la activación mediante la introducción de uno o dos grupos hidroxilo, mediante reacciones catalizadas por mono- o dioxigenasas, respectivamente (Harayama & Rekik, 1989). Las diferentes estrategias existentes en la naturaleza pueden observarse en la **Figura I. 5**

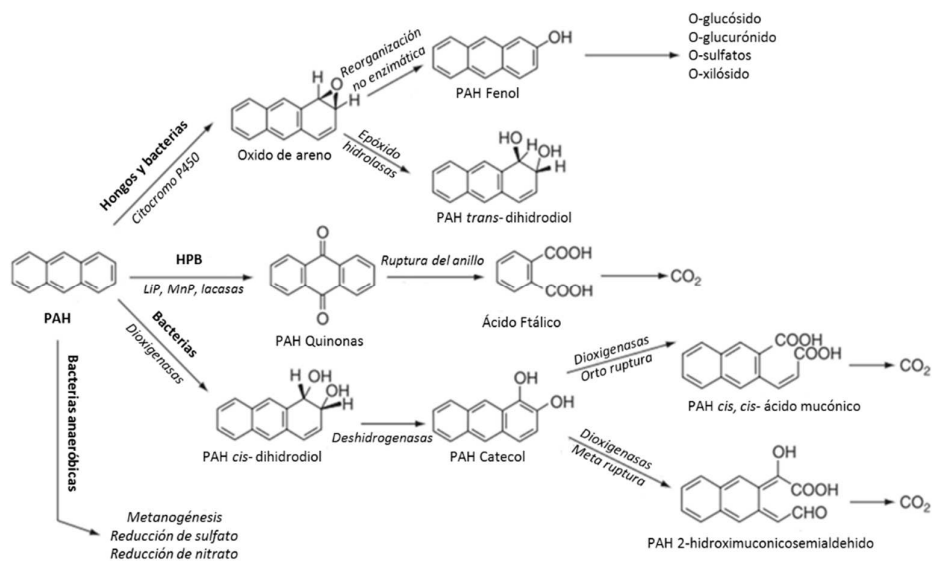


Figura I. 5. Primeras reacciones de la degradación y/o transformación de los hidrocarburos aromáticos por bacterias y hongos (Tomado de Cerniglia & Sutherland, 2010).

I.5.1 Biodegradación bacteriana de PAH

Actualmente, numerosos géneros bacterianos han sido descritos como degradadores de PAH. Una gran diversidad bacteriana es capaz de degradar los PAH de bajo peso molecular y unos cuantos géneros (Ejemplos: *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter* y *Nocardia*, entre otros) han sido catalogados como degradadores de PAH de elevado peso molecular.

El principal mecanismo, que presentan la mayoría de las bacterias, para degradar PAH de forma aeróbica consiste en la oxidación del anillo bencénico por parte de dióxigenasas para formar *cis*-dihidrodiol, como se puede observar en la **Figura I. 5**. Estos dihidrodiol son dehidrogenados, formando intermediarios dihidroxilados, que pueden ser metabolizados vía catecoles, después de entrar a metabolismo central, hasta CO₂ y agua. Por su parte, algunas bacterias pueden catalizar la degradación de PAH a *trans*-dihidrodiol, mediante la acción del enzima citocromo P₄₅₀ monooxigenasa, como *Mycobacterium* sp. (Kelley *et al.*, 1990). Durante las dos últimas décadas, se han descrito géneros bacterianos (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*,

Sphingomonas, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Flavobacterium*) capaces incluso de degradar benzo[a]pireno (Aitken *et al.*, 1998) y se han propuesto rutas metabólicas donde las dioxigenasas tienen un papel principal (Schneider *et al.*, 1996). Finalmente, se ha descrito también que ciertas cepas bacterianas pueden degradar benzo[a]pireno de forma cometabólica, cuando crecen a partir de otra fuente de carbono (Ye *et al.*, 1995).

1.5.2 Biodegradación fúngica de PAH

Aunque se ha avanzado mucho durante los últimos veinte años, el conocimiento actual sobre el metabolismo fúngico de PAH es mucho menor que el referente al metabolismo bacteriano. Sin embargo, los hongos son tan importantes como las bacterias en la biorremediación de PAH en ambientes acuáticos y en suelos.

En general, los hongos son más lentos y menos eficientes que las bacterias en la degradación de PAH. Por el contrario, la mayoría de las cepas bacterianas no son capaces de degradar de forma eficiente PAH de 4 o más anillos bencénicos, mientras que los hongos pueden incluso mineralizar PAH de más de 4 anillos aromáticos. El papel de los hongos en ecología es muy importante, ya que los metabolitos fúngicos formados, más polares y reactivos que los productos parentales, pueden ser mineralizados o detoxificados por la población autóctona bacteriana del suelo.

Se ha demostrado que varias especies fúngicas pueden metabolizar PAH, como *Cunninghamella elegans* (Mucoromycota), *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp. (Ascomycota) (Casillas *et al.*, 1996; Cerniglia & Sutherland, 2010), y los representantes cuasantes de pudrición blanca del phylum Basidiomycota: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Irpex lacteus* (Sutherland *et al.*, 1991; Bezalel *et al.*, 1996; Sack *et al.*, 1997; Cajthaml *et al.*, 2002).

En general, los hongos filamentosos y las levaduras forman trans-dihidrodiol, dihidrodiol epóxidos, quinonas y fenoles, a la vez que productos de conjugación que se forman a partir del fenol (**Figura I. 5**). Estos productos no son mutagénicos, mientras que los productos oxidados son tóxicos y bioactivos. Las rutas metabólicas de degradación de PAH por hongos involucran diversos sistemas enzimáticos, como el citocromo

intracelular P₄₅₀ y los extracelulares lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, de las cuales se ha hablado con más detalle en la sección anterior de esta introducción. La formación de metabolitos hidroxilados es muy importante para la biorremediación, ya que incrementa la mineralización de dichos compuestos.

Capítulo II

Hipótesis y objetivos



II Hipótesis y objetivos

II.1 Hipótesis

➤ *Coriolopsis rigida genera cambios en la microbiota asociada a matrices contaminadas con barro de fondo de pileta API y promueve una activa degradación de hidrocarburos.*

➤ *El tratamiento con un oxidante químico, previo a la inoculación con Coriolopsis rigida, incrementa la eficiencia del bioaumentación.*

II.2 Objetivo general

- Remediar matrices sólidas complejas contaminadas con residuos petroquímicos utilizando procesos combinados de oxidación química y bioaumentación con un hongo ligninolítico.

II.3 Objetivos específicos

1. Evaluar la habilidad de hongos ligninolíticos, incluyendo a *Coriolopsis rigida* LPSC 232 como modelo de estudio, para degradar y detoxificar hidrocarburos del petróleo en diferentes sistemas de cultivo, incluyendo unos conteniendo matrices sólidas complejas.

2. Analizar la contribución de la inoculación con hongos ligninolíticos en matrices complejas como estrategia de bioaumentación, luego de un proceso químico de oxidación con persulfato de amonio.

3. Estudiar el impacto de la inoculación fúngica sobre la microbiota de un residuo petroquímico expuesto a remediación.

Capítulo III

Materiales y métodos



III Materiales y métodos

III.1 Materiales utilizados

III.1.1 Cepas fúngicas

Los hongos utilizados en la presente tesis pertenecen al *phylum* Basidiomycota, aislados de diferentes hábitats de Argentina y Finlandia, pertenecientes a la Colección de cultivos del Instituto Spegazzini de la ciudad de La Plata (LPSC) y a la Colección de Cultivos de Biotecnología Fúngica (*Fungal Biotechnology Culture Collection*, FBCC) del Departamento de Química Aplicada y Microbiología de la Universidad de Helsinki en Finlandia, respectivamente. Las cepas se mantuvieron a 4 °C en agar inclinados con extracto de malta al 2% suplementado con extracto de levadura al 0,1%.

Tabla III. 1. Cepas fúngicas utilizadas en esta tesis.

Especie de hongo	Nº de cepa	Sustrato/hábitat y sitio de recolección	Ubicación taxonómica
Hongos causantes de pudrición blanca (HPB)			
<i>Coriolopsis rigida</i>	LPSC 232	Madera en putrefacción de selvas tropicales. Garupá, Misiones, Argentina.	Fungi, Dikarya, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Polyporaceae
<i>Gelatoporia subvermispora</i>	FBCC 313	ND	Fungi, Dikarya, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Meruliaceae
<i>Grammothele subargentea</i>	LPSC 436	Tronco vivo de Angiosperma. Garupá, Misiones, Argentina.	Fungi, Dikarya, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Polyporaceae
<i>Peniophora albobadia</i>	LPSC 285	Madera en descomposición de las selvas subtropicales. Santa Ana, Misiones, Argentina.	Fungi, Dikarya, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Russulales, Peniophoraceae
Hongos causantes de pudrición parda (HPP)			
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	LPSC 735	Madera en servicio	Fungi, Dikarya, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Gloeophyllales, Gloeophyllaceae

III.1.2 Medios de cultivo

Para cada medio de cultivo se indica la composición en g/l de agua destilada. En cada caso se ajustó el pH hasta el valor correspondiente con solución de NaOH o HCl 10%. Se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Medio Mineral Líquido (MML) (Vecchioli *et al.*, 1990)

5 g NaCl

1 g K₂HPO₄

1 g (NH₄) H₂PO₄

1 g (NH₄)₂SO₄

0,2 g MgSO₄

3 g KNO₃

pH= 7,2

Medio Mineral Sólido (MMS)

Se agregan 15 g.l⁻¹ de agar (Difco) al MML.

Caldo R2 (Reasoner & Geldreich, 1985)

0,5 g Extracto de levadura

0,5 g Proteasa peptona

0,5 g Acido casamino

0,5 g Glucosa

0,5 g Almidón

0,3 g Acido Pirúvico

0,3 g K_2HPO_4

0,05 g $MgSO_4$

pH= 7,2

R2A

Se agregan 15 g.l⁻¹ de agar (Difco) al medio de cultivo caldo R2.

Agar Rosa de Bengala (RB) (Vecchioli *et al.*, 1990).

5 g Peptona

10 g Glucosa

0,5 g $MgSO_4$

1 $KH_2(PO_4)_3$

0,035 g Rosa de Bengala

15 g agar

El pH se ajustó en 6,0. Una vez esterilizado, dejar templar y adicionar estreptomicina, 0,25 mg.l⁻¹.

Caldo ME

20 g extracto de malta

1 g extracto de levadura

MyA2

Se agregan 20 g.l⁻¹ de agar (Difco) al medio de cultivo caldo ME.

Medio para recuento de bacterias sulfato reductoras

0,5 g KH_2PO_4

1 g NH_4Cl

1,26 g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,98 g MgSO_4

5 ml Lactato de Sodio 50%

1 g Extracto de Levadura

0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,1 g Ácido ascórbico

100 μl Ácido tioglicólico 80%

pH=7-7,5

III.1.3 Buffers y soluciones

Solución fisiológica

NaCl 0,85 % (p/v) en agua destilada.

Solución mezcla de hidrocarburos policíclicos aromáticos

Se indica la composición de la solución en g/l de pentano (97%, Cicarelli) de una solución con mezcla de cuatro hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). Se conservó refrigerada.

0,5 g Antraceno (99%, Carlo Erba)

0,5 g Dibenzotiofeno (98%, Aldrich Chemical Company)

1 g Fenantreno (99,5%, Carlo Erba)

0,5 g Fluoreno (99,5%, Carlo Erba)

Buffer TAE

Se indica la composición del buffer 40X en g/l de agua destilada.

193,6 g TRIS (Cicarelli)

45,7 ml Ácido acético glacial (Anedra)

14,9 g EDTA (Anedra)

pH= 7,4.

Para preparar buffer TAE 1X, 25 ml de buffer 40X se llevan a 1 litro con agua destilada.

Solución de agarosa 1,5%

Se prepara una solución de agarosa (GE *Healthcare*) 1,2% p/v en buffer TAE 1X.

Soluciones para Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)

En la **Tabla III. 2** se describe la composición de las soluciones empleadas para Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante.

Tabla III. 2. Composición de las soluciones para DGGE.

Componentes	Solución 0%	Solución 80%
Acrilamida/bisacrilamida 30%, 29:1 (BIO-RAD)	20 ml	20 ml
TAE 1X pH 7,4	25 ml	25 ml
Urea (Cicarelli)	-	33.8 g
Formamida (<i>Appli Chem Panreac</i>)	-	320 ml

III.1.4 Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH)

En la presente tesis se trabajó con distintos PAH, siendo el fenantreno modelo de hidrocarburo de bajo peso molecular (LMWH), el pireno modelo de hidrocarburo de alto peso molecular (HMWH) y el dibenzotiofeno un PAH con un heterociclo sulfurado.

Tabla III. 3. Características de los hidrocarburos policíclicos aromáticos estudiados en esta tesis.

Características	Naftaleno	Fluoreno	Fenantreno	Antraceno	Pireno	Dibenzo- tiofeno
N° de anillos aromáticos	2	3	3	3	4	2+ Heterociclo Sulfurado
Peso Molecular (g/mol)	128,2	166,2	178	178	202	184,26
Solubilidad en agua (mg/l) a 25 °C	31,9	1,8	1,0	0,07	0,16	0,0015
Log Kow	3,50	4,28	4,45	4,46	5,32	4,80
Punto Ebullición (°C)	218	295	332	340	393	333
Punto Fusión (°C)	80	116	101	216	156	100
Densidad (g/cm³)	1,14	1,20	1,28	0,98	1,27	1,25
Factor carcinogénico	0,001	0,001	0,001	0,01	0,001	-

*(Nisbet & LaGoy, 1992)

III.1.5 Sustrato lignocelulósico

Como sustrato lignocelulósico para la preparación de los inóculos fúngicos se utilizó rastrojo de trigo (SL) proveniente del residuo de cosecha de la Estación Experimental Julio Hirschhorn, localizada en Los Hornos, dependiente de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. El rastrojo de trigo es comúnmente utilizado en las estrategias de bioestimulación y bioaumentación (Baldrian, 2008; Covino *et al.*, 2010). La composición de nutrientes del mismo es de 18,11 kg.ha⁻¹

de nitrógeno, 3,5 kg.ha⁻¹ de fósforo, 3,52 kg.ha⁻¹ de potasio y 1,51 kg.ha⁻¹ de azufre fue determinada por la FCA y F (Voisin, 2016).

III.1.6 Suelo de zona industrial

Para los ensayos con microcosmos de suelo contaminado artificialmente se recolectó suelo aledaño a la refinería La Plata sobre el Camino Vergara (34° 53' 13.051"S, 57° 55' 50.923"O). Por su ubicación geográfica, el suelo se clasifica en franco, a continuación la **Tabla III. 4**, detalla sus características edafológicas y químicas.

Tabla III. 4. Caracterización edafológica y química del suelo aledaño a la zona industrial.

Propiedades	Suelo
<i>Textura</i>	Franco
<i>Carbono orgánico [%]</i>	2.40 ± 0.30 3.78
<i>Materia orgánica [%]</i>	4.15
<i>Nitrógeno total [%]</i>	0.24 ± 0.03
<i>Fósforo disponible [mg/Kg]</i>	3.67 ± 0.58
<i>Sulfatos [mg/Kg]</i>	9 ± 1
<i>Capacidad de retención de agua [%]</i>	35.22

El suelo recolectado se secó y tamizó con mallas de 4 y 2 mm con el objetivo de homogeneizar la muestra. Una vez acondicionado fue almacenado en caja plástica hermética a 4 °C en oscuridad.



Figura III. 1. Zona industrial. Sitio donde se recolectó el suelo en la ciudad de Ensenada.

III.1.7 Barro de fondo de pileta API

Para el armado de microcosmos con residuo petroquímico se utilizó un barro del fondo de piletas o separadores de aceite API (*American Petroleum Institute*) generados durante proceso *downstream* en una refinería de la zona industrial La Plata. En el **Capítulo IV** se muestran los resultados del análisis físico-químico y biológico del mismo.



Figura III. 2. Piletas o separadores API. Instalaciones donde se separan los aceites y sólidos en suspensión de las aguas residuales (efluentes) provenientes de la refinación del crudo de petróleo.

III.2 Metodologías para cultivos fúngicos

III.2.1 Producción de biomasa fúngica

Condiciones de cultivo

Cada hongo se cultivó por duplicado en medio de cultivo agarizado MyA2 a 25 °C y oscuridad durante 7 días para su posterior inoculación en los distintos ensayos.

En medio líquido

A partir de placas de MyA2 con micelio activo de 7 días, se inocularon 8 discos de micelio de 5mm de diámetro en 100 ml de caldo- extracto de malta al 2% suplementado con extracto de levadura al 0,1% en matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se incubó a 25 °C en oscuridad durante 15 días. Transcurrido dicho tiempo, el micelio desarrollado fue separado y triturado en matraz Erlenmeyer plástico de 400 ml con 10 bolitas de vidrio, se llevó a un volumen de 350 ml con agua destilada estéril para obtener la suspensión miceliar para ser utilizada como inóculo en los ensayos de bioaumentación.

III.2.2 Screening del potencial degradador de los hongos saprótrofos

III.2.2.1 Potencial degradador de PAH de los hongos ligninolíticos

Para determinar el potencial degradativo de cada cepa fúngica en presencia de carboximetilcelulosa se utilizó el protocolo modificado de Bogardt & Hemmingsen (1992). Se plantearon 3 tratamientos:

- Control: MMS (MML+ 15 g/l agar) + carboximetilcelulosa (CMC) 1%
- CMC+ PAH
- PAH

Se utilizaron 20 ml de medio mineral sólido (MMS) como base de la placa de Petri. Luego se prepararon tubos con 5 ml de agarosa 0,8%, suplementada con

carboximetilcelulosa al 1 % para el tratamiento control y el tratamiento CMC+PAH. Se adicionaron 200 μ l de la solución etanólica de una mezcla de PAH (0,073 g fenantreno (FEN), 0,037 g fluoreno (FLU)/antraceno (ANT)/dibenzotiofeno (DBT)) a los tubos de agarosa y agarosa suplementada con CMC 1%, previamente fundidos y mantenidos a 40 °C, y se mezcló con vortex. Luego se volcó sobre la placa de Petri con base de MMS. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Las placas fueron inoculadas con un disco de micelio activo de 5 mm de diámetro ubicado en el centro de la placa para cada hongo individualmente. Se incubó a 25 °C y en oscuridad monitoreando día a día su crecimiento y presencia de halo. A los 5 días de incubación se midió el diámetro de las colonias y la presencia/ausencia de halo de degradación.

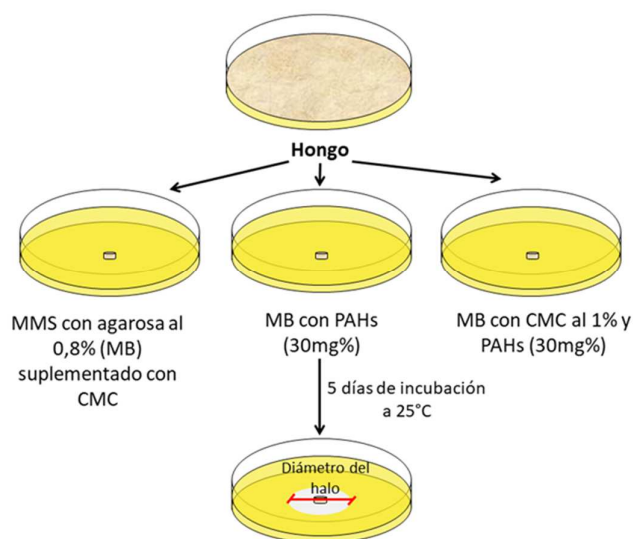


Figura III. 3 Esquema de la metodología empleada para evaluar el potencial de degradación de PAH en presencia de CMC como fuente de carbono adicional.

III.2.2.2 Capacidad celulolítica

Sobre las placas inoculadas del ensayo anterior, se midió la capacidad celulolítica a través del revelado del halo celulolítico con una solución de rojo Congo 0,5g/l hasta cubrir toda la superficie de la placa durante 10 minutos. Luego se enjuagó 3 veces con

solución de NaCl (40g/l) y se dejó 10 minutos para estabilizarse (Magnelli & Forchiassin, 1999). Finalmente se enjuagó con ácido acético al 5% para acentuar el contraste. Finalmente se midió el diámetro de la colonia y la presencia/ausencia de halo. En caso de no observarse halo más allá del micelio desarrollado, con ayuda de un escarpelo se retiró el mismo y se corroboró la solubilización de la CMC.

III.2.2.3 *Co-inoculación de hongos con capacidad degradadora de PAH*

En medio agarizado MyA2 suplementado con 1 mM de guayacol se inocularon los siguientes pares de hongos que crecieron en presencia de una mezcla de PAH (para corroborar la actividad oxidativa de los HPB). Los discos de micelio fueron inoculados con 4 cm de distancia entre ellos.

Tabla III. 5. Descripción de los tratamientos de co-inoculación.

Hongos	Tratamiento
<i>LPSC 735+LPSC 232</i>	CMC
<i>LPSC 735+LPSC 285</i>	CMC+PAHs
<i>LPSC 735+LPSC 436</i>	PAHs

III.2.2.4 *Potencial degradador de PAH de LPSC 232 y LPSC 436 como única fuente de carbono*

Se prepararon placas de Petri con MMS como base y sobre cada una se colocó 5 ml de agarosa al 0,8% fundida (40°C) con 250 µl de una solución etanólica del PAH (8,5 mg/ml) (PIR, FEN o DBT). Una vez solidificada la superficie del medio de cultivo con el PAH como única fuente de carbono y energía, se inoculó en el centro un disco de micelio activo de 5 mm de diámetro. Se realizaron los correspondientes controles sin PAH, por triplicado. Las placas se incubaron a 25 °C y en oscuridad, monitoreando día a día su crecimiento y presencia de halo transparente de solubilización del PAH correspondiente.

III.2.3 Tolerancia a hidrocarburos

III.2.3.1 Tolerancia a una mezcla de PAH

Se evaluó la tolerancia de los 5 hongos a una mezcla de PAH, como fue descrito en la sección III.2.2.1. A partir de los diámetros de las colonias en ausencia (Tratamiento Control) y presencia de PAH, se calculó la tasa de tolerancia a PAH según la siguiente ecuación (EC III. 1) (Lee *et al.*, 2014).

$$\text{Tolerancia} = \left(\frac{\text{Diámetro de crecimiento fúngico en presencia de PAH}}{\text{Diámetro de crecimiento del control}} \right) * 100 \quad \text{EC III. 1}$$

III.2.3.2 Tolerancia a PAH específicos

Se evaluó la tolerancia de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 a 6 PAH (NAF, FEN, ANT, PIR, FLU, DBT) sobre placas con medio mineral sólido suplementado con glucosa al 1% (MMS+G) y extracto de malta al 2% (MMS+EM) independientemente (Figura III. 4). Se colocaron ~100 mg de cristales del PAH (esterilizados por UV) en forma de anillo a 2 cm del centro. Luego se inoculó en el centro de la placa un disco de micelio activo de 5 mm de diámetro. Se realizaron los correspondientes controles sin PAH en cada condición. Las placas se incubaron a 25 °C y en oscuridad. Luego de 7 días de incubación se midieron los diámetros de las colonias (n=10). Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

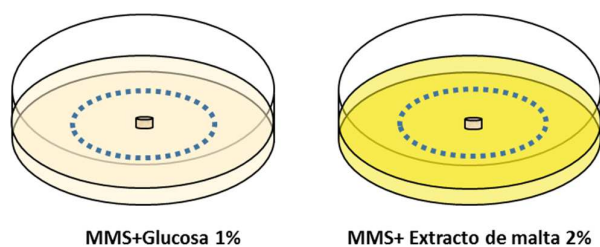


Figura III. 4. Esquema del ensayo de tolerancia a cristales de PAH en medio mineral sólido. El anillo punteado representa los cristales de PAH a 2 cm de distancia del inóculo central.

III.2.3.3 Tolerancia al barro FP antes y después del tratamiento de oxidación química

A partir de los extractos acuosos del barro FP y del barro luego del tratamiento oxidativo, FP+PSA, se prepararon medios agarizados al 0.8% conteniendo los extractos al 25, 50 y 100%. El control se realizó con agua destilada. Estos medios se aplicaron sobre placa de MyA2 suplementada con 1 ml de solución antibiótica de cloranfenicol 0,25 g/l y estreptomicina 0,5 g/l. Se inoculó un disco de micelio activo, e incubó a 25 °C en oscuridad por 5 días donde se registró el diámetro de la colonia (mm). Todos los tratamientos se realizaron por triplicados.

III.2.3.4 Tolerancia al barro FP+PSA pos neutralización del pH

Ensayos de neutralización

Con el fin de ajustar el pH ácido tras la oxidación con PSA, se ensayaron 2 agentes neutralizantes: NaHCO_3 (pH= 8,17) y una mezcla de conchilla molida (pH=8,77) con arena (pH=7,56).

1- Sobre ~ 5 g FP+PSA (pH ~ 2) se adicionaron distintos volúmenes de NaHCO_3 (0,5M) (1; 2; 2.5 y 5 ml) y agitó durante 24 horas en *shaker* (140 rpm). Finalmente se registró el pH.

2- Se ensayaron 4 proporciones conchilla: arena (**Tabla III. 6**) sobre ~ 5 g FP+PSA. Luego de 24 horas se determinó el pH de las mezclas.

Sobre los extractos acuosos del barro FP+PSA con NaHCO_3 (0,5M) y las distintas proporciones conchilla:arena se realizó el ensayo de tolerancia como se detalló en la sección anterior.

Tabla III. 6. Proporciones para la prueba de alcalinización con conchilla y arena

Proporción	Conchilla (g)	Arena (g)
1	1	14
2	5	10
3	7,5	7,5
4	15	0

III.2.4 Efecto de PAH seleccionados sobre el perfil de FAME en hongos seleccionados y la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ácidos grasos específicos utilizando glucosa ^{13}C

Condiciones de cultivo

Sobre placas con MMS suplementado con D-glucosa natural ^{12}C (1g/l) o D-glucosa marcada ^{13}C (U- $^{13}\text{C}6$, 99% *Cambridge Isotope Laboratory Inc.*) al 20%, se agregó 5 ml de agarosa al 1% fundida con 200 μl de solución de acetona y PAH seleccionado (PIR, DBT, PIR+DBT) (8,5 mg/ml). Se inoculó un disco de micelio activo de LPSC 232 y LPSC 436 independiente, e incubó a 25 °C en oscuridad hasta que la placa se cubra de micelio.

Extracción y análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME)

El micelio desarrollado en cada tratamiento (control; PIR, DBT, PIR+DBT) y condición de cultivo (^{12}C o ^{13}C 20%) se retiró con espátula de metal previamente esterilizada. A partir del micelio obtenido en cada condición se realizó la extracción de los ácidos grasos según el protocolo de Bligh & Dyer (1959) y su derivatización a FAME con fluoruro de boro en metanol (Morrison & Smith, 1964). Se utilizó como estándar

interno al FAME 19:0. El perfil de la fracción FAME se analizó por cromatografía de gases (GC Hewlett-Packard 6890) acoplado a un espectrómetro de masas (Hewlett-Packard 5973) e identificados a través de la biblioteca MIDI (versión 4.0 TBSA40).

Análisis de isótopos de carbono por GC - combustión – IRMS

La determinación de la composición isotópica de carbono de los FAME se realizó por cromatografía de gases, combustión y espectrometría de masas (IRM-GC-C-MS) (Feisthauer *et al.*, 2008). La composición isotópica se reportó en notación δ en relación con el estándar internacional Vienna Pee Dee Belemnite (V-PDB) según la ecuación **EC III. 2** (Slater *et al.*, 2001). Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los FAME se ajustaron según (Silfer *et al.*, 1991).

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_m - R_{V-PDB}}{R_{V-PDB}} \right) * 1000 \text{ ‰} \quad \text{EC III. 2}$$

Donde:

$\delta^{13}\text{C}$ = composición isotópica es la diferencia relativa en partes por mil (‰) entre una proporción de isótopos de muestra y la proporción de isótopos del estándar internacional.

R_m = relación isotópica $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ de la muestra

R_{V-PDB} = relación isotópica $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ del estándar V-PDB

III.2.5 Efecto del pireno y el barro FP en el crecimiento de *Corioloopsis rigida* LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436 en diferentes medios de cultivo

Preparación de los cultivos líquidos

En condiciones de esterilidad se colocaron 50 ml de medio de cultivo en un Erlenmeyer de 250 ml con pireno 500 mg/l (previamente esterilizado por UV durante 10 minutos) y otro con barro FP liofilizado 1 g/l. En la **Tabla III. 7** se detallan los diferentes tratamientos ensayados. A excepción de los tratamientos abióticos, todos se inocularon con 5 discos de micelio activo de LPSC 232 y LPSC 436 individualmente. Se incubaron a 28 °C en agitación (50 rpm) y oscuridad durante 14 días. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado. Transcurrido el tiempo, el micelio desarrollado junto con el caldo de cultivo remanente se trituró con una procesador *Ultraturax* T5 (S25/N/18G) a 9500 rpm durante 40-60 segundos hasta que sea solución homogénea.

Tabla III. 7. Tratamientos en cultivos líquidos suplementados con PIR y barro FP inoculados con LPSC 232 y LPSC 436.

	PIRENO	BARRO FP
	Control abiótico MML+PIR	Control abiótico MML+FP
	Hongo+ MML+PIR	Hongo+ MML+FP
	Hongo+ MML+glucosa 1%	Hongo+ MML+glucosa 1%
TRATAMIENTOS	Hongo+ MML+glucosa 1%+PIR	Hongo+ MML+glucosa 1%+FP
	Control abiótico ME+PIR	Control abiótico ME+FP
	Control biótico:Hongo+ ME	Hongo+ ME
	Hongo+ ME+PIR	Hongo+ ME+FP

Estimación de biomasa fúngica por peso seco

Se colocó un filtro de papel (*Whatman* N°1 Ø 55mm) en una placa de Petri de vidrio y se secó a 80 °C durante 1 hora en estufa. Luego se colocó en el desecador y registró el peso en balanza analítica. Se tomó 2 ml de micelio triturado sobre el filtro seco y filtró al vacío. Se enjuagó con agua destilada para limpiar resto del medio de

cultivo. La biomasa fúngica se secó a 80 °C durante 24 h. Luego se colocó en el desecador y registró el peso final.

Estimación de biomasa fúngica por ergosterol

Se colocaron 2 g de KOH, 20 ml metanol *p.a.* y 5 ml etanol absoluto en Erlenmeyer de 100 ml. Luego se adicionaron 2 ml de micelio triturado y se tapó con papel de aluminio. Se incubó en baño a 70 °C por 30 minutos, agitando manualmente cada 10 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y se tapó con tapón de vidrio con anillo de teflón. En tubo falcon 15 ml se colocó 5 ml muestra con 5 ml *n*-hexano y se agitó horizontalmente en shaker por 20 minutos. Se transfirió el extracto a tubos vidrios y evaporó con N₂. Luego se resuspendió en metanol HPLC por sonicación durante 5 minutos. Finalmente centrifugar a 16000 *g*, 4 °C por 5 minutos y midió por HPLC. (Shimadzu. Columna: Nucleosil 100-5 C18. 250 x 4 mm. TA: 9,6 min, eluyente: Metanol al 100%. Detector: PDA 278 nm)(Barajas-Aceves *et al.*, 2002).

Tabla III. 8. Curva de Calibración para ergosterol a partir de una solución madre de 100 mg/l.

Concentración teórica (mg/l)	Solución Madre (ml)
0.1	0.01
1	0.1
5	0.5
10	1
50	5

III.2.6 Habilidad de *C. rigida* LPSC 232 en la remoción de pireno en cultivo líquido

Preparación de los cultivos

Con el fin de corroborar la capacidad de *C. rigida* LPSC 232 en remover pireno por cometabolismo, se colocó 100 µl de una solución de pireno en acetona en frasco de vidrio de penicilina (120 ml). Se dejó evaporar y colocó 20 ml de caldo extracto de malta

al 2% y extracto de levadura al 0,1% resultando en una concentración final de 50 mg/l. Se inoculó con 2 discos de micelio activo bajo esterilidad. Se realizó un control biótico sin PIR. Con el fin de evaluar la posible adsorción del PAH en el micelio, se prepararon 2 sets de triplicados que se esterilizaron en autoclave por 30 minutos a 1 atm. Un set se contaminó con PIR y el otro se consideró como control abiótico (**Tabla III. 9**).

Tabla III. 9. Resumen tratamientos con LPSC 232 y pireno.

	LPSC 232+ ME2+PIR t0
	LPSC 232+ ME2 t14
TRATAMIENTOS	LPSC 232+ ME2 +PIR t14
	LPSC 232 _{autoclavado} + ME2 t14
	LPSC 232 _{autoclavado} + ME2+PIR t14

Todos los tratamientos se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 14 días. Al final del monitoreo se separó la biomasa del medio de cultivo con pinza metálica y colocó en tubo falcon de 50 ml.

Extracción del pireno

Sobre la biomasa se realizaron 3 extracciones sucesivas con 5 ml de acetato de etilo cada una en baño ultrasónico (*Teslab Ultrasonic TB04TA*, 40 kHz, 160 W) por 15 minutos. Luego se centrifugó a 5000 *g* por 5 minutos para separar la fase acuosa remanente retenida por el micelio. Los extractivos se reservaron en frascos de vidrio caramelo.

Sobre el remanente de medio líquido se realizaron 3 extracciones sucesivas con 10 ml de acetato de etilo por agitación horizontal 150-200 rpm durante 30 minutos. Luego se pasaron a tubos falcon de 50 ml y centrifugó a 5000 *g* por 5 minutos aproximadamente para romper la emulsión y separar la fase acuosa. Los extractivos se reservaron en frascos de vidrio caramelo.

Finalmente los extractivos obtenidos de la biomasa fúngica y del medio de líquido se filtraron con membrana de nylon de 0,45 μm y guardaron en viales caramelo para su determinación por HPLC-UV.

III.2.7 Ensayo de mineralización en sistemas biometers (Bartha & Pramer, 1965)

Preparación del inóculo

Se inocularon los hongos *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en medio agarizado MyA2 y se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 7 días. Bajo flujo laminar, se cortaron con pipeta Pasteur de vidrio estéril 8 discos (5 mm de diámetro) de micelio e inocularon en matraz Erlenmeyer con 250 ml caldo-extracto de malta 2% y extracto de levadura 0,1 %. Estos se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 14 días. El micelio desarrollado fue procesado siguiendo el protocolo de Saparrat y colaboradores (2002) para obtener una suspensión de micelio homogénea.

Preparación de los biometers

El sistema *biometer* consiste en un matraz Erlenmeyer con un tubo de ensayo adosado el cual contiene una trampa de KOH que secuestra el CO₂ producido por los microorganismos cuando mineralizan las fuentes de carbono presentes en la matriz de estudio (**Figura III. 5**). Se prepararon soluciones de HCl 0,5 M y KOH 0,5 M.

Se prepararon matraces biométricos para los siguientes tratamientos (por triplicado) en condición axénica (A) con el barro FP estéril y en condición no estéril (NE) independientemente:

- Control positivo: Rastrojo de trigo inoculado con el hongo ligninolítico (LPSC 232 o LPSC 436).
- Control negativo (abiótico): Rastrojo de trigo + barro FP /arena.
- Bioaumento fúngico LPSC 232 o LPSC 436: Rastrojo de trigo + barro FP/arena + hongo ligninolítico.

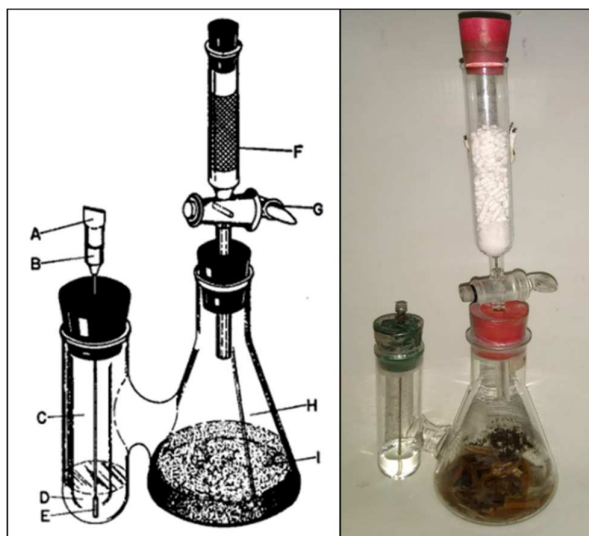


Figura III. 5. Sistema biometer para el monitoreo de CO₂ producido por los microorganismos. Esquema (izquierda) A: Tapón de goma. B: Jeringa metálica. C: Tubo de 50 ml. D: Solución de KOH. E: Tubo de polietileno. G: Llave robinete. F: Columna de ascarita. H: Erlenmeyer de 250 ml. I: matriz de estudio (derecha).

Bajo campana de gases, se preparó un stock del barro FP con arena, previamente calcinada en estufa de 400 °C, en proporción 1:3 respectivamente. Luego, se fraccionó 180 g de la mezcla en cada matraz de los tratamientos (II) y (III). Se agregaron 2 g de rastrojo estéril en cada uno de los tres *biometer*.

Para la condición axénica, los matraces biométricos conteniendo rastrojo y la mezcla barro FP/arena se esterilizaron dos veces en autoclave a 1 atm por 30 minutos.

Para la condición NE, se colocaron 2 g rastrojo de trigo en todos los matraces (humedad 70%), se esterilizaron (2 veces a 1 atm por 30 minutos) y luego se añadió la mezcla de barro FP/arena (FP NE).

Finalmente, los tratamientos I y III se inocularon con 2 ml de la suspensión miceliar. Se sellaron los matraces con sus tapones y se colocó en los tubos laterales 10 ml de la solución de KOH 0,5 M. Se incubaron en oscuridad a 28 °C durante 60 días.

Monitoreo del CO₂ producido durante la incubación

La frecuencia del monitoreo varió de una a tres veces por semana según los niveles observados de la actividad respiratoria de los organismos en las condiciones E y NE. Para realizar la medida, se trasvasó el volumen de solución de KOH del tubo lateral a un nuevo Erlenmeyer conteniendo Ba(OH)₂. Inmediatamente se repuso el volumen de KOH 0,5 M del tubo lateral y se continuó la incubación.

El volumen retirado se tituló con una solución de HCl 0,5 M utilizando fenolftaleína como indicador del punto final. La cantidad de CO₂ producido se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[CO_2] = \frac{\left(\frac{((Vol\ KOH * [KOH]))}{1000}\right) - \left(\frac{((Vol\ HCl * [HCl]))}{1000}\right)}{2 * 10^6} \quad EC\ III.\ 3$$

Donde:

[CO₂] = concentración molar de CO₂ (μmol/ml)

[KOH] = concentración molar de KOH (M)

[HCl] = concentración molar de HCl (M)

Vol = volumen en ml

III.2.8 Preparación de microcosmos

III.2.8.1 *Microcosmos con suelo contaminado artificialmente con fenantreno*

Se prepararon microcosmos en condición axénica (A) y condición no estéril (NE).

La tierra utilizada en los microcosmos en condición A fue esterilizada a 1 atm en autoclave durante dos ciclos de 30 minutos. Sobre bandejas plásticas estériles (240 x 170 x 40 mm) se dispusieron 350 g de tierra estéril para los microcosmos en la condición A y 350 g de tierra no estéril para los microcosmos en la condición NE.

Bajo flujo laminar, se contaminó con una solución de FEN en acetona p.a de modo de obtener una concentración final en suelo de 2500 mg.kg⁻¹. La solución se distribuyó

con pipeta en pequeñas alícuotas de 20 μl sobre la tierra. Se dejó evaporar la acetona p.a y luego se homogeneizó manualmente con guantes de nitrilo (**Figura III. 6**).



Figura III. 6. Preparación de los microcosmos con suelo contaminado artificialmente con fenantreno.

- Sobre el suelo contaminado se colocó rastrojo de trigo inoculado con cada hongo. Se envolvieron con doble bolsas plásticas estériles. Se incubaron durante 120 días a 28 °C en oscuridad. Los tratamientos en la condición E se realizaron según el siguiente detalle.

- Control A: Microcosmos con suelo estéril contaminado con 2500 mg.kg^{-1} de FEN y rastrojo de trigo estéril no inoculado humedecido al 70%.

- LPSC 232 A: Microcosmos con suelo estéril contaminado con 2500 mg.kg^{-1} de FEN y rastrojo de trigo estéril inoculado con *Coriopsis rigida* (LPSC 232).

- LPSC 436 A: Microcosmos con suelo estéril contaminado con 2500 mg.kg^{-1} de FEN y rastrojo de trigo estéril inoculado con *Grammothele subargentea* (LPSC 436).

- LPSC 735 A: Microcosmos con suelo estéril contaminado con 2500 mg.kg^{-1} de FEN y rastrojo de trigo estéril inoculado con *Gloeophyllum sepiarium* (LPSC 735).

- LPSC 436/735 A: Microcosmos con suelo estéril contaminado con 2500 mg.kg^{-1} de FEN y rastrojo de trigo estéril inoculado con *Grammothele subargentea* (LPSC 436) y *Gloeophyllum sepiarium* (LPSC 735) en una proporción 50:50.

Los tratamientos en la condición NE fueron realizados en microcosmos con tierra no esterilizada previamente y contaminada con FEN. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado.

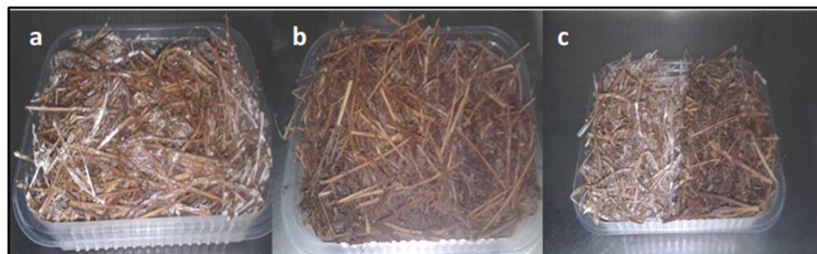


Figura III. 7. Microcosmos en condición axénica al inicio del tratamiento con *G. subargentea* LPSC 436 (a), *G. sepiarium* LPSC 735 (b) y con el cultivo dual de ambos hongos.

III.2.8.2 Microcosmos con suelo contaminado artificialmente con barro de fondo de pileta API (FP)

Los microcosmos fueron preparados con tierra no estéril, previamente tamizada y contaminada con 10% de barro FP. Se homogeneizó manualmente con guantes de nitrilo cuidadosamente bajo campana y fraccionó 350 g de la mezcla en bandejas plásticas estériles (240 x 170 x 40 mm). En esterilidad se colocaron sobre la tierra 400g aproximadamente de rastrojo de trigo previamente inoculado con *Corioloopsis rigida* LPSC 232 ó *Grammothele subargentea* LPSC 436 con 15 días de incubación. Las bandejas se envolvieron con doble bolsas plásticas estériles. Se incubaron durante 90 días a 28 °C en oscuridad. Todos los microcosmos se realizaron por triplicado.

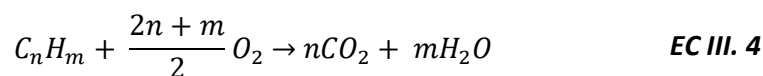
III.2.8.3 Microcosmos con barro de fondo de pileta API oxidado y sin oxidación previa

III.2.8.3.1 Cálculo de la dosis del persulfato de amonio

La concentración de oxidante que se utiliza en el tratamiento de un suelo contaminado es un parámetro importante que se calcula teniendo en cuenta la cantidad de contaminante presente. Se define como dosis a la cantidad estequiométrica de oxidante necesaria para mineralizar por completo (a dióxido de carbono y agua) a los contaminantes.

En el presente trabajo se utilizó persulfato de amonio (PSA)(Merck) como agente oxidante en un 10% respecto de la cantidad de barro FP, activado con hierro Fe (II) al 25% en solución con agua destilada (Peluffo *et al.*, 2016). La acción del catión tiene como finalidad suplementar nitrógeno al sistema, resultando en un doble efecto: eliminación química del contaminante y fertilización del suelo.

La dosis de oxidante se definió sobre la mínima cantidad de oxígeno necesaria para oxidar un mol del compuesto, como se detalla en la Ecuación **EC III. 4**.



El cálculo de la dosis de PSA se realizó considerando que por cada mol de oxígeno intervienen 4 moles de electrones. Sabiendo que por cada mol de persulfato se ponen en juego 2 moles de electrones.

Considerando que el PSA no solo reacciona con los PAH sino que también con la materia orgánica presente en el suelo, se decidió aplicar 3 dosis de la solución oxidante por aspersión con una diferencia de 48 hs en agitación (250 rpm), llegando a un total de 30 g PSA kg^{ss}⁻¹. Luego se incubó a 30 °C en oscuridad y después de 20 días se corroboró la ausencia de persulfato residual por espectrofotometría (Liang, *et al.*, 2008). Considerando que los 30 g de PSA aportan 3,68 g de N kg^{ss}⁻¹ al sistema, los microcosmos iniciales tendrán (0,368 + 0,20) g de N, es decir 0,57 %, aproximadamente.

III.2.8.3.2 Preparación de microcosmos

Bajo campana de gases, se prepararon 2 *stocks*: uno con arena calcinada y barro FP (25%) sin oxidar (**Figura III. 8-B**) y otro con arena calcinada y barro FP oxidado PSA (25%). De cada mezcla se fraccionaron 20 g en frascos de vidrio (200 ml capacidad) independientes por condición (axénica y no estéril), tiempo (inicial, 30 y 60 días) y tratamiento (control, bioaumentación LPSC 232, bioaumentación LPSC 436). Para el armado de los microcosmos en la condición axénica se utilizó cada mezcla previamente esterilizada. En todos los microcosmos se agregaron 2 g de rastrojo estéril (**Figura III. 8-C**), y humedecieron con agua destilada al 70%.

La inoculación se realizó con 2 ml de micelio triturado según los tratamientos bioaumentación con LPSC 232 (**Figura III. 8-A**) y LPSC 436 e incubaron en oscuridad a 28 °C por 30 y 60 días. Los tratamientos control no fueron inoculados. Todos los tratamientos fueron realizados por triplicado. Se reservaron a -20 °C los microcosmos del tiempo inicial para futuras determinaciones.

Transcurridos los tiempos de incubación, cada microcosmos se homogeneizó con una multiprocesadora de mano (Philips 300W) previamente a las determinaciones químicas y biológicas (**Figura III. 8-D**).

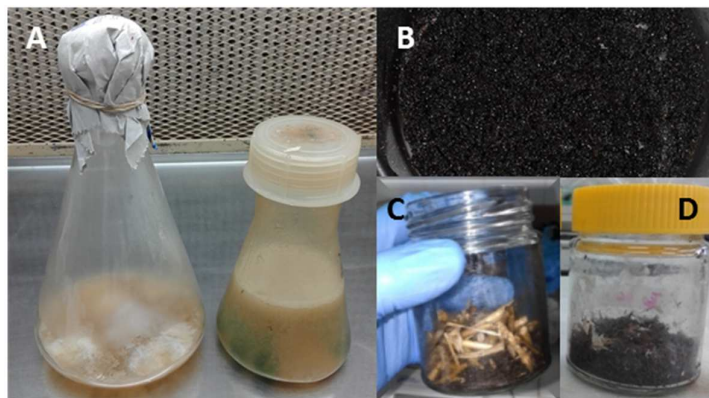


Figura III. 8. Preparación de microcosmos barro FP en estrategias combinadas. A. Micelio de LPSC 232 luego de 15 días de incubación (izquierda) y suspensión micelial homogeneizada (derecha). B. Barro FP en arena calcinada. C. Armado de microcosmo con rastrojo de trigo. D. Microcosmos procesado.

III.3 Determinaciones físicas y químicas

III.3.1 Porcentaje de humedad del suelo

El contenido de agua de las muestras de suelo de los diferentes ensayos se determinó por gravimetría. Se pesaron ~4-5 g de suelo en una placa de Petri de vidrio y secó en estufa a 105 ± 5 °C durante 24 horas hasta obtener peso constante. Se enfrió en desecador hasta llegar a temperatura ambiente para su posterior pesada. La diferencia de peso respecto al suelo húmedo se expresó como porcentaje de humedad (%H).

III.3.2 Determinación de humedad del residuo FP por destilación azeotrópica

Se colocaron ~10 g de residuo FP en un balón de 250 ml y se agregó tolueno saturado en agua destilada hasta cubrir la muestra (~30 ml tolueno/agua). Se adaptó una trampa graduada de Dean-Stark (10 ml) y conecto al refrigerante para su destilación. Se utilizó una platina para calentar la mezcla a ebullición suave (Pe tolueno/agua 84 °C) durante 2 horas. Transcurrido ese lapso, se dejó enfriar y efectuó la lectura del agua destilada

III.3.3 Determinación de pH y conductividad eléctrica

Las medidas de pH y conductividad eléctrica se realizaron a partir de 2 g de muestra de tierra o residuo. Se colocaron en un tubo falcon de 50 ml con 20 ml de agua destilada, se mezclaron con vortex y agitación durante 10 minutos. Se dejó en reposo durante 1 hora. Luego se sumergió el electrodo de vidrio Phoenix Electrode Company en el sobrenadante (Método EPA-9045D). El electrodo de pH se calibró con buffer comercial (Anedra) de pH 4, 7 y 10. El electrodo de conductividad se calibró con las soluciones del equipo.

III.3.4 Determinación de la concentración residual de persulfato de amonio

En un tubo falcon de 15 ml se pesaron 5 g del barro oxidado (FP+PSA), se agregaron 5 ml de agua bidestilada. Se mezcló con vortex y luego con agitador durante 5 minutos y se dejó en reposo durante una hora para que decante. Se tomó el sobrenadante y se filtró con membrana de celulosa de 0,45 μm . Del filtrado se tomaron 100 μl y se colocaron junto con 500 μl de solución NaHCO_3 y KI (0,05 g + 1,0 g en 10 ml de agua bidestilada) en un matraz de 10,00 ml enrasando con agua bidestilada y se mezcló por inversión para homogenizar. Luego de 15 minutos de preparada la mezcla se midió la absorbancia con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 entre 200 y 500 nm utilizando celdas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico. Para el cálculo de la concentración de persulfato se construyó una curva de calibración utilizando patrones de PS realizados por pesada directa (y dilución) y tomando el valor de la absorbancia a 350 nm (Liang *et al.*, 2008)

III.3.5 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) por FT-IR

A 5 g de muestra, previamente secadas en estufa a 60 °C durante 24 horas, se le adicionaron 20 ml de percloroetileno (Anedra. Para espectroscopia infrarroja) en vasos de teflón aptos para microondas. Las extracciones se realizaron en microondas (Qlab Pro Microwave Digestion System) a una temperatura de digestión de 60 °C, 18 minutos de estabilización y 10 minutos de digestión. Dejar enfriar las muestras. Bajo campana, las muestras se filtraron en jeringas de plástico, con un taponcito de algodón en la punta, con 1 g de silica gel 60 (0,063 mm-0,200 mm; AppliChem GmbH). Finalmente, las muestras se midieron en espectrofotómetro de infrarrojo FT-IR (*Thermo Scientific Nicolet 200*) con celda de cuarzo (1 cm de camino óptico) utilizando el Programa EnCompass. Se definieron los límites de absorbancia entre 400-4000 cm^{-1} , considerando la altura de pico a 2950 cm^{-1} como la concentración de HTP (USEPA 8440, 1996).

A partir de los microcosmos realizados con FP/ arena y rastrojo se tomaron de 5 g de muestra y realizó la extracción por sonicación (1 ciclo de 1 hora) con 20 ml de

percloroetileno. Las muestras se filtraron en jeringas de plástico con 1 g de sílica gel 60 (0,063 mm-0,200 mm; AppliChem GmbH) para la posterior cuantificación de HTP.

III.3.6 Determinación de hidrocarburos alifáticos (HA) y policíclicos aromáticos (PAH) por GC-FID

A partir de 2,5 g de muestra se adicionaron 5 g de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4 , Merk) y realizó la extracción con 15 ml de una mezcla de solventes orgánicos de hexano: acetona 1:1 (v/v) (Sayara *et al.*, 2010) calidad cromatográfica, mediante baño ultrasónico Teslab Ultrasonic TB04TA, 40 kHz, 160 W (Song *et al.*, 2007) durante 1 hora (EPA 3550). Luego se centrifugó durante 10 minutos a 5000 *g* y los sobrenadantes se recogieron en frascos de vidrio caramelo previamente enjuagados con acetona. El procedimiento se realizó tres veces consecutivas (extracción exhaustiva). Los extractos se evaporaron y se solubilizó en hexano calidad HPLC. Finalmente se filtró con membrana de nylon de 0,45 μm y guardaron en viales para GC.

A partir de los microcosmos FP/ arena y rastrojo se realizó la extracción por sonicación (1 ciclo de 1 hora) de la fracción de alifáticos y aromáticos mediante hexano:acetona (1:1) a partir de 2,5 g de muestra.

III.3.7 Determinación de PAH por HPLC-UV

A partir de los microcosmos con suelo contaminado artificialmente con fenantreno ($2500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), se tomaron 3 g de muestra con 30 ml de acetato de etilo p.a. Se sonicó en baño ultrasónico (Teslab Ultrasonic TB04TA, 40 kHz, 160 W) durante 1 hora. Luego se centrifugó a 3000-4000 *g* en una centrifuga (Presac DSC-16-RV) por 15 min y se filtró parte del extracto con membrana de nylon de 0,45 μm .

A partir de los cultivos líquidos contaminados con pireno se realizó la extracción del PAH con acetato de etilo. Al volumen total de los cultivos se le agregó acetato de etilo (1:2 acetato de etilo/cultivo), se agitó durante 30 minutos a 150 rpm y se conservó

la fase orgánica. Este procedimiento se repitió 3 veces. Los extractos fueron filtrados con membrana de nylon de 0,45 μm y pasados a viales HPLC.

En ambos ensayos la concentración de PAH se determinó mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en fase reversa utilizando un cromatógrafo Waters® España, con una columna Symmetry Waters® España C18 (15 cm, 4.6 mm i.d., tamaño de perla 5 mm, tamaño de poro 100 Å) con un gradiente lineal metanol: ácido fosfórico (20:80 hasta los 15 minutos de corrida, 5:95 durante 2 minutos y posteriormente 20:80 hasta llegar a los 19 minutos de corrida) y un flujo de 1ml/min (Coppotelli *et al.*, 2010). Los espectros se analizaron con el software Empower. Se realizó una curva de calibración de 7 puntos en acetato de etilo calidad HPLC.

III.3.8 Fraccionamiento SARA del residuo FP

La separación de las fracciones de hidrocarburos SARA (S: Saturados; A: Aromáticos; R: Resinas y A: Asfaltenos) se llevó a cabo bajo la norma 143-modificada (**Figura III. 9**). Aproximadamente 2 g de residuo liofilizado, se agitó con *n*-pentano en una relación 1:40 durante toda la noche. Se filtró con filtro de papel (poro menor a 2 μm) y se lavó 2 o 3 veces con pentano. Los maltenos recuperados (hidrocarburos saturados y aromáticos) y resinas tipo II forman parte de la fracción soluble mientras que, los asfaltenos y las resinas tipo I quedan retenidos en el filtro. Luego las resinas tipo I se separaron de los asfaltenos por reflujo continuo un equipo *Sohxlet*. El filtro de papel se colocó en un cartucho de celulosa y se realizó la extracción con pentano en temperatura de ebullición ($\sim 36,1$ °C) durante 3-4 horas. Quedarán las resinas tipo I en el solvente y en el cartucho los asfaltenos y la tierra. Luego, la muestra seca se colocó en vaso de precipitado con 60 ml de tolueno para solubilizar los asfaltenos, evidenciándose un precipitado de tierra que fue separado por filtración con filtro de papel. Todos los extractos se dividieron en dos y evaporaron y cuantificaron por gravimetría. Finalmente, los extractos se resuspendieron en percloroetileno y fueron filtrados con jeringas con silica gel (ver **III.3.5**) para la determinación de la concentración de HTP en cada fracción.

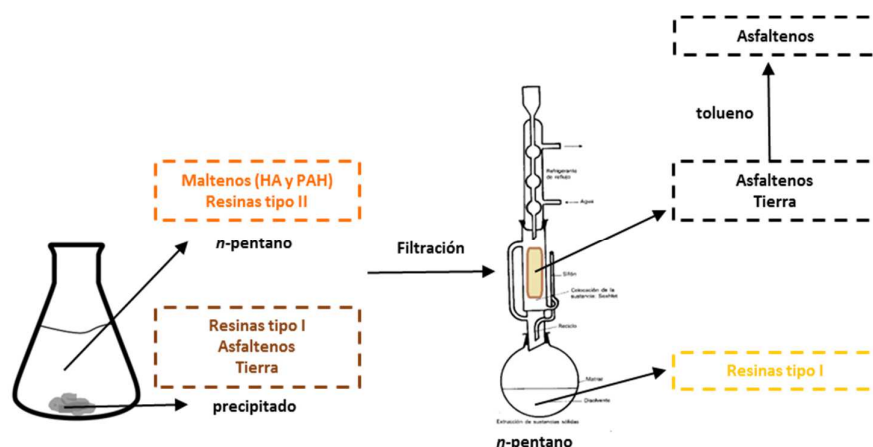


Figura III. 9. Esquema del fraccionamiento SARA basado en la norma 143-modificada.

III.3.9 Análisis espectral FT-IR de la fracción soluble en pentano

A partir de 1 g de muestra compuesta (por triplicados) se realizó la extracción de los hidrocarburos solubles en *n*-pentano (hidrocarburos saturados y aromáticos, resinas II) en una relación 1:40 durante toda la noche. Luego se filtró con filtro de papel (poro menor a 2 μm) y dejó evaporar a temperatura ambiente. Del extracto sólido se confeccionaron pastillas con bromuro de potasio (KBr) a través de la técnica *pellet* (Bava *et al.*, 2019) y midieron con un espectrofotómetro infrarrojo (FT-IR) (*Thermo Scientific Nicolet 6700*, detector DTGS) en el rango 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 0,5 cm^{-1} . Previo al análisis cualitativo, los espectros se pre-procesaron de la siguiente manera: (i) se calcularon las segundas derivadas sobre los espectros utilizando el algoritmo de Savitzky-Golay (Savitzky & Golay, 1964) con un suavizado de 9 puntos para aumentar el número de características discriminantes dentro del conjunto de bandas espectrales y minimizar los problemas con los cambios en la línea base; (ii) luego las derivadas segundas de los espectros se normalizaron vectorialmente en todo el rango para independizarse de la cantidad de muestra (Helm & Naumann, 1995; Naumann, 2000; Bosch *et al.*, 2006). Los análisis de *cluster* jerárquico se realizaron sobre las regiones espectrales 2800-3000, 1590-1760 y 730-900 cm^{-1} a través del método de cálculo “*scaling to 1st range*” y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo “*av. linkage*”. El análisis factorial se realizó con la derivada segunda normalizada de los

espectros en las regiones espectrales 2800-3000, 1590-1750, 1300-1530 y 700-900 cm^{-1} , por medio del método de factorización. El pre-procesamiento y el análisis de los espectros FT-IR se realizaron con el *software* OPUS (versión 7.0 Bruker Optics Alemania; Naumann 2000).

III.4 Técnicas de recuentos bacterianos

III.4.1 Recuento de bacterias heterótrofas cultivables

Se tomaron 10 g de fondo de pileta API y se resuspendieron en 90 ml de solución fisiológica previamente esterilizada por autoclave. Se agitó en *shaker* a 250 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se dejó decantar durante 10 minutos y se prepararon diluciones seriadas 1/10 en tubos Eppendorf® con solución fisiológica estéril. Se sembraron por duplicado 100 μl de cada una de las diluciones en placas con medio de cultivo R2A. Se distribuyó la muestra cuidadosamente utilizando una espátula de Drigalsky estéril. Las placas se incubaron a 25 °C durante 7 días. Pasado ese tiempo se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Las placas tomadas como válidas fueron aquellas que presentan entre 30 y 300 UFC. Se calculó el logaritmo de las UFC por ml de muestra (Reasoner & Geldreich, 1985).

III.4.2 Recuento de bacterias degradadoras de HA

A tubos de vidrio con 5 ml de MML estériles, suplementados con 50 μl de hexadecano comercial (Merk), se adicionaron 100 μl de cada una de las diluciones seriadas 1/10 anteriores por duplicado. Se incubaron a 25 °C durante 21 días. Transcurrido dicho periodo se observó la turbidez presente en cada dilución y se cuantificó por el método del Número más probable (Wrenn & Venosa, 1996).

III.4.3 Recuento de bacterias degradadoras de PAH

Las bacterias degradadoras de PAH se cuantificaron en microplacas estériles de 96 pocillos con MML y, como sustrato, una mezcla de PAH en pentano (Wrenn & Venosa, 1996). Una vez evaporado el pentano, dejando una fina capa de PAH en el fondo de cada pocillo, se cargaron los pocillos con 180 μ l de MML y con 20 μ l de las diluciones seriadas (1/10) de la muestra por octuplicado. Las placas se incubaron a 22 ± 2 °C durante 21 días. Para enumerar las bacterias degradadoras se utilizó el método del Número Más Probable (NMP) tomando como pocillos positivos aquellos donde se observó una coloración amarilla/naranja luego del período de incubación mencionado.

III.4.4 Recuento de bacterias sulfato reductoras

Se realizó la técnica de dilución por extinción, la cual consiste en inocular un tubo con medio de cultivo fresco, mezclar y volver a tomar una alícuota de ese tubo. Ésta alícuota se siembra con una dilución 1/10 en otro tubo con medio de cultivo fresco y así sucesivamente. Se incubaron a 30 °C en oscuridad durante 21 días en condiciones anóxicas y al cabo de este tiempo se registraron como tubos positivos aquellos que presentaron precipitado negro (Hungate, 1969).

III.4.5 Recuento de hongos

A partir de las diluciones seriadas 1/10 anteriores, se tomaron 100 μ l de cada una y distribuyeron con una espátula de Drigalsky estéril sobre en placa de agar RB. Cada dilución se realizó por duplicado. Se incubaron a 24 °C durante 7 días. Pasado ese tiempo se realizó el recuento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), siguiendo con el mismo procedimiento que para el recuento de bacterias heterótrofas cultivables.

III.5 Estudio de funcionalidad de los microcosmos

III.5.1 Actividad enzimática lacasa

Para evaluar la actividad fúngica se procedió a determinar la actividad enzimática lacasa en suelo según el protocolo de extracción de Ruiz-Hidalgo y colaboradores (2014), utilizando como sustrato de actividad oxidativa al ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)]. En tubos falcon de 50 ml se pesó 3 g de muestra de suelo adicionando 30 ml de buffer acetato de sodio 200 mM a pH 5. Se agitó en *shaker* a 150 rpm durante 30 minutos. Luego se centrifugó a 4000 *g* por 15 minutos. Se retiró el sobrenadante con ayuda de un filtro de papel y reservó en frascos de vidrio caramelo para su posterior medida. En cubeta de plástico (Volumen final: 1000 μ l) se preparó la reacción en el momento de la medición como se detalla en la **Tabla III. 10**.

Tabla III. 10. Actividad enzimática lacasa. Preparación de la reacción. Tiempo de reacción de 2 a 5 minutos a temperatura ambiente.

Pasos	Reactivos	Volumen (μ l)
1	Buffer acetato de sodio 500 mM pH 5,5	200
2	Agua destilada	500
3	Muestra	200
4	Sustrato ABTS 50 mM	100

Se utilizó un espectrofotómetro para medir la absorbancia a $\lambda=436$ nm. Se utilizó el buffer de reacción como blanco del equipo. La actividad se expresa en unidades internacionales (U) por litro definiendo la unidad enzimática como la cantidad de enzima producida por μ mol de sustrato consumido por minuto. En caso de muestras de suelo o barro FP, los resultados se expresaron en mU por gramo de muestra seca.

$$AE = \frac{\Delta A * V}{t * \epsilon * b * v}$$

EC III. 5

Donde:

- AE (U/ml): actividad enzimática en unidades internacionales por mililitros
- ΔA : Absorbancia final- absorbancia inicial
- V: volumen total de la reacción (ml)
- t: tiempo de reacción (minutos)
- ϵ : coeficiente de extinción molar del ABTS oxidado a 436 nm: $29,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$
- b: ancho de la cubeta (trayectoria óptica) = 1 cm
- v: volumen de muestra (ml)

III.5.2 Actividad deshidrogenasa (Thalman, 1968)

A 2,5 g de muestra húmeda, en frasco color caramelo 50 ml, se le adicionaron 2,5 ml de solución de triclorofeniltetrazolio (TTF) al 1 % preparada en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,7. Se agitó con *vortex* e incubó en oscuridad a 25 °C durante 24 horas. Para detener la reacción enzimática se agregaron 20 ml de acetona (p.a). Cada frasco se agitó por intervalos de 30 minutos durante 2 horas, para maximizar la extracción del producto de reacción. El contenido de cada frasco se filtró con papel de filtro y reservó en tubo de vidrio limpio. Por último, se realizó la medida de absorbancia a 546 nm utilizando un espectrofotómetro (Beckman DU 640 UV-Visible). Como blanco de reacción, para cada triplicado, se utilizó 2,5 g de muestra con 2,5 ml del buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,7, sin sustrato. Como blanco del espectrofotómetro se utilizó acetona (p.a). Se preparó una solución estándar de $500 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de trifenílformazan (TPF), producto de la oxidación del triclorofeniltetrazolio, en acetona y a partir de la misma se realizó la curva de calibración de 5 puntos (5, 10, 20, 30 y 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Los resultados se expresaron como μg de TPF $\text{g}_{\text{ms}}^{-1}$ (gramo de muestra seca).

III.5.3 Actividad hidrolasas mediante hidrólisis de diacetato de Fluoresceína (FDA) (Schnürer & Thomas, 1982)

La actividad hidrolasa se determinó a través de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) a fluoresceína, la cual es medida colorimétricamente. Se homogeneizó 1 g de muestra con 20 ml de buffer fosfato de sodio (60 mM, pH 7,6) y el agregado de 100 μ l de una solución de FDA (2 mg/ml de acetona). Luego se incubó a 20 °C en agitador rotatorio durante 2 horas a 150 rpm. Transcurrido dicho tiempo se interrumpió la reacción con el agregado de 20 ml de acetona. Se centrifugó a 2000 g durante 15 minutos y filtró el sobrenadante con papel de filtro. Se midió con celda de vidrio en espectrofotómetro (Beckman DU 640 UV-Visible) a una absorbancia de 490 nm. A partir de una solución patrón de 5000 mg.kg⁻¹ se realizó una curva de calibración de 6 puntos (5; 2,5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 mg/ml). Los resultados son expresados como DO_{490nm}/g_{seco}.

III.6 Estudios genómicos

III.6.1 Extracción, purificación y cuantificación de ADN fúngico

Para la extracción de ADN de los hongos ligninolíticos se procedió con el Protocolo de extracción de ADN vegetal CTAB de Doyle & Doyle (1990) modificado por Bernet & Branchard (2001). Se tomó el micelio de 7 días de incubación en agar MyA2 cuidadosamente con una espátula, evitando arrastrar agar. Dicho tejido se colocó en mortero donde se congeló con nitrógeno líquido y molió hasta obtener un polvo homogéneo. A este se le adicionaron 800 μ l de buffer CTAB suplementado con 200 μ l de CTAB 10X, 1 μ l de β -mercaptoetanol y 1% PVPP, se homogeneizó la mezcla y se pasó a un tubo Eppendorf© de 2 ml que se incubó a 60 °C durante 30 minutos. Luego, se lavó con un volumen de cloroformo-isoamilalcohol (12:1), se mezcló y se centrifugó 5 min a 10.000 g . El sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf© de 2 ml en donde se procedió a precipitar el ADN. Para esto se agregó un volumen de isopropanol y 10% del volumen de acetato de sodio 3 M. La mezcla se mantuvo a -18 °C durante 1 hora. La suspensión

se centrifugó a 10.000 *g* durante 10 min para generar un pellet de ADN. Para su purificación se lavó el pellet tres veces con 300 μ l etanol 70% durante 5 min de centrifugación a 11.000 *g*, finalmente se secó en estufa de 30 °C. El ADN se resuspendió en 150 μ l de buffer TE y se le agregó 1-2 μ l de ARNasa (10 μ g. μ l⁻¹), luego se incubó a 37 °C por espacio de 1 hora. La solución de ADN final se mantuvo en freezer a -20 °C.

El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific). Se utilizó buffer TE como blanco y se consideró un índice de pureza A260/A280 \sim 1.8 para determinar la calidad del ADN extraído. Los cálculos de la concentración de ADN se basan en una variación de la ecuación de la ley de Beer utilizando la absorbancia de ácidos nucleicos corregido, y se expresaron en ng/ μ l.

III.6.2 Identificación de los hongos alóctonos

Amplificación de la región de Espacios Transcritos Internos del ADN ribosomal (ITS: Internal Transcribed Spacer) mediante técnicas de PCR para posterior secuenciación.

La amplificación de la región ITS se llevó a cabo con los *primers* ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) mediante el servicio de amplificación, purificación y secuenciación de Macrogen, Corea (<https://dna.macrogen.com/eng/>). Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank utilizando el programa BLAST.

III.6.3 Extracción de ADN de las comunidades microbianas presentes en los microcosmos

La extracción de ADN de los microorganismos presentes en los microcosmos contaminados con FP API se realizó con aproximadamente 1 g de muestra siguiendo los pasos descritos en el manual del Kit comercial E.Z.N.A™ Soil DNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA). Los extractos de ADN obtenidos se colocaron en tubos estériles adecuados y se guardaron en el freezer a -20 °C hasta el momento de la amplificación.

III.6.4 Determinación de la estructura microbiana

III.6.4.1 Amplificación de segmentos de rADN bacteriano y fúngico mediante técnicas de PCR

A partir de las muestras de ADN obtenidas de los microcosmos, se realizó la amplificación de los segmentos hipervariables V3-V5 mediante el par de *primers* 341F (5'- CCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') del rDNA 16S (Muyzer *et al.*, 2004) para estudiar la diversidad bacteriana; y del transcripto interno primario (ITS1) mediante el par de *primers* ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (White *et al.*, 1990) para la diversidad fúngica. La reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) contenía 1 - 2 µl de ADN, 0,12 µl de polimerasa GoTaq (5UI/ul), 6 µl de buffer 5X, 2,4 µl de dNTPs 2 mM, 3 µl de cada primer 5 µM, 0,6 µl de seroalbúmina bovina (BSA) 10 mg/ml y agua bidestilada estéril completando un volumen total de 30 µL de mezcla de reacción. Las amplificaciones se realizó en un termociclador *Eppendorf Mastercycler* (Eppendorf©, Hamburg, Germany). Para los segmentos hipervariables V3-V5, el programa consistió en 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 10 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 62 °C y 1 min a 72 °C; 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 57 °C y 1 min a 72 °C; finalmente, una extensión de 10 min a 72 °C. Para la región ITS1 se ejecutó con un inicio en 94 °C durante 5 min seguido de 25 ciclos de 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s (la temperatura de hibridación comenzó a 60 °C y se redujo en 1 °C en cada uno de los primeros 10 ciclos) y 72 °C durante 45 s, con un paso de elongación final de 5 min a 72 °C. Los productos de amplificación se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1,5 % con TAE X1 como buffer de corrida a 90 V y 2 A durante 60 minutos. Posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV (*National Labnet Company*, Modelo TM-26).

III.6.4.2 Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante DGGE

Se prepararon geles de 6% de poliacrilamida con diferentes gradientes desnaturalizante de urea-formamida, 45-75% para bacterias y 50-65% para hongos. La electroforesis se realizó en buffer TAE 1X en un DGGE-2401 apparatus (C.B.S Scientific Co., Del mar, CA, USA) a una temperatura de 60 °C. Se aplicó un voltaje constante de 100 V durante 16 h para la corrida. Luego de la electroforesis, el gel se tiñó durante una hora con SybrGold® (Invitrogen) al cual se fotografió con un sistema de documentación de imágenes (BioRad; Hercules, CA, USA). Una vez obtenido el gel de DGGE con las muestras de cada sistema, el gel se digitalizó en una cámara-CCD y se analizó utilizando el software GelComparII (AppliedMaths, Kortrijk, Belgium). Se determinaron las densidades ópticas de las bandas. Estos perfiles de densidad sirvieron como base para calcular la matriz de similitud usando el coeficiente de Pearson y la posterior construcción del dendrograma (UPGMA) (Sokal & Michener, 1958).

III.6.5 Estudio de la diversidad microbiana

Para el estudio de la diversidad bacteriana y fúngica se utilizó el servicio de secuenciación de nueva generación (NGS) de amplicones 16S rARN y 18S rARN (bTEFAP® Illumina) respectivamente, del laboratorio de investigación molecular “Mr DNA”, E.E.U.U (<http://www.mrdnlab.com/>). En la **Tabla III. 11** se detallan los *primers* utilizados.

Tabla III. 11. Primers utilizados para la secuenciación de amplicones 16S rARN y 18S rARN.

Nombre del primer	Secuencia (5' a 3')	Referencia
515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	(Caporaso <i>et al.</i> , 2011)
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	(Caporaso <i>et al.</i> , 2011)
euk1391F	GTACACACCGCCCGTC	(Amaral-Zettler, <i>et al.</i> , 2009; Stoeck <i>et al.</i> , 2010)
EukB-Rev	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	(Amaral-Zettler <i>et al.</i> , 2009; Stoeck <i>et al.</i> , 2010)

El análisis de secuencias del gen 16S rARN se realizó con el protocolo 16S *Bacteria and Archaea Standard Operating Procedure* (Comeau *et al.*, 2017). Las secuencias de alta calidad se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTU) con el *software* QIIME1 (v1.9.1)(Kuczynski *et al.*, 2012) con un 97% de identidad y se clasificaron taxonómicamente contra la base de datos *GreenGenes* (Mc Donald *et al.*, 2011). A partir del número mínimo de lecturas por muestra (12.725) se normalizó la tabla de OTUs, la cual se utilizó para realizar curvas de rarefacción, calcular la diversidad alfa (índices de Good, Shannon, Chao1 e inversa de Simpson) y la diversidad beta ejecutando análisis de coordenadas principales (PCoA) en distancias UniFrac (Lozupone *et al.*, 2011). Con el fin de evaluar estadísticamente las diferencias entre las distancias ponderadas se utilizó el test de similitud (ANOSIM).

Para las secuencias del gen 18S rARN se utilizó el análisis taxonómico generado por el laboratorio Mr DNA, a través del *software* QIIME1 y la base de datos *GreenGenes*. Sobre la tabla de OTUs normalizada al número mínimo de lecturas por muestra (2089) se realizaron las curvas de rarefacción y el análisis de la diversidad alfa (índices de Good, Shannon, Chao1, inversa Simpson) y diversidad beta (PCoA a partir de método Bray-Curtis, test estadístico PERMANOVAR) a través de la herramienta *MicrobiomeAnalyst* (Dhariwal *et al.*, 2017).

III.6.6 Cuantificación de poblaciones microbianas por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Mediante la técnica de qPCR se cuantificaron de forma absoluta los genes 16S rARN para monitorear la comunidad bacteriana, e ITS *Gram* y *Icc1* para monitorear la permanencia de los hongos alóctonos LPSC 232 y LPSC 436 inoculados en los distintos tratamientos. Los *primers* empleados se detallan en la **Tabla III. 12**. La cuantificación se llevó a cabo en base a curvas de calibración realizadas a partir de diluciones de plásmidos que contenían como inserto el gen *target* y se graficaron los valores de C_t (ciclo umbral, del inglés *cycle threshold*) en función del logaritmo del número de copias por μl . Los productos PCR de los genes ITS *Gram* y 16S rARN a cuantificar se clonaron utilizando el vector pGEM-T Easy vector (3015 pb) y el vector recombinante obtenido se purificó con Qiaprep miniprep kit (Qiagen). Se comprobó la presencia del producto PCR ligado al vector utilizando los mismos *primers* utilizados para generar el producto PCR en el paso inicial. Particularmente la cuantificación del gen *Icc1* se realizó a partir de diluciones del producto de PCR. La especificidad y número de bases del producto PCR se evidenció por secuenciación (Macrogen). El vector recombinante se cuantificó con Nanodrop TM (Thermo Scientific) y el número de copias de cada gen por μl se calculó usando el tamaño del plásmido recombinante y un promedio de masa molecular de 650 Da por par de nucleótidos como se detalla en la ecuación **EC III. 6**.

$$N^{\circ} \text{copias} / \mu\text{l} = \frac{(\text{ng} / \mu\text{l}) * 6,022 \times 10^{23}}{(\text{longitud del inserto en pb} + 3015) * 10^9 * 650} \quad \text{EC III. 6}$$

Los ensayos de *real time* PCR se realizaron en un volumen de reacción de 10 μl conteniendo 1 \times iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.4 μM de cada primer, 0,05 ng de ADN molde o agua milliQ (control negativo). El ciclo de amplificación para el gen 16S rARN inició con una temperatura de 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con un paso de elongación final de 5 min a 72 °C. Para el gen ITS *Gram* temperatura inicial de 94 °C por 5 min, seguido de

30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 62 °C durante 30 s y 72 °C durante 45 s, y elongación final de 5 min a 72 °C. Finalmente para el gen *lcc1* la temperatura inicial fue de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s, 55°C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y temperatura de elongación final de 72 °C por 10 min.

Tabla III. 12. Primers utilizados para la determinación del número de copias de los genes target.

	Secuencia	Referencia
16S rARN	1055F: 5'-ATGGCTGTCGTCAGCT-3'	(Harms <i>et al.</i> , 2003)
	1392R: 5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3'	
ITS Gram	ITSGramF: 5'-GCAAGGAATCGAGCTAATGC-3'	Diseñado con Primer3
	ITSGramR: 5'-GATCTCTGGCTCTCGCATC-3'	https://primer3.org/
<i>lcc1</i>	LCC1-F: 5'-GCACGTTGATGATGAATCC-3'	(Saparrat <i>et al.</i> , 2010)
	LCC1-R: 5'-CGGTAGCGCTTGCCCTTC-3'	

Diseño de primer específico

Con el objetivo de monitorear la permanencia de los hongos inoculados LPSC 232 y LPSC 436 (familia Polyporaceae), se diseñó el *primer* específico ITS *Gram* a partir de la secuencia MW295711 (*GenBank*) de *Grammothele subargentea* LPSC 436 con el *software* Primer3. Dicha secuencia ITS ribosomal fue obtenida por la Dra. Sonia Wirth (Laboratorio de Agrobiotecnología, FCEN-UBA) a partir de *primers* genéricos para Basidiomicetos (ITS1 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; ITS4B 5'-CAGGAGACTTGACACGGTCCAG-3'), seguido de su clonación con vector pGEM-T Easy y secuenciación con oligonucleótidos SP6 y T7.

III.7 Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Para evaluar la fitotoxicidad de los compuestos generados durante los diferentes ensayos de remediación en suelo y del propio residuo FP, se realizó una prueba de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var: mantecosa) (Castillo

Morales, 2004) utilizando los extractos acuosos de los mismos. Se colocó 30 g de muestra con 30 ml de agua destilada en matraz de Erlenmeyer de 250 ml y se agitó a 200 rpm en agitador horizontal durante 10 minutos. Luego se centrifugó a 4000 *g* durante 10-15 minutos en tubo falcon de 50 ml. A partir del sobrenadante (100%) se realizaron diluciones 50%, 25%, 10% y 5%. Se prepararon placas de Petri de 90mm de diámetro con 2 discos de papel de filtro del mismo tamaño, que se saturaron con 5 ml de cada dilución, evitando que se formen burbujas de aire. Finalmente, con ayuda de una pinza metálica, se colocaron 20 semillas distribuidas homogéneamente en cada placa. Se incubaron a 24 °C en oscuridad durante 5 días. Transcurrido dicho tiempo se registró la cantidad de semillas germinadas y observó la presencia de hongos y/o pelos secundarios en la radícula. Posteriormente, se procedió a congelar y descongelar todas las placas de Petri, de esta manera el tejido vegetal se ablanda y facilita la medición de la radícula e hipocótilo. Las diluciones se realizaron por triplicado. Como control negativo se utilizó agua destilada. Como control positivo se utilizó Zn(SO₄). Con los datos obtenidos se calculó el índice de germinación (IG%) y el índice de inhibición de elongación radicular e hipocótilo (IE%) (Visioli *et al.*, 2014), como puntos finales de la prueba.

$$IG\% = 100 - \left(\frac{G_m * 100}{G_c} \right)$$

EC III. 7. Índice de germinación porcentual. *G_c* número de semillas germinadas en el control negativo con agua destilada. *G_m* número de semillas germinadas del extracto de la muestra.

$$EI\% = \left(\frac{LG_c - LG_m}{LG_c} \right) * 100$$

EC III. 8. Índice de inhibición en la elongación radicular o hipocótilo. *LG_c* longitud de radículas/hipocótilo desarrolladas en el control negativo con agua destilada. *LG_m* longitud de radículas/hipocótilo desarrolladas en el extracto de la muestra.

III.8 Análisis estadísticos

El análisis de los resultados experimentales se llevó a cabo mediante los siguientes métodos estadísticos: correlación lineal de Pearson entre variables, comparación entre medias (Prueba “*t Student*” bilateral), análisis de la varianza (ANOVA una y dos vías) y análisis Post Hoc de ANOVA Test de Tukey (HSD) utilizando el *software* estadístico *InfoStat versión 2008* (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Capítulo IV

Tratamiento oxidativo del barro petroquímico FP



Como se mencionó en el **Capítulo I**, los barros oleosos generados por la actividad petrolera son considerados residuos peligrosos según la normativa vigente (ver **Sección I.2**). La correcta caracterización fisicoquímica y biológica es fundamental para evaluar su potencial riesgo hacia el ambiente; así como también para la selección de tecnologías de tratamiento previo a su disposición final. Existen diferentes estrategias para el tratamiento de barros oleosos, con sus ventajas y limitaciones (Hu *et al.*, 2013). Entre estas se encuentra la oxidación química, capaz de oxidar los compuestos orgánicos presentes en los barros, a especies químicas menos tóxicas, hasta incluso su mineralización. Una ventaja es que los oxidantes, como por ejemplo el anión persulfato, pueden reaccionar sobre compuestos aromáticos de alto peso molecular, descomponiéndolos en hidrocarburos simples que tienen mayor solubilidad y biodisponibilidad. Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto en las fracciones más complejas como son resinas y asfaltenos. Conocer el efecto del tratamiento oxidativo sobre las fracciones de hidrocarburos del barro y la microbiota resiliente al mismo, serán clave para continuar con la estrategia de micorremediación propuesta en la presente tesis.

A continuación se desarrollan los siguientes objetivos específicos:

- *Caracterizar al barro FP en función de sus propiedades físicas, químicas, microbiológicas y toxicológicas.*
- *Evaluar el efecto del tratamiento oxidativo con persulfato de amonio sobre la concentración de hidrocarburos presentes en el barro FP.*
- *Identificar el efecto del oxidante sobre las comunidades bacterianas y fúngicas nativas del barro FP.*

IV Tratamiento oxidativo del barro petroquímico FP

IV.1 Caracterización fisicoquímica del barro de fondo de pileta API (FP) antes y después de la aplicación de PSA

En la **Figura IV 1** se puede apreciar el aspecto macroscópico del residuo de color marrón oscuro a negro, de consistencia viscosa y oleosa, y baja solubilidad en agua. Al mezclarlo con agua (10%) se identifican 3 fases: una fase superior oleosa, una fase acuosa intermedia turbia y una fase sedimento inferior.

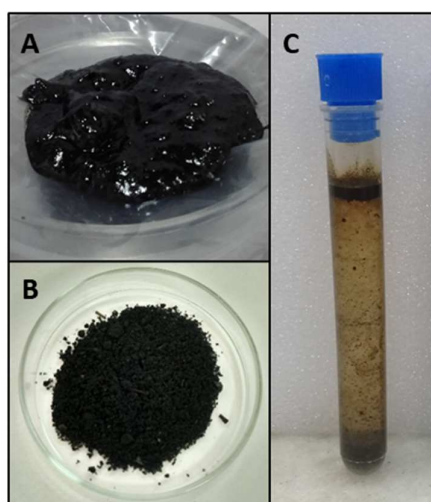


Figura IV 1. Barro de fondo de pileta API. Fondo de pileta API fresco (A) y liofilizado (B). Solubilidad en agua destilada (C): Fondo de pileta API más agua destilada para discriminar la fase oleosa superior, fase acuosa intermedia y fase sedimento inferior.

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del FP API se detallan a continuación en la **Tabla IV 1**.

Tabla IV 1. Propiedades fisicoquímicas del barro FP API.

Propiedades		
Características organolépticas	Color	Marrón oscuro-negro
	Olor	Sulfuros-hidrocarburos
	Aspecto	Viscoso-Oleoso
Solubilidad en agua		Fase oleosa superior (HC)
		Fase acuosa intermedia
		Fase sedimento inferior
Humedad^a		16 ±3
Ph		5,6 ± 0,1
Conductividad eléctrica (dS/m)^b		1,1 ± 0,1
Potencial Redox (mV)		173 ± 17
Metales pesados (mg/kg)^c		
Niquel (Ni)		101
Vanadio (V)		45
Hierro (Fe)		21599

a. Determinada por destilación azeotrópica.

b. Determinado por método EPA-9050D.

c. Determinación por digestión con ácido nítrico ICP-OES.

IV.1.1 Determinación de Hidrocarburos Totales (HT) por FT-IR

A partir de 1 g de FP liofilizado se evaluó la eficiencia de extracción de la digestión por microondas con percloroetileno a través de 5 extracciones sucesivas.

Cabe aclarar que, todas las determinaciones de hidrocarburos se realizaron a partir del residuo liofilizado para eliminar el contenido de humedad, ya que para la extracción por microondas las muestras deben estar libres de agua. Para más detalles del procedimiento ver **Sección III.3.2** Materiales y Métodos.

En la **Figura IV 2** se observa que en la primera extracción se obtienen 190.953 ± 14.844 mg.kg⁻¹, correspondiente al 91% de HT respecto del total de hidrocarburos determinado, 209.529 ± 6246 mg kg⁻¹. Dado que en la primera extracción

se obtuvo la mayor eficiencia de extracción, se decidió realizar una única extracción de hidrocarburos con la técnica propuesta.

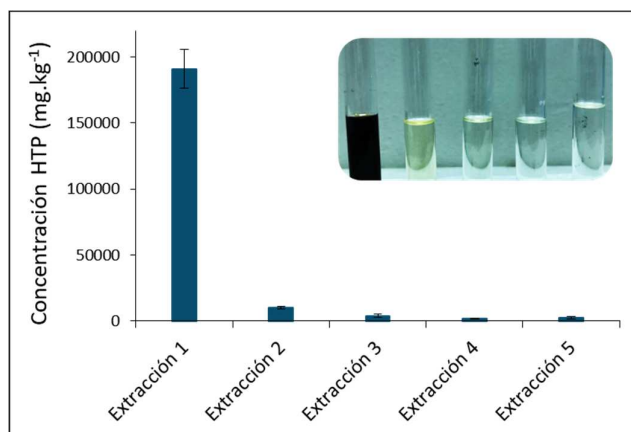


Figura IV 2. Concentración de HT del FP. Extracciones exhaustivas en percloroetileno a través de digestión por microondas. Promedio y desviaciones estándares a partir de triplicados. En el extremo superior derecho se muestra una fotografía de las 5 extracciones sucesivas de marrón oscuro a incoloro.

Paralelamente, se realizó la extracción con percloroetileno del FP autoclavado (121 °C, 30 minutos) para evaluar la pérdida abiótica durante el proceso de esterilización, resultando una concentración de 207.397 ± 12.398 mg.kg⁻¹.

La comparación entre medias (Prueba “t”) de las dos muestras: FP y FP estéril, mostró que no hay diferencias significativas entre ellas ($p= 0,853$), indicando que el proceso de esterilización no afectaría significativamente la concentración final de HT. Así mismo, la similitud en los valores de concentración del barro antes y después del proceso de autoclavado sugiere que el FP tendría un contenido muy bajo de compuestos volátiles a 120 °C.

Posteriormente se evaluó el efecto del tratamiento oxidativo con persulfato de amonio sobre los hidrocarburos totales de petróleo del barro FP, resultando en una eliminación del $31 \pm 5\%$ (132.872 ± 9.765 mg.kg⁻¹) respecto de su control sin oxidar (193.054 ± 16.082 mg.kg⁻¹) como se observa en la **Figura IV 3**. El análisis de comparación

de medias (Prueba “*t Student*” bilateral) resultó significativo ($t=5,54$; $p=0,0052$) entre tratamientos.

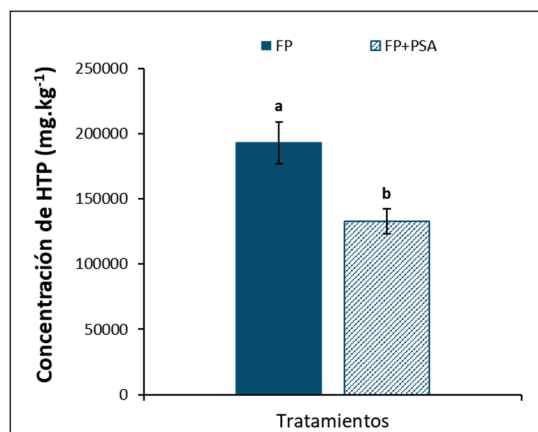


Figura IV 3. Concentración de HT del fondo de pileta API oxidado (FP+PSA) y sin oxidar (FP). Las barras representan las desviaciones estándares.

IV.1.2 Determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por GC-FID

El análisis de hidrocarburos cromatografiables (GC-FID) a partir de extractos orgánicos de acetona:hexano dio un valor de 4.714 ± 250 mg. kg⁻¹ para hidrocarburos alifáticos (HA) y fue no detectable para los hidrocarburo policíclicos aromáticos (PAH). En la **Figura IV 4** se puede observar el perfil cromatográfico del barro FP, con los picos de HA y la elevación de la línea de base, característica de crudos de petróleo.

La comparación de los valores de hidrocarburos cromatografiables con los HT obtenidos por FT-IR (193.054 ± 16.082 mg.kg⁻¹) evidencian la presencia en el barro de fracciones más complejas y pesadas no detectables por cromatografía gaseosa. Este resultado motivó la aplicación del fraccionamiento de los hidrocarburos de petróleo.

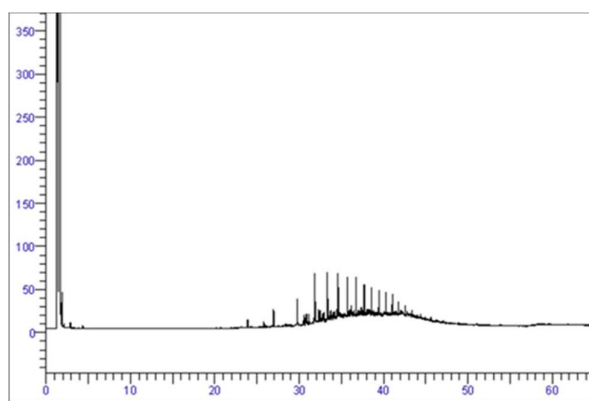


Figura IV 4. Perfil cromatográfico (GC-FID) obtenido a partir del extracto acetona:hexano del barro FP.

API.

IV.1.3 Determinación de las fracciones de hidrocarburos saturados y aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) del barro FP y FP PSA

El estudio de la composición del barro FP se llevó a cabo por fraccionamiento bajo la norma 143 modificada a partir de solventes orgánicos (**ver Sección III.3.8** Materiales y Métodos), utilizada para la caracterización de crudos de petróleo.

En la **Figura IV 5** se observan las fracciones de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) con las coloraciones esperadas de acuerdo con lo observado en los fraccionamientos de los crudos de petróleo. Una diferencia notable es la presencia de tierra como producto final del proceso de separación.

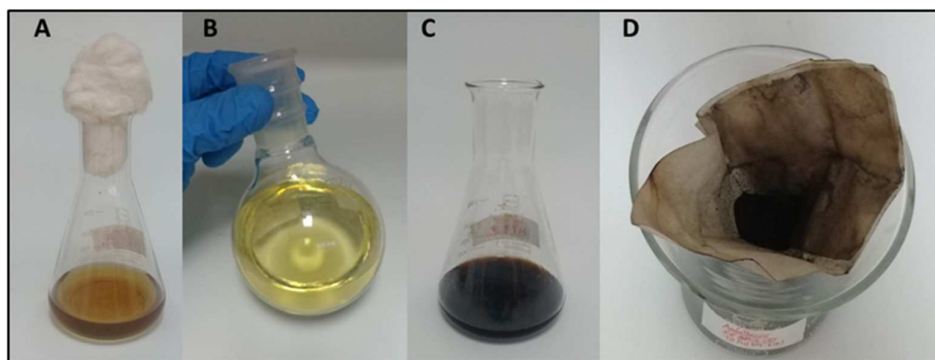


Figura IV 5. Fracciones SARA del FP. Filtrado de fracción maltenos (hidrocarburos saturados y aromáticos y resinas II) en *n*-pentano (A). Extracto de fracción de resinas I luego de extracción por Soxhlet con *n*-pentano (B). Fracción de asfaltenos en tolueno (C). Tierra retenida por filtración al final del proceso de extracción con tolueno (D).

Se aplicó el mismo procedimiento para determinar las fracciones luego de la oxidación del barro FP con persulfato de amonio (FP+PSA). Los resultados de la concentración de HT (FT-IR) para cada fracción se muestran en la **Tabla IV 2**.

Tabla IV 2. Concentración de HT en cada fracción del FP antes y después del tratamiento oxidativo con PSA.

Tratamiento	Maltenos	Resinas I	Asfaltenos	Total (mg. kg ⁻¹)
FP	10.704±2.588,3	5.752±1.618	297±43	16.753±4.162,4
FP+PSA	13.045±508	1.495±600	205±34	14.745±58

Promedios ± desviaciones estándares (n=3)

Del análisis de los resultados de la **Tabla IV 2** se observa que el tratamiento oxidativo no produjo un descenso significativo en la concentración total de HT (expresado como la suma de las fracciones) (t=0,68: p=0,62). Este resultado sería contrario al obtenido a partir de los extractos con percloroetileno (**Figura IV 2**). Esta diferencia es atribuible a los procedimientos de extracción aplicados en cada método.

La determinación de los HT por extracción exhaustiva con percloroetileno nos permite evaluar el efecto del PSA sobre el total del barro FP.

En cambio, el fraccionamiento SARA nos permite evaluar el efecto oxidativo en cada fracción determinada.

Comparando las medias entre los tratamientos (Prueba “*t Student*” bilateral), el tratamiento oxidativo únicamente produjo un cambio significativo en la fracción de Resinas I ($t=8,26$; $p=0,014$), reduciendo su concentración de 34,2% a 10,1% (**Figura IV.6**). El aumento de la fracción Maltenos de un 63,9% a 88,5%, resultó no significativo ($t=-1,26$; $p=0,33$), al igual que el descenso de la fracción Asfaltenos ($t=2,36$; $p=0,14$), indicando que el tratamiento con PSA no produjo cambios sobre estas fracciones.

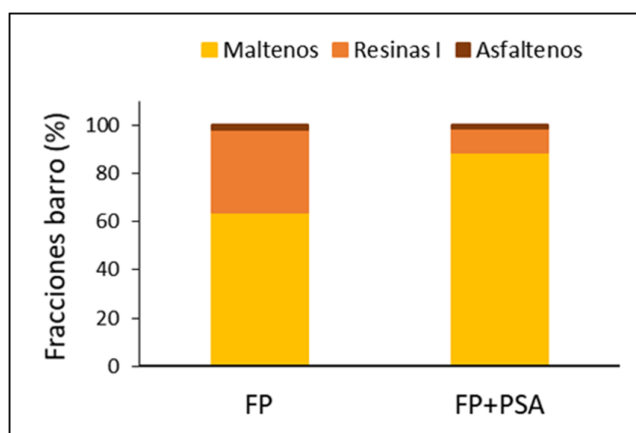


Figura IV 6. Porcentaje de HT de las fracciones maltenos, resinas I y asfaltenos del fondo de pileta sin oxidar (FP) y oxidado con persulfato de amonio (FP+PSA).

Cabe la aclaración que las metodologías y sus objetivos son diferentes, por lo que el fraccionamiento con distintos solventes orgánicos nos permitirá evaluar el efecto del oxidante sobre las fracciones más polares y recalcitrantes y la extracción con percloroetileno nos permitirá ver el efecto global sobre la concentración final.

IV.3 Caracterización microbiológica del FP

Aplicando métodos de cultivo fue determinada la concentración de poblaciones bacterianas heterótrofas, degradadoras de hidrocarburos (HA y PAH), de bacterias reductoras de sulfato y de hongos presentes en el barro FP.

Como se puede observar en la

Tabla IV 3, el barro FP posee una comparativamente alta concentración de bacterias heterótrofas, presentando también un potencial de bacterias degradadoras de PAH y en menor medida degradadoras de HA. La presencia de bacterias reductoras de sulfato (anaerobias estrictas) se correlaciona con la presencia de compuestos sulfurados fácilmente reconocibles por el olor del residuo.

Tabla IV 3. Caracterización microbiológica del barro FP.

	Log UFC.g ⁻¹ ss /Log NMP g ⁻¹ bs
<i>Bacterias heterótrofas</i>	7,9 ± 0,1
<i>Bacterias degradadoras de PAH</i>	5,85 ± 0,06
<i>Bacterias degradadoras de HA</i>	3,6 ± 0,3
<i>Bacterias sulfato reductoras</i>	5,5 ± 0,2
<i>Hongos</i>	5±5

En la **Figura IV 7** se observa la diversidad de morfotipos de colonias bacterianas (A) determinada en los recuentos sobre R2 agar. También se apreció diversidad de morfotipos fúngicos sobre Rosa Bengala-agar (B).

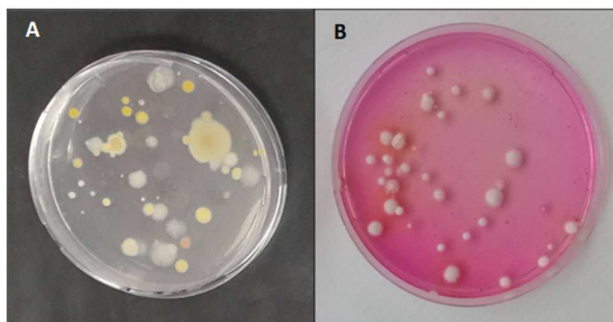


Figura IV 7. Recuento de bacterias heterótrofas en medio R2A (dilución -6) (A). Se observan diferentes morfotipos. Recuento de hongos en medio Rosa de Bengala) (B).

IV.4 Análisis taxonómico de las comunidades bacterianas y fúngicas nativas del barro FP y FP+PSA

Los resultados de la secuenciación masiva fueron analizados con el software bioinformático QIIME1 (v1.9.1). La cobertura del proceso de secuenciación se evaluó a través de las curvas de rarefacción (ver **Anexo Figura A.1**), representación gráfica del número de OTUs observadas en función del número de secuencias, y del índice de Good (índice de cobertura). El análisis de alfa diversidad se determinó mediante los estimadores de riqueza de especies (Chao 1), diversidad de Shannon e Inversa de Simpson, como indicador de uniformidad de especies.

La **Tabla IV 4** muestra los estimadores de alfa diversidad determinados a partir del barro FP antes y luego del tratamiento oxidativo con PSA. En ella se aprecia que, tanto para las bacterias como para los hongos, la cobertura de la secuenciación fue de 96-98%.

La aplicación del PSA produjo una leve disminución de la riqueza de especies bacterianas, indicado por el descenso en el número de OTUs observadas y en el índice de Chao 1. La marcada reducción del índice de Shannon evidenció la reducción de la diversidad de especies comunes, manteniéndose la uniformidad del arreglo bacteriano.

Tabla IV 4. Parámetros de diversidad bacteria y fúngica del barro FP obtenidos a partir de la secuenciación por Illumina de los genes 16S rARN y 18SrARN respectivamente, antes y después del tratamiento oxidativo con PSA.

Tratamientos	OTUs observadas	Índice de Chao 1	Índice de Shannon	Inversa de Simpson	Índice de Good (%)
Bacterias					
FP	356	448	6,08	1,04	96
FP+PSA	280	393	3,35	1,47	98
Hongos					
FP	134	157	3,30	1,10	98
FP+PSA	88	182	1,02	3,28	98

La **Figura IV 8** muestra los órdenes predominantes en el barro FP, previos al tratamiento oxidativo. Estos pertenecieron a la clase Betaproteobacteria, con una abundancia del 25% del orden Burkholderiales representado por miembros del género *Polaromonas*, y a la clase Gammaproteobacteria con una abundancia del 10,7% del orden Pseudomonadales. Pocas secuencias pudieron ser asignadas, destacándose un bajo porcentaje pertenecientes al género *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae) y *Acinetobacter* (Moraxellaceae).

El orden Anaerolineales (17,7%) estuvo representados por miembros del género T78 (Familia Anaerolinaceae). Finalmente, un 12,6% correspondió a miembros del orden Lactobacillales.

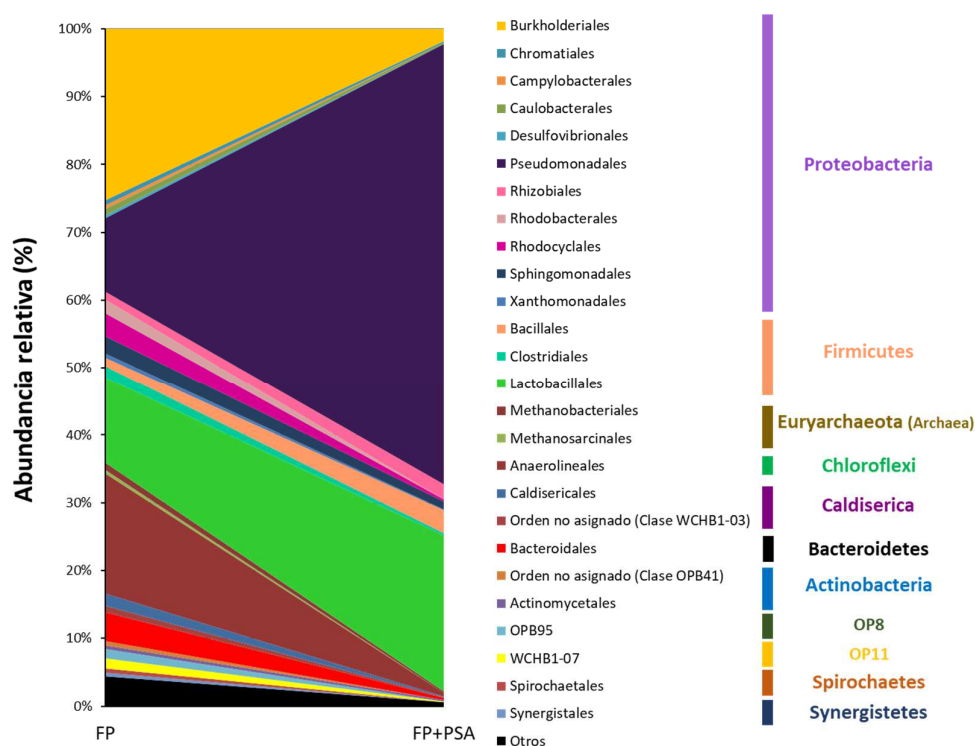


Figura IV 8.Perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas a nivel de Orden, en el barro petroquímico FP antes y después de la oxidación. Se consideró las abundancias de órdenes menores a 0,5% como "Otros". Las barras en la leyenda indican el Phylum al cual pertenecen los órdenes.

Luego del tratamiento oxidativo, miembros de los órdenes Pseudomonadales y Lactobacillales aumentaron su proporción al 64,9% y 23%, respectivamente resultando los predominantes. Un bajo porcentaje de secuencias pudieron ser asignadas, detectándose un 3,9% pertenecientes al género *Pseudomonas*. No obstante, este porcentaje duplicó el valor detectado en el barro antes del tratamiento oxidativo. Miembros del género *Lactococcus* fueron identificados como representativos del orden Lactobacillales. Los órdenes Burkholderiales y Anaerolineales disminuyeron agudamente su abundancia relativa al 1,8% y 0,6%, respectivamente, sugiriendo una marcada sensibilidad al estrés oxidativo. Mientras que el orden Bacillales reveló un aumento (3,4%), representado por el género *Bacillus*.

La comunidad fúngica reveló una marcada reducción en el índice de Shannon sugiriendo un mayor impacto del tratamiento sobre las poblaciones comunes y un arreglo más equitativo.

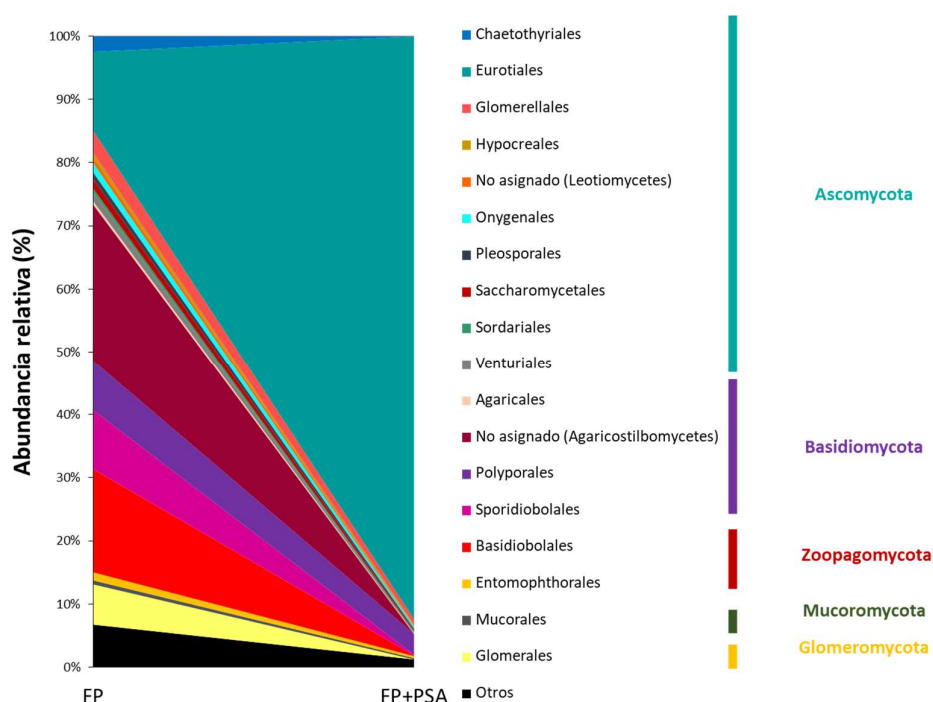


Figura IV. 9. Perfiles taxonómicos de las comunidades fúngicas a nivel de Orden, en el barro petroquímico FP antes y después de la oxidación. Se consideró las abundancias relativas mayores al 1%. Las barras en la leyenda indican el Phylum al cual pertenecen las órdenes.

El análisis taxonómico del barro FP reveló una dominancia de miembros del phylum Basidiomycota (47%), Ascomycota (28%) y Zoopagomycota (18%). En el phylum Basidiomycota estuvo representado principalmente por dos clases, Agaricostilbomycetes (25%, orden no asignado) y Microbotryomycetes (19%). Esta última clase se correspondió con los géneros *Sporobolomyces* (19,0%) y *Rhodotorula* (10,6%), pertenecientes al orden Sporoboliales. Con respecto a los otros fila, miembros del orden Eurotiales/*Aspergillus* (8,26%) caracterizaron al phylum Ascomycota, mientras que el orden Basidiobolales/*Basidiobolus* (18,4%) representó al phylum Zoopagomycota.

Luego del tratamiento oxidativo, resultó evidente la dominancia de miembros del orden Eurotiales (93,6%) representado en su totalidad por el género *Penicillium*. (Figura IV. 9).

IV.5 Evaluación de la toxicidad del FP: Test de fitotoxicidad sobre semillas de lechuga

Los resultados del ensayo de toxicidad se presentan en la **Tabla IV.5**. En ella se observa que el índice de germinación disminuye a medida que aumenta la concentración del extracto acuoso del residuo, apreciándose el máximo porcentaje de inhibición a partir de la dilución 25%.

Tabla IV 5. Fitotoxicidad en extractos acuosos del barro FP. Índice de germinación porcentual (IG%), e Índices porcentuales de Inhibición en la elongación radicular (IEr %) y del hipocótilo (IEh%).

Concentración del extracto acuoso del FP	IG%	IEr%	IEh%
5	49,31	22,06	24,03
10	11,42	65,03	62,51
25	0,01	98,91	98,76
50	0,02	98,83	98,47
100	0,01	99,07	98,91

En cuanto al índice porcentual de inhibición de la elongación de la radícula (IE_r %) y del hipocótilo (IE_h %) se registra un comportamiento similar a la germinación, donde a partir de la dilución 25% ambos índices alcanzan los máximos valores del porcentaje de inhibición. En la **Figura IV. 10** se presentan las fotografías de las plántulas desarrolladas con los extractos acuosos menos concentrados, registrándose la presencia de pelos radiculares como en el control.

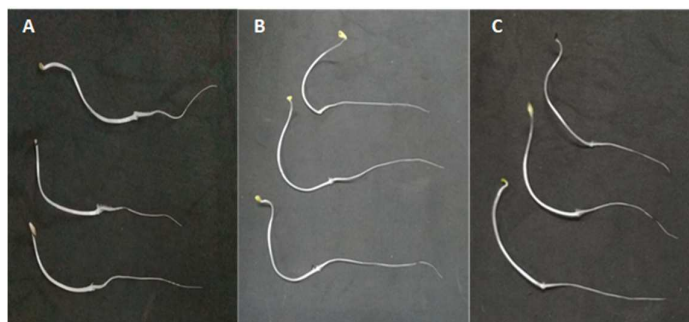


Figura IV. 10. Fitotoxicidad del FP. Control con agua destilada (A), extractos acuosos dilución 5% (B) y 10% (C). Obsérvese la presencia de pelos radiculares tanto en el control como en presencia del FP.

Con la finalidad de determinar si existe alguna relación de la respuesta de la longitud de la radícula y la longitud del hipocótilo frente a las diluciones del extracto, se realizó el análisis de correlación de Pearson, resultando una correlación positiva ($R^2=0,972$) entre las dos variables.

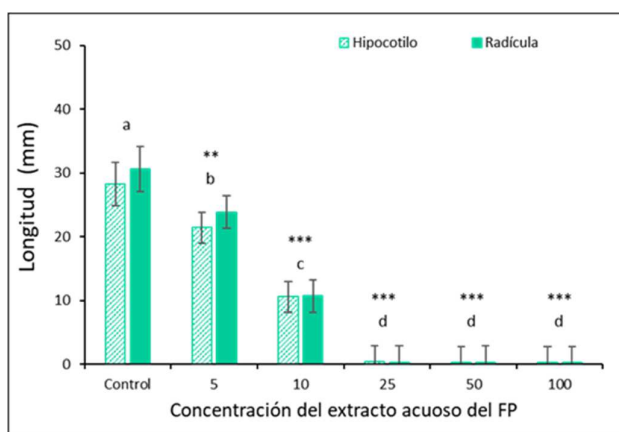


Figura IV 11. Longitudes promedio de las radículas e hipocótilos de *L. sativa* a diferentes concentraciones del extracto acuoso del residuo FP. Las barras indican los desvíos estándares ($n=120$). Las letras minúsculas indican las diferencias entre las concentraciones y el control con agua destilada (ANOVA de una vía, Test deTukey, *** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$).

La **Figura IV. 11** muestra la variación promedio de la longitud de la radícula y del hipocótilo (mm) en función de las diluciones del extracto. A partir del análisis de varianza

(ANOVA de una vía) entre el factor dilución del extracto acuoso y la longitud de radícula e hipocotilo independientemente, resultaron diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) a partir de la concentración 10%.

Los resultados evidenciaron un efecto tóxico máximo a partir del 25% de concentración del extracto acuoso del barro FP, para los tres parámetros analizados: germinación, elongación de radícula y de hipocótilo.

IV.6 Discusión

Grandes cantidades de barros oleosos son generados anualmente en refinerías de petróleo a nivel mundial a expensas de altos costos económicos y ambientales (Hui *et al.*, 2020). La búsqueda de técnicas alternativas para la recuperación y disposición final de estos residuos es actualmente un desafío a fin de minimizar sus efectos (Johnson & Affam, 2019).

Por tratarse de un residuo peligroso, la legislación nacional exige (Ley N° 24.051, Art.15, Morelli *et al.*, 2001) una caracterización fisicoquímica y biológica de los barros derivados del petróleo dado que los resultados proveen las bases para la evaluación del riesgo potencial hacia el ambiente.

Los barros están compuestos principalmente entre un 20-30 % de crudo de petróleo, 30-40 % de agua y 40-50 % de suelo, además de traza de metales pesados (Hu *et al.*, 2017). Sin embargo, su composición es dependiente de la química del crudo de partida y su procedencia, así como también del procesamiento de refinado, como por ejemplo un barro proveniente de un fondo de tanque de almacenamiento es diferente de uno existente en una pileta de separación API o generados a consecuencia de la etapa de lavado del equipamiento (Da Silva *et al.*, 2012).

El Naggar y colaboradores (2010) observaron que la recuperación y cuantificación de los componentes de los barros oleosos son también dependientes de la selección de los solventes de extracción, la relación barro/solvente, la temperatura y el tiempo del proceso de extracción. Es conocido que una adecuada selección del

solvente facilitará la caracterización del residuo, disminuyendo costos y tiempo de recuperación e incrementando la extractabilidad de hidrocarburos. Los autores comprobaron que la presencia de compuestos sólidos en el barro condiciona la eficiencia de extracción, principalmente por procesos de desorción asociados a la estructura de los poros en la matriz y su interacción a través de puentes de hidrógeno, siendo la fracción resinas un factor condicionante del tiempo de extracción, mientras que la fracción de asfaltenos es la más difícil de recuperar debido a su fuerte polaridad.

En la presente tesis, el barro FP fue caracterizado determinando su concentración de hidrocarburos totales y las concentraciones de las fracciones alifáticas, aromáticas, resinas y asfaltenos (SARA); así como también fue evaluada su susceptibilidad a la acción oxidante del persulfato de amonio.

La alta concentración de HT determinada (209.529 mg/kg) fue comparable a los datos reportados en la bibliografía (Marín *et al.*, 2006; Roldán-Carrillo *et al.*, 2012). La evaluación de la pérdida abiótica luego de la esterilización del barro sugirió una baja a escasa concentración de compuestos volátiles en el barro.

El fraccionamiento del barro en 64% de maltenos (HA, PAH y resinas II), 34% de resinas I y 2% de asfaltenos, evidenció su alto contenido en resinas, comparado con datos reportados por Hu y colaboradores (2013), quienes registraron un rango del 7–22,4% de esta fracción en muestras de barros analizadas. Así mismo se destacó la ausencia de hidrocarburos aromáticos cromatografiables.

La caracterización biológica del barro FP se realizó a través del estudio de su microbiota nativa. El análisis de la comunidad bacteriana reveló la dominancia de bacterias pertenecientes al *phylum* Proteobacteria (50%), principalmente a las clases β (29%) y γ (12%). Esta dominancia también fue reportada por otros autores a partir de barros oleosos de refinería (Milton *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2016). La presencia de miembros de los géneros *Polaromonas* (Betaproteobacteria/Burkholderiales) y *Pseudomonas* sp (Gammaproteobacteria/Pseudomonadales) detectados en el barro se correspondió con hallazgos de estos géneros en suelos (Lladó *et al.*, 2015; Sutton *et al.*, 2014) y sedimentos (Jeon *et al.*, 2003; Dias, 2011) contaminados con hidrocarburos.

También fueron registrados en efluentes y barros oleosos (Di Martino *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013; Goveas *et al.*, 2020).

La presencia de miembros del orden Anaerolineales (17,7%) se asocia con la condición anóxica propia de la generación de estos barros. La presencia de miembros del género T78 puede ser explicada a través de la reconocida participación de estas células en pasos de fermentación e hidrólisis en procesos de digestión anaeróbica (Yuan *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2019). Ha sido sugerido que la morfología filamentosa de estos microorganismos y su posición particular dentro de los flóculos o gránulos cumple una función clave en el mantenimiento de la estructura de los flóculos (Petriglieri *et al.*, 2018) y los gránulos (Zhu *et al.*, 2017). Células de T78 también podrían metabolizar alcoholes y carbohidratos a través de interacciones sintróficas (Praveckova *et al.*, 2016).

La abundancia de miembros del orden Lactobacillales (12,6%) no pudo ser asignada a géneros descritos (<0,5%). Las características generales del orden corresponden a bacilos Gram-positivos, no esporulados con metabolismo mayoritariamente fermentativo, pudiendo asimilar hidratos de carbono, glicerol y ácidos orgánicos. A diferencia de muchos anaerobios, en su mayoría no son sensibles al oxígeno, pudiendo desarrollarse en su presencia, por lo que son clasificados como anaerobios aerotolerantes (Bender *et al.*, 2019).

Debido a los procesos de separación y recolección, los barros petroquímicos suelen estar expuestos a la atmósfera pudiéndose alterar la composición de la comunidad microbiana autóctona. Adicionalmente, la preparación de los microcosmos en el laboratorio también incide en su microbiota, inhibiendo a las poblaciones sensibles al oxígeno. En estas condiciones, la acotada representación de las bacterias metanogénicas correspondientes al *phylum* Euryarchaeota puede ser atribuida a la mayor sensibilidad de estos microorganismos a la exposición al aire durante los ensayos de laboratorio.

La dominancia de levaduras basidiomicetáceas pertenecientes al orden Sporidiobolales caracterizó la comunidad fúngica del barro FP. Miembros de los géneros *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Orden Sporidiobolales), taxa característicos de muestras ambientales, fueron identificados en el barro. Varias publicaciones describen

aislamientos de estos géneros a partir de suelos contaminados evidenciando su capacidad de metabolizar PAH y tolerancia a metales pesados como el mercurio (Romero *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2017; Sanjeeb & Nilanjana, 2017; Varjani, 2017; Ezekoye *et al.*, 2018; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2019).

Si bien la presencia de determinados taxa puede relacionarse con su capacidad de tolerar y/o metabolizar compuestos de la matriz contaminada, algunos pueden estar en estado activo o bien en forma de propágulo. Esto último puede explicar la detección del género *Ganoderma* (Orden Polyporales) en esta matriz, que no es el hábitat natural donde crece este hongo, sino que sus basidioesporas presentes en alta concentración en bioaerosoles, pudo haber sido la causa de su detección en el barro (Chen *et al.*, 2018; Redondo *et al.*, 2020).

Entre los Ascomycotas, el orden Eurotiales fue dominante con el género *Aspergillus*, y en menor frecuencia el orden Glomerellales con género *Colletotrichum*. Miembros del género *Aspergillus* se han aislado de sitios contaminados y estudiado por su capacidad de metabolizar hidrocarburos de petróleo como única fuente de energía (Cerniglia & Sutherland, 2010; Al-Dhabaan, 2021).

Entre los hongos zygomycetáceos, el orden Basidiobolales (Zoopagomycota) representado por el género *Basidiobolus* fue mayoritario (18%), del cual hasta la fecha no se ha registrado reportes en sitios contaminados. Sin embargo, otros hongos zygomycetáceos, como *Mucor racemosus*, *Rhizomucor variabilis*, *Umbelopsis* sp han sido aislados con frecuencia en suelos contaminados con hidrocarburos (Kim *et al.*, 2010).

La caracterización toxicológica del barro FP, evaluada mediante utilizando semillas de *L. sativa*, demostró un alto porcentaje de inhibición de la germinación (IG%) correspondiente al 67.35% en la concentración del 10% del extracto acuoso. Resultados similares fueron reportados por Morelli y colaboradores (1999) en la caracterización toxicológica de dos barros API con alto porcentaje de hidrocarburos aromáticos y menor concentración de resinas y asfaltenos, respecto del barro FP. Los autores estimaron un porcentaje de IG mayor al 65% para una concentración del 10% del extracto acuoso del barro API. Una diferencia en la toxicidad de los barros API y el barro FP fue evidenciada a la concentración del 5%, donde los barros API rindieron muy bajo efecto tóxico (<4%),

mientras que el barro FP conservó una toxicidad del 37%. Este resultado sugiere que, aun siendo una fracción marcadamente hidrofóbica, el mayor contenido de la fracción resinas del barro FP contribuye al efecto fitotóxico.

La aplicación secuencial de PSA en tres dosis sobre el barro FP redujo la concentración de hidrocarburos totales en un 32% aproximadamente, luego de 20 días. Resultados similares fueron descritos por Medina y colaboradores (2018) donde la aplicación de persulfato de amonio sobre un suelo crónicamente contaminado con hidrocarburos aromáticos eliminó el 29% de los PAH presentes, principalmente los de bajo peso molecular, sin cambios en el contenido de hidrocarburos alifáticos. De modo análogo, Peluffo y colaboradores (2018) demostraron una eficiencia de remoción de fenantreno (36%) en un suelo contaminado artificialmente a los 7 días de incubación tras la aplicación de persulfato de sodio.

El tratamiento oxidativo con PSA generó modificaciones en la fracción de maltenos y resinas, sin cambios significativos en la fracción de los asfaltenos. El contenido de resinas se redujo significativamente en un 24%, mientras que los maltenos se incrementaron casi en un 25%. Aun no siendo significativo el incremento de la fracción maltenos, es posible inferir que el PSA oxidó la fracción resinas I, provocando su disminución, y que los productos de oxidación fueron extraídos en la fracción más liviana correspondiente a los maltenos.

Gamarra & Ossa (2016) estudiaron el envejecimiento termo-oxidativo natural de los asfaltos e interpretaron que los cambios en las fracciones SARA tras la oxidación se deben al movimiento de componentes desde las fracciones no-polares hasta las más polares generando nuevas estructuras en la fracción asfalteno con grupos funcionales enriquecidos en oxígeno. Estos cambios porcentuales relativos a la oxidación en las fracciones SARA son de conocimiento limitado, siendo los cambios químicos difíciles de interpretar (Petersen, 2009). Por lo tanto, es aún necesario indagar utilizando otras técnicas, como FT-IR, a fin de proporcionar información química adicional sobre la distribución de las cadenas alifáticas, aromatización, grupos sustituyentes aromáticos y otros grupos funcionales con el fin de dilucidar el alcance del tratamiento oxidativo sobre la matriz de hidrocarburos del barro.

El radical sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) generado por el tratamiento con PS produce peroxidación lipídica, oxidación de proteínas, daños en el ADN y otros efectos tóxicos (Cabiscol *et al.*, 2000) sobre células susceptibles, causando muerte celular. Sin embargo, dependiendo de su estructura y también de su disposición en la matriz heterogénea del barro, otros microorganismos pueden ser afectados en menor grado, o incluso resistir el efecto oxidativo. En este sentido el espesor de las esporas bacterianas y muchas de origen fúngico como las melanizadas pueden minimizar la acción biocida del radical sulfato y explicar la persistencia de ciertos grupos microbianos después de su exposición al tratamiento oxidativo (Nosanchuk & Casadevall, 2006; L. Lin & Xu, 2020). También, dependiendo del alcance del tratamiento es posible inducir la esporulación de algunos microorganismos al generarse compuestos de menor peso molecular que actúan como activadores, con el consecuentemente incremento celular comparado con el barro de partida (Alonso-Monge *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2018).

En concordancia con Gou y colaboradores (2020), la biomasa correspondiente al ADN extraído del barro FP se redujo después de la oxidación con persulfato de amonio.

Al evaluar el efecto del PSA sobre la microbiota nativa del barro FP, se observó una reducción de aproximadamente un 50% en la concentración de bacterias heterótrofas cultivables (comunicación personal Dra. Peluffo).

El análisis de la diversidad bacteriana reveló un marcado impacto sobre la diversidad de especies, resultando dominantes miembros de los órdenes Pseudomonadales, con un significativo incremento de la abundancia del género *Pseudomonas*. Miller y colaboradores (1996) describieron una disminución de bacterias heterótrofas cultivables en lixiviados de suelo contaminados con el herbicida de naturaleza aromática (pendimetalina) luego de ser tratados con el reactivo de Fenton, junto con el incremento en la concentración de especies de *Pseudomonas*. Este resultado fue asociado a los cambios generados en la matriz del barro por el tratamiento oxidativo, favoreciendo el desarrollo de aquellas poblaciones tolerantes/resistentes al estrés y de rápida capacidad de crecimiento a expensas de los productos de la oxidación parcial de la materia orgánica. Dicho comportamiento es compatible con el esquema de estrategias *r*, siendo los miembros del género *Pseudomonas* un ejemplo de poblaciones frecuentemente descripto (Kakosová *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 2018; Gou *et al.*, 2020).

El incremento de la abundancia a casi el doble del orden Lactobacillales evidenciarían la tolerancia al estrés oxidativo generado tras la aplicación del PSA, tal como reportan otros autores frente al mismo oxidante (Song *et al.*, 2019).

El tratamiento oxidativo reveló una marcada reducción de la diversidad fúngica, disminuyendo la abundancia de especies dominantes para rendir un arreglo más uniforme.

A diferencia de las bacterias, los hongos pueden colonizar nuevos sustratos a través de la diferenciación de micelio. El éxito en la colonización dependerá de las estrategias de vida de cada especie. Según Boddy y Hiscox (2017) los hongos presentan 3 estrategias de vida según el agente impulsor: el estrés (estrategas S), la perturbación (estrategas R) y la incidencia de competidores (estrategas C), a menudo presentan una combinación de las tres. La llegada y el establecimiento exitoso a un nuevo recurso (recurso primario) dependerá de las capacidades enzimáticas del hongo, así como también de las condiciones ambientales, principalmente el estrés abiótico. Dentro de la competencia fúngica por los recursos orgánicos se reconocen: (i) la captura de recursos primarios, cuando un hongo coloniza y gana influencia sobre un territorio/recurso previamente desocupado, y (ii) la captura de recursos secundarios, cuando un hongo captura territorio de hongos que ya han colonizado un recurso (Boddy, 2000).

El gran incremento del *phylum* Ascomycota, representando casi en su totalidad por el género *Penicillium* (orden Eurotiales) (91%) revelaría la rápida respuesta ante el estrés oxidativo de ciertos hongos. Schmidt-Heydt y colaboradores (2015) reportaron la capacidad de *Penicillium verrucosum* para producir micotoxinas frente al estrés oxidativo ocasionado por altos niveles de NaCl, Cu⁺² o exposición a la luz, lo que permite a la especie adaptarse a una amplia variedad de ambientes. Adicionalmente, la activación de la esporulación como respuesta al estrés ocasionado durante tratamientos de pasteurización fue descrita en 4 especies de hongos pertenecientes al orden Eurotiales (Dijksterhuis *et al.*, 2018). Algo similar habría ocurrido tras la oxidación del barro, donde los estrategas R representantes de Eurotiales, esporularon rápidamente garantizando su detección y/o su supervivencia a expensas de compuestos hidrosolubles fácilmente asimilables.

En este escenario, la presencia de productos derivados del tratamiento con PSA pudo desencadenar mecanismos de competencia como la producción de compuestos orgánicos disueltos o volátiles; permitiendo la transición de una estrategia R a una estrategia combativa (estrategia C) generando intermediarios para tolerar el estrés oxidativo remanente.

IV.7 Conclusiones

✓ El barro FP API tiene una alta concentración de hidrocarburos totales, representada principalmente por las fracciones resinas I y II.

✓ La abundancia relativa de representantes del phylum Proteobacteria, con miembros reconocidos degradadores de hidrocarburos, detectados en la biota del barro FP, sugiere un potencial metabólico activamente degradativo, compatible con las características de estrategias r. Del mismo modo, la abundancia de miembros del phylum Basidiomycota, Ascomycota y Zoopagomycota, contribuiría a una biota potencialmente degradadora, aun considerando que algunos de sus miembros podrían estar presentes como propágulos.

✓ El relativamente alto efecto fitotóxico observado es un rasgo para considerar en los tratamientos de biorremediación a aplicar.

✓ El tratamiento oxidativo aplicado fue efectivo, reduciendo un $31\pm 5\%$ el contenido de HT, siendo evidente el alcance sobre la fracción de Resinas I. Estos cambios fueron acompañados con la reducción de la carga bacteriana cultivable, disminuyendo las posibilidades de competencia con el inoculante fúngico. No obstante, la biota bacteriana mantuvo su riqueza y diversidad de especies. El efecto oxidativo promovió tanto el aumento de poblaciones degradadoras de hidrocarburos (Pseudomonadales), como de generalistas (Lactobacillales).

✓ La comunidad fúngica reveló un descenso en su diversidad de especies postratamiento oxidativo, siendo dominante el género *Penicillium*, un estrategia R con

rápida respuesta al estrés oxidativo a través de la activación de su esporulación y síntesis de metabolitos secundarios.

✓ El uso de PSA sobre una matriz compleja como es el barro FP generó nuevos interrogantes en el tratamiento oxidativo respecto de la disponibilidad de los contaminantes más complejos.

Capítulo V

Estudio del potencial de hongos saprótrofos para su aplicación en estrategias de remediación de hidrocarburos



V Estudio del potencial de hongos saprótrofos para su aplicación en estrategias de remediación de hidrocarburos

Ha sido ampliamente documentada la capacidad de los hongos degradadores de la madera, específicamente los HPB, para degradar PAH de alto y bajo peso molecular a través de complejos sistemas oxidativos que incluyen a enzimas extracelulares. La expresión de estas enzimas, lacasas o peroxidasas, está bajo la regulación de diferentes factores fisiológicos que modulan los mecanismos de respuesta frente a xenobióticos y antioxidantes (Janusz *et al.*, 2013).

El metabolismo fúngico de los PAH se puede monitorear a través de diferentes estrategias de estudio, analizando por ejemplo el perfil de distintos marcadores químicos. Los ácidos grasos, ya sean saturados o insaturados, son esenciales para la estructura celular y actividad fúngica, formando parte principalmente de los fosfolípidos de membrana y los triglicéridos. Aunque la acumulación de estos últimos se produce en un compartimento intracelular denominado cuerpo lipídico, consistente de un núcleo formado por los triglicéridos rodeado por una monocapa de fosfolípidos, ha sido demostrado también que este sitio es el destino de otros compuestos orgánicos como PAH (Verdin *et al.*, 2005; Beopoulos *et al.*, 2011).

La síntesis de lípidos ocurre por dos vías metabólicas principales: una denominada *de novo* y otra *ex novo*. La primera utiliza al acetil-CoA generado en la mitocondria como precursor metabólico, mientras que en la vía *ex novo* los ácidos grasos incorporados con la nutrición son los precursores.

Durante la vía *de novo*, el ácido palmítico mayoritariamente es el precursor de la síntesis de los otros ácidos grasos a través de la sucesiva elongación y desaturación de su estructura carbonada, gracias a la acción de varias enzimas localizadas en el retículo endoplasmático, específicamente las elongasas y desaturasas respectivamente.

Los ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1 Δ^9) y linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) son dominantes en las membranas de los hongos (Ruess *et al.*, 2005; Stahl & Klug, 1996), siendo considerado el ácido linoleico un marcador fidedigno de la biomasa fúngica (Boschker & Middelburg, 2002). Aunque bajo condiciones de limitación de nutrientes los

heterótrofos sintetizan lípidos *de novo* (Gaye-Siessegger *et al.*, 2003), el perfil de ácidos grasos que ellos sintetizan, al igual que la distribución isotópica del carbono componente de estos compuestos, son rasgos variables dependientes de la especie, de la estructura diferenciada en un momento determinado de su ciclo de vida, de su fisiología y metabolismo lipídico, así como también son influenciados por diferentes factores ambientales, incluyendo la presencia de xenobióticos (Ruess *et al.*, 2005).

El ergosterol ha sido ampliamente utilizado para estimar la biomasa fúngica en hongos saprótrofos (Matcham *et al.*, 1985; Nielsen & Madsen, 2000; Niemenmaa & Hatakka, 2008; Niemenmaa *et al.*, 2008). Sin embargo, aún existen controversias en su utilización como biomarcador fúngico, dado que depende de las especies, el estatus nutricional, el estado de crecimiento y el efecto de los contaminantes sobre el metabolismo (Srinivasan & Glaser, 1999; Barajas-Aceves, 2000; Hart & Brookes, 1996).

Con el fin de evaluar la habilidad de ciertos hongos saprótrofos para degradar y detoxificar hidrocarburos del petróleo, en el presente capítulo se desarrollan los siguientes objetivos específicos:

- *Evaluar el potencial degradador de PAH por diferentes hongos con el fin de utilizarlo en estrategias de bioaumento fúngico.*
- *Estimar la capacidad de tolerancia de los hongos seleccionados frente a PAH en distintos medios de cultivo.*
- *Analizar las capacidades de hongos seleccionados para metabolizar diferentes PAH mediante el fraccionamiento isotópico del C y la síntesis de ácidos grasos.*
- *Evaluar la tolerancia de los hongos seleccionados frente al barro FP API antes y después de su oxidación con PSA.*
- *Identificar el efecto del pireno y barro FP sobre la biomasa fúngica en cultivos líquidos.*
- *Evaluar la capacidad de mineralización de los hongos LPSC 232 y LPSC 436 en presencia del barro FP y su microbiota nativa.*

V.1 Cultivo fúngico sobre medio agarizado

V.1.1 Tolerancia y potencial degradador de PAH de hongos seleccionados

V.1.1.1 Mezcla de PAH en presencia de carboximetilcelulosa (CMC)

El efecto de una mezcla de PAH sobre el crecimiento micelial fue diferente entre los hongos ensayados, tanto en presencia como en ausencia de CMC. Como se muestra en la **Tabla V. 1**, *G. subvermispora* FBCC 313 resultó ser intolerante a los PAH, ya que no pudo desarrollar micelio en presencia la mezcla de PAH, aun cuando se suplementa con carboximetilcelulosa como fuente de carbono adicional. Por otro lado, *P. albobadia* LPSC 285 presentó la mayor tasa de tolerancia, con colonias más densas que su control, aunque no se observó halo de solubilización de PAH. *G. subargentea* LPSC 436 y *G. sepiarium* LPSC 735 tuvieron una tasa de tolerancia de 69 y 50 respectivamente, con colonias mucho más densas y altas que sus controles sin hidrocarburos. Registrándose halo de solubilización en las placas con PAH como única fuente de carbono, mucho más notorio en *G. sepiarium* (**Figura V. 1**). En *C. rigida* LPSC 232 se observó un halo y tolerancia menor, con respecto al resto de los hongos. Sin embargo, en el cálculo de tolerancia sólo se tiene en cuenta el diámetro de las colonias y no el aspecto del micelio. En relación con lo mencionado, la respuesta de *C. rigida* LPSC 232a los PAH es diferente, en comparación con LPSC 436 y LPSC 735 donde el aspecto del micelio es mucho más denso y alto.

Tabla V. 1. Potencial degradador de los hongos sobre una mezcla de PAH en presencia y ausencia de CMC.

	<i>Coriolopsis rigida</i> LPSC 232		<i>Peniophora albobadia</i> LPSC 285		<i>Gelatoporia subvermispora</i> FBCC 313		<i>Grammothele subargentea</i> LPSC 436		<i>Gloeophyllum m sepiarium</i> LPSC 735	
	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅
CMC	53 ^a	1	37 ^a	1	18	2,05	43 ^a	1	34 ^a	1,29
CMC+ PAH	20 ^b	1,50	30 ^b	1,03	ND	NC	27 ^c	1,07	11 ^c	3,18
PAH	20 ^b	1,05	30 ^b	0	ND	NC	30 ^b	1,07	17 ^b	1,12
Tolerancia a PAH (%)*	37		81		0		69		50	
Actividad oxidativa	+		+		+		+		-	

∅= Diámetro de la colonia (mm), h/∅= relación entre diámetro del halo celulolítico (en CMC y CMC+PAH) o halo solubilizador de hidrocarburos (en PAH) (mm) y diámetro de la colonia (mm). * Tolerancia a mezcla PAH= (Diámetro colonia en PAH/ Diámetro colonia en celulosa) x100. (+) Oxidación de guayacol; (-) negativo. † No hubo crecimiento. N=3. Desviaciones estándares menores al 5%. Para cada hongo letras diferentes denotan diferencias significativas ($p<0.05$, Tukey). ND= no desarrollado. NC= no corresponde.

Sobre las placas del ensayo anterior, se midió la capacidad celulolítica de cada hongo en presencia o ausencia de la mezcla de PAH. Dicho ensayo tiene como objetivo corroborar el co-metabolismo de los hongos, por lo que se utilizó CMC como fuente adicional de carbono. Aunque todos los hongos presentaron actividad celulolítica, sólo los aislamientos *G. subvermispora* FBCC 313 y *G. sepiarium* LPSC 735 revelaron halo de celulólisis, cuyos diámetros fueron superiores a los frentes de crecimiento. Este comportamiento puede ser atribuido a la difusión de sus enzimas extracelulares al medio. Por el contrario, en el resto de los hongos, no se observó halo alrededor de la colonia, sino que la actividad celulolítica se evidenció al desprender el micelio desarrollado del agar.

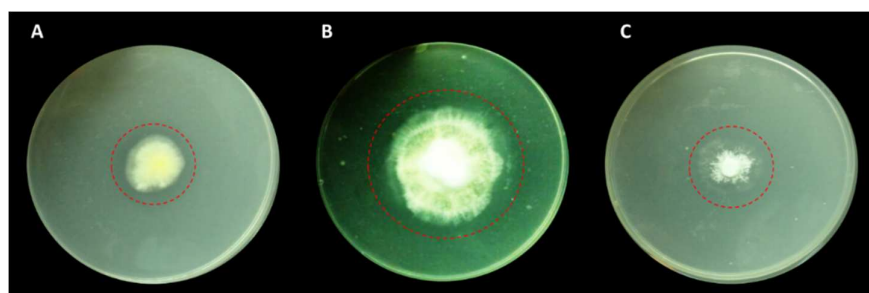


Figura V. 1. Cultivo de *Gloeophyllum sepiarium* (A), *Grammothele subargentea* LPSC 436 (B) y *Corioloropsis rigida* LPSC 232 (C) sobre un medio mínimo agarizado suplementado con CMC al 0,8% y una mezcla de PAH y su halo de solubilización (círculo rojo punteado).

En el tratamiento CMC+PAH, los diámetros de las colonias fueron menores al control con CMC, evidenciando un efecto tóxico de los hidrocarburos. Sin embargo, el cultivo de *C. rigida* LPSC 232 mostró un leve halo celulolítico alrededor de su micelio en CMC+PAH. Este comportamiento sugeriría que la presencia de PAH indujo la liberación de enzimas extracelulares, favoreciendo la solubilización de PAH.

Finalmente, fue observado que la relación halo/diámetro colonia en presencia de PAH es mayor en *G. sepiarium* LPSC 735, indicando que su actividad celulolítica no se modifica en presencia de PAH (**Figura V. 2**).

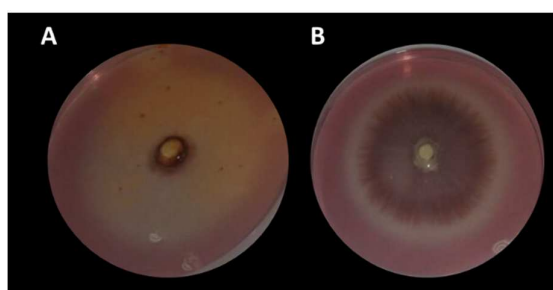


Figura V. 2. Actividad celulolítica de LPSC 735. En presencia de una mezcla de PAH suplementado con CMC (A), control positivo con CMC (B). Halo de degradación de la CMC revelado con rojo Congo.

V.1.1.2 *Actividad enzimática celulolítica y oxidativa de los hongos seleccionados*

Al evaluar la actividad enzimática oxidativa entre los distintos hongos (Cultivo en presencia de guayacol), se corroboró que los hongos de podredumbre blanca presentan actividad fenol oxidasas, mientras que *G. sepiarium* LPSC 735, hongo de podredumbre parda, no expresa dicha actividad (**Tabla V. 1**).

V.1.1.3 *Crecimiento y potencial degradador de hongos saprótrofos en cultivos duales sobre una mezcla de PAH*

Se evaluó la co-inoculación de *G. sepiarium* LPSC 735 (HPP) con hongos causantes de la pudrición blanca de la madera (HPB) y su efecto en la solubilización de la mezcla de PAH, a excepción de *G. subvermispora* FBCC 313 quien resultó ser intolerante a los hidrocarburos.

A los 7 días de incubación, se midieron los diámetros de las colonias (sin contacto), y registró que todos los hongos, en presencia de PAH, con y sin CMC, redujeron sus diámetros en comparación con su control (CMC), como se evidenció en los cultivos individuales. Como se observa en la **Tabla V. 2**, no se registró inhibición de la actividad oxidativa en ninguno de los co-cultivos de HPB en presencia de *G. sepiarium* LPSC 735. La tolerancia de LPSC 735 frente a la mezcla de PAH en los cultivos duales no varió significativamente respecto de su comportamiento individual. La presencia de PAH no modificó su capacidad solubilizadora de CMC en ninguno de los cultivos duales, a pesar de reducirse considerablemente el diámetro de la colonia, respecto de su control.

Tabla V. 2. Potencial degradador de cultivos duales entre *G. sepiarium* LPSC 735 y hongos causantes de la pudrición blanca de la madera sobre una mezcla de PAH en presencia y ausencia de CMC.

	<i>G. sepiarium</i> LPSC 735		<i>C. rigida</i> LPSC 232		<i>G. sepiarium</i> LPSC 735		<i>P. albobadia</i> LPSC 285		<i>G. sepiarium</i> LPSC 735		<i>G. subargentea</i> LPSC 436	
	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅	∅	h/∅
CMC	33 ^B	1,27	37 ^A	1	34 ^B	1,18	40 ^A	1,13	35 ^B	1,23	47 ^A	1
CMC+PAH	13 ^C	3,08	10 ^D	1,5	12 ^D	3,33	30 ^C	1,1	14 ^D	3,21	28 ^C	1
PAH	15 ^C	1,3	10 ^D	1	14 ^D	1,43	33 ^B	1	12 ^D	1,58	29 ^C	1,1
Tolerancia a PAH (%) *	45		27		41		83		34		62	
Actividad oxidativa	-		+		-		+		-		+	

∅= Diámetro de la colonia (mm), h/∅= relación entre diámetro del halo celulolítico (CMC y CMC+PAH) o halo solubilizador de PAH (mm) y diámetro de la colonia (mm). * Tolerancia a mezcla de PAH= (Diámetro colonia en PAH/ Diámetro colonia en celulosa) x100. (+) Oxidación de guayacol; (-) negativo. N=3. Desviaciones estándares menores al 5%. Las letras en mayúsculas indican las diferencias significativas entre los diámetros de la colonia entre los tratamientos y los hongos en cada dupla (ANOVA de dos vías. Prueba de Tukey, nivel de confianza del 95%).

El par LPSC735-LPSC 285 mostró inhibición al contacto, mientras que los pares LPSC 735-LPSC 232 y LPSC 735-LPSC 436 registraron una parcial interacción entre los micelios (Molla *et al.*, 2001). Sólo en el par LPSC 735-LPSC 436 se observó un halo de solubilización de PAH mayor que el observado en el resto de los pares (**Figura V. 3A**) y la presencia de exudados en la zona de contacto.

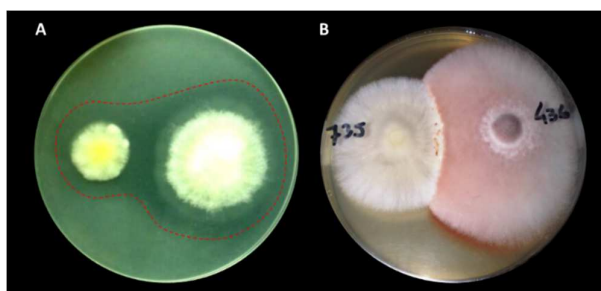


Figura V. 3. Ensayo de co-inoculación. LPSC 735- LPSC 436. En MMS+PAH (A) y MyA2 suplementado con guayacol (B), a los 7 días de incubación. Obsérvese los exudados color ámbar en la zona de contacto entre los hongos.

V.1.1.4 Tolerancia de *Coriolopsis rigida* LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436 frente a cristales de PAH

La tolerancia a cristales de PAH fue ensayada disponiendo los cristales en la superficie de medios agarizados describiendo un anillo a 2 cm del punto de siembra (ver **Sección III.2.3.2**). De este modo se evaluó la tolerancia de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en MMS suplementado con glucosa y MMS suplementado con extracto de malta (EM).

Los resultados mostraron que, en ambos hongos, el diámetro de la colonia fue significativamente mayor en el medio con EM. Las colonias en el medio MMS suplementado con glucosa fueron menores y menos densas, independientemente de la presencia de PAH (**Figura V. 4**).

Independientemente de la composición del medio basal, (MMS+G o MMS+EM), no fue observado desarrollo fúngico en presencia de cristales de naftaleno, indicando un 100% de inhibición atribuible a la toxicidad del PAH en fase vapor.

Con respecto al resto de los PAH testeados, ambos hongos respondieron similarmente, registrándose los mayores diámetros de las colonias en pireno (PIR), antraceno (ANT) y fluoreno (FLU).

Como se puede ver en la **Figura V. 4**, el crecimiento radial de ambos hongos no se vio impedido por los cristales de PAH (a excepción del naftaleno), incluso en presencia de ANT, PIR y FLU el desarrollo se extendió sobre los mismos hacia los bordes de la placa. En *C. rigida* LPSC 232 la presencia de ANT generó un efecto estimulador significativo en el diámetro de la colonia respecto al control en MMS+EM de un 20%, no así en el MMS+G donde el crecimiento fue similar a su control.

Mientras que el PIR no produjo cambios significativos en el medio suplementado con EM, sí disminuyó el crecimiento fúngico significativamente en MMS+G en un 19% al igual que el FLU, en un 23%.

Tanto FLU como FEN en MMS+EM generaron una disminución significativa y similar (~13%), siendo mayor el efecto inhibitorio del FEN en MMS+G (57%). En

presencia de DBT la tolerancia fue menor, reflejado en sus tasas de inhibición de 65 y 70% en medio con EM y G, respectivamente.

Para *G. subargentea* LPSC 436 la presencia de ANT evidenció un crecimiento significativamente mayor que su control en ambos medios de cultivo (8% EM y 13% G). Este efecto estimulador se observó también en presencia FLU sólo en EM (7%), registrándose además la presencia de pigmentación marrón en el micelio, mientras que en medio suplementado con G tuvo un efector inhibidor del 10%. El PIR produjo un efecto inhibitorio del crecimiento del *G. subargentea* LPSC 436 de 9% y 16% en extracto de malta y glucosa respectivamente. En presencia de FEN el crecimiento radial se detuvo a unos mm de los cristales, registrándose una inhibición del 36% y 32% creciendo en malta y glucosa respectivamente (**Figura V. 5**). En DBT la tasa de inhibición fue de 38-44% en MM con EM y G, respectivamente, menores que en LPSC 232.

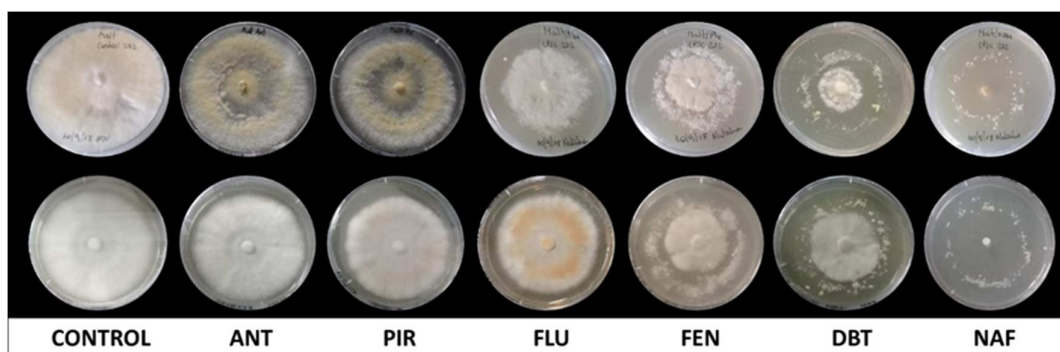


Figura V. 4. Cultivos de *Coriolopsis rigida* LPSC 232 (arriba) y *Grammothele subargentea* LPSC 436 (abajo) sobre medio mínimo agarizado con extracto de malta al 2% y con cristales de diferentes PAH.

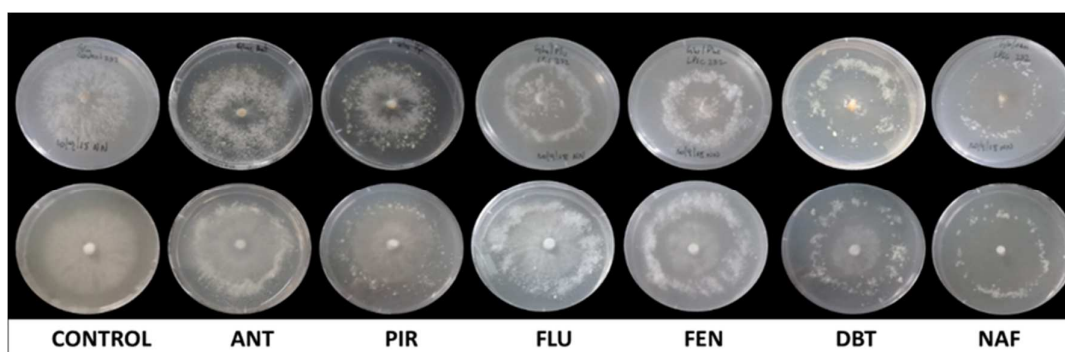


Figura V. 5. Cultivos de *Coriolopsis rigida* LPSC 232 (arriba) y *Grammothele subargentea* LPSC 436 (abajo) sobre medio mínimo agarizado con glucosa al 1% y cristales de diferentes PAH.

La **Figura V. 6** presenta de manera comparativa los diámetros de colonia de los hongos frente a los cristales de PAH en ambos medios de cultivo ensayados. En ella se señala el efecto de la interacción entre el tipo de fuente de carbono y el PAH suplementado, sobre el crecimiento miceliar de los hongos. Sin embargo, para el caso de *C. rigida* LPSC 232, el PIR en presencia de EM no mostró diferencias significativas con respecto al control, así como tampoco el ANT en presencia de glucosa.

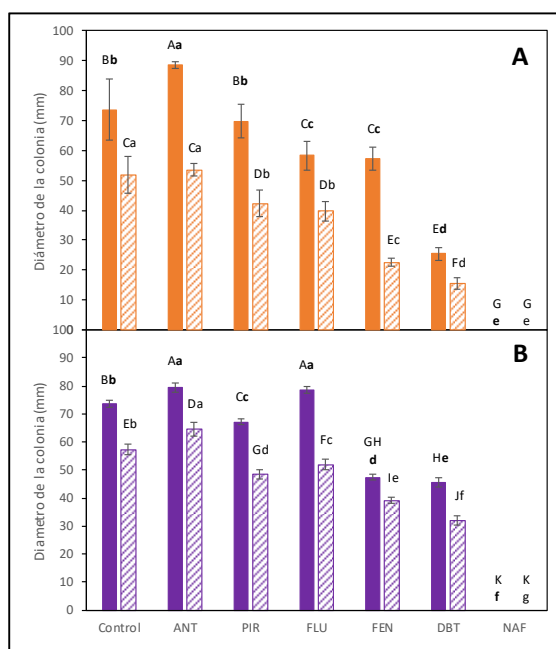


Figura V. 6. Diámetro de colonia (mm) de *C. rigida* LPSC 232 (A) y *G. subargentea* LPSC 436 (B) en presencia de cristales de diferentes PAH a los 7 días de incubación. Promedios \pm desviaciones estándar por triplicado. El análisis estadístico entre comparaciones múltiples de pares (ANOVA de dos vías) se realizó por la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Las letras en mayúsculas indican las diferencias significativas entre las variables medio de cultivo y PAH (variables independientes) sobre el diámetro de la colonia. Las letras minúsculas en negrita representan el nivel de significancia entre los PAH en presencia de extracto de malta al 2% y las minúsculas normal en presencia de glucosa al 1%.

V.1.1.5 Cultivo de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en medio agarizado con PAH como única fuente de carbono

Se evaluó el potencial degradador de PAH individualmente, sin fuente de carbono adicional, para *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436, según protocolo modificado (Bogardt y Hemmingsen, 1992) (ver **Sección III.2.2.4**).

Los resultados de la **Tabla V. 3** muestran nuevamente que la presencia de PIR no afectó a *C. rigida* LPSC 232. Mientras que FEN y DBT ejercieron un marcado efecto inhibitorio (30% y 59%, respectivamente).

En estas nuevas condiciones *G. subargentea* LPSC 436 no resultó inhibido por el PIR y formó un halo de solubilización ($42\pm 3,5$ mm) a los 8 días. La inhibición registrada en FEN fue también acompañada por la formación de un halo de inhibición ($43\pm 3,5$ mm) a los 10 días. Las colonias de este hongo fueron más densas y elevadas comparando con las desarrolladas por *C. rigida* LPSC 232, comportamiento similar al registrado en los ensayos anteriores.

Tabla V. 3. Crecimiento de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 sobre medio agarizado con diferentes PAH a los 8 días de incubación.

Hongo	MMS	MMS+PIR	MMS+FEN	MMS+DBT
LPSC 232	38 ± 3^a	$34,7\pm 0,6^a$	26 ± 1^b	15 ± 2^c
LPSC 436	44 ± 4^a	39 ± 3^{ab}	$*32\pm 3^b$	$*33\pm 3^b$

Diámetro (mm) de la colonia promedio y desvíos estándar. Las letras indican las diferencias significativas entre los datos de cada hongo con un nivel de confianza del 95%. (*) Formación de halo de solubilización a los 10 días.

Las tasas de inhibición para el DBT fueron de 59% y 25% para LPSC 232 y LPSC 436 respectivamente.

V.1.1.6 Efecto de PAH seleccionados sobre el perfil de FAME en cultivos de LPSC 232 y LPSC 436 y la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de ácidos grasos específicos utilizando glucosa ^{13}C

Se evaluó el perfil de los ácidos grasos a partir de la biomasa de los hongos cuando fueron cultivados en MMS con 0,1 % de glucosa, ya sea ^{12}C o marcada con ^{13}C en sus 6 átomos de C (20 %), en presencia de PIR, DBT y PIR+DBT.

Se determinó la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (‰) de los ácidos palmítico (16:0) y linoleico (18:2 (cis, cis $\Delta^{9,12}$)) por ser éstos los detectados en mayor porcentaje relativo, y el ácido linoleico ampliamente utilizado como un estimador de la biomasa fúngica.

Dicha relación fue estimada en los cultivos con glucosa marcada y sin marcar, tanto en presencia como en ausencia de PAH.

De la observación macroscópica de los cultivos se apreció que la presencia de glucosa marcada modifica el crecimiento de *C. rigida* LPSC 232 (**Figura V. 7**).

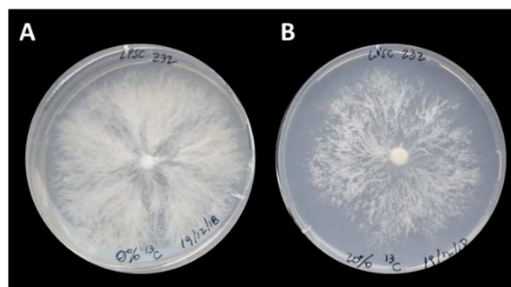


Figura V. 7. Cultivo de *Coriopsis rigida* LPSC 232 en MMS suplementado con glucosa natural (1g/l) (A) y glucosa ^{13}C al 20% (B) sin PAH a los 14 días de incubación a 28 °C en oscuridad.

Las diferencias observadas en el perfil de FAME de *C. rigida* LPSC 232 entre los medios de cultivo en presencia de los distintos hidrocarburos, en glucosa ^{12}C y en glucosa marcada ^{13}C al 20% se muestran en la **Figura V. 8**, donde los ésteres metílicos de los ácidos grasos palmítico (16:0), petroselínico (18:1 Δ^6) y linoleico (18:2 $\Delta^{9,12}$) fueron los mayoritarios. Analizando los cultivos control en glucosa ^{12}C y glucosa ^{13}C , se aprecia que la presencia del isotopo ^{13}C modifica las proporciones de los AG detectados.

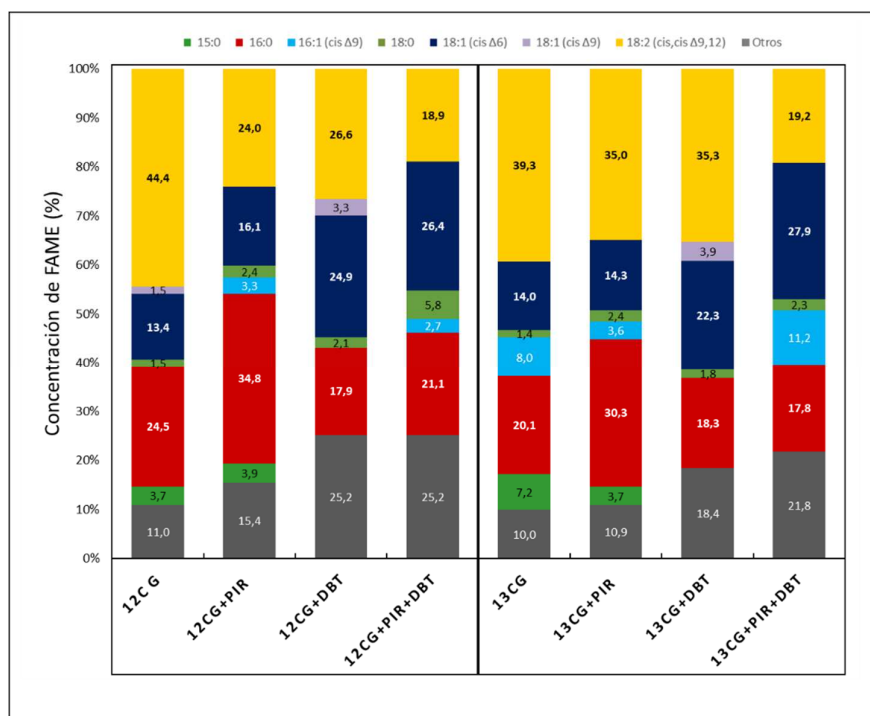


Figura V. 8. Perfil relativo porcentual de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, GC-MS) de *C. rigida* LPSC 232 en medio agarizado con glucosa ¹²C y glucosa ¹³C al 20% y distintos PAH. En el eje horizontal se identifican los controles sin PAH (¹²CG y ¹³CG), y suplementados con pireno (PIR), dibenzotiofeno (DBT) y su combinación (PIR+DBT). En la leyenda, Otros corresponde a FAME no identificables.

En la **Tabla V. 4** se muestran las proporciones de los FAME respecto del total, expresados por el hongo en todas las condiciones de cultivo. Cabe destacar que de aquí en adelante se nombrará ácidos grasos (AG) a los ésteres metílicos de ácidos grasos. En la tabla se aprecia que la proporción 18:0/FAME_{total} fue la más baja entre los ácidos grasos.

Los datos muestran que las proporciones del ácido palmítico y linoleico en cultivo con glucosa ¹³C descendieron en un 18 y 12% respectivamente, manteniéndose constante la relación entre ellos. Además, disminuyó la relación entre ácidos saturados (palmítico y esteárico) y monoinsaturados (petroselínico y palmitoleico) en un 44%, asociado a la aparición del ácido palmitoleico (16:1 Δ⁹=0,03%) y a la desaparición del ácido oleico.

Al comparar los cultivos suplementados con PAH en glucosa ^{12}C y glucosa ^{13}C se observó que las proporciones de los ácidos grasos analizados variaron dependiendo de la presencia del ^{13}C . Por ejemplo, en ciertos casos donde la presencia de PAH incrementó o disminuyó la concentración del ácido graso, en glucosa ^{13}C el efecto fue menor.

Tabla V. 4. Proporciones relativas de los AG comunes a todas las condiciones de cultivo de *C. rigida* LPSC 232 respecto de los FAME totales, en glucosa marcada al 20% ($G^{13}\text{C}$) y sin marcar ($G^{12}\text{C}$).

	$G^{12}\text{C}$				$G^{13}\text{C}$			
	Control	PIR	DBT	PIR+DBT	Cont	PIR	DBT	PIR+DBT
15:0/FAME_{total}	0,04	0,04	nd	nd	0,07	0,04	nd	Nd
16:0/FAME_{total}	0,25	0,35	0,18	0,21	0,20	0,30	0,18	0,18
18:0/FAME_{total}	0,01	0,02	0,02	0,06	0,01	0,02	0,02	0,02
16:1 (Δ^9)/FAME_{total}	nd	0,03	nd	0,03	0,08	0,04	Nd	0,11
18:1 (Δ^6)/FAME_{total}	0,13	0,16	0,25	0,26	0,14	0,14	0,22	0,28
18:2	0,44	0,24	0,27	0,19	0,39	0,35	0,35	0,19
Sat/Monoinsat	1,74	1,92	0,71	0,92	0,98	1,83	0,77	0,51
Sat/18:2 ($\Delta^{9,12}$)	0,59	1,55	0,75	1,42	0,55	0,93	0,57	1,05

Sat= ácidos grasos saturados excluyendo al 15:0. Monoinsat= ácidos grasos monoinsaturados. nd=no detectado

La presencia de PIR en el cultivo con glucosa ^{12}C incrementó la proporción de los ácidos palmítico y esteárico en un 42% y 66% respectivamente comparado con su control.

Se evidenció un aumento del 20% del ácido petroselínico (18:1 (cis Δ^6)) y un descenso del 50% en el ácido linoleico. Cabe destacar la aparición del AG monoinsaturado palmitoleico, no detectado en el control, y la ausencia del ácido oleico. Estas variaciones aumentaron la relación entre los ácidos saturados y monoinsaturados en un 10%, y hasta el doble entre los ácidos petroselínico y linoleico, destinos claves del C en este estudio. En cultivo con glucosa ^{13}C se registró un aumento sólo en los ácidos grasos saturados palmítico (51%) y esteárico (63%). La proporción del ácido linoleico disminuyó en un 10% y la del ácido palmitoleico se redujo a la mitad. También se observó una disminución del ácido saturado pentadecanoico (15:0) en un 49% respecto del control. Estas variaciones aumentaron un 87% la relación entre AG saturados y monoinsaturados, sin mayores cambios entre los AG petroselínico y linoleico.

En presencia de DBT en el medio con glucosa ^{12}C se registró un aumento en los ácidos esteárico y petroselínico (45% y 86% respectivamente), y un descenso en los ácidos palmítico (27%) y linoleico (40%). Se observó la desaparición del ácido 15:0, y se detectó un FAME no identificable, en un tiempo de retención menor a este, en una proporción de 0.05 respecto al total. Estas variaciones aumentaron las relaciones tanto del ácido palmítico como del petroselínico con el ácido linoleico, a la vez que disminuyeron la proporción entre AG saturados y monoinsaturados en un 60%.

En el medio con glucosa ^{13}C , el comportamiento fue similar al medio con glucosa ^{12}C , registrándose un incremento menor en la proporción de los ácidos esteárico (24%) y petroselínico (58%), y un descenso del 10% en el ácido linoleico, manteniendo constante la relación palmítico/linoleico, y disminuyendo la relación saturado/monoinsaturado en un 21%. Cabe destacar que, en presencia de DBT, se detectó ácido oleico tanto en cultivo con glucosa ^{13}C como ^{12}C , en una proporción de más del doble que su control. También se observó la desaparición del ácido pentadecanoico, y la detección de un FAME no identificable, en una proporción 0.03 respecto del total.

En presencia de PIR+DBT en glucosa ^{12}C disminuyó la proporción de los ácidos palmítico (14%) y linoleico (58%), alcanzando una relación palmítico/linoleico igual a 1. Los ácidos esteárico y petroselínico incrementaron en un 296% y 97% respectivamente con relación al control. Se registró la presencia del ácido palmitoleico en una proporción similar a la detectada en PIR. El notable aumento del ácido esteárico impactó en la relación con sus AG insaturados. En glucosa ^{13}C el incremento del ácido esteárico (56%) fue mucho menor que en glucosa ^{12}C , mientras que el incremento del ácido petroselínico fue similar (98%). En cambio, el ácido palmitoleico incrementó un 40% respecto del control, disminuyendo la relación saturado/monoinsaturado a la mitad. El descenso del ácido palmítico (11%) y linoleico (51%) fue similar al medio sin glucosa marcada. Tanto en glucosa ^{12}C como en glucosa ^{13}C , el ácido pentadecanoico no fue detectado, en cambio, se detectó el mismo FAME no identificado en una proporción de 0,05 y 0,04 respectivamente, en relación con el total de FAME.

Fue observado que la presencia de PIR en el medio, ya sea sólo o con DBT, en glucosa ^{12}C y glucosa ^{13}C se incrementa la proporción entre ácido palmítico y linoleico comparado con su respectivo control.

En la **Tabla V. 5** se presentan los resultados de la relación isotópica $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de los ácidos grasos palmítico y linoleico en los cultivos de *C. rigida* LPSC 232 en presencia de los PAH en medios con glucosa ^{12}C y glucosa ^{13}C (20%) respecto de sus controles. En ella se aprecia que la relación $\delta^{13}\text{C}$ de los ácidos grasos se modificó por la presencia de los PAH, en ambas condiciones de cultivo.

Tabla V. 5. Relación de isotopos estables $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de ácidos grasos mayoritarios de *C. rigida* LPSC 232 obtenidos de cultivos en medio con glucosa ^{12}C y enriquecido con ^{13}C , así como en presencia de PIR, DBT y en su combinación.

<i>Coriopsis rigida</i> LPSC 232				
Tratamientos	16:0		18:2 (cis, cis $\Delta^{9,12}$)	
	Glucosa ^{12}C	Glucosa ^{13}C 20%	Glucosa ^{12}C	Glucosa ^{13}C 20%
Control	-8,8±0,2 ^b	1.764±3 ^c	-9±0,4 ^b	1.904±2 ^d
PIR	-17,7±0,3 ^a	1.524±34 ^a	-18,5±0,3 ^a	1.603±8 ^c
DBT	7,6±0,7 ^d	1.667±12 ^b	-3,6±0,6 ^c	1.494±4, ^a
PIR+DBT	5,1±0,6 ^c	1.743±33 ^c	-2,5±0,1 ^d	1.587±2 ^b

Las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre tratamientos respecto a cada condición de la glucosa para cada AG (ANOVA a una vía. Test de Tukey $p < 0,05$).

En medio con glucosa ^{12}C , la presencia de PIR descendió significativamente la relación ambos ácidos grasos (~100%). Lo que indica una mayor incorporación de ^{12}C (proveniente de la glucosa o del PIR) por parte del hongo, manteniéndose una igualdad en la repartición de C para ambos AG, como en el control.

La presencia de PIR en medio con glucosa ^{13}C descendió de manera similar la relación isotópica en el ácido palmítico (~14%) y el linoleico (~16%) indicando la mayor incorporación de ^{12}C sobre ^{13}C . Similarmente a lo observado en el medio con glucosa ^{12}C , del resultado podría interpretarse que el pireno puede ser utilizado como fuente de carbono por *C. rigida* LPSC 232.

La presencia de DBT, ya sea sólo o combinado con PIR en medio con glucosa natural aumentó de manera significativa el valor $\delta^{13}\text{C}$ respecto del control en ambos ácidos grasos, alcanzando valores positivos sólo en el ácido palmítico lo que se traduce en un enriquecimiento desigual del ^{13}C , más evidente en el ácido palmítico.

Este resultado es compatible con un efecto tóxico del DBT, solo o en la mezcla con PIR, para *C. rigida*, al menos en la concentración utilizada en estos experimentos.

El comportamiento de los cultivos en glucosa ^{13}C , contrariamente al observado en glucosa natural evidenció valores de la distribución isotópica menores al control. Los resultados indicaron el enriquecimiento en el ^{12}C lo cual sugiere no solo la incorporación del ^{12}C de la glucosa sino también del PAH. La relación entre ambos AG indicó un enriquecimiento desigual con mayor incorporación de ^{12}C en el ácido linoleico.

La **Figura V. 9** muestra el aspecto de las colonias de *G. subargentea* LPSC 436 en medio agarizado con glucosa natural y en glucosa ^{13}C . La presencia de glucosa ^{13}C alteró la velocidad de crecimiento (datos no mostrados) de *G. subargentea* LPSC 436 con respecto a su control sin glucosa marcada, pero en menor medida comparado con *C. rigida* LPSC 232.

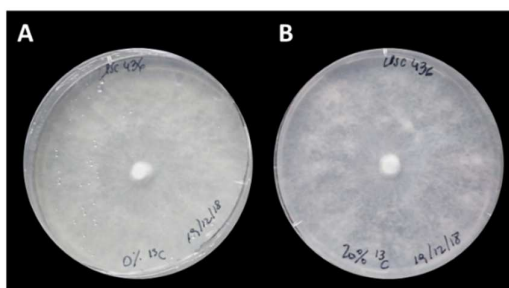


Figura V. 9. Cultivo de *Grammothele subargentea* LPSC 436 en MMS suplementado con glucosa natural (1g/l) (A) y glucosa ^{13}C al 20% (B) sin PAH a los 14 días de incubación a 28 °C en oscuridad.

La **Figura V. 10** muestra los perfiles lipídicos de *G. subargentea* LPSC 436 en los medios de cultivo con glucosa ^{12}C y en glucosa ^{13}C (20%), en presencia de los distintos PAH. En ella se aprecia que el porcentaje total de ácidos grasos estimados a partir de los

cultivos en los medios suplementado con glucosa ¹²C y glucosa ¹³C sin PAH son similares entre sí.

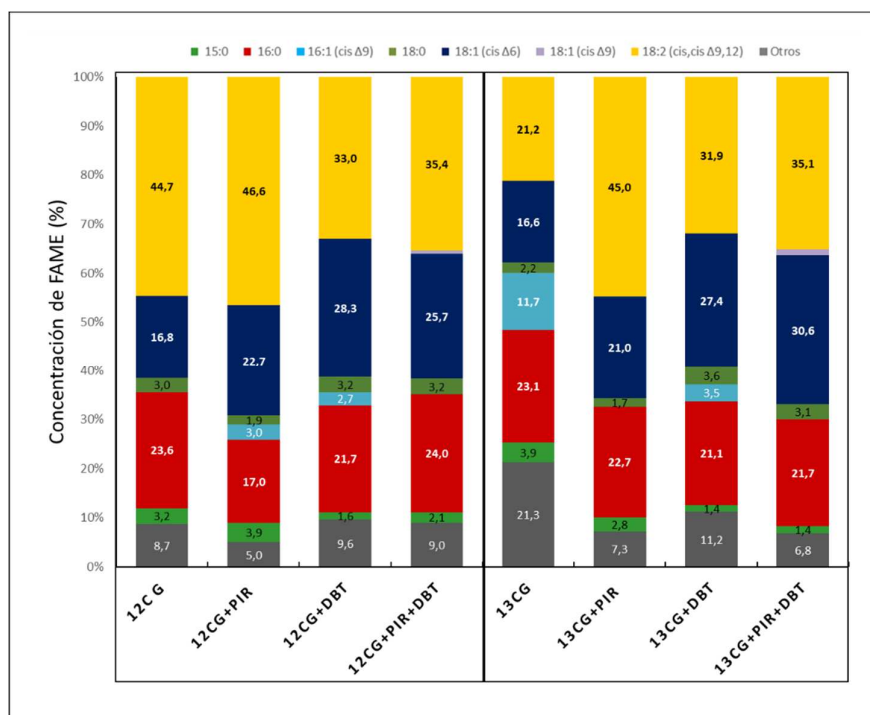


Figura V. 10. Perfil relativo porcentual de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, GC-MS) de *G. subargentea* LPSC 436 en medio agarizado con glucosa ¹²C y glucosa ¹³C al 20% y distintos PAH. En el eje horizontal se identifican los controles sin PAH (¹²CG y ¹³CG), y suplementados con pireno (PIR), dibenzotiofeno (DBT) y su combinación (PIR+DBT). En la leyenda, Otros corresponde a FAME no identificables.

La **Tabla V. 6** muestra la proporción de los AG más frecuentemente detectados en mayor porcentaje relativo. Se calcularon también las proporciones de los ácidos grasos representativos, respecto del total determinado en cada condición. La proporción 18:0/FAME_{total} fue la más baja entre los ácidos grasos seleccionados.

Analizando los cultivos control en glucosa ¹²C y glucosa ¹³C se observó que las proporciones de los ácidos grasos disminuyeron en glucosa ¹³C, principalmente los ácidos esteárico (27%) y linoleico (53%), aumentando la relación palmítico/linoleico en

un factor de 2. También estas variaciones afectaron la relación entre AG saturados y entre el ácido esteárico y su derivado monoinsaturado.

Al igual que en cultivo de *C. rigida*, se detectó el ácido palmitoleico, aunque en una proporción mucho menor (0,03%).

Tabla V. 6. Proporciones relativas de los AG comunes a todas las condiciones de cultivo de *G. subargentea* LPSC 436 respecto de los FAME totales, en glucosa marcada al 20% ($G^{13}C$) y sin marcar ($G^{12}C$).

	Control $G^{12}C$	PIR $G^{12}C$	DBT $G^{12}C$	PIR+DBT $G^{12}C$	Control $G^{13}C$	PIR $G^{13}C$	DBT $G^{13}C$	PIR+DBT $G^{13}C$
15:0/FAME_{total}	0,03	0,04	0,02	0,02	0,04	0,03	0,01	0,01
16:0/FAME_{total}	0,24	0,17	0,22	0,24	0,23	0,23	0,21	0,22
18:0/FAME_{total}	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03
16:1 (Δ^9)/FAME_{total}	Nd	0,03	0,03	nd	0,12	nd	0,04	nd
18:1 (Δ^6)/FAME_{total}	0,17	0,23	0,28	0,26	0,17	0,21	0,27	0,31
18:2($\Delta^{9,12}$)/FAME_{total}	0,45	0,47	0,33	0,35	0,21	0,45	0,32	0,35
Sat/Monoinsat	1,58	0,73	0,80	1,03	0,90	1,16	0,80	0,78
Sat/18:2 ($\Delta^{9,12}$)	0,60	0,41	0,75	0,77	1,20	0,54	0,77	0,71

Sat= ácidos grasos saturados. Monoinsat= ácidos grasos monoinsaturados. nd=no detectable

La presencia de PIR en los cultivos con glucosa ^{12}C incrementó la proporción de los ácido petroselínico (35%) y pentadecanoico (23%), con la aparición del ácido palmitoleico (0,03%). Los ácidos palmítico y esteárico disminuyeron su proporción en un 28y 37% respectivamente. En glucosa ^{13}C se observó un notable incremento del ácido linoleico (113%) y en menor medida el ácido petroselínico, con un 26% respecto del control, lo que redujo la relación palmítico/linoleico a la mitad. El descenso del ácido esteárico en un 21%, generó cambios en la relación entre AG saturados y entre saturados/monoinsaturados. También se registró un descenso en el ácido saturado pentadecanoico en un 28%.

La presencia de DBT en glucosa ^{12}C , registró un incremento en la proporción del ácido petroselínico (68%) y un descenso del ácido linoleico (26%) respecto a su control, aumentando al doble la relación entre ellos comparado al control. También se observó una disminución del ácido pentadecanoico del 50%. En el medio con glucosa ^{13}C aumentó la proporción de los ácidos grasos de 18C, los ácidos esteárico y petroselínico

se incrementaron en un 65% mientras que el ácido linoleico en un 51%. Otro cambio se evidenció en el ácido pentadecanoico con un descenso en un 65%. La proporción del ácido palmítico (0,03%) no resultó modificada por el DBT en ninguna condición. La relación palmítico/linoleico se incrementó a 0,66 en ambas condiciones.

En presencia de PIR+DBT se observó un comportamiento similar al registrado en los cultivos con DBT. En el medio con glucosa ^{12}C disminuyeron los ácidos linoleico y pentadecanoico en un 21 y 34%, respectivamente, e incrementó el ácido petroselínico en un 53% respecto de su control. También se detectó ácido oleico en una proporción muy baja de 0,006%. En cuanto a la relación palmítico/linoleico se mantuvo similar a lo observado en DBT. En el medio con glucosa ^{13}C se registró un incremento en los ácidos esteárico (41%), petroselínico (84%) y linoleico (66%). Mientras que disminuyó el ácido pentadecanoico en un 64%. La proporción del ácido oleico se duplicó (0,012%), disminuyendo la relación con el ácido esteárico respecto del medio con glucosa sin marcar.

La **Tabla V. 7** muestra la relación de isotópica $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de los ácidos palmítico y linoleico de *G. subargentea* LPSC 436 frente a los distintos PAH en las diferentes condiciones de cultivo. En ella se aprecia que la relación $\delta^{13}\text{C}$ de los ácidos grasos se modificó por la presencia de los PAH, en ambas condiciones de cultivo.

Tabla V. 7. Relación de isotopos estables $\delta^{13}\text{C}$ (‰) de ácidos grasos mayoritarios de *G. subargentea* LPSC 436 obtenidos de cultivos en medio con glucosa ^{12}C y enriquecido con ^{13}C , así como en presencia de PIR, DBT y en su combinación.

<i>Grammothele subargentea</i> LPSC 436				
Tratamientos	16:00		18:2 Δ 9,12 (cis, cis)	
	Glucosa ^{12}C	Glucosa ^{13}C 20%	Glucosa ^{12}C	Glucosa ^{13}C 20%
Control	-12,6±0,2 ^b	1.451,3±11,5 ^b	-20,6±0,1 ^b	1.519,2±12,3 ^c
PIR	-17,1±0,5 ^a	1.536,6±7,6 ^c	-23,0±0,3 ^a	1.665,2±2,6 ^d
DBT	-10,2±0,3 ^c	1.147,5±4,0 ^a	-17,1±0,4 ^c	1.397,1±1,3 ^a
PIR+DBT	-13,5±0,4 ^b	1.434,3±4,5 ^b	-16,0±0,1 ^d	1.457,3±2,5 ^b

Las letras minúsculas indican las diferencias significativas entre tratamientos respecto a cada condición de la glucosa para cada AG (ANOVA a una vía. Test de Tukey $p < 0,05$).

Analizando la relación entre los valores $\delta^{13}\text{C}$ de los AG en sus controles, se observa que en presencia de glucosa ^{13}C la relación palmítico/linoleico aumenta, indicando mayor incorporación de ^{13}C en el ácido palmítico respecto del control ^{12}C .

La presencia de PIR en el medio con glucosa ^{12}C disminuyó la $\delta^{13}\text{C}$ en 36% y 11.6% para los ácidos palmítico y linoleico respectivamente, indicando la incorporación de ^{12}C (de glucosa y/o PIR) con una repartición desigual del ^{12}C entre los AG, mayor para el ácido graso saturado.

En el medio con glucosa ^{13}C , la presencia de PIR incrementó levemente el valor de $\delta^{13}\text{C}$ en ambos ácidos grasos, indicando una incorporación del ^{13}C mayor en el estimador de biomasa (10%).

El DBT incrementó los valores de $\delta^{13}\text{C}$ en el medio con glucosa natural en ambos ácidos grasos indicando la incorporación de ^{13}C sobre ^{12}C en un 19% para el palmítico y 17% para el linoleico.

Contrariamente, en presencia de glucosa ^{13}C , el DBT disminuyó significativamente la $\delta^{13}\text{C}$ para ambos ácidos grasos respecto al control, indicando la incorporación diferencial del ^{12}C sobre el ^{13}C , principalmente en el ácido palmítico (21%).

La combinación de PIR+DBT en glucosa natural, reveló un comportamiento intermedio a lo observado individualmente para ambos hidrocarburos. La mezcla de PAH produjo un incremento de $\delta^{13}\text{C}$ solo en ácido linoleico (22% respecto de su control), indicando una mayor incorporación de ^{13}C en esta condición.

En presencia de glucosa ^{13}C , la mezcla de PIR+DBT solo produjo una reducción menor en el valor de $\delta^{13}\text{C}$ para el ácido linoleico indicando una incorporación del 4% de ^{12}C sobre ^{13}C .

V.1.2 Efecto del barro petroquímico FP oxidado sobre el crecimiento de *Corioloopsis rigida* LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436 sobre medio agarizado

El tratamiento oxidativo con persulfato de amonio provocó un descenso significativo en el valor de pH del barro, desde $5,6 \pm 0,1$ a 2.

La ausencia de crecimiento de ambos hongos en el medio MyA2 suplementado con el FP oxidado, fue atribuida al pH ácido del mismo.

Con la finalidad de apreciar el efecto del barro, se consideró neutralizar la extrema acidez aplicando dos estrategias diferentes, neutralización con NaHCO_3 (pH= 8,17) y mezcla con conchilla (pH=8,77) y arena (pH=7,56). La

Tabla V. 8 muestra los valores de pH obtenidos en diferentes volúmenes de bicarbonato agregado a 5 g de barro oxidado, y distintas proporciones de conchilla y arena.

Tabla V. 8. Valores de pH de mezclas de FP oxidado y agentes neutralizantes.

NaHCO₃ 0.5M(ml)	pH	Conchilla (g)	Arena (g)	pH
5	7,69	1	14	7,77
2.5	6,62	5	10	7,79
2	4,67	7,5	7,5	7,85
1	3,76	15	0	7,78

Sobre la base de los resultados se seleccionó la neutralización con 2 ml de NaHCO_3 (0,5M) ajustando el pH a 4,67 para el ensayo de tolerancia de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en medio MyA2 con solución antibiótica (cloranfenicol 0,25g+estreptomicina 0,5g). La **Tabla V. 9** muestra los resultados de los diámetros de la colonia (mm) a distintas concentraciones del extracto acuoso del barro neutralizado con

bicarbonato. Se puede apreciar la baja tolerancia de ambos hongos al extracto acuoso al 100%.

Tabla V. 9. Tolerancia de los hongos LPSC 232 y LPSC 436 frente al extracto acuoso del FP oxidado neutralizado con bicarbonato.

Hongo	Concentración del extracto acuoso			
	0%	25%	50%	100%
LPSC 232	72,7±0,6 ^a	74±2 ^a	71±5 ^{ab}	62±7 ^b
LPSC 436	74±4 ^a	74±3 ^a	70±8 ^{ab}	60±4 ^b

Diámetro de colonia (mm) Valor Promedio±DS de triplicados. Las letras indican las diferencias significativas entre los datos correspondientes a cada hongo con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados del ensayo de tolerancia con diferentes cantidades de conchilla (1, 5, 7,5 y 15 g) no evidenciaron diferencias significativas en el diámetro de la colonia fúngica entre los tratamientos. Por lo tanto, la neutralización se realizó con la menor cantidad de conchilla. En la **Figura V. 11** se aprecia cómo ambos hongos se desarrollaron al igual que el control con el ajuste de pH a 7,7 en presencia de la mezcla de 5 g de barro, 1 g de conchilla y 14 g de arena.

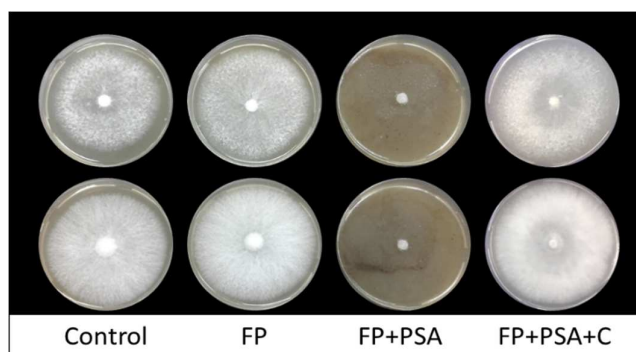


Figura V. 11. Cultivos de *C. rigida* LPSC 232 (arriba) y *G. subargentea* (abajo) en presencia de barro FP oxidado con persulfato de amonio (FP+PSA), sin oxidar (FP) y con 1g de conchilla (FP+PSA+C) para el ajuste del pH en MyA2 (cloranfenicol 0,25g+estreptomicina 0,5g).

En la **Tabla V. 10** se registran los diámetros de las colonias de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en presencia de diferentes concentraciones del extracto

acuoso obtenido a partir del barro FP inicial, oxidado con PSA y éste último suplementado con 1 g de conchilla (FP+PSA+C).

Tabla V. 10. Tolerancia de los hongos seleccionados al barro FP en los distintos tratamientos.

Hongo	Tratamiento	0% (Control)	25%	50%	100%
LPSC 232	FP	74,67±0,58 ^a	78,67±1,53 ^a	73,33±2,89 ^a	76,67±4,73 ^a
	FP+PSA	74,67±0,58	NO hubo crecimiento		
	FP+PSA+C	75,5±0,70 ^a	80,00±1,14 ^b	81,5±0,70 ^b	80±0 ^b
LPSC 436	FP	80,33±3,79 ^a	82,67±0,58 ^a	82±4,36 ^a	80±1,73 ^a
	FP+PSA	80,33±3,79	NO hubo crecimiento		
	FP+PSA+C	75±0 ^a	75±1,41 ^a	78±2,83 ^{ab}	79±2,83 ^b

Diámetro de colonia (mm) Valor Promedio±DS de triplicados. Las letras indican las diferencias significativas entre los datos correspondientes a cada hongo en cada tratamiento con un nivel de confianza del 95%.

V.2 Cultivo fúngico en medio líquido

V.2.1 Efecto del pireno sobre el crecimiento de *Corioloopsis rigida* LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436 en diferentes medios de cultivo

Se cultivaron los dos hongos seleccionados por 14 días en dos medios de cultivo líquido de composición contrastante: medio mineral líquido (MML) con glucosa 1% y medio con extracto de malta al 2% y extracto de levadura 1 g/l (ME2), así como en la presencia de pireno (PIR) al 0,05 %.

Paralelamente también se cultivaron en MML con pireno al 0,05 % como única fuente de C y energía. Todos los cultivos fúngicos incluyeron sus respectivos controles abióticos (sin inóculo).

En todos los cultivos con medios suplementados con compuestos orgánicos fácilmente asimilables se observaron colonias superficiales, a excepción de los cultivos donde el pireno fue la única fuente de C y energía disponible, donde el hongo estaba reducido a pellets sumergidos (**Figura V. 12 A**). Macroscópicamente se observó que la

presencia de PIR no redujo el crecimiento de la colonia en ME2 para ambos hongos (Figura V. 12 Ad y e, B d y e).

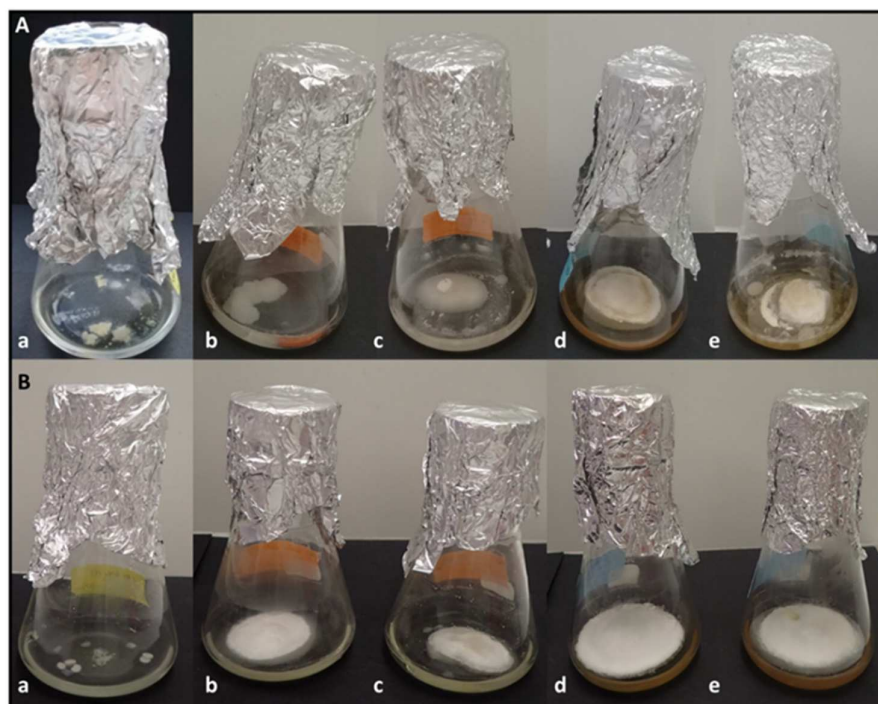


Figura V. 12. Cultivos líquidos de *Corioloopsis rigida* LPSC 232 (A) y *Grammothele subargentea* LPSC 436 (B) en medio mineral (MML) con pireno (a), en MML suplementado con glucosa al 1% solo (b) y en presencia de pireno 0,05% (c), en medio ME2 solo (d) y en presencia de pireno (e), después de 14 días de incubación en oscuridad a 25 °C y 30 rpm.

Los resultados de biomasa fúngica (mg peso seco/cultivo) y la cantidad de ergosterol ($\mu\text{g}/\text{cultivo}$) para ambos hongos se muestran en la **Figura V. 13 (Ay B)**.

En la figura se aprecia que el crecimiento de *C. rigida* LPSC 232 medido como biomasa seca y cantidad de ergosterol por cultivo es significativamente mayor en ME².

La presencia de PIR no afectó la producción de biomasa seca en ninguno de los medios de cultivo estudiados. En cambio, sí redujo la cantidad de ergosterol en ME², correspondiente al 26% respecto de su control ($1345 \pm 115 \mu\text{g}/\text{cultivo}$ a $994 \pm 70 \mu\text{g}/\text{cultivo}$).

Los cultivos de *G. subargentea* LPSC 436 no manifestaron diferencias significativas en la biomasa ni cantidad de ergosterol en ningún medio (**Figura V. 13 C y D**).

La presencia de glucosa en el medio mineral con o sin pireno, tuvo una mejor respuesta en *G. subargentea* LPSC 436 (260±100 y 188±35 mg por cultivo respectivamente) comparado con *C. rigida* LPSC 232 (38±14 y 78±18 mg por cultivo respectivamente) en cuanto a la biomasa seca producida. No así en el contenido de ergosterol, siendo mayor en MML+G+PIR para LPSC 232 (92±17 µg/cultivo) que LPSC 436 (62±19µg/cultivo).

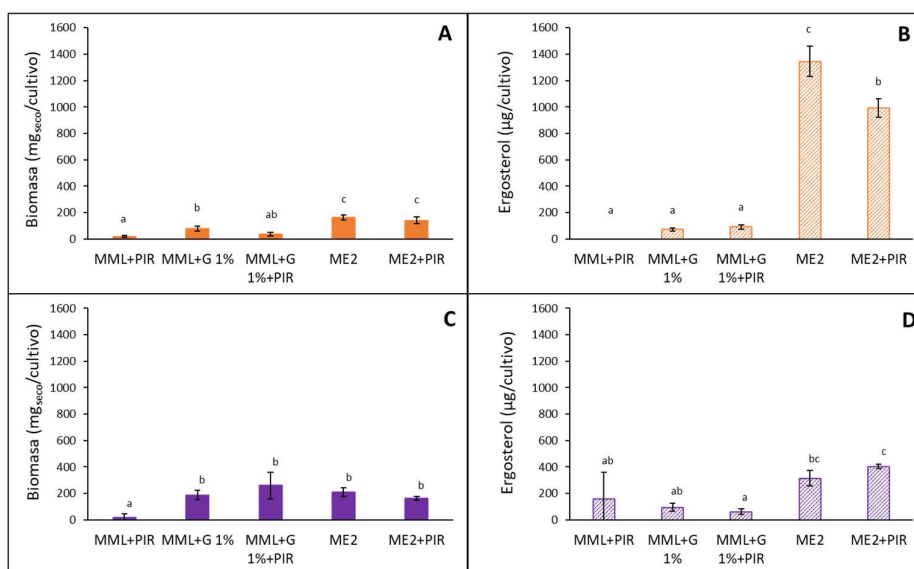


Figura V. 13. Biomasa por peso seco (mg) (A y C) y cantidad de ergosterol (µg) (B y D) por cultivo líquido de *C. rigida* LPSC 232 (naranja) y *G. subargentea* LPSC 436 (violeta) en distintos medios de cultivo suplementados con pireno. Las barras representan las desviaciones estándares y las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos por cada hongo con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados estadísticos de correlación lineal de Pearson entre la concentración de ergosterol y biomasa por cultivo evidenciaron una correlación positiva en *C. rigida* LPSC 232 ($r^2= 0,91$), siendo baja en el caso de *G. subargentea* LPSC 436 ($r^2=0,33$).

V.2.2 Efecto del barro FP sobre el crecimiento de *Coriopsis rigida* LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436 en diferentes medios de cultivo

Se cultivaron durante 14 días ambos hongos en medios líquidos (MML; MML+Glu 1% y ME2) suplementados con el barro FP (1 g/l). Paralelamente se cultivaron en MML+Glu 1%, como control. Los cultivos en MML suplementado con el barro FP no evidenciaron desarrollo superficial de colonia. Los cultivos suplementados con glucosa y ME2, evidenciaron un desarrollo superficial de las colonias, siendo mayores y más densas en este último medio (**Figura V. 14**).

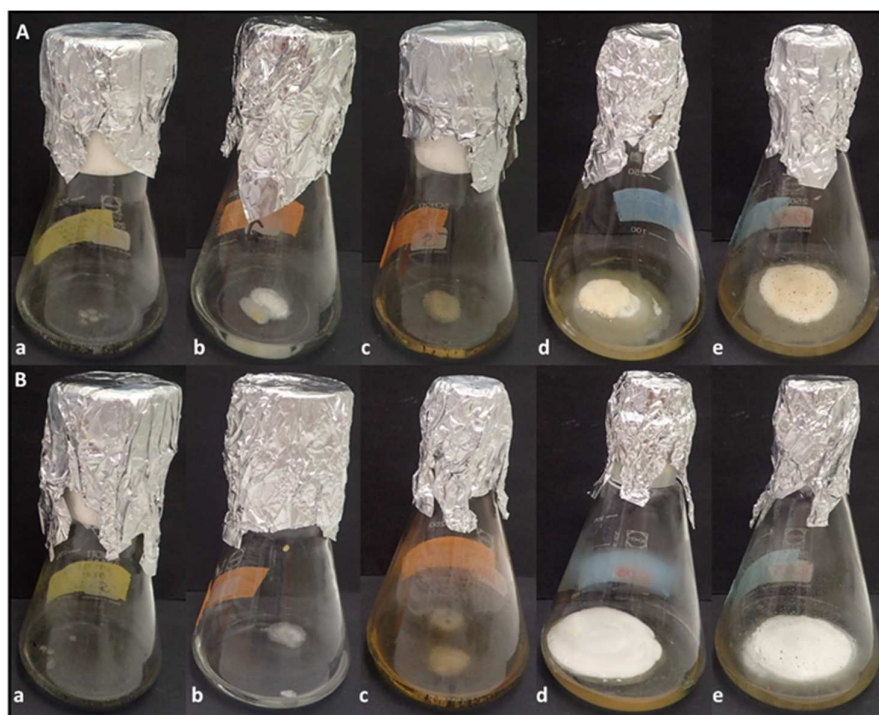


Figura V. 14. Cultivos líquidos de *Coriopsis rigida* LPSC 232 (A) y *Grammothele subargentea* LPSC 436 (B) en medio mineral (MML) con FP (a), en ML suplementado con glucosa al 1% (b) y en presencia de FP (c), en medio con extracto de malta y de levadura (c) y FP (d), después de 14 días de incubación en oscuridad a 25 °C y 30 rpm.

En presencia del residuo FP y sólo en ME2 el cultivo de *C. rigida* LPSC 232 evidenció un aumento significativo de la biomasa con un descenso en el contenido de ergosterol (**Figura V. 15A y B**).

La presencia del residuo FP en ambos medios de cultivo no produjo diferencias significativas en la biomasa seca de *G. subargentea* LPSC 436, respecto de los cultivos control. Similarmente a lo observado con *C. rigida*, se registró un contenido de ergosterol significativamente mayor en ME2 que en MML+G. La presencia del residuo disminuyó este valor en el medio ME2 (652 ± 158 a 348 ± 7 $\mu\text{g}/\text{cultivo}$) (**Figura V. 15 C y D**). Se determinó la correlación entre la biomasa seca y cantidad de ergosterol, resultando positiva y similar en ambos hongos, *C. rigida* LPSC 232 ($r^2=0,59$) en *G. subargentea* LPSC 436 ($r^2=0,52$), a diferencia de lo observado en presencia de pireno.

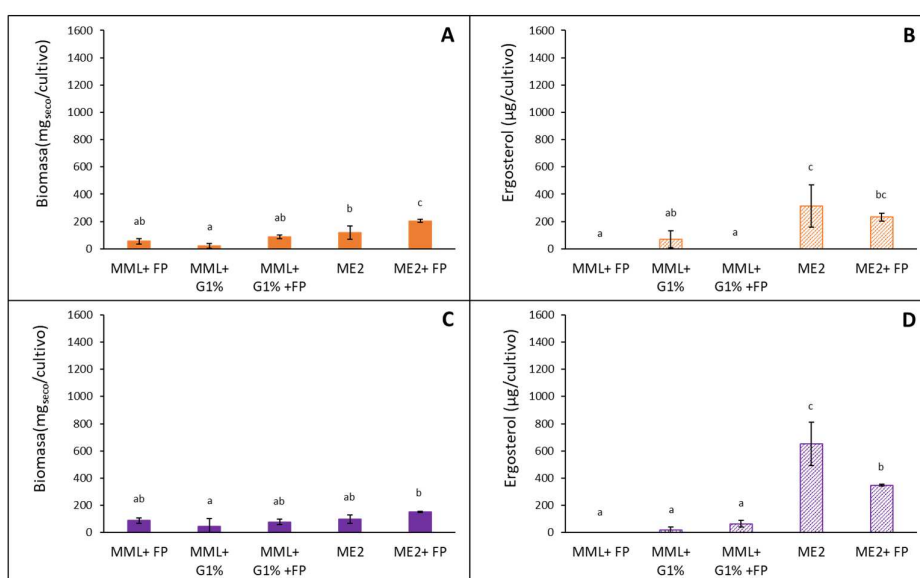


Figura V. 15. Biomasa seca y concentración de ergosterol por cultivo de LPSC 232 (A y B) y LPSC 436 (C y D) en distintos medios de cultivo suplementados con FP liofilizado. Las barras representan las desviaciones estándares ($n=3$) y las letras indican las diferencias significativas entre los tratamientos por cada hongo con un nivel de confianza del 95%.

V.2.3 Evaluación de la habilidad de *Coriopsis rigida* LPSC 232 para la remoción de pireno en cultivo líquido

Luego de 14 días de incubación de *C. rigida* LPSC 232 en medio ME2 suplementado con pireno $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, se evaluó la concentración de pireno residual.

Considerando la concentración de pireno adsorbido al micelio estimada a partir de los controles inoculados con biomasa autoclavada ($0,0037 \pm 0,0004 \text{ mg.l}^{-1}$) y la pérdida abiótica del hidrocarburo, *C. rigida* LPSC 232 removió el 52% del pireno disponible ($21 \pm 6 \text{ mg.l}^{-1}$, **Figura V. 16**).

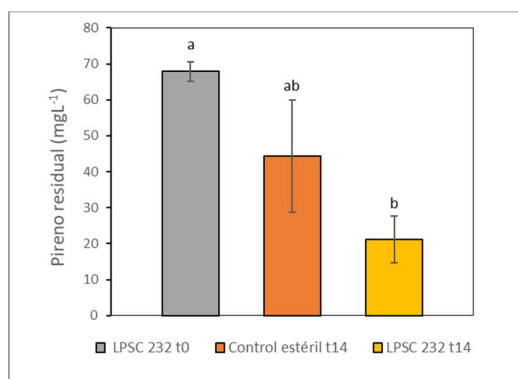


Figura V. 16. Concentración de pireno residual (mg.l^{-1}) en cultivos de *C. rigida* LPSC 232 en ME2 al inicio y luego de 14 días de incubación. Promedios \pm DS de ensayos triplicados. Las letras en minúsculas diferentes indican diferencias significativas con respecto al tiempo 0 con un nivel de confianza del 5% (ANOVA, Test de Tukey).

La concentración de biomasa seca de los cultivos incubados en presencia de pireno fue similar a la determinada en los cultivos libres del hidrocarburo ($119 \pm 24 \text{ mg}$ versus $88 \pm 8 \text{ mg}$ respectivamente) sugiriendo que la presencia del PIR no impidió el crecimiento del hongo en el cultivo (**Figura V. 17**).



Figura V. 17. Cultivo de *Coriopsis rigida* LPSC 232 en medio ME2 (izquierda) y en ME2 suplementado con 50 mg. l⁻¹ de pireno (derecha) después de 14 días de incubación.

V.3 Cultivo fúngico sobre rastrojo bajo condiciones de fermentación en estado sólido: Actividad respiratoria y su respuesta frente al barro FP

Se estudió la actividad mineralizante de los hongos ligninolíticos *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en presencia del barro FP, en condiciones axénicas y no estériles. El propósito fue evaluar el efecto del barro sobre la actividad de cada hongo en presencia y ausencia de su microbiota nativa. En la **Figura V. 18** se puede observar macroscópicamente como ambos hongos colonizan al rastrojo y al barro FP en condiciones axénicas, y las diferencias en la colonización cuando se hace presente la microbiota nativa del residuo en los microcosmos no estériles.

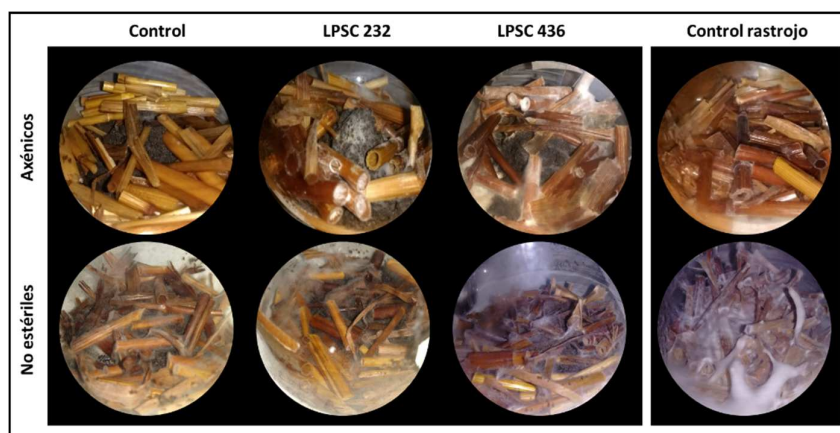


Figura V. 18. Microcosmos de barro FP API tratados bioaumento con *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en condiciones axénicas y no estériles a 60 días. Derecha: Controles positivos sobre rastrojo de trigo LPSC 232 (Arriba) y LPSC 436 (Abajo). Los ensayos se realizaron por triplicados independientes.

La **Figura V. 19** muestra la concentración de CO₂ acumulada durante los 60 días de incubación, en los distintos tratamientos.

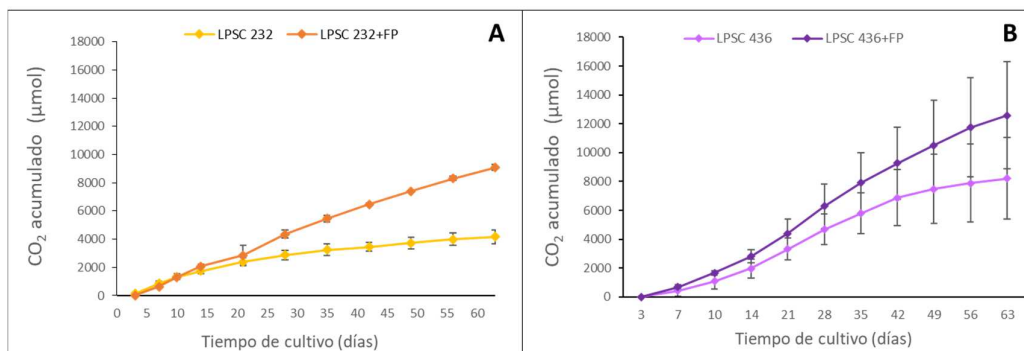


Figura V. 19. Efecto de FP sobre la actividad respiratoria de cultivos axénicos de *Coriolopsis rigida* LPSC 232 (A) y *Grammothele subargentea* LPSC 436 (B) creciendo sobre rastrojo de trigo bajo condiciones de fermentación en estado sólido a 28 °C en oscuridad. Los puntos y las barras representan los promedios y desviaciones estándares (n=3).

Luego de 60 días de incubación la cantidad de CO₂ total acumulado (μmol) por *C. rigida* LPSC 232 en presencia de barro FP estéril fue de 9.075±202. Resultando un incremento significativo del 118% respecto del control.

El efecto del barro sobre la mineralización se apreció luego de los 15 días de incubación, siendo significativo luego del día 28, donde se registra la producción de 4.364±298 μmol acumulativo, que equivale al 52% de la producción total.

Evaluando la producción de CO₂ entre los días monitoreados, se observó un incremento de más del doble durante la semana 3 a 4, alcanzando su máximo de producción para luego descender hasta 760,5 μmol. Mientras que el descenso de la producción de CO₂ en el control se inicia al día 21.

La producción de CO₂ del cultivo de *G. subargentea* LPSC 436 en presencia del barro FP estéril no evidenció diferencias significativas respecto de su control, debido a la gran dispersión de los datos experimentales (**Figura V. 19**). No obstante, se aprecia una tendencia superior en presencia del barro desde el inicio del ensayo, con una producción total de CO₂ comparable a la alcanzada por *C. rigida* LPSC 232.

El comportamiento de LPSC 436 en los intervalos de producción de CO₂ fue similar a su control, sin embargo, al igual que LPSC 232 el máximo de producción de CO₂ ocurre al día 28.

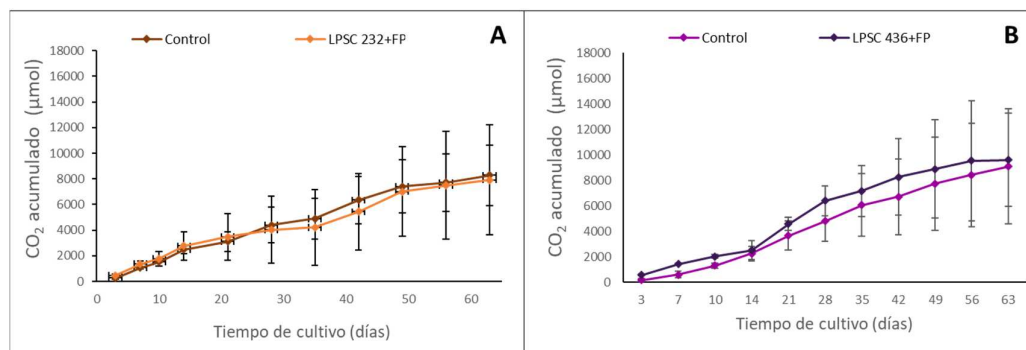


Figura V. 20. Efecto de la inoculación de los hongos ligninolíticos *Coriolopsis rigida* LPSC 232 (A) y *Grammothele subargentea* LPSC 436 (B) sobre la producción de CO₂ de un sistema conteniendo el residuo FP no estéril. Los puntos y las barras representan los promedios y desviaciones estándares (n=3).

La **Figura V. 20** muestra la producción de CO₂ durante el cultivo de ambos hongos en presencia del barro FP no estéril, en comparación con la producción de la microbiota nativa.

La presencia del barro FP no estéril no produjo diferencias significativas en la producción de CO₂ en el cultivo de ambos hongos. El resultado sugiere que la inoculación de los hongos ligninolíticos no produce un efecto negativo de la sobre la actividad respiratoria asociada a la microbiota nativa del barro durante los 60 días de incubación.

Sin embargo, el máximo de producción de CO₂ se registró al día 42 en el tratamiento con *C. rigida* LPSC 232, mientras que no se observaron cambios durante la producción cuando el hongo fue *G. subargentea* LPSC 436.

V.4 Discusión

Habilidad potencial de hongos saprótrofos seleccionados para tolerar y degradar distintos PAH y componentes de un barro de FP

Los ensayos de tolerancia frente a una mezcla de PAH, ya sea en presencia o ausencia de CMC como una fuente de carbono adicional, mostraron resultados diferenciales según los aislamientos analizados.

Gelatoporia subvermispora FBCC 313 no toleró a los PAH aún en presencia de CMC. Si bien *Peniophora albobadia* LPSC 285 mostró el menor efecto de inhibición del crecimiento por los PAH, y por lo tanto mayor tolerancia, estos cultivos no registraron ningún halo evidente de solubilización de los PAH, tanto cuando fueron las únicas fuentes de carbono disponibles en el medio como tampoco en la presencia adicional de CMC.

En cambio, *Grammothele subargentea* LPSC 436, *Gloeophyllum sepiarium* LPSC 735 y *Coriopsis rigida* LPSC 232 resultaron ser tanto tolerantes a la mezcla de PAH, como también capaces de solubilizar los PAH, siendo *G. sepiarium* LPSC 735 el que reveló la mayor relación entre el diámetro de la colonia y el halo de solubilización de PAH

asociado. Este último hongo también registró el mayor halo celulolítico en relación con el diámetro de la colonia en presencia de CMC+PAH, lo que puede estar relacionado a la habilidad de estos hongos para causar pudriciones pardas, degradando la celulosa tanto enzimáticamente como a través de mecanismos radicalarios (Mansfield *et al.*, 1998).

Por otro lado, analizando a los HPB creciendo en presencia de CMC y PAH, *C. rigida* LPSC 232 registró la mayor relación entre el halo celulolítico respecto al diámetro de su colonia, sugiriendo una capacidad diferencial en este hongo para sintetizar enzimas cuya actividad extracelular conduzca a una degradación de celulosa más eficiente comparado a lo observado para *G. subargentea*, así como (posiblemente) también a la solubilización de PAH. Estudios previos han reportado la habilidad diferencial de ambos hongos, incluso comparado con otros (Colombo *et al.*, 1996; Saparrat *et al.*, 2014).

Numerosas investigaciones han analizado la co-inoculación entre hongos (Qi-He *et al.*, 2011; Yanto & Tachibana 2014b) y hongo-bacteria (Borràs *et al.*, 2010) a fin de evaluar si su interacción genera sinergia en la degradación de hidrocarburos.

Basado en los resultados obtenidos con *G. sepiarium* LPSC 735, que fue el que registró el mayor halo de solubilización de PAH, este hongo se coinoculó en presencia de los otros hongos testeados (LPSC 232, LPSC 285 y LPSC 436). Únicamente el par LPSC 735-LPSC 285 exhibió inhibición en el crecimiento de los hongos. Mientras que los co-cultivos LPSC 735-LPSC 232 y LPSC 735-LPSC436 evidenciaron una parcial interacción miceliar en el sentido de Molla y colaboradores (2001), el cultivo dual entre LPSC 735 y LPSC 436 registró el mayor halo de solubilización de PAH, así como también la detección de exudados en la zona de contacto entre los frentes de crecimiento de cada colonia fúngica. Trabajando con cultivos duales sobre medio agarizado, Yanto y colaboradores (2014) reportaron la producción de pigmentos en la línea de contacto entre *Pestalotiopsis sp* NG007 y 4 hongos causantes de la pudrición blanca de la madera (*T. versicolor* U97, *P. ostreatus* PL1, *Cerrena sp.* F0607 y *Polyporus sp.* S133). Los autores atribuyeron este resultado al incremento en la actividad enzimática oxidativa, y lo relacionaron con la mayor degradación de asfaltenos y resinas observada cuando los co-cultivos fueron inoculados en suelo contaminado. Si bien las pruebas obtenidas en el

presente trabajo son preliminares, sobre la base de la posible participación de las enzimas oxidativas o su actividad en la remoción de PAH, es posible que la detección de halos de solubilización de PAH mayores en los cultivos duales sea consecuencia de la inducción y/o activación de estas enzimas oxidativas y/u otros compuestos derivados de su actividad, en respuesta a la interacción interespecífica (Baldrian, 2004). Cabe destacar que la actividad oxidativa de los HPB, inferida a través de la oxidación de guaiacol en el medio, no se vio afectada por la presencia de *G. sepiarium* LPSC 735 (ver **Tabla V. 2**).

Los ensayos de tolerancia frente a PAH individuales (NAF, ANT, PIR, FEN, DBT, FLU) realizados con los hongos *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 también mostraron resultados diferentes según el hongo estudiado, como así también según la disponibilidad de fuentes diferentes de carbono asimilables, sea glucosa (G) o compuestos del extracto de malta (EM).

LPSC 232 y LPSC 436 fueron incapaces de crecer en presencia de NAF, aun cuando fueron inoculados en un medio rico como aquel con extracto de malta, lo que puede ser atribuido a la alta presión de vapor del PAH. Respecto del efecto producido por los restantes PAH testeados, en general el crecimiento de los hongos fue mayor en el medio suplementado con extracto de malta comparativamente a lo registrado en presencia de glucosa como principal fuente de carbono asimilable. La mayor tolerancia observada en EM puede ser atribuida a la disponibilidad de un espectro mayor de compuestos fácilmente asimilables en el extracto de malta, incluyendo compuestos que pueden ser usados como fuente de nitrógeno orgánico y factores de crecimiento, pudiendo afectar la tasa de consumo del sustrato y su tasa cometabólica (García-Rivero & Peralta-Pérez, 2008).

Analizando el comportamiento de *C. rigida* LPSC 232 se aprecia que únicamente ANT ejerció un efecto estimulador cuando se testeó en EM. El bajo valor de solubilidad en agua de este PAH es un factor influyente en su biodisponibilidad, lo que tal vez condiciona el crecimiento fúngico. El PIR, 10 veces más soluble que ANT, no modificó el diámetro de colonia en EM, aunque sí fue inhibido en medio con G. La mayor solubilidad de FEN, DBT y FLU (100 veces todas mayor que la de ANT) pudo haber sido la causa de la inhibición (menor tolerancia) observada en ambos medios de cultivo por los cristales de PAH. La presencia de S en la molécula de DBT podría ser la causa del mayor efecto

inhibitorio observado por este PAH en ambos medios de cultivo. La utilización de DBT como fuente de azufre ha sido reportada en levaduras basidiomicetáceas como *Rhodospiridium toruloides* (Baldi *et al.*, 2003) y *Trichosporon* (Zahra *et al.*, 2006) así como también en hongos ascomicetáceos como *Exophiala spinifera* (Elmi *et al.*, 2015) y *Stachybotrys bisbyi* (Gherbawy *et al.*, 2016). En muchos hongos ligninolíticos la oxidación del S y la desulfuración ocurren indirectamente durante la degradación de lignina o como respuesta al estrés frente a xenobióticos, sin involucrar su asimilación (Linder, 2018). Ichinose y colaboradores (2002) reportaron la capacidad del hongo ligninolítico *Coriolus versicolor* para oxidar compuestos organosulfurados, como DBT, y generar sulfóxidos y sulfonas más hidrofílicos que contribuyen a su acción inhibitoria en el crecimiento fúngico. Es sabido que, durante el proceso de la desulfuración oxidativa, los compuestos azufrados se oxidan a sus respectivos sulfóxidos y sulfonas, lo que aumenta su polaridad y modifica algunas de sus propiedades tales como su punto de ebullición (Mei *et al.*, 2003). Entre las enzimas involucradas en este proceso se encuentran peroxidasas, como cloroperoxidasa y lignina peroxidasa, componentes del citocromo P-450 y lacasas (Doerge, 1986; Kobayashi *et al.*, 1986; Colonna *et al.*, 1992; Ayala *et al.*, 1998; Torres & Vazquez-Duhalt, 2000; Fukushima *et al.*, 1978; Bressler *et al.*, 2000). En la naturaleza son pocos los microorganismos que pueden degradar el DBT como fuente de asimilación de azufre; entre ellos se encuentran: *Pseudomonas* (Luo *et al.*, 2003), *Rhodococcus* (Maghsoudi *et al.*, 2001), *Acinetobacter* (Marzona *et al.*, 1997) y *Desulfovibrio* (Bahrami *et al.*, 2001). Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre el mecanismo de desulfuración oxidativa para la asimilación de S por hongos.

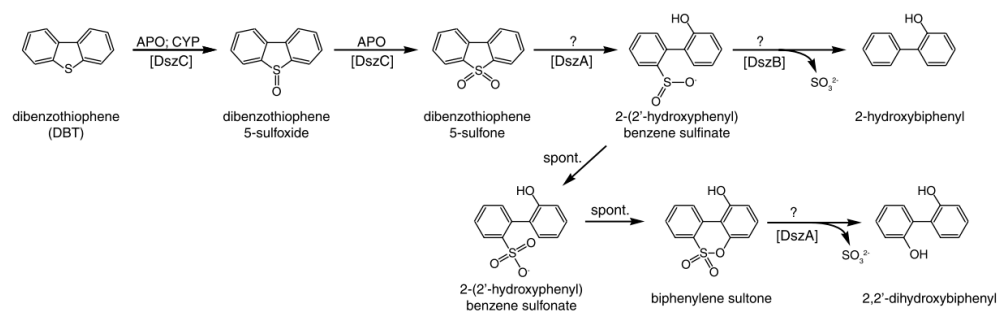


Figura V. 21. Metabolismo propuesto para la desulfuración en hongos (Tomado de Linder, 2018).

Grammothele subargentea LPSC 436 mostró un patrón de respuesta similar frente a cada PAH, aunque con características propias. Los cristales de ANT estimularon su crecimiento en ambos medios de cultivo, siendo notablemente superior en presencia de G. Otro rasgo diferencial expresado por este hongo fue la estimulación producida por el FLU en EM, junto con la pigmentación parda de la colonia. La detección de pigmentación asociada al micelio se puede atribuir a la acción de sistemas enzimáticos oxidativos capaces de sintetizar melaninas fúngicas (Mayer & Staples, 2002), siendo el resultado de los mecanismos fúngicos de defensa ante el estrés oxidativo inducido por xenobióticos (Saparrat *et al.*, 2014). El efecto inhibitorio (menor tolerancia) de este hongo fue observado en presencia de PIR, FEN y DBT, evidenciando una reducción del efecto debido al aporte nutricional del EM.

La estimulación del crecimiento fúngico por los cristales de ANT, observado en ambos hongos, puede estar asociada a la baja solubilidad de este PAH exponiendo a los hongos a concentraciones suficientemente bajas como para inducir un efecto de hormesis.

Es conocido que la estimulación del crecimiento fúngico por hidrocarburos puede estar vinculada a un efecto de hormesis, definido como una respuesta bifásica en los sistemas biológicos, donde a dosis bajas de un compuesto se genera una estimulación, mientras que, a dosis elevadas, se manifiesta una inhibición (Calabrese, 1999).

La inducción hormética ha sido asociada a procesos de biotransformación que pueden involucrar la participación de complejos enzimáticos relacionados con la detoxificación o excreción de compuestos orgánicos biológicamente indeseables, como constituyentes celulares dañados, medicamentos y xenobióticos ambientales (Gems & Partridge, 2008). Zied y colaboradores (2017) reportaron el efecto de hormesis de varios fungicidas sobre diferentes cepas de *Agaricus bisporus*, con un 45% de incremento en el crecimiento micelial respecto al control a una dosis de 5,5 mg.kg⁻¹ de Tebuconazole.

El PIR, FEN y DBT fueron los PAH seleccionados para analizar la potencial capacidad degradadora de ambos hongos sin el suplemento de fuentes nutricionales

adicionales. Los resultados confirmaron la habilidad de *C. rigida* LPSC 232 de tolerar PIR y su inhibición frente a DBT (59%) y FEN (30%). No obstante, aunque también se registró la inhibición del crecimiento de *G. Subargentea* LPSC 436 en presencia de PIR y FEN, este hongo produjo solubilización de ambos PAH. El morfotipo diferenciado del hongo, caracterizado por un micelio más denso y elevado podría ser otro indicio de respuesta frente al PAH. Este resultado sugirió la metabolización del PAH aún en ausencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables en el medio agarizado. Sin embargo, la evidencia bibliográfica (Hobbie, 2004) sobre la capacidad de algunos otros hongos saprótrofos para utilizar al agar del medio de cultivo como una fuente de carbono y energía, abre el interrogante si bajo estas condiciones *G. subargentea* LPS 436 puede cometabolizar al PIR y FEN. No obstante, aunque el cometabolismo de lignina y de otros aromáticos es un proceso paradigmático, existen algunos datos que avalan la habilidad de estos hongos para degradar fenoles en sistemas no cometabólicos (Carabajal *et al.*, 2016). Por lo tanto, estudios adicionales son aún necesarios para poder confirmar los mecanismos que desarrollan estos HPB para degradar y/o tolerar compuestos aromáticos, y cuáles son las mejores estrategias metodológicas para obtener conclusiones que estén libres de artefactos que condicionan los resultados detectados.

Respecto de la capacidad de ambos hongos para degradar mezclas complejas de hidrocarburos, se realizaron ensayos utilizando el barro FP previamente oxidado con persulfato de amonio (FP+PSA). Es hipotetizado que dicho tratamiento oxidativo puede aumentar la biodisponibilidad de las fracciones más pesadas del barro, cuyos resultados son prometedores (ver **Capítulo IV**). Sin embargo, *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 fueron incapaces de crecer sobre un medio agarizado suplementado con una solución acuosa obtenida del barro tratado (FP+PSA), incluso utilizando una serie de diluciones. La ausencia de crecimiento es atribuida al bajo pH del medio debido a la adición del barro oxidado. Sobre la base de la propuesta de Verstraete y colaboradores (1976), que lograron duplicar la biodegradación en un suelo contaminado con gasolina a través del incremento del pH pasando de un valor inicial de 4,5 a 7,4, se consideró la corrección del pH con la aplicación de NaHCO_3 o conchilla, como agentes alcalinizantes.

Ambos hongos lograron crecer en el medio con FP+PSA cuando distintas concentraciones de conchilla fueron incorporadas, siendo el crecimiento miceliar

equivalente al observado sobre el medio agarizado basal. Estos resultados condujeron a la selección de la menor concentración de conchilla para el acondicionamiento del sistema suplementado con el barro FP previamente oxidado (FP+PSA), en los ensayos de bioaumentación fúngica desarrollados en el **Capítulo VI**.

Los ensayos hasta aquí evaluados sugieren la existencia de diferencias fisiológicas entre los hongos estudiados, aun cuando ellos pertenecen al mismo grupo fisiológico y taxonómico (familia: Polyporaceae). Estos resultados parciales revelan una tolerancia selectiva y capacidad degradadora de los aislamientos estudiados frente a los PAH testeados y la necesidad de estudios específicos para una correcta selección de uno de los aislamientos para que sea competente para su uso en estrategias de bioaumentación en matrices contaminada con PAH.

Utilización del fraccionamiento isotópico del C y la síntesis de ácidos grasos en el estudio de las capacidades de hongos seleccionados para metabolizar diferentes PAH

En esta tesis se obtuvieron los perfiles lipídicos de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 cuando se cultivaron en un medio agarizado suplementado con glucosa natural al 0,1%, los que se correspondieron con los citados en la bibliografía para otros hongos de su grupo ecofisiológico (hongos ligninolíticos), registrándose el ácido palmítico y el ácido linoleico como los más abundantes (Nurika *et al.*, 2018; Řezanka *et al.*, 1999). También se identificaron los ácidos esteárico (18:0) y petroselínico (18:1 Δ^6) en los perfiles lipídicos de ambos hongos. Es de destacar la escasa información disponible sobre la existencia de este último ácido graso en hongos, con sólo sugerencias de su participación como molécula de partida en la síntesis de ácidos alquilcíclicos insaturados en HPB por Gutiérrez y colaboradores (2002). No obstante, el ácido petroselínico es abundante como componente de lípidos de reserva en estructuras vegetales de la familia Umbelliferae, incluida la zanahoria, el perejil y el cilantro (Cahoon & Ohlrogge, 1994; Hudson, 1993). Al comparar los perfiles lipídicos de ambos hongos estudiados en el medio suplementado con glucosa, los porcentajes relativos de los ácidos grasos revelaron diferencias, siendo superior en *G. subargentea* LPSC 436

respecto a *C. rigida* LPSC 232 en el caso del ácido esteárico (100%) y del ácido petroselinico (25%).

El análisis del fraccionamiento isotópico del C de los dos ácidos grasos mayoritarios reveló valores negativos tanto para *C. rigida* LPSC 232 como para *G. subargentea* LPSC 436, en concordancia con lo registrado para otros hongos del phylum Basidiomycota en cultivos líquidos axénicos (Hennet *al.* 2002). Es importante destacar el valor de la relación $\delta^{13}\text{C}$ de los ácidos grasos analizados, 0,98 en *C. rigida* versus 0,61 en *G. subargentea*, sugiriendo en este último una mayor incorporación de ^{12}C en el ácido linoleico, lo que está en concordancia con las diferencias observadas en la tasa de crecimiento, aun siendo similares las relaciones entre las proporciones obtenidas para FAME.

En los cultivos de ambos hongos suplementados con glucosa al 0,1%, enriquecida con ^{13}C al 20% respecto al ^{12}C , la presencia de glucosa marcada disminuyó la proporción de ácidos grasos saturados respecto de los monoinsaturados, en respuesta a la aparición del ácido palmitoleico y la disminución relativa de los ácidos palmítico (en *C. rigida*) y esteárico (en *G. subargentea*). La presencia de glucosa ^{13}C en estos cultivos desencadenó un descenso del ácido linoléico, bioindicador de biomasa fúngica, en un 12% para LPSC 232 y un 53% para LPSC 436. Asimismo, se registró un incremento en los niveles relativos del ácido pentadecanoico (15:0) en comparación con lo detectado en sus respectivos controles creciendo sobre glucosa natural. Teniendo en cuenta que un descenso en la relación C/N (considerado mayoritario al isótopo ^{12}C) en el medio genera un aumento relativo de los monoinsaturados en la biomasa de hongos pertenecientes al phylum Mucoromycota (Bernat *et al.*, 2018), el comportamiento observado en LPSC 232 y LPSC 436, aun cuando pertenecen a otro grupo fúngico, podría también estar asociado al descenso en la relación $^{12}\text{C}/\text{N}$ por la suplementación de ^{13}C . Varios antecedentes sugieren una respuesta similar ante las variaciones de la relación C/N en función de los sustratos incorporados. Řezanka y colaboradores (1999) reportaron la detección de ácido palmitoleico en los perfiles lipídicos de los basidiomas de *Stereum hirsutum* y *Trametes versicolor* (Polyporaceae) que fueron diferenciados sobre sustratos leñosos, una condición nutricional limitante en nitrógeno. Fernandez y Cadisch (2003) comprobaron que la dinámica del fraccionamiento isotópico del C durante la

mineralización de glucosa y lignina (entre otros sustratos) por *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* (HPB) es dependiente de la calidad de los sustratos y la proporción de sus nutrientes (C/N) así como la tasa de descomposición de los hongos, lo que a la vez puede estar asociado a diferentes vías metabólicas, y por lo tanto a un destino selectivo del ^{13}C .

Es conocido que las reacciones químicas varían según la naturaleza de los isótopos que conforman los reactivos, y según sus cambios se distinguen dos tipos de efectos isotópicos: cinéticos y termodinámicos. Los primeros se deben a diferencias en la velocidad de una reacción entre distintos isótopos, mientras que los segundos reflejan diferencias en las constantes de equilibrio de reacción.

Ivlev (2001) plantea que los efectos cinéticos de los isótopos $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ son claves para comprender la distribución del ^{13}C en los sistemas biológicos. Este efecto se origina a partir de procesos físicos o químicos irreversibles, y se debe a diferencias en la velocidad de reacción según los distintos isótopos que forman la molécula reactiva. Por ejemplo, en los procesos químicos las moléculas ligeras (^{12}C) reaccionarán más rápidamente que las pesadas (^{13}C). En este sentido, a partir del análisis de la abundancia de ^{13}C natural, Monson y Hayes (1982) evidenciaron un enriquecimiento selectivo de ^{12}C en los C9 y C10 de los ácidos palmítico y oleico de *Saccharomyces cerevisiae* en un cultivo aeróbico como producto del efecto cinético isotópico asociado a la acción de la desaturasa Δ^9 en la síntesis *de novo* de lípidos. De este análisis es posible inferir que la suplementación de glucosa enriquecida con ^{13}C al medio alteró la distribución isotópica de los carbonos de los AG identificados en los cultivos de los hongos estudiados en esta tesis, siendo la aparición del palmitoleico y el enriquecimiento en los AG de C impar el resultado de la modulación de alguna actividad elongasa y/o desaturasa involucrada en la síntesis *de novo* que resultara inhibida bajo esta condición. Equivalentemente, Baillif y colaboradores (2009) estudiaron los mecanismos de elongación y desaturación de ácidos grasos en *Fusarium lateritium* mediante el marcaje con deuterio (^2H) suplementado en diferentes sustratos (agua, glucosa, acetato) y evidenciaron efectos cinéticos del isótopo sobre los pasos de desaturación en los C9 y C12, mediados por las desaturasas Δ^9 y Δ^{12} ; así como también estereoespecificidad de las reductasas en el complejo FAS (*Fatty acids synthase*), que operan durante la incorporación o remoción

de átomos de hidrogeno a lo largo de las cadenas de ácidos grasos. También analizando la síntesis de AG en *Neurospora crassa* a partir de la suplementación de ácido palmítico y linoleico marcados con ^2H y ^{14}C respectivamente en el medio de cultivo, McKeon y colaboradores (1997) propusieron que además de una vía principal de síntesis *de novo*, se activa una vía alternativa que se inicia a partir del ácido palmítico marcado, el cual se elonga a 18:0 y así sucesivamente para sintetizar AG saturados para su almacenamiento y formación de estructura. Estos autores observaron que sólo una pequeña cantidad de 18:0 marcado reingresa a la vía *de novo* para formar 18:1 Δ^9 e identificaron al ácido palmitoleico y a su correspondiente derivado elongado en el C9, el ácido vaccénico (18:1 Δ^{11}) entre los ácidos grasos minoritarios. Lozano Martínez (2016) propone que la presencia de ácido palmitoleico puede estar asociada a i) la formación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) de la serie ω 1, 4 y 7, poco comunes en fosfolípidos de membrana, ii) la acumulación mayoritariamente en los cuerpos lipídicos (*S. cerevisiae*, *Y. lipolytica*), o iii) al tráfico lipídico sin necesidad de acumulación (*Ashbya gossypii*). Todos estos estudios refuerzan la hipótesis del rol del ^{13}C de la glucosa en la activación de una vía alternativa hacia la producción de ácido palmitoleico en LPSC 232 y LPSC 436 con el consecuente desvío del destino del C en la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Este comportamiento conduciría al descenso relativo del ácido linoleico en ambos hongos cuando comparado a su respectivo cultivo sobre glucosa natural (**Figura V. 22**). En este contexto, es posible inferir un efecto cinético isotópico sobre la actividad elongasa en el C9 cuando la glucosa ^{13}C es utilizada por LPSC 436, provocando el descenso relativo de la proporción de ácido esteárico (flecha violenta, **Figura V. 22**) comparado al cultivo sin presencia de glucosa marcada. El efecto cinético isotópico también explicaría el descenso de ácido linoleico procedente del esteárico por la vía principal, con la consecuente relación palmítico:linoleico cercana a 1. De este modo, el ácido esteárico marcado reingresaría en menor proporción a la vía *de novo* para continuar con la desaturación (flecha punteada), lo que concuerda con los cambios detectados en el destino del C.

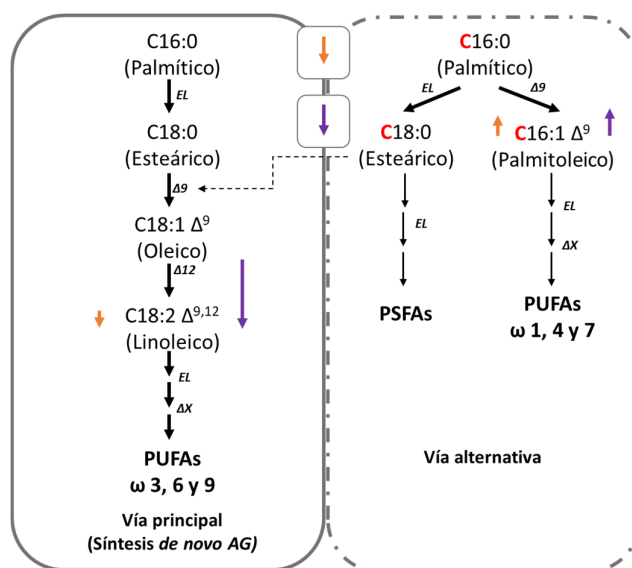


Figura V. 22. Esquema de las vías posibles de síntesis de ácidos grasos en *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 según la naturaleza de los isótopos de C disponibles en la glucosa en medio de cultivo. La vía principal (recuadro de línea continua) representa la síntesis de novo cuando el cultivo se lleva a cabo en presencia de sustratos con ^{12}C . La vía alternativa (recuadro con línea punteada) se activa cuando se incorpora ^{13}C (en rojo) desencadenando la síntesis de AG. EL: elongasas; Δx : desaturasas. Las flechas de menor grosor hacen referencias a posibles productos destino. La flecha punteada indica el reingreso a la vía principal del ácido esteárico desde la vía alternativa, aportando ^{13}C a los siguientes productos. PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados. PSFAs: ácidos grasos polisaturados.

El análisis comparativo de los valores de ^{13}C de los AG entre ambos hongos también reveló que *C. rigida* LPSC 232 presentó valores superiores en medios suplementado con glucosa enriquecida con ^{13}C , lo que indicaría una mayor incorporación del isótopo ^{13}C en la vía principal de síntesis de novo de lípidos. No obstante, existen además otras respuestas fisiológicas que pueden activar los hongos bajo estas condiciones, y que generan las diferencias en el enriquecimiento isotópico, tales como unas relacionadas a las tasas de asimilación de la glucosa y sus productos de degradación. Henn y Chapela (2000) reportaron que las triosas con ^{13}C presentan tasas de asimilación menores que las triosas no marcadas. Futuros estudios podrán revelar la contribución de otros mecanismos de respuesta al ^{13}C .

Cambios en la configuración de los ácidos grasos monoinsaturados, desde una isomería geométrica *cis* a *trans* y la formación de grupos ciclopropilos en la cadena

carbonada de ácidos grasos de fosfolípidos pueden ser ocurrir también debido a variaciones ambientales (Kaur *et al.*, 2005). Los cambios ambientales pueden modificar la actividad desaturasa y generar disturbios en la homeostasis celular alterando la permeabilidad y fluidez de las membranas, así como también en los perfiles lipídicos y en su reserva (Calonne *et al.*, 2014; Verdin *et al.*, 2006). Dichas alteraciones en el metabolismo lipídico, que pueden ser también causadas incluso por agentes activadores de estrés oxidativo, conducirían a la peroxidación de los lípidos, un mecanismo que ha sido también implicado en la degradación de xenobióticos por levaduras (Howlett & Avery, 1997) y hongos filamentosos (Sorkhoh, 1990), incluyendo unos ligninolíticos (Cerniglia & Sutherland, 2010).

Hammel y colaboradores (1992) revelaron en *Phanerochaete crhysosporium* la participación de diferentes estrategias metabólicas para la degradación PAH (componentes intracelulares del sistema P450 y sistemas enzimáticos ligninolíticos extracelulares), siendo la expresión de cada uno de ellos dependiente de la concentración de nitrógeno en el medio. Sobre la base de la respuesta diferencial de los hongos ante la presencia de glucosa enriquecida con ^{13}C , se realizó el análisis del efecto de PAH seleccionados (PIR, DBT y la mezcla de ambos) en el perfil lipídico de cada aislamiento y en la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de los ácidos grasos palmítico y linoleico. Una disminución en el valor de la distribución isotópica δ^{13} en los ácidos grasos analizados por efecto de PAH puede ser de utilidad para inferir la asimilación fúngica de alguno de los PAH testeados.

La **Figura V. 23** muestra el efecto de los PAH testeados sobre la ruta biosintética de diferentes ácidos grasos de *C. rigida* LPSC 232 creciendo en dos medios agarizados conteniendo ya sea glucosa natural o en la presencia de glucosa enriquecida en ^{13}C . Si bien en este trabajo no se discriminó la procedencia de los ácidos grasos, ya sea a partir de lípidos neutros (NLFA) o de fosfolípidos (PLFA), basado en la bibliografía se hipotetizó que el destino final del C en estos cultivos es compatible con la alta relación NLFA/PLFA.

Ha sido reportado en otros cultivos fúngicos creciendo en medio agarizado con glucosa (Larsen *et al.*, 1998) y en respuesta a la adición de glucosa al suelo, una mayor producción de triacilglicéridos (NLFA) como productos de reserva (Bååth & Anderson, 2003; Lundberg, Ekblad, & Nilsson, 2001).

La presencia de PIR en el medio con glucosa natural aumentó en la biomasa del hongo la relación entre ácidos saturados/monoinsaturados, producto del aumento de los ácidos saturados palmítico y esteárico, y de los ácidos palmitoleico y petroselínico. La falta de detección del ácido oleico entre los FAME sugiere alguna inhibición de la ruta principal *de novo* y la activación de rutas alternativas de síntesis de AG. Estas últimas serían las responsables de los ácidos monoinsaturados mencionados, lo que estaría asociado a la formación de PUFAs ω 1, 4 y 7 y posiblemente a la generación de intermediarios involucrados en la síntesis de compuestos alquilitacónicos, unos compuestos implicados en la peroxidación lipídica de compuestos aromáticos por *Ceriporiopsis subvermispora* (Gutiérrez, *et al.*, 2002). Adicionalmente el descenso observado en la relación isotópica (\sim 100%) en los ácidos palmítico y linoleico de *C. rigida* LPSC 232 sugirió la incorporación del ^{12}C procedente del PIR. Las variaciones en los ácidos monoinsaturados podrían deberse a cambios en la actividad desaturasa. Bernat (2018) comprobó que *Umbelopsis isabelina* genera una respuesta al estrés oxidativo en presencia del herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) vinculada a cambios en la actividad desaturasa, una enzima implicada tanto en la síntesis de los lípidos de membrana como de reserva, siendo los AG 18:2 y 18:3 los más susceptibles a la peroxidación lipídica.

La presencia de PIR en el medio de glucosa enriquecida con ^{13}C , incrementó notablemente la relación saturados/monoinsaturados de los AG de *C. rigida* LPSC 232 por el aumento de los saturados y el descenso del ácido palmitoleico, sin variaciones en el ácido petroselínico. Además, la adición de PIR redujo la incorporación de ^{12}C en los AG palmítico y linoleico obteniéndose un valor de $\Delta^{13}\text{C}$ de 13% y 16% respectivamente para cada AG, comparado con el control en ausencia del PAH. Por lo tanto, la presencia de glucosa ^{13}C reduciría la habilidad de co-metabolizar PIR, inhibiendo vías metabólicas alternativas, lo que indicaría una preferencia del isotopo ^{12}C sobre el ^{13}C .

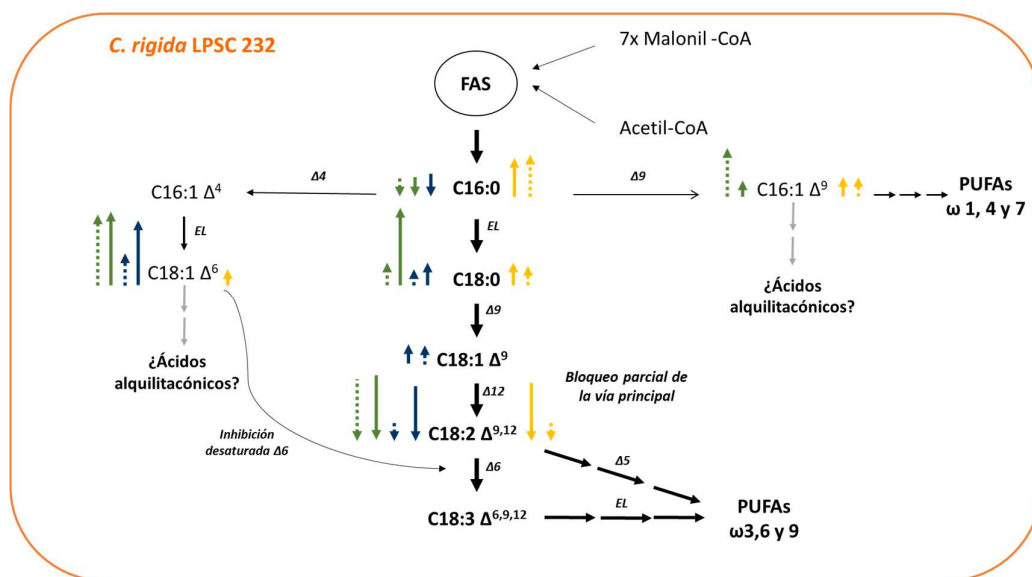


Figura V. 23. Esquema de la ruta biosintética de ácidos grasos para *C. rigida* LPSC 232 y su respuesta frente a diferentes PAH testeados en cultivos agarizados conteniendo glucosa con ^{12}C o ^{12}C - ^{13}C . Adaptado de Ji y colaboradores, 2014, para *Mortierella alpina*. FAS: complejo enzimático sintasa de ácidos grasos de sus siglas en inglés Fatty Acids Synthase. EL: Enzima elongasa. Δx : Enzimas desaturasas. Las flechas en negrita indican la vía principal de síntesis de los ácidos poliinsaturados (PUFAs) $\omega 3, 6$ y 9 , mientras que las finas muestran las vías alternativas. Las flechas en gris indican el destino hipotético de algunos AG monoinsaturados. Las flechas a la izquierda de un intermediario determinado y en color indican el efecto del pireno (naranja), DBT (azul) o mezcla de ambos (verde) en medio de cultivo, con glucosa ^{12}C (línea continua) o con glucosa ^{13}C al 20% (línea punteada) sobre la proporción (aumenta o disminuye) de los ácidos grasos del total extraído con respecto a su control sin PAH. El tamaño de estas flechas es relativo entre el efecto de PAH sobre el mismo AG.

Un comportamiento diferente fue apreciado cuando se incorporó DBT al cultivo de *C. rigida* tanto en glucosa natural como cuando estuvo enriquecida en ^{13}C , registrándose una disminución en la relación saturado/monoinsaturados. El incremento de las proporciones relativas en el ácido petroselínico, acompañado del aumento del ácido esteárico y la presencia del ácido oleico, sugieren que el DBT desencadenaría la sobreactivación de la vía alternativa del ácido petroselínico con la consecuente reducción en la síntesis de AG por la vía principal en presencia de glucosa natural. A diferencia de lo observado con PIR, la presencia de DBT en el medio con glucosa natural provocó la reducción del ácido pentadecanoico (15:0) hasta un valor no detectable. Este

comportamiento sugiere algún paso inhibitorio en la producción de los ácidos grasos de cadena media como el de 12:0 y 14:0. Sin embargo, siendo ambos ácidos grasos precursores del ácido petroselínico, otra vía posiblemente fuera activada involucrando la desaturasa $\Delta 4$ que actúa sobre el ácido palmítico, y la enzima elongasa que adiciona 2C conduciendo a la formación del ácido petroselínico (Cahoon & Ohlrogge, 1994). El incremento del ácido oleico también evidencia la alteración producida por el DBT en la vía principal de la síntesis lipídica de *novo* y la vía del ácido petroselínico en *C. rigida* LPSC 232. Los resultados del fraccionamiento isotópico en cultivos creciendo con glucosa natural revelaron una mayor incorporación de ^{13}C en el ácido palmítico (186%) en comparación con el linoleico (62%), evidenciando un efecto inhibitorio del DBT. Fue posible correlacionar esta respuesta con el cambio macroscópico observado en el cultivo de *C. rigida*, tanto en glucosa como en EM donde el DBT produjo una evidente disminución del diámetro de la colonia fúngica. Por otro lado, en medio con glucosa enriquecida con ^{13}C , el DBT produjo una incorporación de ^{12}C sólo en el ácido linoleico sugiriendo que el efecto isotópico de la glucosa ^{13}C ejerció una mayor interferencia sobre la síntesis lipídica que el DBT, disminuyendo así la vía alternativa del petroselínico, lo que no podría sugerir la asimilación del PAH por el hongo.

El efecto observado al cultivar *C. rigida* en presencia de la mezcla PIR y DBT sobre la síntesis lipídica puede ser explicado como una respuesta combinada del efecto individual de los mismos. En medio con glucosa natural, el ácido linoleico disminuyó en un 58% y aumentó el ácido petroselínico en un 98%, sugiriendo un efecto sinérgico en la combinación. Como se mencionó anteriormente, la detección del ácido petroselínico estaría revelando la inhibición de la vía principal. El incremento de este ácido se correspondería con la respuesta observada ante el DBT, mientras que la presencia del ácido palmitoleico podría ser atribuida al efecto producido por el PIR. En esta condición estarían activas las 3 vías de síntesis lipídica.

Similarmente a lo observado en presencia de DBT en glucosa natural, los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los AG sugirieron que la mezcla de PIR+DBT promueve la incorporación de ^{13}C por sobre los PAH, favoreciendo la incorporación del isotopo pesado a los AG destinos. En presencia de la glucosa enriquecida con ^{13}C , el mayor cambio respecto de la condición anterior se observó en el leve aumento del ácido esteárico y el incremento en el ácido

palmitoleico, lo que indicaría una mayor participación de los efectos cinéticos isotópicos sobre los AG. El fraccionamiento isotópico reveló un enriquecimiento diferencial de ^{12}C en el linoleico. Este efecto fue similar a lo observado en DBT, poniendo en evidencia su efecto tóxico.

Sobre la base de los datos aportados por el estudio del perfil lipídico y el fraccionamiento isotópico en *G. subargentea* LPSC 436, se propone para describir los efectos de los PAH individuales y su combinación el siguiente esquema (**Figura V. 24**):

La presencia de PIR en medio con glucosa natural disminuyó la relación saturado/monoinsaturado de los AG del hongo debido al descenso de los ácidos palmítico y esteárico y al incremento del ácido petroselínico con la aparición del ácido palmitoleico. Estos dos últimos ácidos grasos monoinsaturados son precursores de los ácidos alquilacíclicos asociados a degradación de xenobióticos por mecanismos de peroxidación lipídica (Gutiérrez *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que el pireno desencadena una respuesta diferencial en *G. subargentea*, activando dos vías alternativas vinculadas a ácidos monoinsaturados, y bloqueando parcialmente la vía principal desde las primeras reacciones. Los resultados del fraccionamiento isotópico revelaron la incorporación de ^{12}C , siendo mayor para el ácido palmítico (~36%) que para el linoleico (~12%). Sin embargo, este porcentaje sería mucho menor que el observado para *C. rigida*, sugiriendo que en condiciones naturales *G. subargentea* asimilaría menor cantidad de ^{12}C del PIR.

En presencia de glucosa enriquecida con ^{13}C se observó un incremento del doble en la proporción del ácido linoleico. Posiblemente la presencia del isótopo pesado desencadenó una rápida incorporación de éste a los ácidos palmítico y linoleico como respuesta a un mayor estrés, en relación con lo observado en los ensayos de tolerancia. Por otra parte, el ácido palmítico estaría destinado a la síntesis *de novo* y a la vía petroselínica, dado que no se detectó ácido palmitoleico. Esto indicaría una preferencia sobre el isótopo ^{13}C de la glucosa en lugar del ^{12}C del hidrocarburo.

El efecto del DBT en medio con glucosa natural también desencadenó una disminución en la relación saturados/monoinsaturados, producto del incremento del ácido palmitoleico y petroselínico, siendo este último posible responsable de la interferencia en la síntesis de linoleico, expresado por un descenso del 26%.

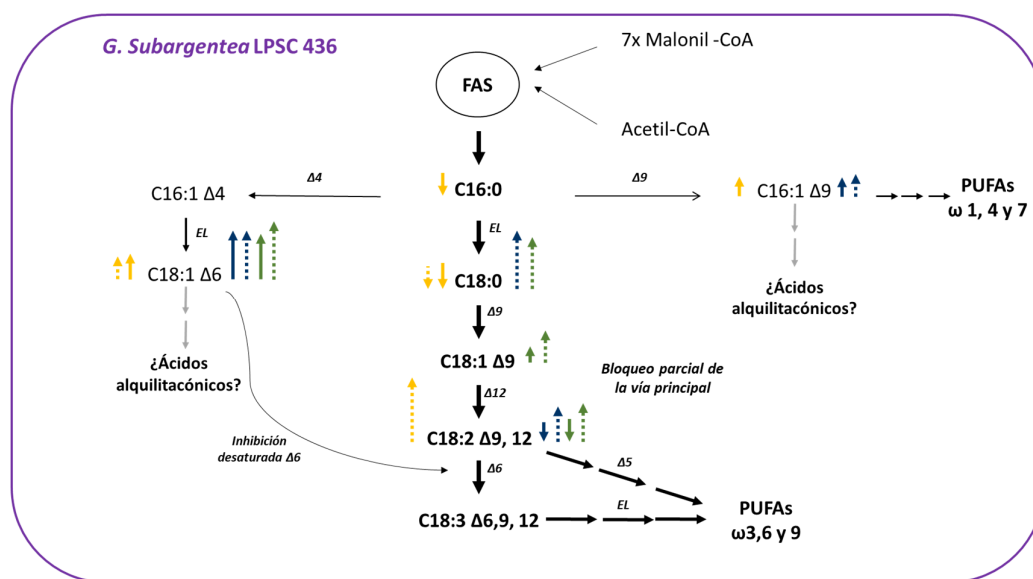


Figura V. 24. Esquema de la ruta biosintética de ácidos grasos para *G. subargentea* LPSC 436 y el efecto de los PAH testeados. Adaptado de Ji y colaboradores, 2014, para *Mortierella alpina*. FAS: complejo enzimático sintasa de ácidos grasos de sus siglas en inglés FattyAcidsSynthase. EL: Enzima elongasa. Δx: Enzimas desaturasas. Las flechas en negrita indican la vía principal de síntesis de los ácidos poliinsaturados (PUFAs) ω3, 6 y 9, mientras que las finas muestran las vías alternativas. Las flechas en gris indican el destino hipotético de los AG monoinsaturados. Las flechas en color indican el efecto del pireno (naranja), DBT (azul) o mezcla de ambos (verde) en medio de cultivo, con glucosa ^{12}C (línea continua) o con glucosa ^{13}C al 20% (línea punteada) sobre la proporción (aumenta o disminuye) de los ácidos grasos del total extraído con respecto a su control sin PAH. El tamaño de las flechas es relativo entre PAH del mismo AG.

A diferencia de lo observado en PIR, el fraccionamiento isotópico en glucosa natural indicó la incorporación de ^{13}C de manera similar en ambos ácidos grasos (~19% y 17%), sugiriendo que *G. subargentea* no utilizaría el ^{12}C del DBT. Sin embargo, en presencia de glucosa enriquecida con ^{13}C , la respuesta es completamente distinta, reactivando todas las vías de síntesis y la incorporación de ^{12}C (glucosa/DBT), siendo destino principal del C el ácido palmítico. Si bien no es posible concluir si bajo las condiciones del experimento se asimiló el PAH, es claro que el DBT desencadenó una respuesta distinta, reactivando las diferentes vías de síntesis alternativas superando el efecto isotópico del ^{13}C de la glucosa.

La mezcla de pireno PIR y DBT, reveló un comportamiento similar a la respuesta observada frente a DBT excepto que, en lugar de activarse la vía del ácido palmitoleico,

el ácido oleico aparece como posible precursor del linoleico en la vía principal hacia PUFAs y el ácido petroselínico iría posiblemente a la formación de ácidos alquilacónicos. El aumento del fraccionamiento isotópico en glucosa natural producido por efecto de la combinación de los PAH condujo a la incorporación de ^{13}C sólo en el ácido linoleico (~22%), sugiriendo la no asimilación de los PAH en esta condición.

El análisis comparativo de ambos hongos permitió apreciar variaciones en la selección de la fuente de carbono asimilable y el destino de ésta en su biomasa cuando ellos crecen en presencia de glucosa natural. Ante la presencia de PAH, se concluye que ambos hongos responden de manera diferencial frente a PIR, DBT y su combinación activando diferentes rutas alternativas y bloqueando parcialmente la vía *de novo* AG, dependiendo de la presencia del isótopo ^{13}C . Si bien ambos hongos fueron tolerantes a los cristales de PIR en medio con glucosa, los resultados sugieren que PIR induce en *C. rigida* LPSC 232 (en condición natural y con glucosa enriquecida en ^{13}C) una ruta alternativa hacia la síntesis del ácido graso monoinsaturado de 16C (palmitoleico) y disminución del ácido linoleico como posible respuesta a la detoxificación del pireno, corroborado por la incorporación de ^{12}C , principalmente en presencia de glucosa rica en ^{13}C . Por otro lado, *G. subargentea* LPSC 436 inactivaría parcialmente las primeras reacciones de síntesis *de novo*, activando principalmente la ruta del petroselínico en ambas condiciones, invirtiéndose el destino del C en presencia de glucosa enriquecida en ^{13}C , incorporando este último isótopo, principalmente a ácido palmítico.

La presencia del DBT, produciría en *C. rigida* LPSC 232 el bloqueo parcial de la vía principal favoreciendo la ruta petroselínica. La mayor incorporación de ^{13}C principalmente al ácido linoleico se correlaciona con su menor tolerancia a cristales de DBT. En cambio, en LPSC 436 se expresarían las dos rutas alternativas de monoinsaturados incorporando menor cantidad de ^{13}C al ácido linoleico en la condición con glucosa enriquecida en ^{13}C .

La toxicidad del DBT se asocia a la presencia de un átomo de azufre en su estructura, lo que podría interferir o inhibir ciertas enzimas responsables de la síntesis lipídica, principalmente las desaturasas $\Delta 9$ y 12. Según Qiao y colaboradores (2015) la etapa catalizada por las desaturasas $\Delta 9$ es un punto de control clave en la acumulación de triglicéridos, aunque existen diferentes especificidades en las distintas desaturasas, las cuales catalizan reacciones específicas en la generación de un ácido graso específico

sobre otro (Wilson *et al.*, 2004). El DBT habría inhibido principalmente la síntesis del ácido linoleico para ambos hongos en la condición de cultivo con glucosa natural, y por lo tanto conduciendo al consecuente incremento en la acumulación de ácido petroselinico, considerado metabolito hacia la ruta final de ácidos eicosanoides (Weber *et al.*, 1997).

Toda esta información constituye una base para el estudio de la metabolización de hidrocarburos policíclicos aromáticos por cultivos de hongos ligninolíticos seleccionados a través de la utilización indirecta del fraccionamiento isotópico del C de la glucosa natural, en paralelo a cultivos control con este sustrato fácilmente asimilable y en presencia de glucosa enriquecida en ^{13}C y su acople con la identificación y cuantificación de AG específicos sintetizados por estos hongos para cuantificar su respuesta frente a la exposición a diferentes hidrocarburos recalcitrantes. Esto permitió identificar la contribución relativa y activación de las rutas metabólicas involucradas en la degradación y/o mineralización de los compuestos tóxicos.

Efecto del PIR y del FP sobre la biomasa fúngica y el potencial de los estimadores de crecimiento como marcadores de respuestas a la contaminación

Niemenmaa y colaboradores (2008) testearon 4 especies de HPB: *Phlebia radiata*, *Panerochaetechrysosporium*, *Physisporinusrivulosus*, *Ceriporiopsis subvermispora* y 2 especies de HPP *Gloeophyllum trabeum* y *Poria placenta* en medio líquido ADMS con bajo contenido de nitrógeno (2 mM) y glucosa (0.1%) y los resultados revelaron una correlación moderadamente baja entre ergosterol y biomasa seca ($r^2= 0.384$) entre las especies. Resultados semejantes se obtuvieron en *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 en cultivos líquidos con MML suplementado con glucosa al 1% y ME2 en presencia de PIR y barro FP. Los resultados del crecimiento de ambos hongos en este estudio revelaron que el medio de cultivo ME2 favorece la síntesis de ergosterol durante 14 días. *C. rigida* LPSC 232 mostró una correlación altamente positiva ($r^2= 0,91$) entre la biomasa estimada por peso seco y cantidad de ergosterol en presencia de PIR, a pesar de que la cantidad de ergosterol disminuyera en presencia del PAH. Mientras que fue moderadamente positiva ($r^2=0,59$) cuando los cultivos fueron suplementados con barro FP, sin registrarse cambios en el contenido de ergosterol.

Barajas-Aceves *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares con *Corioloopsis gallica* creciendo en cultivos líquidos con GMY (glucosa, extracto de malta y levadura en presencia de fungicidas y metales pesados como Cu, Zn y Cd). Los autores observaron la disminución de la cantidad de ergosterol por biomasa seca en un 57% sólo en la mayor concentración de fungicida (25 mg.kg⁻¹). En el caso de *G. subargentea* LPSC 436, las correlaciones fueron diferentes en presencia de PIR ($r^2=0,33$) y FP ($r^2=0,52$), observándose una disminución del ergosterol sólo en presencia del residuo, sin cambios en la biomasa por peso seco. Estas diferencias podrían deberse a que el barro FP es una mezcla compleja con diferentes compuestos (hidrocarburos alifáticos, aromáticos, resinas, asfaltenos y metales pesados) que afectan diferencialmente al crecimiento del hongo, y consecuentemente a la síntesis y acumulación de ergosterol. Como fue mencionado en la sección anterior, el metabolismo lipídico es sensible a los cambios ambientales y a la presencia de xenobióticos. La naturaleza química (lipídica) del ergosterol sugiere indagar si la existencia o no de correlación entre biomasa por peso seco y ergosterol puede ser debido también a la dependiente de las estrategias fisiológicas que cada hongo desencadena ante el estrés ocasionado por la matriz contaminante. Si bien muchos autores correlacionan al ácido linoleico con la cantidad de ergosterol (Miller *et al.*, 1998; Gessner & Newell, 2002; Klamer & Bååth, 2004), los resultados obtenidos indican que el efecto del PIR y FP sobre el contenido de ergosterol y la biomasa por peso seco difiere entre los hongos estudiados, lo que estaría asociado a sus respuestas fisiológicas específicas y a cambios consecuentes en el reacondicionamiento y destino del C en los principales ácidos grasos del metabolismo lipídico de cada uno de ellos.

Remoción y mineralización de PAH

C. rigida LPSC 232 logró remover el 52% del pireno luego de dos semanas de incubación respecto de su control abiótico en cultivo líquido ME2. Esto se corresponde con los resultados obtenidos de numerosos estudios sobre la capacidad de los hongos de la madera en mineralizar PAH de 3 a 4 anillos aromáticos, como fenantreno y pireno en cultivos líquidos y sólidos con rastrojo de trigo (Anastasi *et al.*, 2009; Bezalel *et al.*, 1996; Sack *et al.*, 1997a). Aunque la capacidad de remover y mineralizar PAH depende

de muchos factores, la elección de un medio rico que aporte sustratos fácilmente asimilable como co-sustrato incrementar el proceso, favoreciendo así la degradación de PAH de alto peso molecular (Lange *et al.*, 1996; Novotný *et al.*, 1999; Sayara *et al.*, 2010).

En cuanto a los resultados de biomasa por peso seco, no se registraron diferencias significativas respecto de su control en ausencia de PIR siendo concordantes con lo previamente expuesto. A diferencia de lo observado en estudios realizados con otros hongos descomponedores de la madera (Sack *et al.*, 1997b), la ausencia de pireno en la solución conteniendo acetato de etilo obtenida cuando la biomasa del hongo fue expuesto a extracción, descarta la participación de mecanismos de adsorción del hidrocarburo en el sistema de este cultivo.

Estos resultados junto con los cambios en la proporción isotópica de ciertos ácidos grasos del hongo detectados cuando éste es crecido en presencia de pireno, indicarían que la depleción del ^{13}C se atribuye a la incorporación de ^{12}C del pireno como fuente de carbono por cometabolismo, dado que en presencia de MML no se registró crecimiento fúngico.

Efecto del barro FP sobre la actividad respiratoria de los hongos

La actividad respiratoria de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 respondió diferencialmente a la presencia de barro FP como matriz fuente de hidrocarburos, tanto en presencia como en ausencia de la microbiota nativa.

La capacidad de mineralización de muchos hongos en cultivos líquidos difiere respecto de la determinada en microcosmos con suelo contaminados debido a la baja capacidad de colonización (Anastasi *et al.*, 2009; Covino *et al.*, 2016; Novotný *et al.*, 1999). La actividad metabólica de los HPB también depende de su capacidad para colonizar el soporte utilizado para su aplicación en estrategias de bioaumentación. En este trabajo, la selección de rastrojo de trigo como soporte de crecimiento de los hongos fue clave, permitiendo su inclusión en los microcosmos de FP.

La significativa producción de CO_2 en los microcosmos con barro FP estéril transcurridos 28 días después de la inoculación con *C. rigida* LPSC 232 sugiere la viabilidad y actividad del hongo en el sistema, con una promisoriosa estrategia de

incorporación del rastrojo colonizado con el hongo y su éxito como agente de mineralización aun cuando esté en contacto con el barro.

En cambio, aunque que no se observaron diferencias macroscópicas en la colonización de *G. subargentea* LPSC 436 en rastrojo por la presencia o ausencia del FP, los resultados evidenciaron la ausencia de actividad mineralizante en microcosmos de FP estéril.

Estas diferencias según el hongo analizado sugieren que los compuestos derivados del residuo actuaron como activadores de la actividad respiratoria de LPSC 232. No obstante, este comportamiento no se observó en presencia de microbiota nativa. Tampoco se observaron cambios bajo esta condición en los sistemas inoculados con *G. subargentea* LPSC 436.

El éxito del bioaumentación con organismos exógenos no está garantizado, especialmente el caso de hongos ligninolíticos, cuya hábitat natural no es el suelo (Borràs *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, se comprobó la actividad mineralizante de LPSC 232 en sistemas de cultivo axénico como son los microcosmos conteniendo FP cuando el hongo fue aplicado como una suspensión miceliar sobre el rastrojo. La similitud de CO₂ producido en los sistemas inoculados con el hongo conteniendo FP con su microbiota nativa comparado a unos con FP estéril sugiere un posible efecto inhibitorio frente a la comunidad nativa de bacterias y hongos donde estos últimos están adaptados y pueden limitar el éxito del hongo exógeno durante las interacciones con ellos. No obstante, no es posible descartar el efecto producido por la esterilización sobre la composición química del barro, eliminando compuestos tóxicos para la actividad inicial del hongo.

Numerosos factores bióticos pueden influir en la efectividad de los procesos de bioaumentación, siendo tal vez determinante el éxito de las relaciones de interacción entre los microorganismos autóctonos y el alóctono como antagonismo, depredación, sinergismo o competencia por la fuente de carbono y otros recursos limitantes (Lang *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2002).

V.5 Conclusiones

✓ Existe variabilidad en la habilidad de diferentes hongos, incluyendo a *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436, para tolerar PAH, lo que está a la vez condicionado también por la composición de los medios de cultivos utilizados. Bajo condiciones de cultivo en medio agarizado, *G. subargentea* LPSC 436 expresa una habilidad superior para tolerar una mezcla de PAH, seguido de *G. sepiarium* LPSC 735 y *C. rigida* LPSC 232, siendo este último susceptible a los efectos inhibitorios de los PAH.

✓ *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 toleran los componentes solubles del barro FP y FP oxidado, tras el ajuste de pH con conchilla.

✓ Los hongos *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 responden diferencialmente a la naturaleza isotópica de la glucosa durante su crecimiento. La suplementación de PAH, como PIR y/o DBT, alteran el metabolismo *de novo* implicado en la síntesis de ácidos grasos, activando rutas alternativas hacia la síntesis de ácidos monoinsaturados (palmitoleico y/o petroselínico) e inhibiendo enzimas específicas como la desaturasa Δ^9 .

✓ Bajo condiciones de cometabolismo, *C. rigida* LPSC 232 utiliza al PIR como fuente de carbono.

✓ Diferentes métodos estándares utilizados en la estimación de biomasa fúngica son útiles en estudios de cultivos de hongos expuestos a xenobióticos.

✓ *C. rigida* LPSC 232 es un hongo capaz de mineralizar componentes del barro FP bajo condiciones de fermentación en estado sólido.

✓ La inoculación de los hongos *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 a sistemas conteniendo el barro FP no altera la actividad de los microorganismos autóctonos del residuo.

Capítulo VI

Micorremediación y su combinación con el tratamiento oxidativo



VI Micorremediación y su combinación con el tratamiento oxidativo

El objetivo de la aplicación de estrategias combinadas es potenciar las ventajas y minimizar las limitaciones de las técnicas individuales. La aplicación de un pre-tratamiento con oxidantes químicos ha sido demostrada que mejora la eficiencia de la degradación de mezclas de hidrocarburos complejos (Mora *et al.*, 2014; Martínez-Pascual *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2020).

La inoculación de hongos causantes de la pudrición blanca de la madera ha sido ampliamente estudiada como estrategia de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Sutherland *et al.*, 1991; Bezalel *et al.*, 1996; Sack *et al.*, 1997a; Carrera, 2010; Fernández Lladó, 2012). Sin embargo no ha sido explorada sobre matrices complejas como los barros oleosos expuestos a un oxidante.

Los hongos en una matriz contaminada con xenobióticos, además de detoxificarlos y/o degradarlos, deben superar ciertos factores limitantes (como por ejemplo las propiedades de la matriz, la toxicidad relativa de los contaminantes mayoritarios y sus mezclas, entre otros) que deben ser monitoreados antes de establecer si son relevantes en el proceso de biorremediación.

El éxito del bioaumento fúngico en un suelo es dependiente principalmente de la supervivencia del hongo inoculado, de su capacidad de colonización y su relación con la microbiota autóctona (Gadd, 2001; SaSek, 2003; Baldrian, 2008). En este sentido, el rastrojo de trigo fue seleccionado como soporte lignocelulósico y sustrato cometabolizable más adecuado para el crecimiento de los hongos de pudrición parda y blanca (Bumpus & Aust, 1987; Morgan *et al.*, 1993; Ballaminut *et al.*, 2014).

En el presente capítulo se desarrollan los siguientes objetivos:

- *Evaluar la capacidad degradadora de G. subargentea LPSC 436 y G. sepiarium LPSC 735 en cultivo individual o dual, sobre un suelo contaminado artificialmente con fenantreno en presencia y ausencia de microbiota nativa.*
- *Evaluar la capacidad degradadora de C. rigida LPSC 232, sobre un suelo contaminado artificialmente con fenantreno en presencia y ausencia de microbiota nativa.*
- *Evaluar la capacidad degradadora de C. rigida LPSC 232 y G. subargentea LPSC 436 sobre un suelo contaminado artificialmente con un barro petroquímico API (FP), presencia de microbiota nativa.*
- *Evaluar el efecto de los tratamientos combinados de oxidación con persulfato de amonio (PSA) y bioaumento fúngico con hongos ligninolíticos sobre la degradación de un barro petroquímico API (FP) en presencia y ausencia de microbiota nativa.*

VI.1 Capacidad degradadora de *G. subargentea* LPSC 436 y *G. sepiarium* LPSC 735 en suelo contaminando artificialmente con fenantreno

VI.1.1 Cultivos en microcosmos en condición axénica

La concentración del FEN residual en los microcosmos en condición axénica fue monitoreada a los 0, 30, 60, 90 y 120 días de incubación. En la

Figura VI. 1 se puede observar que durante los primeros 30 días no se registraron cambios significativos entre los tratamientos inoculados con uno o con los dos hongos, respecto del control sin inocular. Luego de los 60 días se detectó una remoción significativa de FEN del 31-41% en presencia de *G. subargentea* LPSC 436 y de *G. sepiarium* LPSC 735, en cultivo individual y dual respecto al control.

Luego de 90 días *G. sepiarium* LPSC 735 se diferenció significativamente de *G. subargentea* LPSC 436 (22%) y del cultivo dual (26%) alcanzando a remover un 83,5% del FEN en suelo, continuando hasta alcanzar casi la total de remoción del hidrocarburo (98,5%) a los 120 días de incubación.

El cultivo dual removió un 77,41% del FEN a los 120 días, sin revelar diferencias significativas respecto de sus comportamientos individuales.

A diferencia de lo observado en cultivo agarizado (**Capítulo V**) donde el cultivo dual entre *G. subargentea* LPSC 436 y *G. sepiarium* LPSC 735 generó interacción entre los micelios, en el rastrojo inoculado no se observó dicho comportamiento.

La forma de inoculación del rastrojo permitió apreciar, luego de la incubación, la colonización manteniendo el aspecto característico de cada hongo hasta alcanzar la zona de contacto. La aparente falta de interacción entre los micelios fue evidenciada a través de la posibilidad de separar manualmente los rastrojos inoculados. Así mismo no se observó integración del cultivo con el suelo contaminado en ninguna de las condiciones ensayadas.

Los resultados sugieren que la inhibición de la capacidad de remoción de *G. sepiarium* LPSC 735 en cultivo dual, puede ser atribuida a mecanismos competitivos temporales dados entre ambos hongos.

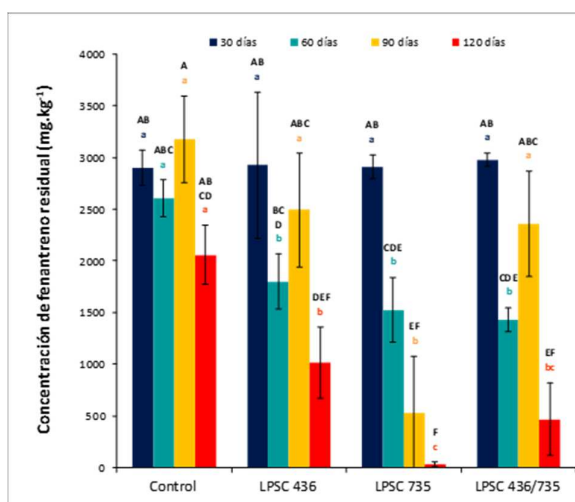


Figura VI. 1. Concentración de fenantreno residual (mg.kg^{-1}) de *G. subargentea* LPSC 436 y *G. sepiarium* LPSC 735 (individual y dualmente), a los 30, 60, 90 y 121 días en condiciones axénicas. Las barras representan las medias y desviaciones estándares ($n=3$). Concentración inicial 2500 mg.kg^{-1} . Las letras minúsculas de igual color representan significancia entre tratamientos a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p < 0,05$)). Las letras mayúsculas representan la variación de FEN residual entre las variables tratamiento y tiempo (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

VI.1.2 Cultivos en microcosmos en presencia de la comunidad nativa del suelo

La concentración de FEN residual en los microcosmos en condiciones no estériles se monitoreó a los 0, 30, 60 y 90 días. En la **Figura VI. 2** se muestran los resultados obtenidos.

Luego de 30 días, la inoculación individual de los hongos estimuló significativamente la remoción de FEN respecto del control, alcanzando a remover un 76% del PAH en ambos hongos.

La co-inoculación produjo una remoción tardía del fenantreno, alcanzando el 92% respecto de la concentración inicial luego de los 90 días de tratamiento.

Al final del ensayo, no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con bioaumentación fúngica respecto del control con la microbiota nativa.

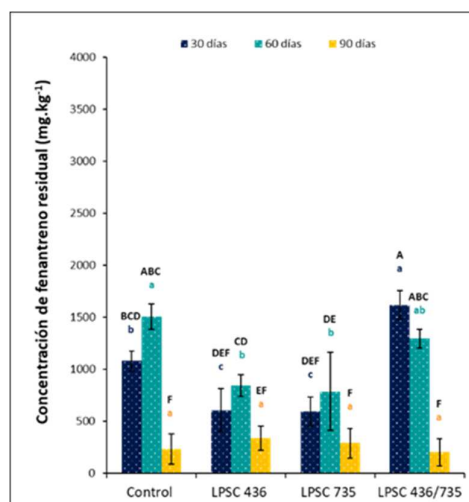


Figura VI. 2. Concentración de fenantreno residual en microcosmos inoculados con los hongos LPSC 436 y LPSC 735, en condiciones NO estériles. Se representan las medias y desviaciones estándares ($n=3$). Las letras minúsculas de igual color representan la variación de FEN residual entre tratamientos a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p < 0,05$)). Las letras mayúsculas representan la variación de FEN residual entre las variables tratamiento y tiempo (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

Los resultados sugieren un efecto de remoción temprana debido al bioaumentación fúngica individual. De acuerdo con lo observado en los cultivos en microcosmos en condición axénica, los mecanismos competitivos temporales atribuidos a la co-inoculación habrían inhibido tanto la capacidad de remoción de fenantreno del cultivo dual, como de la microbiota nativa.

VI.2 Capacidad degradadora de *C. rigida* LPSC 232 en suelo contaminando artificialmente con fenantreno

VI.2.1 Cultivos en microcosmos en condición estéril y no estéril

La concentración de fenantreno residual se monitoreó a los 0, 30, 60 y 90 días en los microcosmos axénicos y no estériles. La concentración inicial de FEN fue de 2952 ± 655 mg.kg⁻¹.

Como se observa en la **Figura VI. 3** la remoción de FEN en presencia de *C. rigida* LPSC 232 en suelo contaminado artificialmente fue significativa en condiciones axénica luego de los 90 días de incubación respecto de su control, alcanzando a remover un 55% del hidrocarburo.

En condiciones no estériles, no se registraron diferencias significativas en la remoción del fenantreno por bioaumentación fúngica con *C. rigida* LPSC 232 respecto del Control, a ninguno de los tiempos muestreados.

El bioaumentación alcanzó a remover un 99,7% días y el Control un 98,7%, respecto de la concentración inicial a los 90 días.

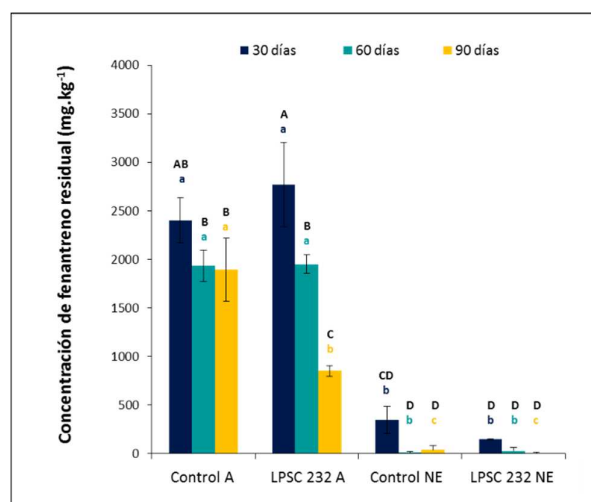


Figura VI. 3. Concentración de fenantreno residual (mg.kg⁻¹) de *C. rigida* LPSC 232 en condiciones axénicas (A) y no estériles (NE). Se representan las medias y desviaciones estándares (n=3). Las letras minúsculas de igual color representan la significancia entre tratamientos a igual tiempo (ANOVA una vía). Las letras mayúsculas representan la variación de FEN residual entre los tratamientos a distinto tiempo (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)) respecto de la concentración inicial de FEN (2952 ±655 mg.kg⁻¹).

La mayor actividad degradadora apreciada en el control puede ser atribuida a un efecto de bioestimulación por parte del soporte lignocelulósico sobre la comunidad

nativa del suelo. Dicha actividad no sería inhibida en ningún momento del ensayo por efecto del bioaumentación con *C. rigida* LPSC 232.

VI.3 Efecto de los hongos LPSC 232 y LPSC 436 en microcosmos de suelo contaminado con barro de fondo de pileta API (S-FP)

VI.3.1 Efecto sobre la remoción de HT del barro

La concentración final de hidrocarburos totales (HT) de los microcosmos de suelo contaminados artificialmente con barro petroquímico al 10% (S-FP) fue determinada a los 30 y 90 días (**Figura VI. 4**).

Luego de 30 días, el tratamiento control (BR) registró una disminución del 21% de HT respecto de la concentración inicial ($11136 \pm 1022 \text{ mg. kg}^{-1}$); el tratamiento bioestimulado (BE) con rastrojo de trigo no inoculado (estéril) se diferenció significativamente de los tratamientos, alcanzando el 81% de degradación. Al final del monitoreo, el tratamiento control (BR) alcanzó un 92% de degradación de HT, diferenciándose, junto con BE, de los tratamientos fúngicos de manera significativa.

La presencia del cultivo de ambos hongos produjo una menor eliminación de HT, durante todo el tratamiento. Así mismo, un comportamiento diferencial entre ambos hongos fue observado. *G. subargentea* removió un 53% de HT a los 30 días, superando la actividad de remoción de *C. rigida* LPSC 232 (36%). Luego de los 90 días, en presencia de *C. rigida* continuó disminuyendo la concentración de HT (63%). Los resultados sugieren que la presencia del soporte lignocelulósico ejerce un efecto estimulador sobre la microbiota nativa promoviendo una rápida eliminación inicial de los HT (30 días de tratamiento).

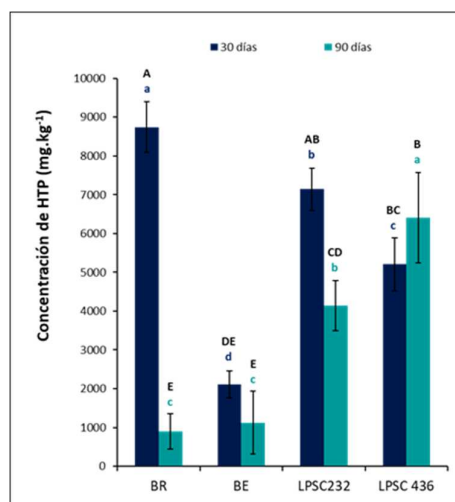


Figura VI. 4. Concentración de hidrocarburos totales (mg.kg⁻¹) en microcosmos de suelo contaminado con barro petroquímico al 10%. Los tratamientos corresponden al control biorremediación (BR), bioestimulación con rastrojo sin inocular (BE) y bioaumentación (BA) con *C. rígida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436). Se representan las medias y desviaciones estándares ($n=3$). Las letras minúsculas de igual color representan la significancia entre tratamientos a igual tiempo (ANOVA una vía). Las letras mayúsculas representan la variación de HT entre las variables tratamiento y tiempo (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

VI.3.2 Efecto sobre la actividad de la microbiota nativa y la actividad enzimática oxidativa

Se evaluó el efecto del bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 sobre la actividad de la microbiota nativa a través del monitoreo de las actividades enzimáticas deshidrogenasa e hidrolasa a los 30, 60 y 90 días junto con los tratamientos control. También se determinó la actividad oxidativa mediante la evaluación de la actividad lacasa utilizada como estimador de la acción de los hongos ligninolíticos.

En la **Figura VI. 5** se presentan los resultados de la actividad deshidrogenasa en presencia/ausencia del barro FP a lo largo del tiempo. Nótese el incremento en la dispersión de los datos al incorporarse el residuo a la matriz del suelo. En el tratamiento BR, se observó un incremento significativo de la actividad deshidrogenasa a los 30 días luego de aplicarse FP al 10%, alcanzando valores de $36 \pm 15 \mu\text{g TPF g}_{\text{ss}}^{-1}$, descendiendo significativamente hacia los 60 días hasta el final del monitoreo. Los resultados del

tratamiento BE revelaron que la mayor actividad deshidrogenasa tuvo lugar durante los primeros 30 días independientemente de la presencia del residuo, descendiendo hacia el final del monitoreo. En el tratamiento con LPSC 232, la actividad enzimática se mantuvo sin cambios significativos a lo largo del tiempo, ya sea en presencia o ausencia de FP. Al comparar los resultados con los demás tratamientos en ambas condiciones, se evidenció sólo un incremento significativo de la actividad deshidrogenasa a los 60 días de $32 \pm 3 \mu\text{g TPF g}_{\text{SS}}^{-1}$, asociado a la presencia del residuo. En cuanto al bioaumentación con LPSC 436, se registró baja o nula actividad durante todo el monitoreo. Sólo a los 60 días se observa un ascenso significativo de la actividad en presencia del barro, aunque no reveló diferencias significativas respecto de BR y BE.

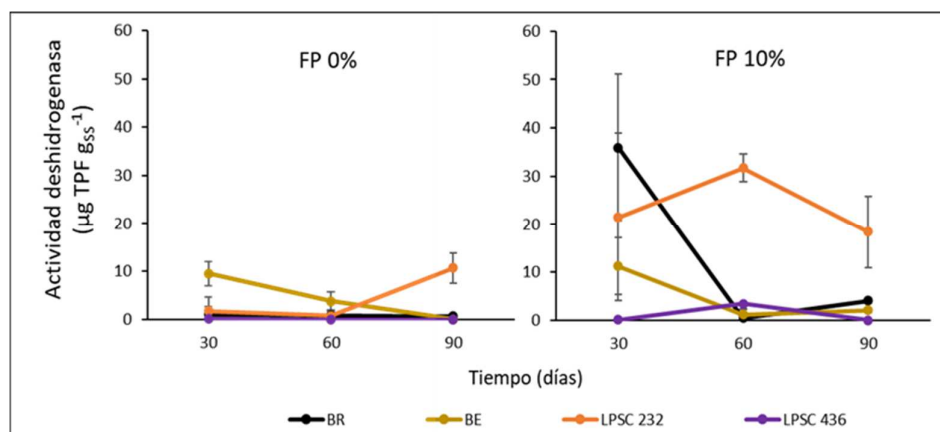


Figura VI. 5. Actividad deshidrogenasa en los microcosmos S-FP bajo la aplicación de los diferentes tratamientos. Los tratamientos corresponden al control biorremediación (BR), bioestimulación con rastrojo sin inocular (BE) y bioaumentación con *C. rígida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436). Se representan las medias y desvíos estándares ($n=3$).

Con respecto a la actividad hidrolasa no se observaron variaciones entre los tratamientos BR, BE y LPSC 436, ya sea en presencia/ausencia del barro a lo largo del tiempo (**Figura VI. 6**). El bioaumentación con LPSC 232 mostró los valores más bajos de actividad hidrolasa a los 30 días con respecto a los demás tratamientos, independientemente de la presencia de FP. A los 60 días logró un incremento significativo de la actividad, siendo superior en presencia del barro comparado con los

tratamientos BR y LPSC 436. Finalmente, a los 90 días los niveles de actividad no mostraron diferencias entre los tratamientos, independiente de la presencia del barro.

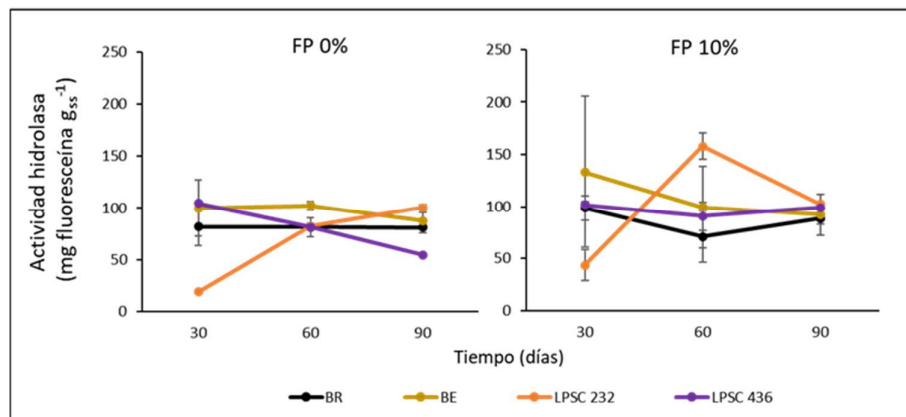


Figura VI. 6. Actividad hidrolasa en los microcosmos S-FP bajo la aplicación de los diferentes tratamientos. Los tratamientos corresponden al control biorremediación (BR), bioestimulación con rastrojo sin inocular (BE) y bioaumento con *C. rigida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436). Se representan las medias y desviaciones estándares ($n=3$).

En cuanto a la actividad lacasa, se observó un comportamiento diferencial entre los dos hongos (**Tabla VI. 1**).

C. rigida LPSC 232 presentó la mayor actividad a los 60 días (41 ± 28 mU g⁻¹), aunque la presencia del FP alteró dicha actividad en todos los tiempos. En cambio, *G. subargentea* LPSC 436 mostró actividad lacasa menor en los primeros 30 días, incluso cuando se suplementó FP al suelo diferenciándose significativamente a los 60 días. Cabe mencionar que sólo se detectó actividad lacasa en el tratamiento BE al adicionarse FP durante los primeros 30 días, aunque no fue significativa respecto del resto de los tratamientos.

Tabla VI. 1. Actividad lacasa en los distintos tratamientos sobre microcosmos S-FP a diferentes tiempos.

Tratamiento	FP (%)	Tiempo (días)	Actividad lacasa (mU.g _{ss} ⁻¹)
BE	0	30	nd ^a
		60	0,3±0,5 ^a
		90	nd ^a
	10	30	6±2 ^b
		60	0,8±1,3 ^a
		90	nd ^a
LPSC 232	0	30	3±2 ^a
		60	41±28 ^b
		90	2±3 ^a
	10	30	nd ^a
		60	1±3 ^a
		90	nd ^a
LPSC436	0	30	21±3 ^{ab}
		60	4±3 ^a
		90	2,2±0,5 ^a
	10	30	10±2 ^a
		60	22±3 ^b
		90	0,7±1,2 ^a

Las letras en minúsculas indican las diferencias significativas entre los tratamientos a distintas concentraciones del barro FP y tiempos (ANOVA de dos vías. Prueba de Tukey, nivel de confianza del 95%).

VI.3.3 Efecto sobre la toxicidad en *L. sativa*

Se monitoreó el efecto fitotóxico de muestras de tierra contaminada tomadas al inicio, luego de 60 y 90 días de los diferentes tratamientos, sobre semillas de *L. sativa* L (*var. mantecosa*).

Se observó que las concentraciones más altas del extracto provocaron una disminución significativa en la germinación de las semillas, más evidente en los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación con LPSC 436.

Sobre las semillas germinadas se midió la longitud de la radícula (mm) registrándose la presencia/ausencia de pelos absorbentes, grosor radicular o cualquier anomalía a modo de interpretar las diferencias respecto al control en agua. En la **Figura VI. 7** se visualizan dos comportamientos relacionados a la longitud de la radícula, uno identificado por la estimulación de la elongación radicular en las concentraciones menores o iguales al 50% en los tratamientos BR y LPSC 232 (**A y C**); y otro representado por los tratamientos BE y LPSC 436 (**B y D**) caracterizado por la disminución significativa de la longitud radicular en la concentración más alta.

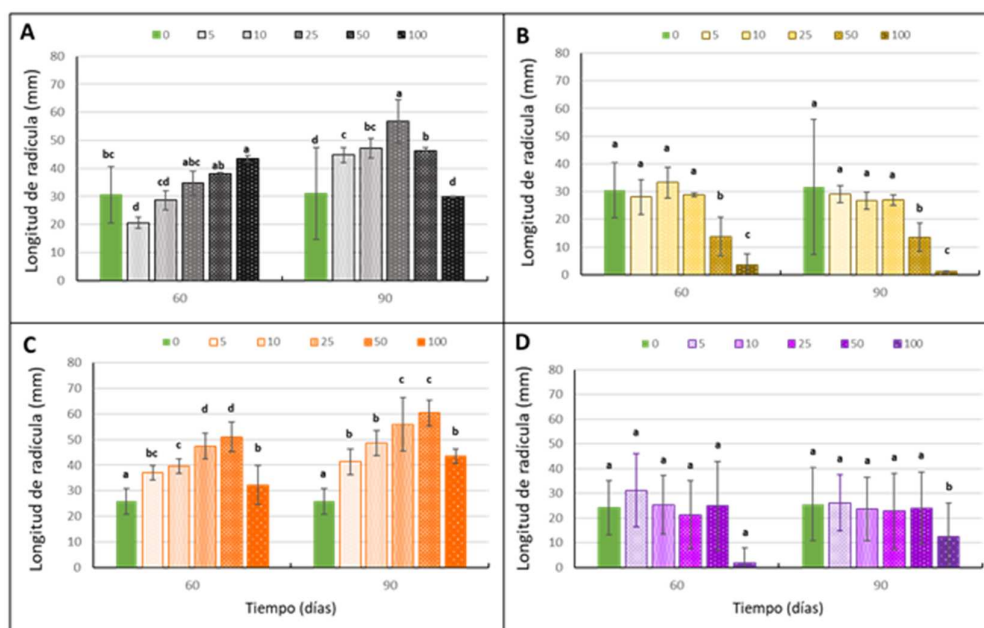


Figura VI. 7. Longitud de radículas (mm) de *L. sativa* a distintas diluciones del extracto acuoso de los microcosmos tierra-S-FP en los distintos tratamientos a los 60 y 90 días. Los tratamientos corresponden a biorremediación (A), bioestimulación con rastrojo sin inocular (B) y bioaumento con *C. rigida* LPSC 232 (C) y con *G. subargentea* LPSC 436 (D). Las barras representan las medias y desviaciones estándares (n=60). Las letras minúsculas representan la significancia entre las diluciones a igual tiempo (ANOVA, Test de Tukey ($p < 0,05$)). Longitud radicular del control agua fue de $27,66 \pm 3,18$ mm.

Las observaciones de la morfología de las plántulas en los distintos tratamientos y tiempos se realizaron previo a su congelamiento, técnica utilizada para facilitar la

medición de aquellas radículas ensortijadas. Se observó una tendencia de reducción de pelos absorbentes en las radículas con el aumento de la concentración de los extractos acuosos en ambos tiempos. En todos los tratamientos se registraron abundantes pelos absorbentes en las concentraciones 5, 10 y 25%, similares al control de agua, salvo en el tratamiento LPSC 232 donde desaparecen completamente a partir de la concentración 25%. En las concentraciones 50% se observan en menor cantidad desapareciendo en las diluciones 100% en todos los tratamientos. A la disminución de pelos absorbentes se le adicionó el afinamiento de las radículas, más notorio en los tratamientos BR y LPSC 232 para ambos tiempos (**Figura VI. 8**).

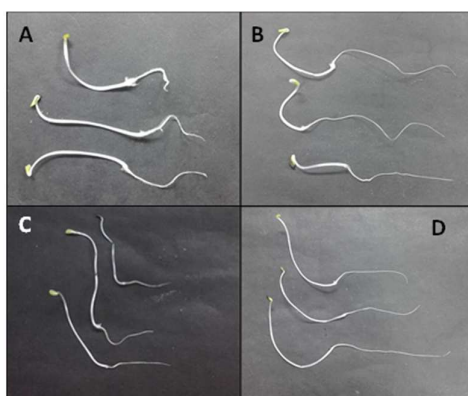


Figura VI. 8. Morfología de las plántulas de *Lactuca sativa* L. A. Plántulas generadas a partir de extracto de suelo control sin contaminar. Plántulas generadas a partir del extracto acuoso concentrado de los tratamientos BR (B), BE (C) y LPSC 232 (D) a los 90 días.

En la **Figura VI. 9** se representan las longitudes promedio de las radículas en las concentraciones 50 y 100% de los extractos acuosos de los distintos tratamientos a 60 y 90 días junto con sus respectivos controles en agua. Los tratamientos BR y LPSC 232 estimulan significativamente la elongación radicular en la concentración 50%, para ambos tiempos en el caso de LPSC 232 y sólo a los 90 días en BR, respecto de sus controles y al tiempo inicial. Mientras que en la mayor concentración del extracto el efecto estimulante se detiene sin presentar diferencias significativas con los controles. En cuanto a BE y LPSC 436, las radículas tienden a disminuir su longitud, diferenciándose

significativamente en las diluciones más concentradas a los 60 y 90 días, respecto al tiempo inicial y sus respectivos controles en agua.

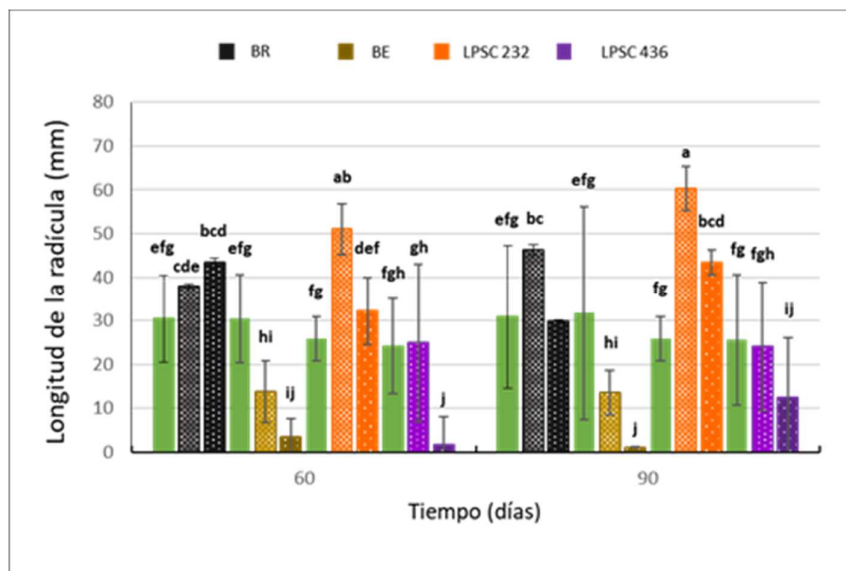


Figura VI. 9. Longitud de las radículas de *L. sativa L* en los tratamientos sobre microcosmos de *S-FP* luego de 60 y 90 días. Los tratamientos corresponden a biorremediación (BR), bioestimulación con rastrojo sin inocular (BE) y bioaumentación con *C. rigida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436), en sus diluciones 50 (barras color claro) y 100 (barras color intenso) respecto de sus controles (barras verdes) en los distintos tiempos. Las barras representan las medias y desviaciones estándares ($n=60$). Las letras minúsculas representan la significancia entre los tratamientos a distintas diluciones y tiempos (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)). La longitud de las radículas del extracto acuoso concentrado de *S-FP* al inicio del ensayo fue de $34,5 \pm 1,82$ mm.

A partir de los datos de germinación y elongación de radícula se calcularon los índices porcentuales de germinación (IG%) y de inhibición de la elongación radicular (IE%) (Ver **Sección III.7** Materiales y Métodos).

En la **Figura VI. 10** se representa el IG% obtenido en los distintos tratamientos en las concentraciones más altas a los 60 y 90 días, registrándose una clara tendencia de estimulación de la germinación en los tratamientos BR y LPSC 232, incrementándose el IG% en las diluciones al 50%.

Si comparamos los IG% al final del tratamiento en el extracto 100%, se observa que LPSC 232 presenta un índice de $138,64 \pm 21,05\%$ estimulando significativamente la germinación respecto del resto de los tratamientos. Mientras que BR ($69,90 \pm 12,60\%$), LPSC 436 ($32,08 \pm 22,05$) y BE ($0,22 \pm 0,03\%$) inhibieron la germinación, sólo BE difiere significativamente.

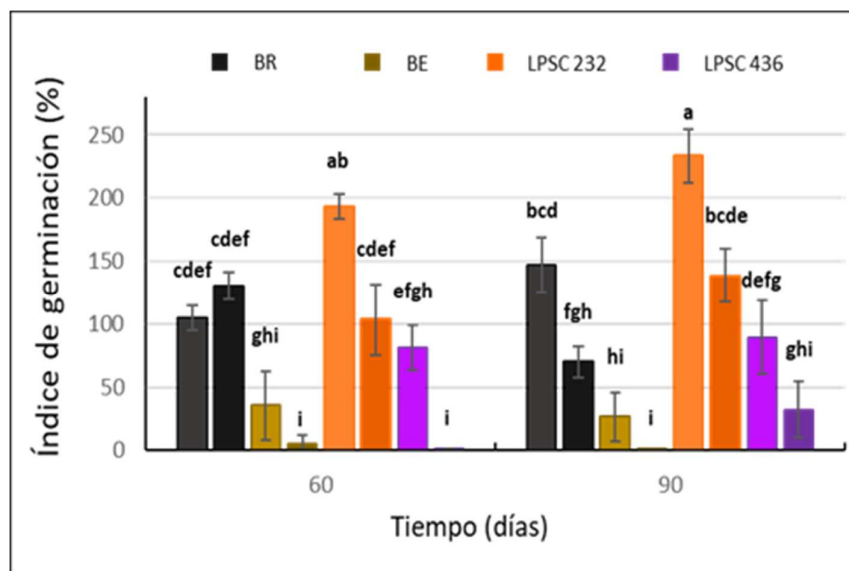


Figura VI. 10. Índice de germinación porcentual (IG%) de *L. sativa L.* en los distintos tratamientos sobre microcosmos tierra-S-FP luego de 60 y 90 días. Los tratamientos corresponden a biorremediación (BR), bioestimulación con rastrojo sin inocular (BE) y bioaumento con *C. rigida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436), en sus extractos 50% (barras color claro) y 100% (barras color intenso) en los distintos tiempos. Las barras representan las medias y desviaciones estándares ($n=60$). Las letras minúsculas representan la significancia entre los tratamientos a distintas diluciones y tiempos (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

La **Figura VI.11**, muestra el índice de inhibición de la elongación radicular (IE%) en las concentraciones del extracto 50 y 100% para los distintos tratamientos a los tiempos 0, 60 y 90 días.

El análisis del parámetro IE% reveló también dos comportamientos diferenciales sobre el efecto en la longitud radicular.

En los tratamientos BR y LPSC 232 se registró una estimulación de la elongación radicular expresándose en valores negativos. La concentración 50% del tratamiento LPSC 232 generó los valores más bajos a los 60 y 90 días, mientras que en BR no se registraron diferencias entre concentraciones y tiempos.

Los tratamientos BE y LPSC 436 revelaron un efecto inhibitorio conforme la concentración de extracto acuoso aumentaba. En BE este efecto se registró a los 60 días y se mantuvo hacia los 90 días sin diferencias significativas, con una tasa de inhibición del $96,30 \pm 0,60\%$. El tratamiento LPSC 436, produjo una inhibición en las concentraciones más altas, con una tasa de inhibición del $92,63 \pm 3,32\%$ a los 60 días, disminuyendo hacia el final del ensayo ($51,40 \pm 20,80\%$), aunque sin diferencias significativas.

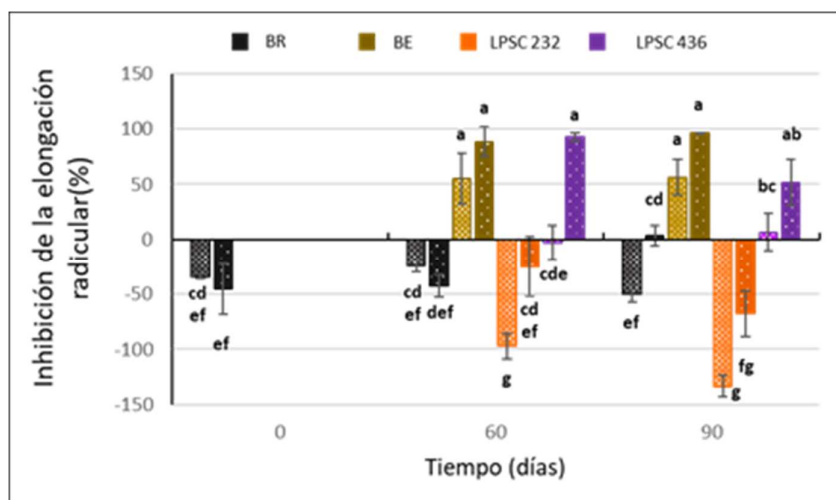


Figura VI. 11. Índice de inhibición de la elongación radicular porcentual de *L. sativa* L. en de los distintos tratamientos sobre microcosmos con *S-FP* a los 0, 60 y 90 días. Los tratamientos corresponden a biorremediación (BR), bioestimulación con rastrojo sin inocular (BE) y bioaumentación con *C. rigida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436), en sus concentraciones 50 (barras color claro) y 100 (barras color intenso). Las barras representan las medias y desviaciones estándares ($n=60$). Las letras minúsculas representan la significancia entre los tratamientos a distintas diluciones y tiempos (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

De los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad es posible inferir un comportamiento diferencial entre ambos hongos sobre la fitotoxicidad del suelo contaminado con barro.

VI.4 Capacidad degradadora de los hongos LPSC 232 y LPSC 436 en microcosmos de barro de fondo de pileta API (FP) tratado por oxidación con Persulfato de amonio (PSA)

En la **Figura VI. 12** se observa el grado de colonización de *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 sobre los microcosmos con barro FP (oxidado y sin oxidar) tanto en condiciones axénicas como no estériles a los 30 y 60 días de incubación.

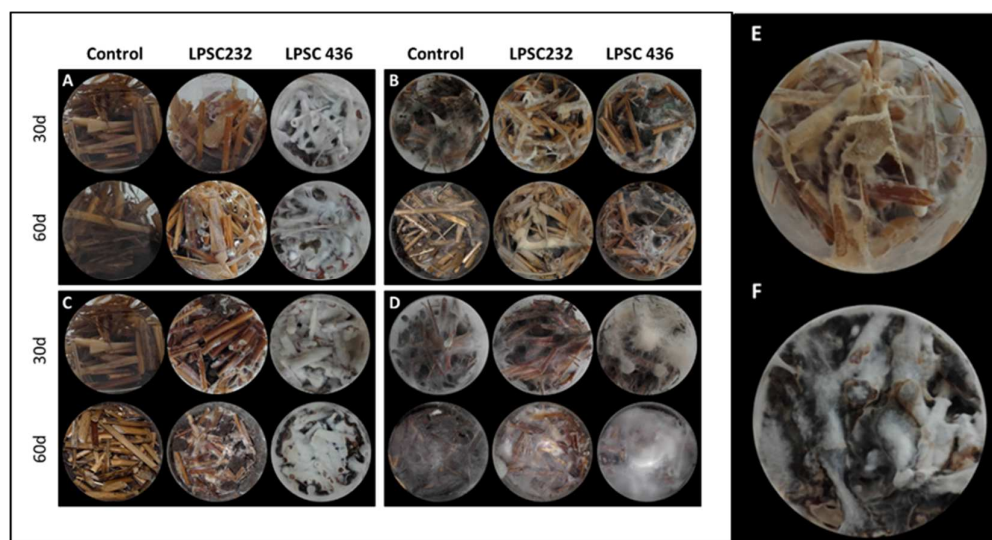


Figura VI. 12. Microcosmos de barro FP API tratados por oxidación química con PSA y bioaumentación con *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436. A: Microcosmos en condición axénica sin pretratamiento oxidativo. B: Microcosmos sin pretratamiento oxidativo en presencia de la microbiota autóctona del barro. C: Microcosmos en condición axénica con barro oxidado. D: Microcosmos con barro oxidado en presencia de microbiota nativa. Derecha: Controles positivos sobre rastreo de trigo a los 30 días LPSC 232 (E) y LPSC 436 (F). Los ensayos se realizaron por triplicados independientes a 30 y 60 días.

En condiciones axénicas, sobre el barro sin oxidar y oxidado (A y C, respectivamente) los hongos colonizaron la mezcla de rastrojo de trigo y barro. *G. subargentea* LPSC 436 desarrolló su micelio blanco y esponjoso característico de manera homogénea cubriendo toda la superficie de la mezcla. Mientras que *C. rigida* LPSC 232 generó su micelio localizado y heterogéneo, de aspecto blanquecino a marrón claro hacia el final del monitoreo. Además, se observó que después de los 14 días de incubación (28 °C en oscuridad), el micelio de ambos hongos se expandió en profundidad, colonizando el residuo como se aprecia en la **Figura VI. 13**.

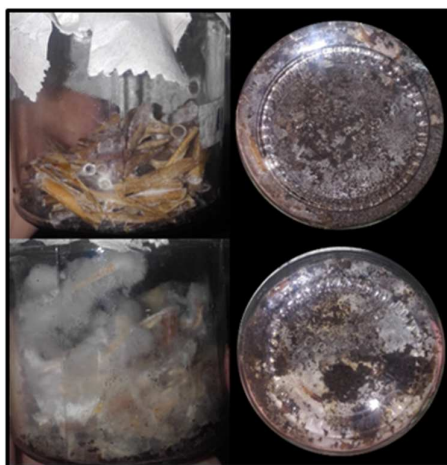


Figura VI. 13. Establecimiento de los inóculos en microcosmos estériles a los 14 días. Arriba: *C. rigida* LPSC 232. Abajo: *G. subargentea* LPSC 436.

En presencia de microbiota nativa del barro, se observó una colonización reducida en todos los microcosmos tanto en barro oxidado como sin oxidar. De lo observado macroscópicamente, podría inferirse que *C. rigida* LPSC 232 logró establecerse mejor que *G. subargentea* LPSC 436 en presencia de microbiota autóctona, principalmente en los microcosmos no oxidados donde la comunidad nativa no fue alterada (**Figura VI. 12 B**).

VI.4.1 Efecto sobre la remoción de hidrocarburos del barro

Se monitoreo la concentración de hidrocarburos totales (HT) por FT-IR e hidrocarburos alifáticos y aromáticos por GC-FID al tiempo 0, 30 y 60 días.

En la **Figura VI. 14** se observa la concentración de HT en cada condición para los tratamientos de bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 junto con su respectivo control (rastraje sin inocular).

En condiciones axénicas sobre el barro FP, todos los tratamientos a los 30 y 60 días se diferenciaron de la concentración inicial, aunque no se observaron cambios significativos entre tratamientos a cada tiempo. Los tratamientos bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 no mostraron diferencias en los tiempos monitoreados. (**Figura VI. 14. A**).

En condiciones axénicas sobre FP+PSA, no se observan diferencias significativas entre tratamientos a cada tiempo. No obstante, comparando cada tratamiento en función del tiempo, sólo el bioaumentación con LPSC 232 mostró diferencias significativas entre los 30 y 60 días. Esto puede atribuirse a la independencia de los ensayos y a la heterogeneidad del barro (**Figura VI. 14. C**).

En presencia de la microbiota nativa del barro FP, LPSC 436 reveló un significativo descenso de ~35% de los HT a los 30 días ($88907 \pm 20821 \text{ mg.kg}^{-1}$). Luego de 60 días, el tratamiento con LPSC 232 se igualó con LPSC 436 (40%), diferenciándose del control, que removió un 18% de los hidrocarburos respecto de la concentración inicial.

Finalmente, en microcosmos FP+PSA se observó un descenso significativo de los hidrocarburos totales en todos los tratamientos luego de 30 días respecto de la concentración inicial ($116268 \pm 3845 \text{ mg.kg}^{-1}$). Luego de los 60 días, el tratamiento con LPSC 436 incrementó la concentración de HT ($105362 \pm 8540 \text{ mg.kg}^{-1}$) diferenciándose de su respectivo control, el cual redujo la concentración casi en un 30% ($81830 \pm 2550 \text{ mg.kg}^{-1}$).

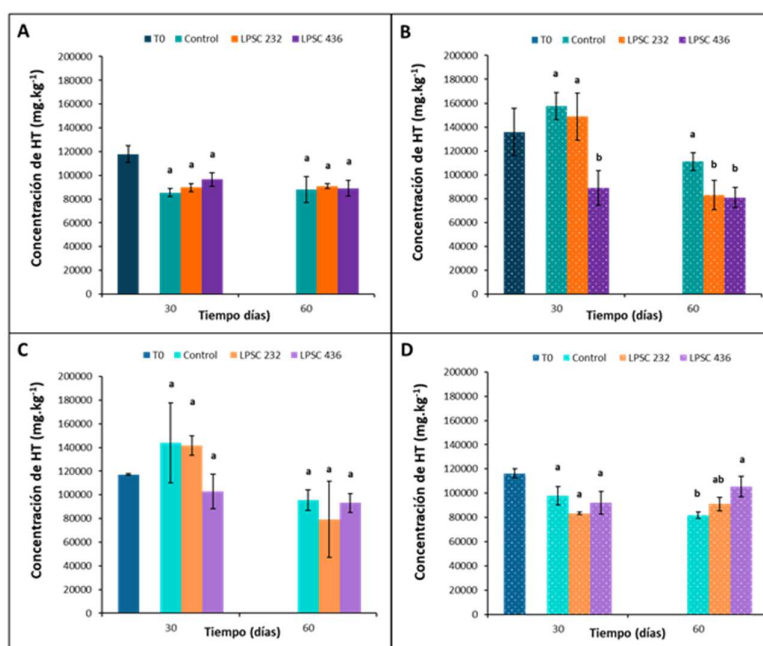


Figura VI. 14. Concentración de hidrocarburos totales (HT) en microcosmos con barro petroquímico. Microcosmos con FP en condiciones axénicas (A) y en presencia de la microbiota nativa del barro (B). Microcosmos con FP+PSA en condiciones axénicas (C) y no estériles (D). Las barras representan las medias y desviaciones estándares ($n=3$). Las letras minúsculas representan la significancia entre tratamiento a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p<0,05$)) para cada condición independientemente.

En la **Figura VI. 15** se representa la concentración de hidrocarburos alifáticos (GC-FID) en cada condición para los distintos tratamientos a lo largo del tiempo.

En condiciones axénicas sobre FP (**Figura VI. 15 A**), se observó un incremento de HA a los 30 días en los tratamientos de bioaumentación LPSC 232 y LPSC 436 en un 91% y 126% respectivamente, diferenciándose significativamente entre sí y con su respectivo control; manteniéndose sin cambios significativos hacia el final del monitoreo. No se observan diferencias significativas entre los controles 30 y 60 días respecto de la concentración inicial, lo que indicaría baja a nula pérdida abiótica. En los microcosmos con FP+PSA, (**Figura VI. 15 C**) no se observaron cambios significativos entre los tratamientos de bioaumentación ni con sus respectivos controles.

En los microcosmos con FP en presencia de la microbiota nativa (**Figura VI. 15 B**), la concentración de hidrocarburos alifáticos disminuyó significativamente luego de los

30 días en todos los tratamientos, incluido el control. No obstante, en esta condición, la remoción de HA promovida por el bioaumentación fue significativamente más alta que el control. Luego de 60 días, únicamente los tratamientos de bioaumentación dejaron un residual no detectable de HA en los microcosmos. Los microcosmos FP+PSA en presencia de microbiota (**Figura VI. 15 D**), revelaron un comportamiento similar al observado en la condición anterior, donde todos los tratamientos reducen la concentración de HA luego de 30 días. Sin embargo, sólo el bioaumentación con LPSC 436 produce una significativa reducción de HA a valores no detectables. Luego de 60 días, tanto los tratamientos de bioaumentación como control, redujeron la concentración de HA a valores no detectables.

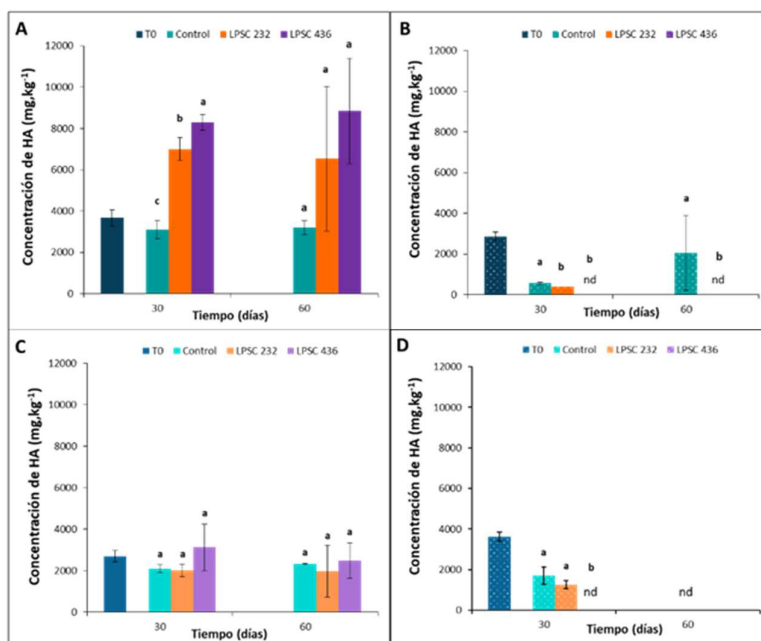


Figura VI. 15. Concentración de hidrocarburos alifáticos (HA) determinados por GC-FID en los microcosmos FP y FP+PSA con bioaumentación fúngica. Microcosmos con FP en condiciones axénicas (A) y en presencia de la microbiota nativa del barro (B). Microcosmos con FP+PSA en condiciones axénicas (C) y no estériles (D). Las barras representan las medias y desviaciones estándares (n=3). Las letras minúsculas representan la significancia entre tratamiento a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p < 0,05$)) para cada condición independientemente.

Finalmente, se monitoreó la concentración de PAH (GC-FID) en todas las condiciones (**Figura VI. 16**).

En condiciones axénicas sobre FP (**Figura VI. 16 A**) se observó un incremento significativo de la concentración de PAH en los tratamientos bioaumentación a casi el doble respecto del control, luego de los 30 días. Dicho incremento se redujo hacia el final del monitoreo sin diferencias significativas respecto del control. El incremento de PAH puede ser atribuido a la actividad de los hongos ligninolíticos. En los microcosmos con FP+PSA (**Figura VI. 16 B**), no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ni entre los tiempos analizados.

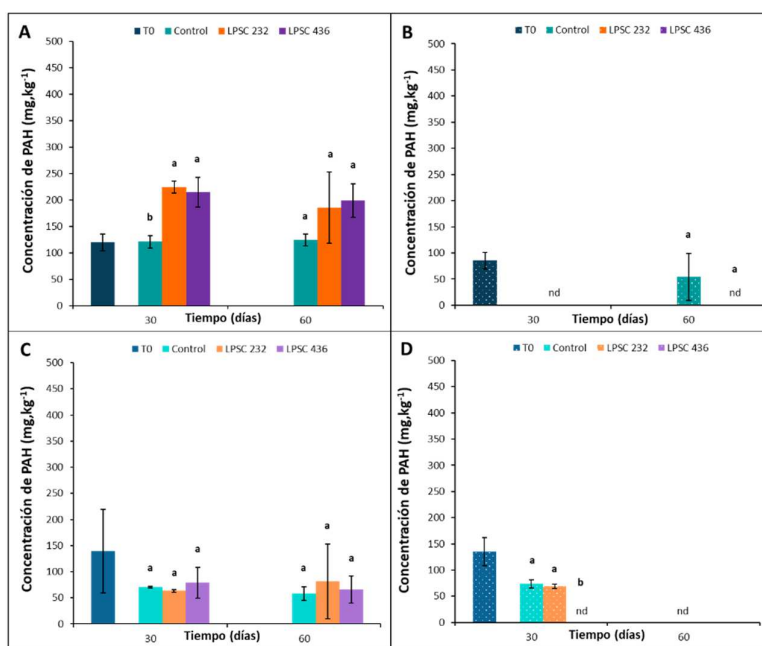


Figura VI. 16. Concentración de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH) determinados por GC-FID en los microcosmos FP y PSA con bioaumentación fúngica. Microcosmos con FP en condiciones axénicas (A) y en presencia de la microbiota nativa del barro (B). Microcosmos con FP+PSA en condiciones axénicas (C) y no estériles (D). Las barras representan las medias y desviaciones estándares ($n=3$). Las letras minúsculas representan la significancia entre tratamiento a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p < 0,05$)) para cada condición independientemente.

En presencia de la microbiota nativa del barro (**Figura VI. 16 C**), todos los tratamientos se diferenciaron rápidamente de la concentración inicial ($85 \pm 5 \text{ mg. kg}^{-1}$) luego de los 30 días, sin detectarse PAH, a excepción del control a los 60 días. En los microcosmos con FP+PSA (**Figura VI. 16 D**), solo el tratamiento bioaumentado con LPSC 436 logró reducir significativamente la concentración de PAH luego de los 30 días. Ambos tratamientos de bioaumentado y el Control promovieron la degradación de PAH hasta valores no detectable, luego de 60 días.

VI.4.2 Efecto del bioaumentado con LPSC 232 pos tratamiento oxidativo del barro FP analizado por espectroscopia FT-IR

La **Figura VI. 17 A y B** muestra los espectros FT-IR normalizados de la fracción de hidrocarburos soluble en *n*-pentano de los microcosmos FP+PSA luego del bioaumentado con LPSC 232, a 30 y 60 días en condiciones axénicas y no estériles, respectivamente.

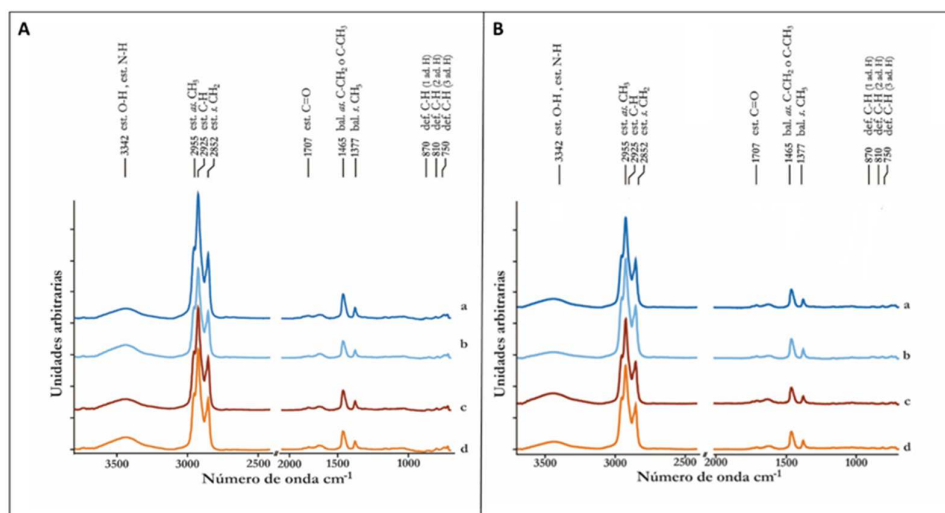


Figura VI. 17. Espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano en condiciones axénicas (A) y no estériles (B). Las letras indican los tratamientos control a 30 (a-azul) y 60 días (b-celeste) y bioaumentado con LPSC 232 a 30 (c-rojo) y 60 días (d-naranja). Se indican las principales asignaciones de bandas correspondientes a los principales constituyentes moleculares. bal: balanceo, def: deformación, est: estiramiento, as: asimétrico, s: simétrico

En la figura se señalan las principales bandas asociadas a los grupos funcionales. Los espectros FT-IR mostraron las características espectrales generales y los marcadores particulares previamente reportados para muestras de hidrocarburos.

En la **Tabla VI. 2** se resume la asignación tentativa de las bandas correspondientes a los grupos funcionales.

Tabla VI. 2. Regiones espectrales y asignación de bandas de grupos funcionales.

Regiones Espectrales	Número de onda (cm ⁻¹)	Asignación ^a	Referencias
2800-3000	3342	estr. O-H, estr. N-H	(Naumann, 2000; Bava <i>et al.</i> , 2019)
	2955	estr. asim. C-H del CH ₃	(Naumann, 2000; Bava <i>et al.</i> , 2019)
	2924	estr. asim. C-H del CH ₂	(Naumann, 2000; Bava <i>et al.</i> , 2019)
	2895	estr. C-H terciario	(Bava <i>et al.</i> , 2019)
	2871	estr. sim. C-H del CH ₃	(Bava <i>et al.</i> , 2019; Naumann, 2000, Poveda-Jaramillo <i>et al.</i> , 2016)
	2852	estr. sim. C-H del CH ₂	(Naumann, 2000; Bava <i>et al.</i> , 2019)
	1500-1800	1740	estr. C=O de cadenas alquilo
1707		estr. C=O en amidas secundarias	(Asemani & Rabbani, 2016)
1690		estr. C=O en aril cetonas o arilácido	(Bava <i>et al.</i> , 2019)
1642		estr. C=O de quinonas	(Buenrostro-Gonzalez <i>et al.</i> , 2002)
1250-1500	1465	bal. asim. C-CH ₂ o C-CH ₃	(Asemani & Rabbani, 2016; Bava <i>et al.</i> , 2019)
	1409	C=O del COO ⁻	(Naumann, 2000)
	1377	bal. sim. C-H del CH ₃	(Asemani & Rabbani, 2016; Poveda-Jaramillo <i>et al.</i> , 2016)
700-900	870	def. fuera del plano del C-H aromático (1 H aislado)	(Bava <i>et al.</i> , 2019)
	810	def. fuera del plano del C-H aromático (2 H adyacentes)	(Bava <i>et al.</i> , 2019)
	750	def. fuera del plano del C-H aromático (3 H adyacentes)	(Bava <i>et al.</i> , 2019)
	720	bal. en cadena CH ₂	(Naumann, 2000; Bava <i>et al.</i> , 2019)

Referencias: a- estr.: estiramiento, def.: deformación, bal.: balanceo, asim.: asimétrico, sim.: simétrico.

Las principales características espectrales asociadas a las cadenas alifáticas se presentan en la región 2800-3000 cm^{-1} debido a estiramientos asimétricos y simétricos del C-H en el CH_2 y CH_3 ; y en la región 1250-1500 cm^{-1} con bandas asociadas a los balanceos asimétricos del C- CH_2 o C- CH_3 y balanceos simétricos del C-H en el CH_3 . Con respecto a las vibraciones asociadas a los estiramientos del grupo funcional C=O, en la región espectral 1500-1800 cm^{-1} se encuentran los picos 1740, 1707 y 1690 cm^{-1} correspondientes a los estiramientos de este grupo funcional presente en cadenas alquilo, en amidas secundarias y en aril cetonas o aril ácidos, respectivamente; y el pico de 1409 cm^{-1} debido a la vibración del carbonilo correspondiente al COO^- . En la región espectral 730-900 cm^{-1} se encontraron los picos 870, 810 y 750 cm^{-1} asociados a la deformación fuera del plano del C-H aromático cuando presenta 1, 2 o 3 hidrógenos adyacentes en el anillo, tal como fue reportado en la descripción de asfaltenos argentinos (Bava *et al.*, 2019).

Debido a la actividad ligninolítica del LPSC 232 sobre el rastrojo, los espectros fueron analizados según los datos reportados por Troncozo y colaboradores (2020), no hallándose picos asociados a lignina o derivados.

Los principales cambios espectrales asociados al efecto del hongo LPSC 232 sobre el barro FP+PSA en condiciones axénicas y no estériles, se observaron en las regiones espectrales asociadas a funciones oxigenadas como grupos carbonilos presentes en cadenas alquilo, amidas secundarias y aril cetonas (1590-1760 cm^{-1}) y en los enlaces C-H de anillos aromáticos (730-900 cm^{-1}).

Se presentan los resultados de los estudios espectrales realizados en muestras de la fracción soluble en *n*-pentano con LPSC 232 y sus controles en condiciones axénicas.

En la **Figura VI. 18** se visualizan las derivadas segundas **(a)** y el análisis de *cluster* **(b)** correspondiente a la región espectral 2800-3000 cm^{-1} asociada a los estiramientos C-H de los grupos funcionales CH_2 y CH_3 presentes en cadenas alifáticas. Nótese que las distancias espectrales obtenidas en el dendrograma correspondiente a las distintas muestras fueron próximas entre sí (menor a 2) sugiriendo que no hay mayor efecto sobre las cadenas alifáticas debido a los diferentes tratamientos.

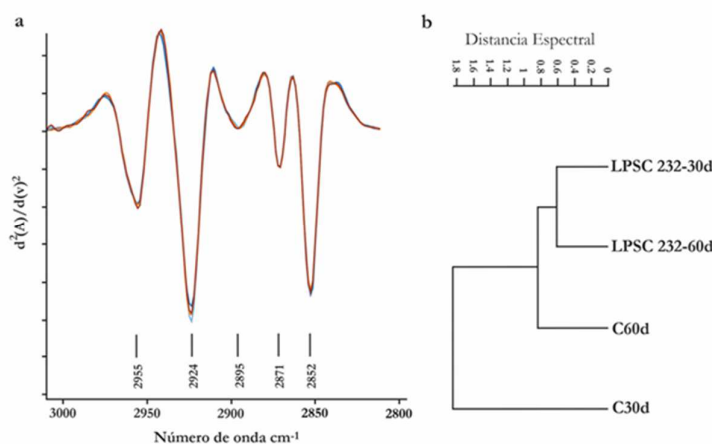


Figura VI. 18. Efecto sobre las cadenas alifáticas en barro FP API oxidado tratado con LPSC 232 durante 30 y 60 días en condiciones axénicas. a. Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros en la región (2800-3000 cm^{-1}). b. Análisis de cluster de la segunda derivada de los espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano en condiciones axénicas. La distancia espectral se calculó utilizando el "scaling to first range" en la región El análisis se realizó con la derivada segunda en la región espectral (2800-3000 cm^{-1}). El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo "av. linkage". Referencias: Control 30 d (azul), Control 60d (celeste), LPSC 232 30d (rojo), LPSC 232 60d (naranja).

El efecto de los tratamientos sobre los grupos carbonilo se analizó a través de los cambios en la región espectral (1590-1760 cm^{-1}). Las principales diferencias se observaron en los picos 1690 y 1680 cm^{-1} asociados a los estiramientos del grupo funcional C=O presente en aril cetonas y en los picos 1660, 1642 y 1631 cm^{-1} . Además, la presencia del hongo generó cambios en los estiramientos del C=O asociado a cadenas alquilo (pico de 1740 cm^{-1}) en ambos tiempos. Mientras que los estiramientos del grupo carbonilo asociado a amidas secundarias (picos 1713 y 1705 cm^{-1}) se vieron afectados por el tiempo del ensayo más que por la presencia del hongo. El análisis de *cluster* de esta región espectral (1590-1760 cm^{-1}) permitió determinar que los mayores cambios se observan a partir de los 60 días (**Figura VI. 19 b**). El dendrograma muestra que el bioaumentación con LPSC 232 a los 60 días generó un notorio cambio en la muestra diferenciándose de su control, en una distancia espectral de más de 80.

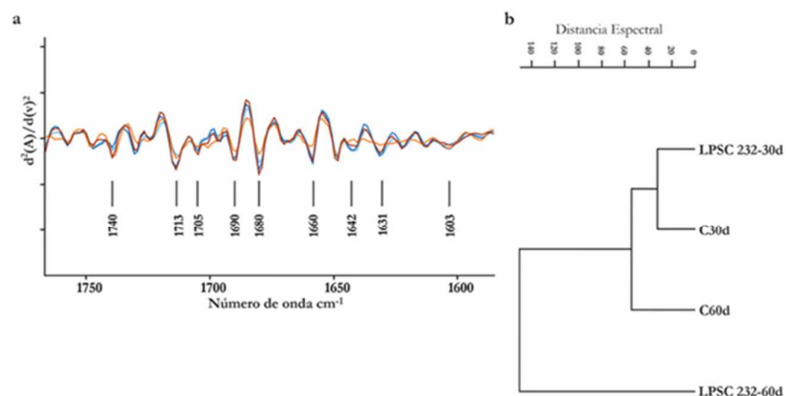


Figura VI. 19. Efecto sobre los grupos carbonilo asociados a cadenas alifáticas, amidas secundarias y grupos aromáticos en barro FP API oxidado tratado con LPSC 232 durante 30 y 60 días en condiciones axénicas. a. Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros en la región (1590-1760 cm^{-1}). b. Análisis de cluster de la segunda derivada de los espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano esterilizadas. La distancia espectral se calculó utilizando el "scaling to first range" en la región espectral (1590-1750 cm^{-1}). El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo "av. linkage". Referencias: Control 30 d (azul), Control 60d (celeste), LPSC 232 30d (rojo), LPSC 232 60d (naranja).

La región 700-900 cm^{-1} presenta picos asociados a la deformación fuera del plano del C-H aromático cuando tiene 1, 2 o 3 hidrógeno adyacentes en el anillo (Figura VI. 20). Dentro de esta región Borrego y colaboradores (1996) y Buenrostro-Gonzalez y colaboradores (2002) hicieron asignaciones similares a las reportadas por Bava y colaboradores (2019).

El análisis de las derivadas segundas de los espectros mostró diferencias significativas entre las contribuciones de los picos asociados al C-H aromático donde el anillo aromático tiene uno (870 cm^{-1}) o dos (810 cm^{-1}) hidrógeno adyacentes en el anillo. Cabe destacar que mientras el pico de 870 cm^{-1} disminuyó, hubo un incremento en el pico presente a 860 cm^{-1} . Además, se observaron pequeños desplazamientos del pico a 810 cm^{-1} , principalmente en los tratamientos luego de 60 días.

En el tratamiento con LPSC 232 luego de 60 días se observó un corrimiento del pico a 812 cm^{-1} , respecto del Control, donde el pico es detectado en 810 cm^{-1} .

En esta región espectral los tratamientos luego de 30 días presentaron el pico en 808 cm^{-1} .

Con respecto a la banda asociada a la deformación fuera del plano del C-H aromático con 3 H hidrógenos adyacentes (750 cm^{-1}), las variaciones en el corrimiento del pico entre las muestras fueron despreciables. El análisis de *cluster* de esta región espectral mostró que al igual que en la región espectral $1590\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$, el tratamiento con LPSC 232 se diferenció notablemente del resto a los 60 días, a una distancia espectral alrededor de 400 respecto del control 60 días.

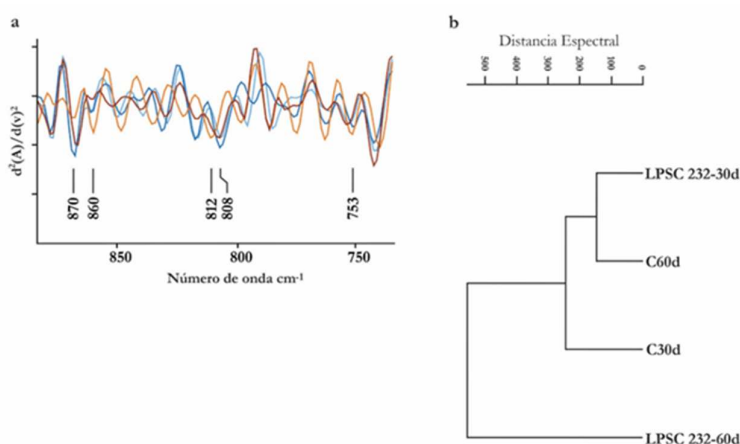


Figura VI. 20. Efecto sobre los enlaces C-H de grupos aromáticos en barro FP-API oxidado tratado con LPSC 232 durante 30 y 60 días en condiciones axénicas. a. Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros en la región ($730\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). b. Análisis de cluster de la segunda derivada de los espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano esterilizadas. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región espectral ($730\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo “av. linkage”. Referencias: Control 30 d (azul), Control 60d (celeste), LPSC 232 30d (rojo), LPSC 232 60d (naranja).

Al igual que en condiciones axénicas se estudiaron los cambios moleculares de barro FP+PSA por efecto de LPSC 232 sobre microcosmos en presencia de la microbiota nativa analizando las regiones espectrales $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, $1590\text{-}1760\text{ cm}^{-1}$ y $730\text{-}900\text{ cm}^{-1}$.

El análisis de *cluster* en las región espectral 2800-3000 cm^{-1} realizado con los espectros normalizados mostró que para este conjunto de muestras no se produjeron variaciones espectralmente apreciables (**Figura VI. 21**). Similarmente a lo observado en condiciones axénicas, no se detectaron cambios en la región asociada a los estiramientos C-H de los grupos funcionales CH_2 y CH_3 de cadenas alifáticas.

Por otro lado, el análisis espectral de las muestras en presencia de la microbiota nativa del barro FP+PSA mostró un comportamiento diferencial respecto de la condición estéril en las regiones espectrales asociadas a estiramientos de los grupos carbonilos (1590-1760 cm^{-1}) y enlaces C-H en grupos aromáticos (730-900 cm^{-1}).

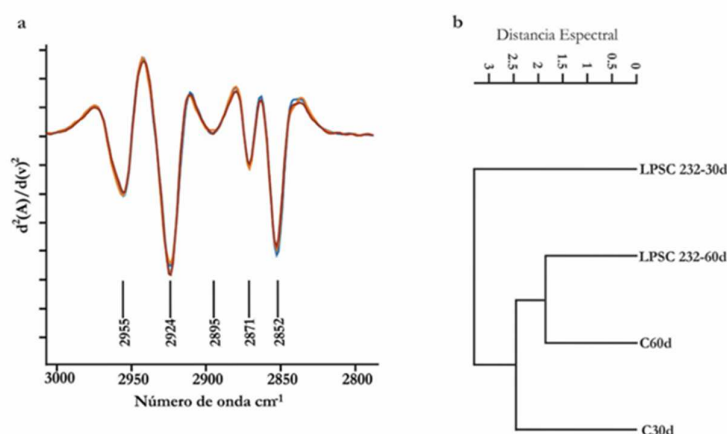


Figura VI. 21. Efecto sobre las cadenas alifáticas en barro FP API oxidado tratado con LPSC 232 durante 30 y 60 días en condiciones no estériles. a. Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros en la región (2800-3000 cm^{-1}). b. Análisis de cluster de la segunda derivada de los espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano esterilizadas. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región espectral (2800-3000 cm^{-1}). El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo “av. linkage”. Referencias: Control 30 d (azul), Control 60d (celeste), LPSC 232 30d (rojo), LPSC 232 60d (naranja).

La **Figura VI. 22 a** muestra las variaciones relacionadas a los estiramientos del grupo carbonilo (1590-1760 cm^{-1}). Los estiramientos del C=O asociado a cadenas alquílicas (pico de 1740 cm^{-1}) no mostraron diferencias en presencia del hongo, ni entre tiempos. Para los picos asociados a las vibraciones del grupo carbonilo en amidas

secundarias (picos 1713 y 1705 cm^{-1}) se observaron cambios a los 30 días en presencia de LPSC 232 respecto de su control. Las vibraciones de este grupo funcional presente en aril cetonas (picos 1690 y 1680 cm^{-1}) se vieron afectadas principalmente por el tiempo del ensayo más que por la presencia del hongo. Es importante destacar que el pico a 1680 cm^{-1} a los 60 días desaparece en presencia del hongo LPSC 232. Este análisis permitió evidenciar que el efecto del tratamiento con LPSC 232 sobre los grupos carbonilo asociados a cadenas alifáticas, amidas secundarias y grupos aromáticos (aril cetonas) es más notorios a tiempos cortos de tratamiento y no presenta mayores cambios a los 60 días, contrariamente a lo observado en las muestras axénicas.

El análisis cluster de la segunda derivada de los espectros en esta región espectral (1590-1760 cm^{-1}) muestra las variaciones globales de los grupos carbonilos presentes en las muestras. En el dendrograma se observan dos grupos a una distancia espectral cercana a 100 en función del tiempo de incubación (**Figura VI. 22 b**).

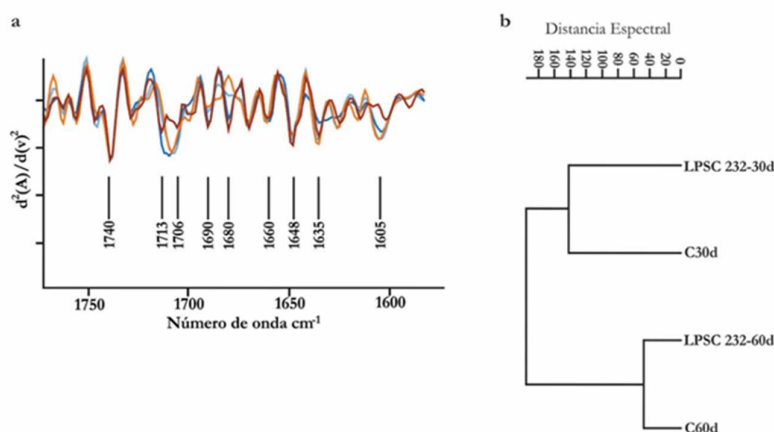


Figura VI. 22. Efecto sobre los grupos carbonilo asociados a cadenas alifáticas, amidas secundarias y grupos aromáticos en barro FP API oxidado tratado con LPSC 232 durante 30 y 60 días en condiciones no estériles. a. Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros en la región (1590-1760 cm^{-1}). b. Análisis de cluster de la segunda derivada de los espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano esterilizadas. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región espectral (1590-1750 cm^{-1}). El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo “av. linkage”. Referencias: Control 30 d (azul), Control 60d (celeste), LPSC 232 30d (rojo), LPSC 232 60d (naranja).

Finalmente se estudiaron las bandas presentes entre $730\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ que dan información sobre las diferentes disposiciones de los átomos de hidrógeno en los anillos aromáticos (**Figura VI. 23**). Los cambios en la banda presente a 870 cm^{-1} , asociada a la deformación fuera del plano del C–H aromático donde el anillo aromático tiene sólo un hidrógeno adyacente, se debieron a desplazamientos en la absorbancia del pico. Conjuntamente, para el tratamiento con el hongo a 60 días se observó una disminución de la absorbancia en este pico. Con respecto a la absorción asociada a la deformación fuera del plano del C–H aromático con 2 H adyacentes (810 cm^{-1}) se observaron cambios en su intensidad, apreciándose que en presencia de LPSC 232 los picos adyacentes (820 y 799 cm^{-1}) presentaron un aumento de intensidad comparado los controles. Para el pico 750 cm^{-1} asociado a la deformación fuera del plano del C–H aromático con 3 H adyacentes no se presentaron diferencias entre tratamientos. El dendrograma mostró que el tratamiento LPSC 232 a los 30 días se diferenció del resto de los tratamientos a una distancia espectral superior a 100 (**Figura VI. 23 b**).

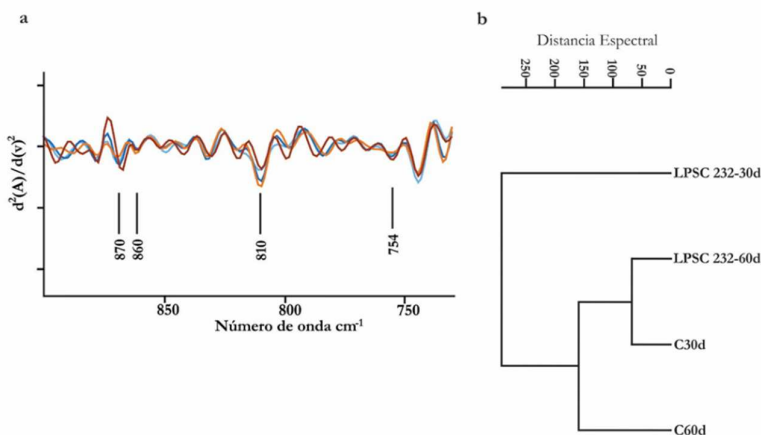


Figura VI. 23. Efecto sobre los enlaces C-H de grupos aromáticos en barro FP API oxidado tratado con LPSC 232 durante 30 y 60 días en condiciones no estériles. a. Segunda derivada normalizada vectorialmente de los espectros en la región ($730\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). b. Análisis de cluster de la segunda derivada de los espectros FT-IR de muestras de la fracción soluble en pentano esterilizadas. La distancia espectral se calculó utilizando el “scaling to first range” en la región espectral ($730\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). El dendrograma se construyó aplicando el algoritmo “av. linkage”. Referencias: Control 30 d (azul), Control 60d (celeste), LPSC 232 30d (rojo), LPSC 232 60d (naranja).

Finalmente se compararon los tratamientos en ambas condiciones a través de un análisis factorial de las segundas derivadas de los espectros en las regiones de interés (2800-3000, 1590-1750, 1300-1530 y 700-900 cm^{-1}). En la **Figura VI. 24** se aprecia la separación de los tratamientos en dos grupos, axénicos y no estériles según el eje 1, sugiriendo en principio la influencia de la microbiota nativa en los cambios de la matriz del barro FP+PSA.

Sobre el eje 2, se aprecia el desplazamiento hacia la izquierda de los tratamientos de bioaumentación respecto de sus controles. Este comportamiento evidencia la actividad de la microbiota resiliente pos oxidación durante la incubación, y la influencia del hongo en los tratamientos de bioaumentación.

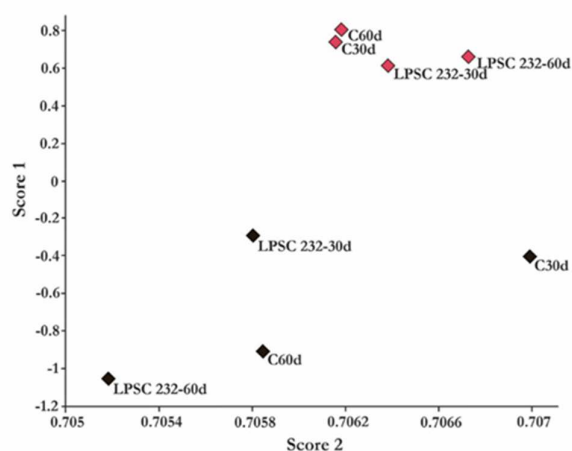


Figura VI. 24. Análisis factorial (Score 1 vs. Score 2) de espectros FT-IR de la fracción soluble en pentano del barro FP tratado con LPSC 232 en condiciones axénicas (rombo rojo) y no estériles (rombo negro). El análisis se realizó con la derivada segunda normalizada de los espectros en las regiones espectrales (2800-3000, 1590-1750, 1300-1530 y 700-900 cm^{-1}), por medio del método de factorización (Software Opus 7.0).

VI.4.3 Efecto sobre actividad enzimática microbiana

En la **Figura VI. 25** se presentan los resultados de la actividad deshidrogenasa en condiciones axénicas y en presencia de microbiota nativa del FP y PSA en los distintos tratamientos.

A partir de los 30 días, se observó una disminución de la actividad deshidrogenasa en los microcosmos FP con cultivo axénico, y en los microcosmos PSA, tanto axénicos como en presencia de la microbiota.

En condiciones axénicas, en microcosmos FP o PSA, el análisis de varianzas entre tratamientos y tiempos (ANOVA dos vías) no reveló diferencias significativas.

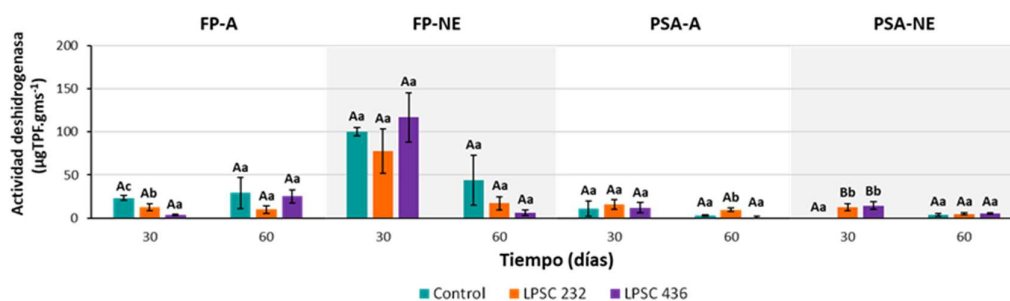


Figura VI. 25. Actividad deshidrogenasa en los microcosmos FP bajo la aplicación de los diferentes tratamientos. Los tratamientos corresponden al control bioestimulado con rastrojo y bioaumento con *C. rígida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436). Se representan las medias y desvíos estándares ($n=3$). Las letras minúsculas representan significancia entre tratamientos a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p < 0,05$)). Las letras mayúsculas representan la variación entre los tratamiento y distinto tiempo (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

Cuando la microbiota nativa del barro estuvo presente, se observó una mayor actividad a los 30 días, sólo en el barro sin oxidar (FP-NE), disminuyendo significativamente hacia los 60 días en cada tratamiento (Control $p=0,03$; LPSC 232 $p=0,02$; LPSC 436 $p=0,003$). Aunque al comparar entre tratamientos y tiempos no se revelaron diferencias significativas.

En los microcosmos PSA-NE no estériles con barro oxidado, la actividad deshidrogenasa fue baja como en los microcosmos axénicos. Los tratamientos LPSC 232 y LPSC 436 a los 30 días revelaron un mayor actividad deshidrogenasa respecto del control, diferenciándose significativamente de los 60 días (ANOVA dos vías $p=0,002$).

Los microcosmos inoculados con LPSC 232 y LPSC 436 presentaron la mayor actividad lacasa en condiciones axénicas sobre FP y PSA (**Figura VI. 26**).

El tratamiento con LPSC 436 registró una mayor actividad lacasa durante los 60 días de monitoreo, solo en cultivo axénico sobre FP, superando significativamente la actividad de LPSC 232.

En presencia de la microbiota nativa del barro (FP-NE), únicamente el tratamiento LPSC 232 reveló actividad a los 30 días, diferenciándose del resto de los tratamientos a ambos tiempos.

En los microcosmos con PSA, LPSC 232 registró una mayor actividad oxidativa a los 30 días comparando con lo observado en microcosmos FP. Esta mayor actividad se expresó tanto en presencia como en ausencia de microbiota nativa, igualando a LPSC 436 hasta los 60 días.

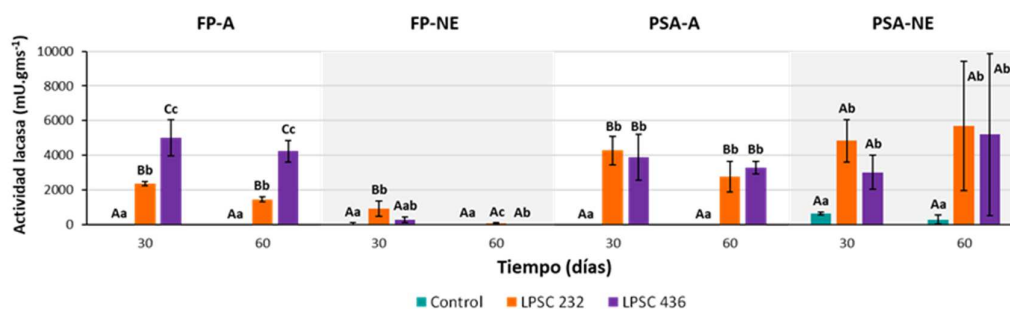


Figura VI. 26. Actividad lacasa en los distintos tratamientos sobre microcosmos FP bajo las diferentes condiciones y tiempo. Los tratamientos corresponden al control bioestimulado con rastrojo y bioaumento con *C. rigida* (LPSC 232) y con *G. subargentea* (LPSC 436). Se representan las medias y desvíos estándares ($n=3$). Las letras minúsculas representan significancia entre tratamientos a igual tiempo (ANOVA una vía, Test de Tukey ($p < 0,05$)). Las letras mayúsculas representan la variación entre tratamientos y tiempo (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

VI.4.4 Estimación de la biomasa microbiana mediante PCR cuantitativa

La presencia y establecimiento de los hongos ligninolíticos LPSC 232 y LPSC 436 fue evaluada utilizando los genes ITS *Gram* y *lcc1* como estimadores de biomasa fúngica siendo genes específicos de los miembros de la familia Polyporales, para detalles sobre el diseño de *primers* ver **Sección III.6.6** Materiales y Métodos.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación del número de copias de genes 16S rARN para evaluar el impacto del pre tratamiento oxidativo y el bioaumentación fúngico con LPSC 232 y LPSC 436 sobre la comunidad bacteriana de los microcosmos en condiciones no estériles.

Las curvas de calibración obtenidas a partir de diluciones seriadas de los plásmidos extraídos de los clones correspondientes a los genes ITS *Gram* y 16S rARN de los productos de PCR de gen *lcc1* se presentan en el **Anexo (Figura A.2 -5)**. Las eficiencias fueron de 1,26; 1,09; 1,27 y 0,95 para ITS *Gram*, *lcc1* LPSC 232, *lcc1* LPSC 436 y 16S rARN respectivamente.

Para obtener un valor de referencia, se cuantificó el número de copias de los genes ITS *Gram* y *lcc1* por ng de ADN extraído a partir de micelio de cultivos agarizados sobre MyA2 (**Tabla VI. 3**).

Tabla VI. 3. Número de copias de los genes ITS *Gram* y *Lcc1* cuantificadas a partir de ADN extraído de cultivos puros

Hongo	Nº copias gen ITS <i>Gram</i> /ng ADN	Nº copias gen <i>lcc1</i> /ng ADN	<i>lcc1</i> /ITS <i>Gram</i>
LPSC 232	$1,3 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^2 \pm 5,0 \times 10^1$	$3,45 \times 10^{-3}$
LPSC 436	$8,30 \times 10^5 \pm 6,41 \times 10^4$	$1,4 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^1$	$1,65 \times 10^{-4}$

En la **Figura VI. 27** se presenta la cuantificación de los genes ITS *Gram* y *lcc1* para los distintos tratamientos de bioaumentación en microcosmos FP y PSA, en condiciones axénicas y en presencia de la microbiota nativa (No estériles).

Ambos genes monitoreados no fueron detectados a ningún tiempo en los tratamientos control en condiciones axénicas.

En los microcosmos FP-A, independientemente del tiempo de incubación, LPSC 232 registró el mayor número de copias del gen ITS *Gram* comparado con LPSC 436, evidenciando un mejor establecimiento y sobrevivencia en condiciones axénicas.

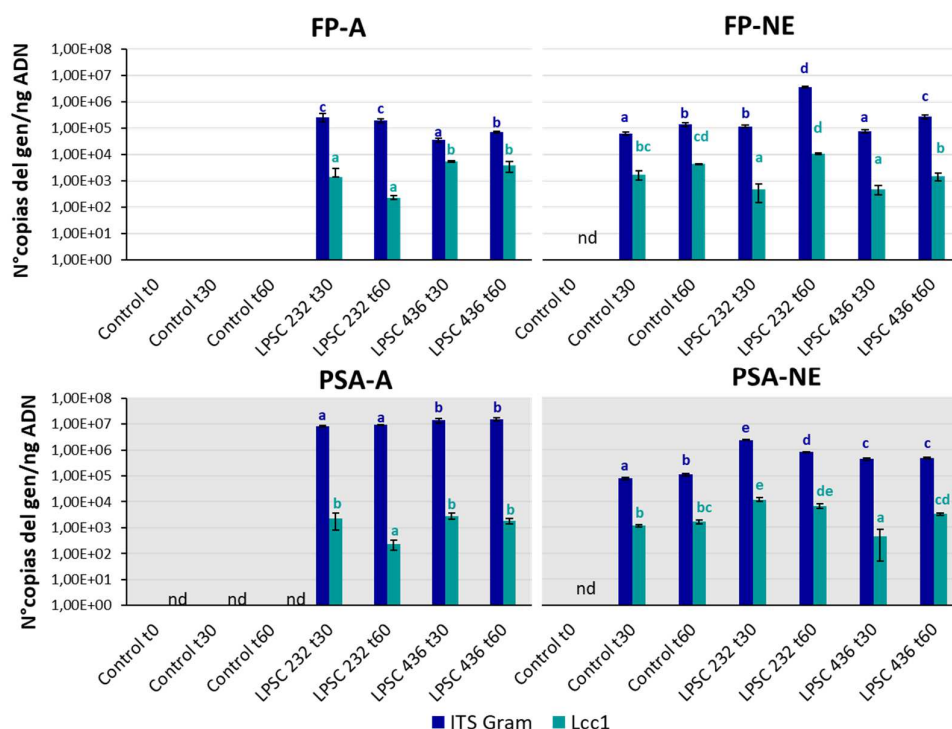


Figura VI. 27. Dinámica del número de copias de genes ITS *Gram* y *lcc1* en los distintos tratamientos. FP-A: Microcosmos sin oxidar axénicos. PSA-A: Microcosmos oxidados con persulfato de amonio en condición axénica. FP-NE: Microcosmos sin oxidar no estériles. PSA-NE: Microcosmos oxidados no estériles. Promedios de triplicados con sus respectivas desviaciones estándar (barras). Se representan las medias y desvíos estándares (n=3). Las letras minúsculas representan significancia en cada condición entre tratamientos a distintos tiempos (ANOVA dos vías, Test de Tukey ($p < 0,05$)).

En los microcosmos PSA-A, ambos hongos incrementaron significativamente (p -valor $< 0,0001$) el número de copias del gen ITS *Gram* en comparación con los microcosmos FP. En estas condiciones, LPSC 436 registró el mayor número de copias respecto de LPSC 232, manteniéndose a lo largo del tiempo.

Respecto del gen *lcc1*, el mayor número de copias detectado en el bioaumentación con LPSC 436 tanto en FP como PSA sugiere que este hongo tendría una sobrevivencia mayor que LPSC 232 en ambas condiciones. Es de destacar que sólo en PSA, ambos genes estimadores indican que LPSC 436 logró establecerse.

En presencia de la microbiota, los tratamientos control FP y PSA registraron un incremento en el número de copias del gen ITS *Gram* sugiriendo la presencia y estimulación del desarrollo de hongos del orden Polyporales en el barro (FPNE), y su resistencia al estrés oxidativo y resiliencia en los microcosmos PSA-NE.

El incremento del número de copias observado en el bioaumentación con LPSC 232 en FP sugirió el crecimiento de los Polyporales luego de 60 días, superando el número de copias del gen ITS *Gram* detectado en el bioaumentación con LPSC 436, en ambos tiempos.

En los microcosmos PSA, ambos tratamientos de bioaumentación incrementaron el número de copias del gen ITS *Gram* luego de 30 y 60 días, comparado con el control. Particularmente, el bioaumentación con LPSC 232 promovió un mayor número de copias del gen indicador durante todo el tratamiento, superando a lo observado en el bioaumentación con LPSC 436.

Analizando los resultados obtenidos de los microcosmos FP vs PSA, los tratamientos de bioaumentación con ambos hongos, promueven el crecimiento de los Polyporales tempranamente en PSA. En cambio, este incremento sería más lento en el barro sin oxidar, y máximo en el bioaumentación con LPSC 232.

Al igual que lo observado con el estimador ITS *Gram*, el incremento inicial del número de copias del gen *lcc1* en presencia de la microbiota nativa sugiere la presencia y estimulación del desarrollo microbiano durante los tratamientos en FPNE. El incremento del número de copias del gen *lcc1* en PSA-NE sugiere la resistencia al estrés oxidativo y resiliencia de las poblaciones.

Ambos tratamientos de bioaumentación en FPNE evidenciaron los valores más bajos de copias del gen *lcc1* luego de 30 días, y no superaron al control durante todo el tratamiento. No obstante, el incremento en número de copias del gen *lcc1* entre los 30

y 60 días observado en cada bioaumentación, acompañó el incremento observado del gen ITS *Gram* en estos microcosmos.

En los tratamientos PSA-NE, únicamente el bioaumentación con LPSC 232 incrementó significativamente los valores del número de copias del gen *lcc1* comparado con el control, luego de 30 y 60 días.

En la **Tabla VI. 4** se presentan los resultados del número de copias del gen 16S rARN por ng de ADN extraído en los sistemas no estériles.

El análisis estadístico realizado entre los microcosmos control verificó el efecto del tratamiento oxidativo sobre la biota nativa del barro FP, a través de la reducción significativa del número de copias del gen 16S rARN. El aumento del gen indicador durante la subsiguiente incubación evidenció la recuperación de la comunidad bacteriana tanto en PSA, como en FP.

El bioaumentación con LPSC 232, tanto en FP como en PSA, no evidenció cambios significativos en el número de copias del 16S rARN respecto del control. En cambio, el incremento de la microbiota bacteriana fue significativo en el bioaumentación con LPSC 436.

Tabla VI. 4. Número de copias del gen 16S rARN por ng de ADN extraído a partir de los microcosmos FP y PSA en condiciones no estériles.

Tratamientos	N° copias del gen 16S rARN/ng ADN	
	FP-NE	PSA-NE
Control t0	$3 \times 10^4 \pm 7 \times 10^{3a}$	$3 \times 10^3 \pm 3 \times 10^{3a}$
Control 30 días	$9 \times 10^4 \pm 2 \times 10^{4bc}$	$2 \times 10^4 \pm 7 \times 10^{3ab}$
Control 60 días	$9 \times 10^4 \pm 3 \times 10^{4bc}$	$4 \times 10^4 \pm 2 \times 10^{4abc}$
LPSC 232 30 días	$7 \times 10^4 \pm 1 \times 10^{4abc}$	$1 \times 10^5 \pm 5 \times 10^{4bc}$
LPSC 232 60 días	$2 \times 10^5 \pm 8 \times 10^4 c$	$3 \times 10^5 \pm 7 \times 10^4 bc$
LPSC 436 30 días	$5 \times 10^4 \pm 3 \times 10^{4ab}$	$1 \times 10^5 \pm 2 \times 10^4 c$
LPSC 436 60 días	$1 \times 10^5 \pm 4 \times 10^4 c$	$3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4 c$

Promedio \pm DS. Letra común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$, ANOVA una vía, Test Tukey)

VI.4.5 Efecto de los tratamientos sobre las comunidades bacterianas y fúngicas

A partir del ADN extraído de los microcosmos FP y PSA en condiciones no estériles para todos los tratamientos, se realizó la amplificación de los segmentos hipervariables V3-V5 y del transcripto interno primario (ITS1), y la posterior separación de fragmentos por DGGE, con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos LPSC 232 y LPSC 436 sobre la estructura de las comunidades bacterianas y fúngicas respectivamente. Se obtuvieron los perfiles de DGGE para los tiempos 0, 30 y 60 días por triplicados. Dada la similitud apreciada entre las réplicas, se presenta sólo un set de resultados. A partir de las imágenes digitalizadas de los geles de DGGE para el gen 16S rARN (**Figura VI. 28**) se construyó un dendrograma para evaluar la similitud de comunidades bacterianas entre tratamientos.

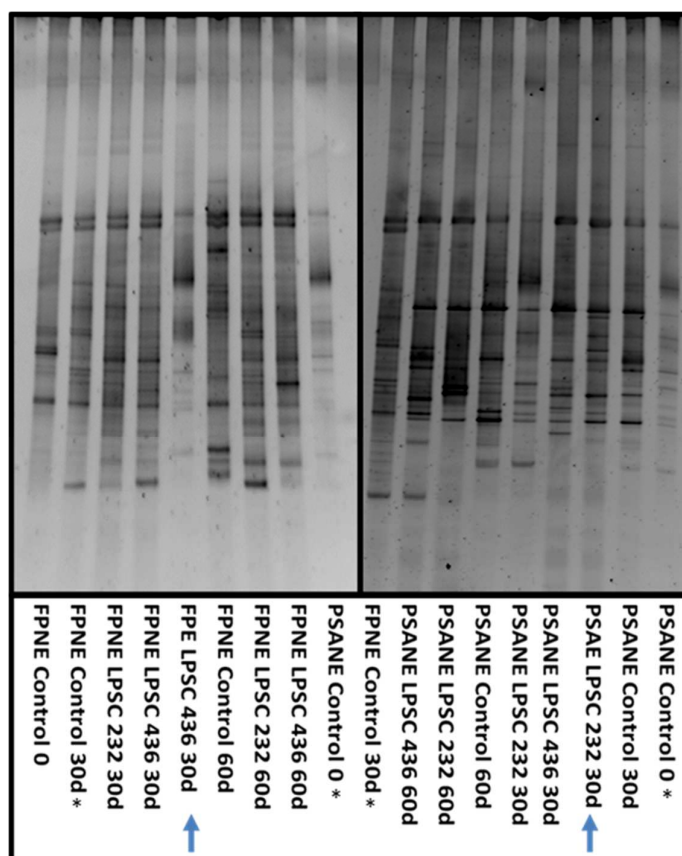


Figura VI. 28. Perfiles de bandas obtenidas por PCR-DGGE para el gen 16S rARN de los microcosmos en los distintos tratamientos. Las flechas azules corresponden a controles negativos. * Patrones internos entre los dos geles.

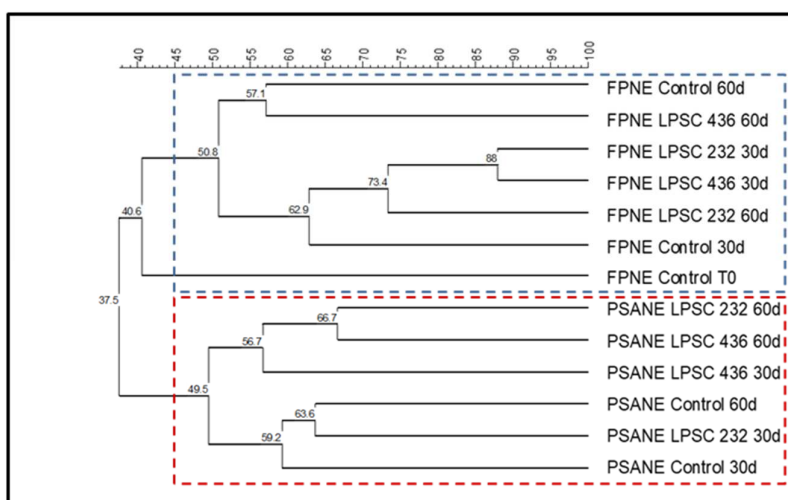


Figura VI. 29. Dendrograma basado en el análisis de las densidades ópticas de las bandas de DGGE para 16S rARN, de los tratamientos FP y PSA en condiciones no estériles (NE). El UPGMA se construyó a partir de la matriz de distancia calculada mediante el coeficiente de Jaccard, utilizando el software Gel Compare II (Applied Maths, Kortrijk 180 Belgium).

En el dendrograma (**Figura VI. 29**) se puede apreciar la formación de dos *clusters* con una similitud de 37,5%, uno de los cuales está conformado por los microcosmos FP (40,6%), y el otro por los microcosmos con el barro PSANE (49,5%), atribuido al efecto del tratamiento oxidativo aplicado al barro FP.

Dentro del *cluster* integrado por los tratamientos FPNE se aprecia la formación de un *subcluster* (73,4%) que incluye los microcosmos inoculados luego de 30 días y el microcosmos con LPSC 232 luego de los 60 días. Esta similitud sugiere un cambio similar en la comunidad bacteriana provocado por el crecimiento fúngico de ambos hongos luego de 30 días, respecto de microcosmos control sin inocular. Así mismo, se aprecia que dicho efecto perdura hasta el día 60, en los microcosmos de bioaumentación con LPSC 232.

La formación del *subcluster* (57,1%) entre el microcosmos inoculado con LPSC 436 a los 60 días y el microcosmos control al mismo tiempo, sugiere que el efecto inicial de la inoculación se pierde luego de los 60 días.

Respecto de los tratamientos de bioaumentación en PSANE, la formación del *subcluster* al 56,7% de similitud sugiere un efecto marcado sobre la estructura de la

comunidad por la inoculación con LPSC 436, luego de los 30 días y hasta el final del tratamiento. En cambio, solo hacia el final del tratamiento se aprecia el efecto de la inoculación con LPSC 232 similar al provocado por LPSC 436, y diferentes del control sin inoculación.

En la **Figura VI. 30** se presentan los perfiles de bandas obtenidos de los microcosmos FP y PSA para el gen ITS1 en los distintos tratamientos. Los perfiles de bandas de los cultivos agarizados de LPSC 232 y LPSC 436, fueron utilizados para detectar el establecimiento de los hongos inoculados.

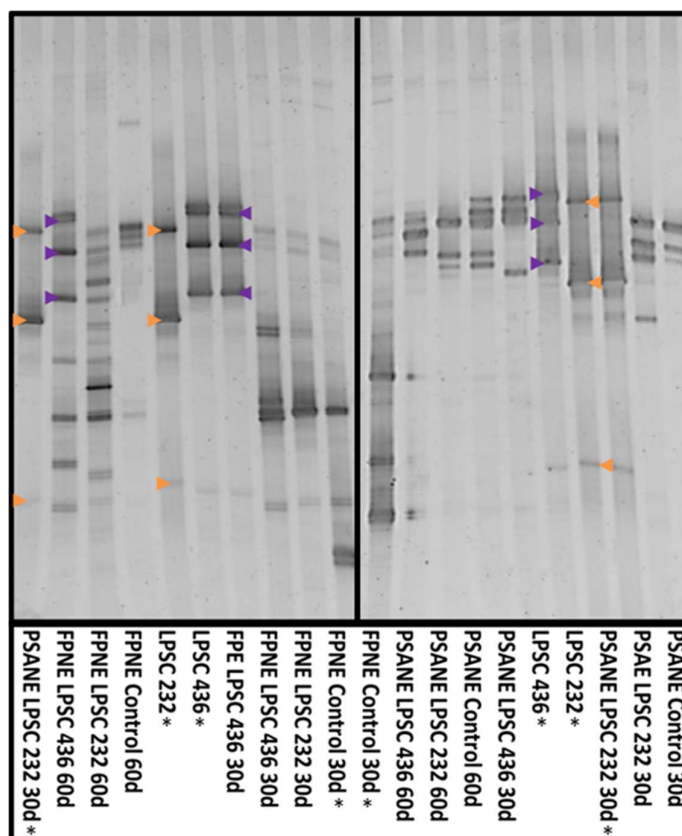


Figura VI. 30. Perfiles de bandas obtenidas por PCR-DGGE para el gen ITS1 de los microcosmos FP y PSA en los distintos tratamientos y tiempo, y cultivos LPSC 232 y 436 en medio agarizado. Las flechas naranjas indican las bandas asociadas a *C. rigida* y las violetas a *G. subargentea*. *patrones internos entre los dos geles.

De la observación de los perfiles obtenidos es posible inferir el establecimiento de LPSC 232 tanto en el microcosmos PSAE como en el PSANE, luego de 30 días.

El establecimiento de LPSC 436 pudo ser inferido en el microcosmos FP en condición axénica luego de los 30 días, y en FPNE a los 60 días.

Luego se procedió a comparar los perfiles de bandas entre tratamientos. Por problemas de gradiente entre ambos geles se dificultó el alineamiento de éstos con el software específico, por lo que se procedió a analizar los geles por separado. La **Figura VI. 31** muestra el dendrograma A correspondiente a los microcosmos FP, mientras que B agrupa a los microcosmos PSA.

En una primera observación, el análisis en ambas condiciones sugiere que los agrupamientos se correspondieron con la variable tiempo, independientemente del tratamiento. No obstante, es posible inferir que los tratamientos de inoculación en los microcosmos FP condicionaron una estructura de comunidad fúngica similar luego de 60 días. Mientras que, únicamente la inoculación con LPSC 232 habría generado un cambio en la comunidad fúngica del microcosmos PSA, luego de 30 días.

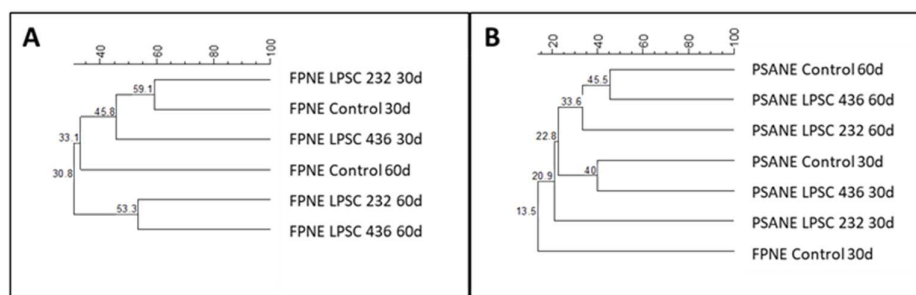


Figura VI. 31. Dendrograma basado en el análisis de las densidades ópticas de las bandas de DGGE para 18S rRNA de los tratamiento FP (A) y PSA (B) en condiciones no estériles (NE) y de bioaumentación con LPSC 232 Y LPSC 436. El UPGMA se construyó a partir de la matriz de distancia calculada mediante el coeficiente de Jaccard, utilizando el software Gel Compare II (Applied Maths, Kortrijk 180 Belgium).

Con el fin de profundizar en el análisis del efecto del bioaumentación fúngica sobre las comunidades bacterianas y fúngicas del barro FP y PSA, se evaluaron los resultados

de secuenciación masiva del gen 16S rARN y 18S rARN de los microcosmos en condiciones no estériles.

La cobertura y calidad de la secuenciación (bTEFAP® Illumina), se presentan en la **Tabla VI. 5** a través del índice de *Good*, considerando las frecuencias de OTU observadas sobre el total de secuencias en cada tratamientos, obteniéndose valores mayores al 95%, lo que indica una muy buena cobertura. Adicionalmente se realizaron las curvas de rarefacción normalizadas al menor número de secuencias registrado por muestra. Para ambos genes la tendencia al aplanamiento de las curvas corroboró la buena cobertura de la secuenciación (**Anexo Figuras A.6 y 7**).

El rango de secuencias bacterianas varió entre 21.327 y 56.377, observándose una reducción del 38% en el número de OTU en las muestras de los tratamientos PSA respecto de las del tratamiento FP.

El rango de las secuencias fúngicas varió entre 2.891 y 184.695. Si bien el rango es amplio, luego de la normalización del número de OTUs al menor número de secuencias por muestra, las curvas de rarefacción se agruparon de manera similar, a excepción de los tratamientos PSANE Control t0 y PSANE LPSC 232 a los 30 días que mostraron los valores más bajos.

Para evaluar la diversidad de las comunidades bacterianas y fúngicas presentes en muestras de los microcosmos luego de los tratamientos se calcularon los estimadores de alfa diversidad (ver **Sección III. 6.5** Materiales y Métodos) que contemplan riqueza, diversidad y equidad de especies.

Tabla VI. 5. Número de secuencias obtenidas de los fragmentos amplificados del gen 16S rARN y 18S rARN por secuenciación masiva, número de OTUs observados e índice de Good porcentual.

Tratamiento	Tiempo (días)	<i>Bacteria y Archaea</i>			<i>Hongos</i>		
		Número de secuencias	OTUs observados	Índice de Good (%)*	Número de secuencias	OTUs observados	Índice de Good (%)*
	0	21.327	356	96	2.891	134	98
<i>Control</i>	30	22.584	400	95	98.662	175	95
	60	34.768	342	97	3.435	240	95
<i>FPNE</i>							
<i>LPSC 232</i>	30	35.440	420	96	97.939	163	96
	60	36.971	391	97	75.210	213	94
<i>LPSC 436</i>	30	54.092	408	98	110.799	164	96
	60	37.350	394	97	128.351	159	96
	0	43.213	280	98	53.931	88	98
<i>Control</i>	30	56.377	258	98	21.394	227	95
	60	43.098	237	97	42.977	212	95
<i>PSANE</i>							
<i>LPSC 232</i>	30	47.059	225	98	184.695	94	99
	60	49.761	218	98	39.546	211	96
<i>LPSC 436</i>	30	55.098	239	98	34.994	205	96
	60	42.769	224	97	34.691	229	96

*Los índices de Good se realizaron sobre las secuencias normalizadas a la menor, 12.725 para bacterias y 2.089 secuencias para hongos.

La **Figura VI. 32** presenta los estimadores de diversidad Chao1, Shannon e Inversa de Simpson para bacterias (A) y hongos (B) a partir de los microcosmos FP (azul) y PSA

(rojo) luego de los tratamientos de bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 y el análisis de varianza.

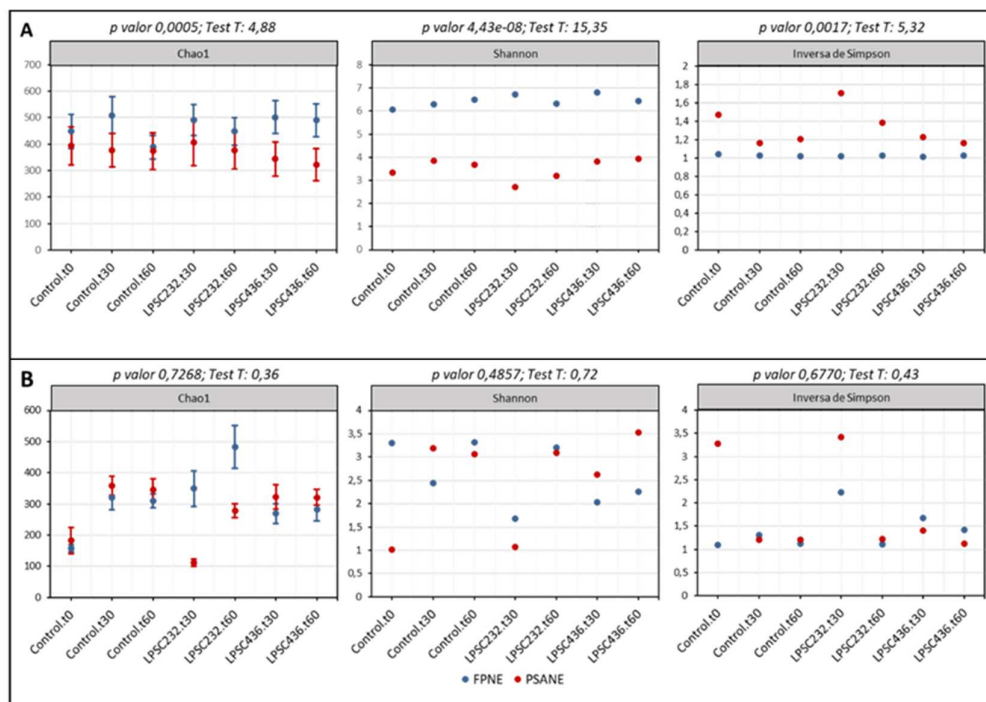


Figura VI. 32. Análisis de alfa diversidad bacteriana y fúngica para los distintos tratamientos. Índices de Chao1, Shannon e inversa de Simpson para Bacteria y Archaea (A) y Fungi (B). Se indica el *p*-valor correspondiente al ANOVA entre tratamientos utilizando prueba T con un nivel de significancia del 95%.

Los resultados revelaron que la oxidación del barro FP con PSA disminuyó la riqueza bacteriana, siendo significativa en los tratamientos con LPSC 436. La diversidad de especies descendió (54% índice de Shannon), independientemente de la presencia de los hongos, incrementándose la dominancia de especies en presencia de LPSC 232 a los 30 y 60 días.

En cuando a las comunidades fúngicas no se observaron cambios significativos en los estimadores de diversidad. Sin embargo, en barro oxidado la presencia de LPSC 232 disminuyó la riqueza y equidad de especies fúngicas.

El análisis de la composición taxonómica bacteriana de los tratamientos control FPNE y control PSANE, evidenció un predominio de los *phyla* Proteobacteria (clases α , β y γ) y Firmicutes.

Las principales variaciones se observaron a nivel de familia a lo largo del tiempo de incubación y por la acción del persulfato de amonio (**Figura VI. 33**).

En la condición inicial del tratamiento control FPNE fueron predominantes los órdenes Burkholderiales (25,1%)/Comamonadaceae (23,9%), Anaerolineales/Anaerolinaceae (17,7%), Lactobacillales (12,6%)/Carnobacteriaceae (10,9%) y Pseudomonadales (10,7%)/Pseudomonadaceae (9,6%). Entre los géneros más abundantes se encontraron a *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y T78. Dicha proporción se modificó con el paso del tiempo, predominando a los 30 días α -Proteobacterias pertenecientes a las familias Caulobacteraceae (24,8%)/*Caulobacter* sp, *Mycoplana* sp, Rhizobiaceae (11,0%)/*Agrobacterium* sp, Sphingomonadaceae (5,3%)/*Sphingomonas* sp y otro género no identificado, y en menor proporción γ -Proteobacterias Pseudomonadaceae (8,9%)/*Pseudomonas* sp y otro género no identificado, y Xanthomonadaceae (5,4%)/*Pseudoxanthomonas* sp. Además de un incremento en los *phyla* Firmicutes (9,9%) representado por la familia Bacillaceae (6,4%)/*Bacillus* sp, y Actinobacteria (4,9%) principalmente la familia Streptomycetaceae (3,1%)/*Streptomyces* sp. Luego de los 60 días, las Proteobacterias disminuyeron considerablemente a la mitad respecto de la proporción inicial. Representantes de los *phyla* Chloroflexi (familia Anaerolinaceae, 26,3%/T78 y *Longilinea* sp), Firmicutes 19,8% (familias Thermoactinomycetaceae (5,6%), Clostridiaceae (4,9%)/*Clostridium* sp, Lachnospiraceae (3,9%)), Bacteroidetes (11,3%, principalmente la familia Porphyromonadaceae), Actinobacteria (8,9%), y Euryarchaeota (Methanobacteriaceae, *Methanobacterium* sp 6,9%) se incrementaron considerablemente respecto del tiempo inicial.

Al comparar los tratamientos control con los tratamientos de bioaumentación con LPSC 232 y 436 a los 30 y 60 días de incubación, se observó un aumento de bacterias asociadas a la degradación de PAH pertenecientes a las familias Xanthomonadaceae (γ -Proteobacteria), Sphingomonadaceae, Caulobacteraceae y Rhizobiaceae (α -Proteobacteria), así como también desulfobacterias representantes de la familia

Ectothiorhodospiraceae. Con respecto a representantes del *phylum* Firmicutes, a los 30 días en ambos tratamientos aumentó la proporción del género *Paenibacillus*, y hacia los 60 días en el tratamiento LPSC 436 se incrementó a más de doble el género *Bacillus*, asociado al descenso de Actinobacteria.

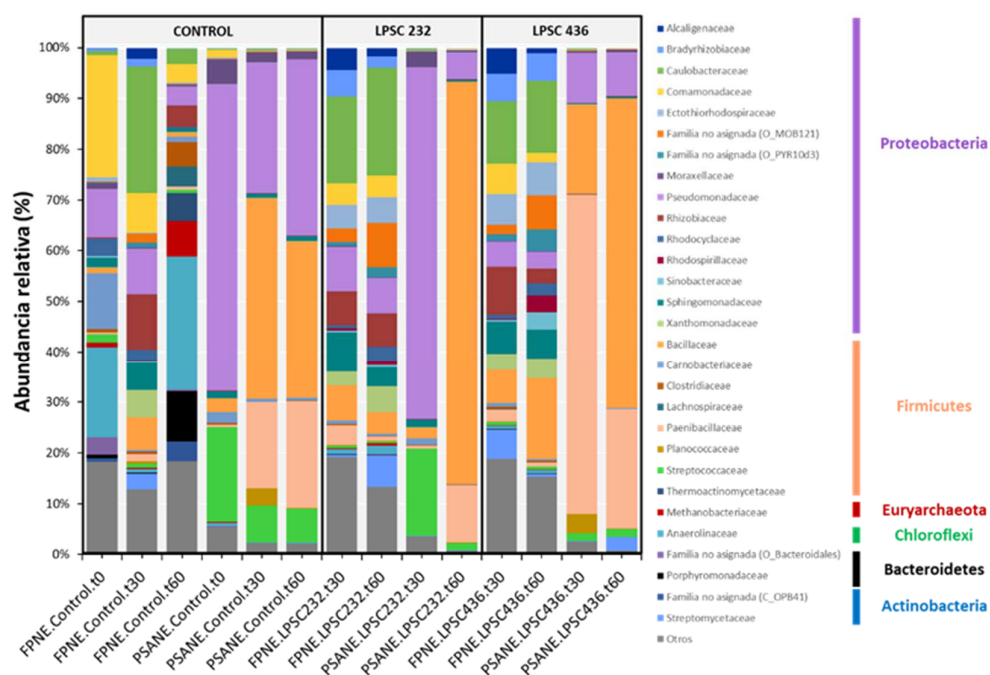


Figura VI. 33. Perfiles taxonómicos de las comunidades bacterianas a nivel de Familia de los microcosmos tratados con PSA y bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 en condiciones no estériles. Se consideró las abundancias de familias menores a 1% como "Otros". Las barras en la leyenda indican el Phylum al cual pertenecen las familias.

En los microcosmos PSANE, se evidenció un incremento de bacterias pertenecientes a las familias Pseudomonadaceae (60,1%) y Streptococcaceae (18,5%) al inicio del monitoreo. Luego de los 30 y 60 días las familias Bacillaceae (39,4-30,7%, respectivamente) y Paenibacillaceae (16,8-20,9%, respectivamente) incrementaron su abundancia, provocando un descenso de las anteriores.

Al comparar los tratamientos de bioaumentación con sus respectivos controles, se observó que luego de 30 días la presencia de LPSC 232 no alteró a las poblaciones dominantes resultando un 68,8% Pseudomonadaceae y un 17,0% Streptococcaceae.

Luego de 60 días, la familia Bacillaceae (79,3%) alcanzó la mayor abundancia registrada entre los tratamientos, junto con representantes de la familia Paenibacillaceae (11,2%).

El bioaumentación con LPSC 436, se asoció con el incremento la familia Paenibacillaceae (62,6%) que predominó luego de 30 días. Hacia el final del monitoreo la proporción de miembros de la familia Paenibacillaceae se invirtió respecto de la familia Bacillaceae (60,8%), revelando una composición similar al tratamiento con LPSC 232.

Con la finalidad de comparar la diversidad bacteriana entre los tratamientos, se realizó un análisis de beta diversidad aplicando el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), a partir de una matriz de distancia (similitud/disimilitud) ponderando la abundancia de OTUs entre tratamientos (método *Weighted Unifrac Distance*). En el gráfico obtenido la proximidad entre las muestras indica mayor similitud.

El análisis estadístico ANOSIM reveló diferencias significativas entre muestras en función del pretratamiento de oxidación con PSA (R: 0,655; p-valor < 0,001), donde las muestras PSANE (elipse roja) se separaron de las muestra FPNE (elipse azul), como se observa en la **Figura VI. 34**.

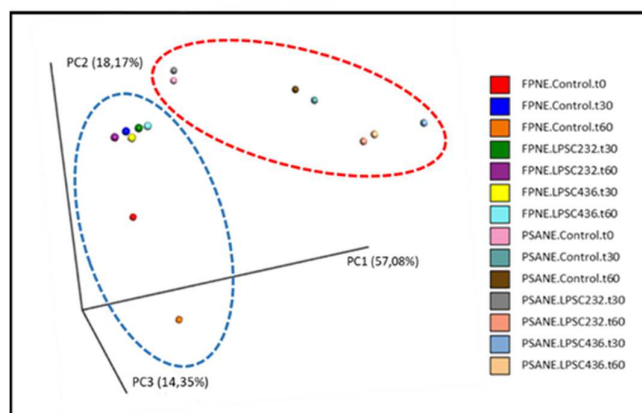


Figura VI. 34. Análisis de betadiversidad a partir del gen 16S rARN. Análisis de Coordenadas principales ponderado sobre la base de la matriz de distancia UniFrac. Las elipses punteadas agrupan las muestras oxidadas (rojo) y sin oxidar (azul).

En la figura se aprecia que las muestras de los tratamientos de bioestimulación y bioaumentación sobre el barro FP no oxidado (FPNE), se distribuyeron según las componentes 2 y 3. El desplazamiento de los controles respecto del día 0 sugiere el efecto de la bioestimulación sobre las poblaciones bacterianas del barro. Del agrupamiento de las muestras de ambos tratamientos de bioaumentación se infiere que la presencia y crecimiento del hongo inoculado no modificó el arreglo bacteriano, minimizando el efecto promovido por la bioestimulación.

Las muestras correspondientes a los tratamientos de bioaumentación post tratamiento oxidativo (PSANE) se distribuyeron según la componente 1, revelando subagrupamientos entre los tratamientos control a los 30 y 60 días, y los tratamientos LPSC 232 y 436 a los 60 días. De la posición relativa de las muestras es posible asumir que la bioestimulación de las poblaciones sobrevivientes tuvo un corto efecto, evidenciado luego de 30 días. En cambio, el tratamiento de bioaumentación produjo mayores cambios, manteniendo el arreglo de poblaciones bacterianas sobrevivientes a la oxidación en presencia de LPSC 232 luego de 30 días y provocando mayores cambios en el bioaumentación con LPSC 436. El efecto diferencial de ambos bioaumentos se reduce con el tiempo del tratamiento.

El análisis de la diversidad fúngica del microcosmos FPNE reveló el predominio de las clases Agaricostilbomycetes (24,8%), Basidiobolomycetes (16,4%) y Eurotiomycetes (16,4%) pertenecientes al filo Basidiomycota, Zoopagomycota y Ascomycota respectivamente (**Figura VI. 35**).

Luego de 30 días de incubación dominaron las familias Aspergillaceae (52,9%), Trichocomaceae (23,6%) y Hypocreaceae (11,2%). Mientras que luego de los 60 días sólo dos familias Glomerellaceae (30,7%) y Aspergillaceae (36,7%) revelaron las mayores abundancias.

El bioaumentación con LPSC 232 condujo luego de 30 días al predominio de los miembros de la familia Aspergillaceae con un 86,9% de abundancia. Sin embargo, luego de 60 días la riqueza y equitatividad de especies alcanzó valores similares al inicio, predominando los miembros de las familias Aspergillaceae (33,4%), Symptoventuriaceae (13,6%) y una familia sin asignación taxonómica perteneciente a la clase Leotiomycetes (11,6%).

El bioaumentación con LPSC 436, no evidenció mayores cambios en el perfil taxonómico luego de 30 días respecto del control. Luego de los 60 días, se observó un dominio de la familia Polyporaceae con un 55,0%, con un descenso de la riqueza de especies respecto de su control.

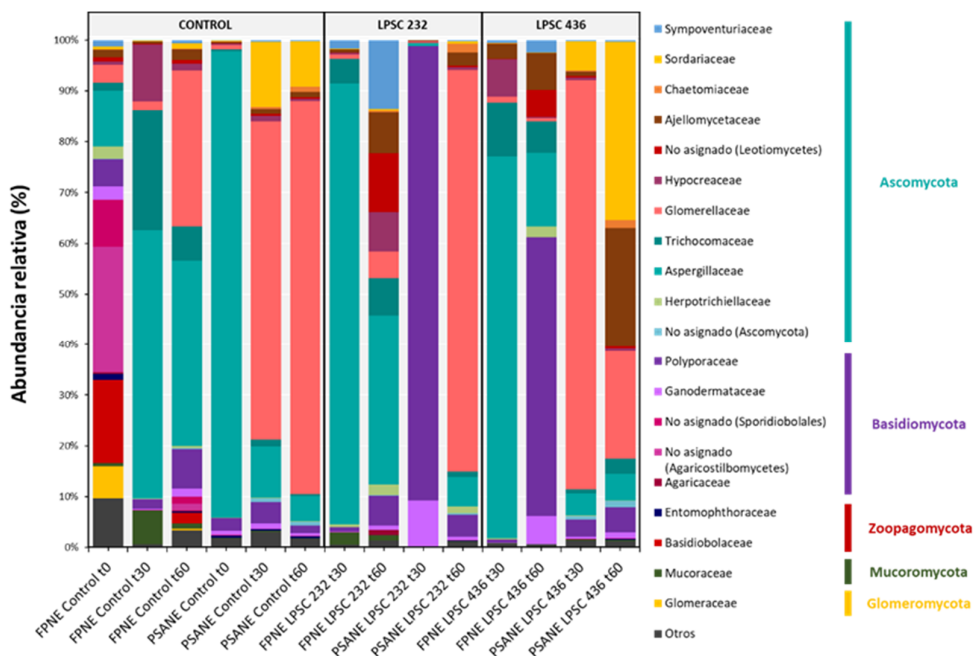


Figura VI. 35. Perfiles taxonómicos de las comunidades fúngicas a nivel de Familia de los microcosmos tratados con PSA y bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 en condiciones no estériles. “Otros” corresponde a abundancias relativas menores al 1%. Las barras en la leyenda indican el Phylum al cual pertenecen las familias.

El tratamiento oxidativo produjo un descenso en la diversidad y un aumento en la dominancia de taxas, representada por los miembros de la familia Aspergillaceae (91,9%) correspondiente al orden Eurotiales. Luego de 30 y 60 días de incubación, los microcosmos control PSANE registraron un descenso en la abundancia de especies de dicha familia (10,0 y 4,9%, respectivamente), y un aumento en las familias Glomerellaceae (62,8 y 77,5%, respectivamente) y Sordariaceae (12,9 y 9,0%, respectivamente).

En el bioaumentación con LPSC 232, luego de 30 días se observó la dominancia de la familia Polyporaceae (89,5%), de la cual el hongo LPSC 232 es miembro. Luego de 60

días de incubación, se incrementó el número de OTUs, acompañado por un aumento en la diversidad y riqueza de especies, predominando la familia Glomerellaceae (79,1%).

El bioaumento con LPSC 436 generó un perfil taxonómico similar al control luego de los 30 días, no así hacia el final de monitoreo donde dominaron las familias Sordariaceae (35,1%) y Ajellomycetaceae (23,5%).

Con la finalidad de comparar la diversidad fúngica entre los tratamientos, se realizó el análisis de beta diversidad a partir de método Bray-Curtis representado en un PCoA.

Como se puede observar en la **Figura VI. 36**, la oxidación con PSA no generó subagrupamientos en la diversidad fúngica (PERMANOVAR: 0,28; p-value < 0,005). La proximidad de los controles iniciales FP y PSA sugiere la resistencia de los hongos nativos frente al pretratamiento de oxidación.

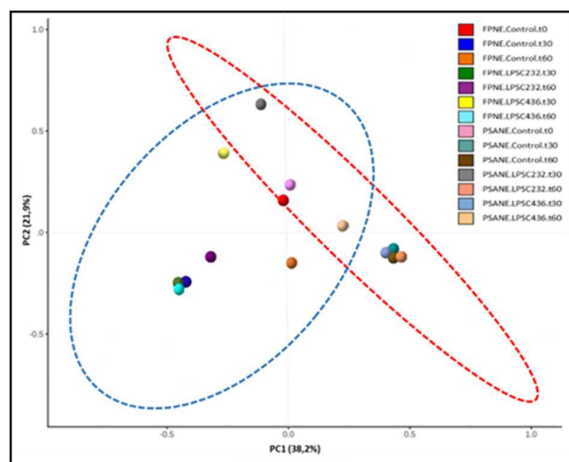


Figura VI. 36. Análisis de beta diversidad fúngica a partir del gen 18S rARN. Análisis de Coordenadas principales sobre la base de la matriz de distancia por el método Bray-Curtis. Las elipses punteadas agrupan las muestras oxidadas PSANE (rojo) y FPNE (azul).

La posición relativa de las muestras de los tratamientos Control FP luego de 30 y 60 días evidencian los cambios producidos por la bioestimulación sobre las poblaciones de hongos autóctonos del barro. El distanciamiento apreciado entre las muestras de

bioaumentación respecto de los Controles luego de 30 y 60 días, sugieren el efecto del hongo alóctono sobre las poblaciones autóctonas del barro, siendo inicialmente notorio en el bioaumentación con LPSC 436.

La proximidad entre los Controles del barro pretratado con PSA luego de 30 y 60 sugiere que la bioestimulación con el rastrojo no modificó el arreglo de los hongos nativos sobrevivientes al tratamiento oxidativo. De la posición relativa entre las muestras se evidencia que el bioaumentación con LPSC 232 fue más influyente en la diversidad de la biota fúngica nativa luego de los 30 días de tratamiento.

VI.5 Discusión

Capacidad degradadora de C. rigida LPSC 232, G. subargentea LPSC 436 y G. sepiarium LPSC 735 sobre un suelo contaminando artificialmente con fenantreno en presencia y ausencia de microbiota nativa

Los hongos causantes de la pudrición blanca (HPB) revelaron resultados prometedores en la remoción de fenantreno en suelo cuando fueron inoculados en forma axénica. Tras 90 días de incubación, *C. rigida* LPSC 232 removió un 55% del hidrocarburo, mientras que *G. subargentea* LPSC 436 un 22%. Estos resultados se correspondieron con estudios previos realizados por Gómez y colaboradores (2006) donde *C. rigida* LPSC232 reveló la capacidad de degradar fenantreno, antraceno, benzo(a)pireno y *p*-benzoquinona luego de 15 días de incubación en cultivo bajo condiciones de fermentación en estado sólido (Rodríguez-Couto *et al.*, 2002).

El hongo causante de la pudrición parda (HPP) *G. sepiarium* LPSC 735 presentó el mayor porcentaje de degradación de fenantreno (83,5%) tras 90 días de incubación, removiendo un 98,5% a los 120 días. Algunos hongos no ligninolíticos pueden degradar PAH en condiciones co-metabólicas a metabolitos secundarios como trans-dihidrodióles, fenoles, quinonas y epóxidos a partir de sistemas enzimáticos

intracelulares como citocromo P450 y la epóxido hidrolasa (Cerniglia & Sutherland, 2010).

Sin embargo, este hongo en cultivo dual con *G. subargentea* LPSC 436 reveló un porcentaje menor (77%). Varios autores demostraron que la capacidad de crecimiento y degradación de rastrojo de trigo en co-cultivos entre HPP y HPB decrece en comparación con los cultivos individuales (Arora, 1995; Hermosilla *et al.*, 2018). En contraposición a los resultados obtenidos en co-cultivos agarizados (**Sección V.1.1.3. Capítulo V**), donde se observó una parcial interacción entre los micelios de ambos hongos, no se evidenció ninguna interacción visual entre los rastrojos inoculados individualmente con cada hongo.

La inhibición de la capacidad de remoción de *G. sepiarium* LPSC 735 en cultivo dual puede ser atribuida a mecanismos competitivos temporales dados entre ambos hongos, causados por factores abióticos del suelo y/o la capacidad individual de cada hongo de colonizar el soporte lignocelulósico (Boddy, 2000). Además, se debe considerar que la extrapolación de una interacción en cultivo agarizado a escala microcosmo con suelo, no garantiza los mismos resultados (Dowson *et al.*, 1988; Pearce, 1990; Griffith & Boddy, 1991).

En presencia de la microbiota nativa del suelo, LPSC 436 y LPSC 735 individualmente aceleraron la remoción de fenantreno a partir de 30 días, independientemente de sus estrategias fisiológicas. Brodkorb y Legge (1992) comprobaron que cuando se aplica el hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* sobre un suelo contaminado se puede mejorar la mineralización de PAH por parte de la microbiota nativa de manera sinérgica. En el caso de LPSC 232 no se evidenció sinergismo con la microbiota nativa en la remoción de fenantreno, aunque tampoco inhibió la actividad de las bacterias y hongos nativos en su degradación. Andersson y colaboradores (2003) demostraron una degradación diferencial de PAH (FLU, FEN, PIR y benzo[a]antraceno) de los hongos *Pleurotus ostreatus* (HPB) y *Antrodia vaillantii* (HPP) sobre un suelo contaminado artificialmente, siendo más rápida en presencia del HPB, posiblemente por sus distintos patrones de colonización de la madera, y la existencia de mecanismos de degradación diferenciales. Además, los autores registraron un efecto negativo sobre la comunidad bacteriana tras la

acumulación de metabolitos derivados de la actividad de *P. ostreatus*, mientras que *A. vaillantii* generó un efecto positivo sobre la actividad bacteriana, posiblemente por la no acumulación de metabolitos de degradación y la disponibilidad de compuestos solubles a consecuencia de su rol celulítico durante la degradación del rastrojo.

Por otra parte, la co-inoculación de LPSC 436 y LPSC 735 generó un efecto inhibitorio temprano de la capacidad degradadora fúngica individual en respuesta a la competencia con la microbiota. La interacción de los hongos inoculados con las bacterias y hongos nativos del suelo podría haber generado una situación de estrés cuya respuesta repercutió sobre la remoción del fenantreno. Muchos factores bióticos y abióticos (como VOCs, DOCs, enzimas extracelulares, melanina) pueden afectar el progreso y los resultados de las interacciones fúngicas (Hiscox *et al.*, 2018) Esto explicaría las diferencias entre el cultivo dual en medio agarizado con una mezcla de PAH, y en los microcosmos con un sustrato lignocelulósico. La inhibición de la microbiota nativa en los microcosmos de suelo contaminado podría ser atribuida a un efecto colateral de los hongos, que individualmente liberaron compuestos de reacción como un mecanismo de competencia fúngica por los recursos disponibles en la matriz contaminada.

Los hongos descomponedores de la madera poseen diferentes estrategias de colonización, entre ellas, la liberación de exudados cuyos compuestos pueden inhibir o estimular a otros microorganismos, incluyendo a otros hongos lignívoros. Esto puede ser a distancia y/o en forma directa a través de su contacto (Boddy, 2000). Probablemente el retraso en la remoción de fenantreno en el sistema co-inoculado con LPSC 436 y LPSC 735 sea consecuencia de un efecto antagónico a distancia entre estos hongos, involucrando compuestos extracelulares difusibles (Heilmann-Clausen & Boddy, 2005), que pueden también afectar sus sistemas enzimáticos. Este tipo de interacción puede relacionarse con el rol que cada hongo tiene cuando coloniza madera u otro tipo de sustrato de crecimiento, dado que los hongos de pudrición parda y pudrición blanca presentan diferencias en cuanto al tipo de colonización y su patrón de degradación, que a la vez puede estar condicionado por el tipo de sustrato y otros factores ambientales (Hermosilla *et al.*, 2018). Investigaciones sobre la sucesión fúngica en madera han mostrado que los Basidiomycetes dominan los primeros estadios de descomposición, mientras que los Ascomycetes son dominantes en los estadios tardíos del ataque

(Fukasawa *et al.*, 2011). Sin embargo, en el suelo y en otros hábitats variados caracterizados con mayor disponibilidad de nitrógeno y con un espectro amplio de compuestos carbonados, no necesariamente poliméricos, los representantes del *phylum* Ascomycota son los dominantes.

Sabiendo que la competencia es la interacción más frecuente entre hongos pertenecientes al subreino Dikarya, condicionada principalmente por los nutrientes y consecuentemente por el espacio, Boddy (2000) clasificó a los hongos sobre la base de sus relaciones con otros coetáneos en dos tipos: competidores por recursos primarios (recursos no colonizados) o competidores por recursos secundarios (recursos colonizados por otros hongos). Puesto que los ensayos se realizaron utilizando rastrojo previamente inoculado con los hongos alóctonos, solo la competencia por recursos secundarios pudo haber contribuido a esta interacción. No obstante, el sistema de estudio es mucho más complejo ya que los hongos están expuestos al crecimiento en contacto con suelo contaminando con fenantreno una matriz fuente de muchos compuestos que no son ni tampoco necesariamente derivan de sustratos leñosos y donde el estado nutricional y la estructura es contrastante a la existente creciendo sobre madera. Asimismo, en condiciones no estériles, la observación macroscópica de los sistemas reveló que el rastrojo colonizado incrementó su densidad micelar adquiriendo una coloración diferencial que pudo deberse al crecimiento de hongos nativos y/o a la transformación de las hifas del hongo alóctono, inicialmente hialinas, a formas miceliales con paredes rígidas y cargadas de metabolitos secundarios coloreados. Luego de 30 días, la presencia de la microbiota nativa afectó la permanencia de LPSC 735 en el rastrojo, sugiriendo que este hongo pudo ser desplazado por los hongos nativos. En cambio, LPSC 436 resultó más competitivo, en respuesta a que luego de los 60 días el rastrojo, vehículo del hongo, mostró sólo algunos signos que evidenciaron una posible colonización por hongos nativos (coloración).

*Efecto del bioaumentación con *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 sobre un suelo contaminado artificialmente con un barro petroquímico en presencia de microbiota nativa*

Luego de detectar la capacidad degradadora de fenantreno de los hongos LPSC 232 y LPSC 436 en suelo no estéril, se evaluó si dicho potencial degradador se evidenciaba en suelo contaminado con el barro FP al 10%.

Los valores de remoción de HT demostraron una activa capacidad degradadora de la microbiota nativa estimulada por el rastrojo, superando la actividad degradadora de ambos hongos ligninolíticos.

El análisis de la actividad enzimática reveló una rápida y mayor actividad deshidrogenasa de la biota del suelo en respuesta a la contaminación en el tratamiento BR. Dicha actividad pudo estar relacionada con los procesos de transformación de los contaminantes, conduciendo a una posterior eliminación neta de HT. Del Panno y colaboradores (2005) evidenciaron que el agregado de un barro petroquímico a un suelo genera cambios drásticos alterando la densidad de sus poblaciones y actividad enzimática. Los autores observaron que superada una etapa inicial de inhibición, el incremento de la actividad deshidrogenasa resulta proporcional a la concentración del contaminante, y conforme avanza la degradación de hidrocarburos, dicha actividad desciende.

En menor medida, el tratamiento de estimulación con rastrojo (BE) incrementó tempranamente la actividad deshidrogenasa e hidrolasa. Lladó y colaboradores (2013) comprobaron que la bioestimulación utilizando un sustrato lignocelulósico favorece el crecimiento de los hongos nativos de la matriz, así como la degradación de PAH de alto peso molecular por parte de la microbiota nativa después de 60 días de incubación en un suelo contaminado crónicamente por creosota. Si bien los valores de actividad lacasa en el tratamiento BE fueron bajos, ello sugiere la presencia en el sistema de microorganismos nativos productores de enzimas oxidativas.

No obstante la baja remoción de HT observada en presencia de los hongos, la microbiota del sistema inoculado con LPSC 232 expresó los mayores valores de actividad

deshidrogenasa e hidrolasa, sugiriendo que el bioaumentación con este hongo estimuló la microbiota nativa del barro y/o el suelo del sistema.

La actividad lacasa detectada en suelo en presencia de ambos hongos, fue inhibida por el barro. Sin embargo, LPSC 436 restableció sus valores máximos luego de 60 días de incubación, sugiriendo que este hongo es más competitivo que LPSC 232 bajo las condiciones del ensayo. La presencia de compuestos fenólicos solubles en el sistema a través de posibles interacciones con las enzimas disponibles pudo haber conducido a la baja o nula actividad lacasa en LPSC 232, siendo que inmoviliza a esta enzima imposibilitando así su extracción (Eichlerova *et al.*, 2012).

La fitotoxicidad evaluada durante los tratamientos evidenció diferentes comportamientos que pudieron relacionarse con la remoción de HC. El mayor porcentaje de inhibición de la germinación y elongación radicular de la semilla de *L. sativa* observado en el tratamiento BE se correspondió con el mayor porcentaje de eliminación de HC producido por la microbiota estimulada por el rastrojo, sugiriendo un efecto tóxico de los intermediarios metabólicos de la degradación de hidrocarburos (Medina, 2017). Dicho efecto fue reducido durante el tratamiento de inoculación con LPSC 232, apreciándose un mayor porcentaje de germinación y estimulación de la elongación radicular, pudiendo ser asociado a un proceso de detoxificación durante el crecimiento fúngico. Anastasi y colaboradores (2009) obtuvieron resultados similares tras detectar la remoción de pireno a partir de un consorcio de 3 HPB sobre suelo contaminado artificialmente. De los resultados es posible inferir que LPSC 232 degrada el sustrato lignocelulósico incrementando así la biodisponibilidad de nutrientes, promoviendo una mayor transformación de hidrocarburos por parte de la microbiota nativa y un descenso en la fitotoxicidad. Troncozo y colaboradores (2019) detectaron compuestos monoaromáticos/fenólicos tras la degradación del orujo de uva en presencia de *C. rigida* en condiciones axénicas, acompañado por un descenso de la fitotoxicidad en semillas de lechuga tras 90 días de incubación.

No obstante, los parámetros de fitotoxicidad en el tratamiento de bioaumentación con LPSC 232 fueron superiores al control en agua, observándose radículas finas con ausencia de pelos secundarios. Esta observación sugiere una respuesta diferencial de la morfología característica de la plántula al incremento de metabolitos secundarios,

indicando la actividad degradadora de la microbiota del sistema. El tratamiento BR tuvo un comportamiento similar, aunque en ausencia de estimulación.

En cambio, el tratamiento con *G. subargentea* LPSC 436 no alcanzaría a disminuir la fitotoxicidad a los 90 días, aunque comparando con el tratamiento BE se aprecia una tendencia a descender el efecto tóxico. Sumado a la mayor actividad lacasa extracelular detectada luego de los 60 días, este comportamiento sugiere una mayor actividad transformante de LPSC 436 capaz de generar metabolitos más tóxicos. La mayor concentración de HT detectada luego de los 90 días podría estar asociada a la habilidad transformadora de LPSC 436.

Liu y colaboradores (2017) demostraron que en la estrategia de inoculación con *P. ostreatus* sobre un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo el agregado de rastrojo influye en el contenido de lacasa detectada en suelo. Los autores explicaron el aumento de la actividad lacasa como respuesta del hongo al colonizar el sustrato, efecto que resulta beneficioso para promover el crecimiento del hongo y así garantizar su permanencia. Tomando este resultado como referencia, se ensayó la estrategia de inoculación sobre el rastrojo en contacto con la matriz contaminada para los experimentos de bioaumentación realizados directamente sobre el barro FP, con el fin de incrementar la alta actividad oxidativa durante las primeras etapas de colonización del rastrojo y potenciar al cometabolismo de los hidrocarburos del barro FP.

Efecto de los tratamientos combinados de oxidación (PSA) y bioaumentación fúngica con hongos ligninolíticos sobre la degradación de un barro API (FP) en presencia y ausencia de microbiota nativa

Implicancias del bioaumentación fúngica sobre el barro FP

Con el fin de garantizar la permanencia de los hongos alóctonos y promover el cometabolismo de los hidrocarburos en la matriz compleja, la aplicación de LPSC 232 y LPSC 436 sobre el barro FP se realizó en forma de suspensión miceliar sobre el sistema rastrojo+barro FP+arena.

En condiciones axénicas, la inoculación del rastrojo de trigo en contacto con el barro FP derivó en una pronta colonización de ambos hongos sobre el rastrojo extendiéndose hacia el barro FP tras dos semanas de tratamiento. Sin embargo, en condiciones no estériles, fue apreciado macroscópicamente que *C. rigida* LPSC 232 logró establecerse mejor comparado con *G. subargentea* LPSC 436. Este comportamiento se correspondió con la mayor actividad mineralizante detectada durante el desarrollo en rastrojo y FP de LPSC 232 (**Capítulo V**).

Al comparar la eficiencia de eliminación de HT en condiciones axénicas, los tratamientos de bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 no revelaron cambios significativos luego de 60 días de incubación. Sin embargo, al analizar los resultados de HA y PAH se detectó un incremento de aproximadamente el doble en la concentración de éstos luego de los 30 días en ambos tratamientos de bioaumentación, manteniéndose hasta el final del ensayo. Cabe destacar que el mayor incremento de HA se observó en el bioaumentación con LPSC 436, correspondiéndose con los mayores niveles de actividad lacasa registrada. Un comportamiento similar se corroboró para los PAH luego de los 30 días, sin cambios significativos hacia el final del tratamiento. Este aumento podría atribuirse a la transformación de los componentes del sistema, tanto rastrojo como barro FP, por parte de ambos hongos dado el incremento en los niveles de la actividad lacasa detectada en los tratamientos de bioaumentación. Conjuntamente con los altos valores de número de copias de los marcadores ITS *Gram* y *lcc1* es posible argumentar que ambos hongos se establecieron en los microcosmos y permanecieron activos hasta el final del tratamiento siendo LPSC 232 quién reveló mayor número de copias del gen ITS *Gram* y LPSC 436 del gen *lcc1*.

Independientemente de las limitaciones propias de la técnica (diseño de los *primers*, extractabilidad del ADN), los cambios observados entre tratamientos pueden atribuirse al efecto desencadenado por los componentes presentes en el sistema. En ambos tratamientos, la relación entre el número de copias del marcador *lcc1* e ITS *Gram* se incrementó respecto a la estimada desde un cultivo agarizado de cada hongo, como control. Lo que sugiere que el barro FP y sus productos de degradación, podrían alterar el genoma fúngico, incluyendo tal vez mecanismos de duplicación y delección génica, así como también a un comportamiento diferencial de los núcleos componentes de cada

uno de estos heterocariontes, rasgo evidenciado por la presencia de fíbula (Strom & Bushley, 2016). Un estudio realizado sobre heterocariontes del basidiomiceto *Heterobasidion parviporum*, reveló que las proporciones nucleares pueden ser afectadas por el medio ambiente involucrando alteraciones genéticas, epigenéticas, transcripcionales y relacionadas al crecimiento (James *et al.*, 2008). Hay antecedentes de la capacidad mutagénica de barros oleosos en suelo durante los procesos de biorremediación, estando la persistencia de la mutagenicidad directa relacionada a la concentración del barro, y aquella de tipo indirecta asociada a la concentración de hidrocarburos fácilmente asimilables y PAH (Morelli *et al.*, 2001). Aunque no hay datos disponibles sobre el efecto directo que los barros petroquímicos puedan tener sobre la estabilidad génica de los hongos, Steenwyk & Rokas, (2018) citan el comportamiento de *Saccharomyces cerevisiae* en respuesta al incremento de cobre como un agente estresante durante la fermentación, registrando la duplicación del gen CUP1 implicado en la producción de una proteína secuestradora de dicho metal (Fogel & Welch, 1982). Si bien estos cambios son evidenciados a nivel poblacional luego de varias generaciones (Moritz, 1994), es probable plantear que la variación observada entre la relación *lcc1*/ITS *Gram* en nuestro sistema de estudio sea el resultado de la biomasa de los hongos generada bajo su exposición al barro luego de 30 y 60 días.

La estimación de un mayor número de copias del gen *lcc1* en LPSC 436 con relación a LPSC 232 en estos microcosmos, y los mayores niveles detectados de la actividad lacasa en el sistema inoculado con el primero de éstos sugiere la aplicación de ambos parámetros como estimadores de la biomasa de LPSC 436 bajo las condiciones del ensayo. Matcham y colaboradores (1985) también reportaron el uso de la actividad lacasa como estimador de la biomasa de *Agaricus bisporus* en cultivo axénico. Aunque el primer lacasa utilizado en esta tesis fue previamente diseñado para la detección de una lacasa de LPSC 232 en cultivo axénico (Saparrat *et al.*, 2010a), el cual hibrida con una región que codifica para el sitio activo de la enzima que coordina con el cobre, las diferencias en el número de copias entre LPSC 232 y LPSC 436 podrían deberse a un origen ancestral y común de las lacasas en los Polyporales (Binder *et al.*, 2013). Un análisis evolutivo realizado por Savinova y colaboradores (2019) a partir de genes lacasa *sensu stricto* de especies representativas de Polyporales sugirió que todas las lacasas,

que son conservadas a nivel funcional y dependientes de cobre, derivan de un solo gen ancestral, el cual, seguido de extensas duplicaciones, dio lugar a la proliferación de nuevos clados que tienen relación con la evolución de las angiospermas, y en consecuencia la conquista de nuevos nichos ecológicos por parte de los hongos.

En presencia de la microbiota del barro FP, el tratamiento con LPSC 436 redujo significativamente la concentración de HT en un 35% luego de los 30 días de incubación, siendo alcanzado por LPSC 232 luego de 60 días con un máximo de degradación del 40% respecto de la concentración inicial. Con respecto a la concentración de HA y PAH, ambos tratamientos de bioaumentación favorecieron la remoción luego de 30 días, sin detectarse hidrocarburos al final del ensayo. Es de destacar el efecto de bioestimulación que el rastrojo de trigo ejerció sobre la microbiota nativa del barro FP, tras remover un 18% de HT al final del tratamiento.

El incremento de la actividad deshidrogenasa, respecto de la condición axénica, registrado en ambos tratamientos de bioaumentación durante los primeros 30 días sugiere que los metabolitos secundarios producidos por los hongos fueron rápidamente degradados por las bacterias y hongos nativos. Si bien fue mayor la remoción de hidrocarburos por bioaumentación con respecto al tratamiento bioestimulado, el descenso de la actividad lacasa y valores altos de los marcadores ITS *Gram* y *lcc1* registrados luego de 60 días confirman la permanencia de los hongos inoculados y su potencial actividad. Los bajos niveles de actividad lacasa observados sugieren que posibles mecanismos de inhibición de la expresión de estas enzimas debido a relaciones microbianas antagónicas y/o la adsorción de las enzimas a la matriz pueden ser las causas que conducen a su escasa detección.

Ambos tratamientos de bioaumentación revelaron una estimulación de la comunidad bacteriana del barro luego de 60 días, estimado a través del marcador 16S rARN. Esto sugeriría que las bacterias utilizan los compuestos derivados de la actividad de los hongos LPSC 232 y LPSC 436 durante la transformación de los componentes del barro FP.

La detección de copias correspondientes a los marcadores ITS *Gram* y *lcc1* en el tratamiento control (en ausencia de los hongos alóctonos) luego de los 30 días, sugiere

la existencia de representantes pertenecientes a Polyporales en la matriz de partida, tal vez como esporas derivadas de la contaminación ambiental y micelio resultante a consecuencia de la bioestimulación, aunque significativamente menor a la detectada en los tratamientos de bioaumentación. Este comportamiento estuvo acompañado de un incremento significativo en el número de copias del marcador 16S rARN luego de 30 días, sugiriendo la estimulación de la microbiota bacteriana por el rastrojo. Lladó y colaboradores (2013b) revelaron que la utilización de un sustrato lignocelulósico sobre suelo contaminado con creosota estimula a hongos y bacterias nativas a la degradación de hidrocarburos, restringiendo al bioaumentación con *T. versicolor* y *L. tigrinus* en la colonización del suelo.

Los resultados preliminares indican que LPSC 232 y LPSC 436 son especies prometedoras para tratamientos de micorremediación de matrices complejas como el barro FP en presencia de su microbiota nativa.

Implicancias del tratamiento combinado

Al combinar el pretratamiento oxidativo PSA con el bioaumentación fúngico, se observaron cambios principalmente en la estructura y diversidad de la comunidad microbiana nativa y en la permanencia y actividad de los hongos alóctonos.

El efecto del oxidante PSA sobre la microbiota del barro FP fue similar al proceso de tratamiento térmico, reduciendo la competencia y favoreciendo la colonización de los hongos inoculados sobre el rastrojo y la matriz contaminada, aunque en menor medida cuando las condiciones fueron no estériles.

Al analizar la concentración de HT en condiciones axénicas, no se observan cambios entre los tratamientos de bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 y el tratamiento control suplementado con rastrojo. La concentración de hidrocarburos cromatografiados (HA y PAH) tampoco evidenciaron cambios significativos entre tratamientos.

Con el fin de profundizar el alcance del bioaumentación con LPSC 232, se estudió la fracción soluble en *n*-pentano de los microcosmos oxidados por espectrofotometría

infrarroja. El análisis de los espectros FT-IR permitió identificar cambios estructurales generados por *C. rigida* LPSC 232, principalmente en las regiones espectrales asociadas a los enlaces C-H de anillos aromáticos (730-900 cm^{-1}), y funciones oxigenadas como grupos carbonilos presentes en cadenas alquilo y aril cetonas (1590-1760 cm^{-1}) luego de 60 días de incubación.

Numerosos estudios revelan la capacidad de los HPB sobre el metabolismo de PAH de bajo y alto peso molecular (Cerniglia & Sutherland, 2010). Quinonas, hidroxí y dihidroxí-PAH fueron identificados entre los principales metabolitos intermediarios en cultivos *in vitro* con HPB como por ejemplo, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis gallica*, *Pleurotus ostreatus*, *Bjerkandera adusta* y *Phanerochaete chrysosporium*, durante la degradación de antraceno, pireno, benzo[a]pireno (Field *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1996; Pickard *et al.*, 1999) y fenantreno (Sutherland *et al.*, 1991; Hammel *et al.*, 1992; Bezalel *et al.*, 1996). En el presente trabajo los cambios asociados a los estiramientos del grupo funcional C=O presente en aril cetonas sugieren la presencia de metabolitos secundarios como quinonas, registrado en la bibliografía.

Pineda-Flores & Mesta-Howard (2001) plantean posibles mecanismos de transformación y fragmentación de los asfaltenos que podrían colaborar a una mejor interpretación de los resultados obtenidos. Si bien los asfaltenos son solubles en tolueno y no estarían presentes en la fracción soluble en pentano (o extractivo), las resinas sí lo son y presentan una estructura condensada similar altamente recalcitrante.

Sobre esta base, la presencia sugerida de quinonas en la fracción de resinas podría ser atribuida a la actividad de LPSC 232, desencadenando transformaciones oxidativas similares a las generadas durante el metabolismo del pireno y/o benzo(a)pireno involucrando lacasas (Cerniglia & Sutherland, 2010) (**Figura VI. 37- 5 y 6**). Así mismo, los cambios registrados en los grupos carbonilos en cadenas alquilo sugieren que al romperse las cadenas alifáticas más grupos COO^- quedan expuestos, posiblemente por mecanismos de β -oxidación (**Figura VI. 37- 2**).

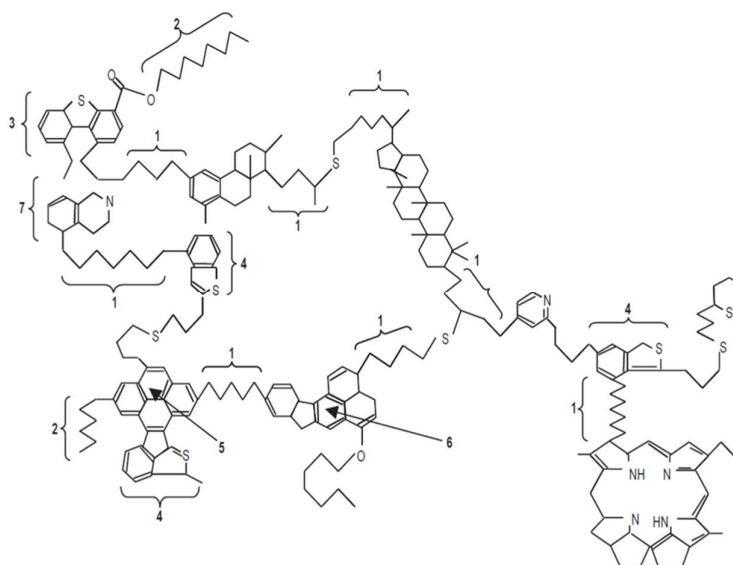


Figura VI. 37. Esquema de una molécula de asfalto y sus regiones susceptibles a la fragmentación y biodegradación. 1: Fotooxidación. 2: β -oxidación, 3 y 4: Rutas metabólicas del dibenzotiofeno. 5: Ruta metabólica del pireno. 6: Ruta similar al benzo[a]pireno. 7: Ruta similar a carbazoles. Tomado de Pineda-Flores & Mesta-Howard (2001).

Finalmente, el tratamiento con LPSC 232 luego de 60 días se diferenció del resto de los tratamientos en la región espectral asociada a las deformaciones fuera del plano del C-H aromático cuando tiene 1, 2 o 3 hidrógeno adyacentes en el anillo; incrementando sus picos cuando tiene 2 o 3 H adyacentes. Esto sugiere que el hongo tiene alguna contribución en la desorganización de los núcleos aromáticos presentes en PAH de alto peso molecular y resinas, conduciendo a núcleos más simples/o menos condensados, tal vez a través de mecanismos oxidativos vía sus lacasas (**Figura VI. 38**).

Estos resultados son compatibles con el incremento registrado de la actividad lacasa en los tratamientos inoculados con LPSC 232 a largo del tiempo, en comparación al barro sin oxidar, alcanzando el valor máximo a los 30 días, sin cambios significativos con el tratamiento LPSC 436. Esto sugiere que el pretratamiento oxidativo no pareció inhibir la actividad de los hongos autóctonos, incluso posiblemente estimulando su biomasa tal como lo observado por el incremento del número de copias del marcador ITS *Gram* en 2 órdenes. Estudios demuestran que la cuantificación de hongos por la técnica de qPCR es válida aun cuando no se conoce el tamaño del genoma completo. Sin

embargo, es de destacar la necesidad de mejores procedimientos de recuperación y extracción del ADN genómico cuando se trata de esporas y estructuras fúngicas provistas de paredes celulares rígidas (Black *et al.*, 2013), sumado a la posible aparición de compuestos derivados de la matriz oxidada que pudieran interferir en la extracción y/o purificación del ADN.

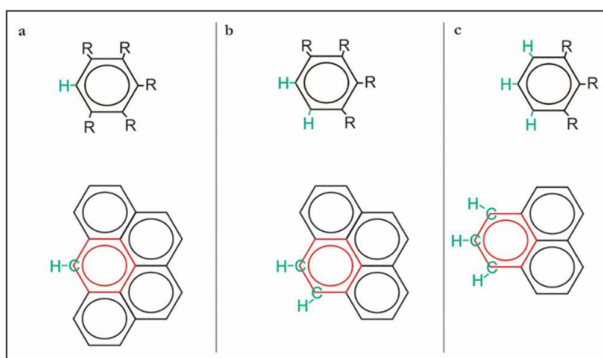


Figura VI. 38. Interpretación de los cambios en los enlaces C-H de anillos aromáticos de la región espectral 730-900 cm^{-1} . Donde a: C-H aromático donde el anillo aromático tiene solo un sustituyente de hidrógeno (1 H adyacente). b C-H aromático (2 H adyacentes) donde el anillo aromático tiene dos hidrógenos adyacentes. c: C-H aromático (3 H adyacentes) donde el anillo aromático tiene tres hidrógenos adyacentes.

En presencia de la microbiota nativa, luego de 30 días todos los tratamientos se diferencian de la concentración de HT inicial, aunque sólo el tratamiento de bioestimulación alcanzó a remover ~30% de los HT al final de monitoreo.

Esto indicaría que la bioestimulación permitió la recuperación de la microbiota nativa del barro FP tras la oxidación. Dada la baja actividad deshidrogenasa y el leve incremento en el número de copias del gen 16S rARN, el descenso en los HT podría atribuirse principalmente a la acción de los hongos nativos, correspondiéndose con una actividad lacasa detectable y un alto número de copias de genes ITS *Gram* y *Icc1* (Lladó *et al.*, 2013). Este comportamiento avala la propuesta que la microbiota nativa incluye miembros capaces de sintetizar lacasas, sabiéndose que hongos pertenecientes

al phylum Ascomycota característicos en suelo son capaces de producir lacasas y peroxidases (Silva *et al.*, 2009)

En ambos tratamientos de bioaumentación, se registró un incremento en la actividad deshidrogenasa luego de 30 días, acompañado por el incremento en el número de copias del gen 16S rARN, lo que indicaría que el bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 estimularía la recuperación de la microbiota bacteriana nativa del barro FP tras la aplicación de un oxidante fuerte como el PSA.

Adicionalmente, el aumento de la actividad lacasa detectado durante el tratamiento con ambos hongos, puede ser asociado a la interacción con la microbiota nativa del barro, resiliente al estrés oxidativo del PSA. La disminución del número de copias del gen ITS *Gram* en los tratamientos de bioaumentación comparado con los tratamientos oxidados axénicos, sugeriría un efecto antagónico producto de la interacción, como se ha registrado en la bibliografía. Sin embargo, el mayor número de copias del marcador *lcc1* detectado en ambos tiempos del tratamiento con LPSC 232 sugiere un comportamiento diferencial frente a su interacción con la microbiota autóctona del barro.

El análisis de los espectros FT-IR de la fracción soluble en pentano reveló un comportamiento diferencial respecto de la condición axénica en las regiones espectrales asociadas a estiramientos de los grupos carbonilos ($1590-1760\text{ cm}^{-1}$) y enlaces C-H en grupos aromáticos ($730-900\text{ cm}^{-1}$). La presencia de LPSC 232 generó cambios en la región asociada al grupo carbonilo en amidas secundarias (picos 1713 y 1705 cm^{-1}) a los 30 días. Mientras que la región asociada al grupo carbonilo en aril cetonas (picos 1690 y 1680 cm^{-1}) se vieron afectadas principalmente por el tiempo del ensayo más que por el tratamiento de bioaumentación. Es importante destacar que el efecto del tratamiento con LPSC 232 sobre los grupos carbonilo asociados a cadenas alifáticas, amidas secundarias y grupos aromáticos (aril cetonas) es más notorio a tiempos cortos de tratamiento, contrariamente a lo observado en las muestras correspondientes al sistema axénico, lo que sugeriría un efecto sinérgico con la microbiota nativa. Resultados similares se observaron en la región asociada a enlaces C-H en grupos aromáticos ($730-900\text{ cm}^{-1}$) donde la presencia de LPSC 232 a los 30 días se diferenció notablemente del resto de los

tratamientos, principalmente en el pico asociado a la deformación fuera del plano del C–H aromático con 2 H adyacentes (810 cm^{-1}).

Inferencias a partir de la dinámica de las comunidades bacterianas y fúngicas, en los tratamientos de bioaumentación y en los combinados

El análisis taxonómico del tratamiento de bioestimulación evidenció la abundancia de los órdenes bacterianos Burkholderiales, Pseudomonadales, Anaerolineales y Lactobacillales, revelando microhábitats con diferente disponibilidad de oxígeno y microorganismos de reconocida capacidad degradadora de hidrocarburos de petróleo (Roy *et al.*, 2014; Sarkar *et al.*, 2016). La diversidad fúngica reveló la presencia de levaduras basidiomicetáceas y hongos del phylum Ascomycota y zygomycetáceos, al igual que en suelos contaminados con hidrocarburos (Kim *et al.*, 2010), PCBs (Stella *et al.*, 2017). A través de la incorporación de rastrojo de trigo, se logró la estimulación de la microbiota nativa, conduciendo a una reducción del 18% de HT. Este comportamiento estuvo asociado a una dinámica en la estructura de la comunidad microbiana e interacciones sintróficas. Luego de los 30 días, miembros de la clase Betaproteobacterias fueron desplazados por Alfacaproteobacteria, principalmente representantes de las familias Rhizobiaceae, Caulobacteraceae y Sphingomonadaceae, frecuentemente asociadas a la degradación de PAH en suelos y sedimentos contaminados (Muangchinda *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2015; Waigi *et al.*, 2015) y a la biotransformación de materiales vegetales en descomposición (Siles *et al.*, 2014; Chiba *et al.*, 2021). La presencia de representantes de los géneros *Agrobacterium* y *Sphingomonas* se correspondió con lo reportado por Viñas y colaboradores (2005) tras bioestimar un suelo contaminado con creosota. Al aplicar aceite de soja como agente estimulante en un suelo contaminado con creosota, Lladó y colaboradores (2015) asociaron la presencia del género *Agrobacterium* al descenso de benzo(a)pireno. Si bien es común la presencia de miembros de la familia Rhizobiaceae en sitios contaminados, no hay registros en la bibliografía de su capacidad degradadora.

El incremento de miembros de Gammaproteobacteria, que incluyó a los géneros *Pseudoxanthomonas* (Xanthomonadaceae) y *Pseudomonas* (Pseudomonadaceae), aunque menor respecto de Alphaproteobacteria, sugiere el efecto estimulador del rastrojo de trigo sobre la capacidad degradadora de hidrocarburos por representantes de las mencionadas familias, también reportadas por otros autores (Lladó *et al.*, 2009; Nopcharoenkul *et al.*, 2011; Covino *et al.*, 2016).

El reemplazo de miembros del orden Lactobacillales por representantes del orden Bacillales, entre los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*; junto con el incremento del género *Streptomyces* (Actinobacteria) sugeriría la existencia de un estadio compatible con un proceso avanzado de compostaje (Pasi *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2019).

Luego de 60 días, el predominio del phylum Chloroflexi con los géneros T78 y *Longilinea* (Anaerolinaceae), junto con la presencia de *Methanobacterium* sp, *Clostridium* sp, y representantes de las familias Lachnospiraceae, Thermoactinomycetaceae y Porphyromonadaceae sugeriría la estratificación por metabolismo aerobio-anaerobio, como consecuencia del agotamiento del oxígeno sin intervención por mezclado, generando microhábitats anóxicos. Notoriamente, miembros de Chloroflexi fueron aislados de barros industriales bajo condiciones aeróbicas *in situ*, los que fueron caracterizados por su capacidad de asimilación de carbohidratos involucrando exoenzimas como quitinasa, glucuronidasa y galactosidasa (Kragelund *et al.*, 2007). Por otro lado, Yamada y colaboradores (2007) aislaron y caracterizaron una cepa de *Longilinea arvoryzae* anaerobia estricta de un suelo de arrozal inundado que fue capaz de mejorar su crecimiento en co-cultivo con organismos metanogénicos hidrogenotróficos. Estas bacterias filamentosas se asocian de manera sintrófica con archaeas metanogénicas como por ejemplo *Methanobacterium* en la degradación de hidrocarburos, como fenantreno (Ye *et al.*, 2018). *Methanobacterium* se caracteriza por ser un metanógeno hidrogenotrófico presente en barros anaeróbicos, que utiliza hidrógeno para producir metano. Ye y colaboradores (2018) proponen al hidrógeno como un metabolito requerido para el crecimiento de *Methanobacterium* durante la degradación del fenantreno. Otros autores reportaron dominancia de representantes de la familia Anaerolinaceae y la archaea *Methanosaeta* en cultivos con

barros oleosos enriquecidos con *n*-alcanos luego de 1300 días de incubación, sugiriendo la cooperación sintrófica entre organismos para degradar los hidrocarburos (Liang *et al.*, 2015).

La anoxia localizada producida promovió también el crecimiento de anaerobios obligados como *Clostridium* sp y miembros de la familia Lachnospiraceae y Porphyromonadaceae (Bacteroidales) capaces de fermentar celulosa. Mientras que la aparición de representantes de la familia Thermoactinomycetaceae y Actinobacteria característicos de la fase termófila del compostaje (Pasi *et al.*, 2010), sugerirían la existencia de zonas aún oxigenadas donde es factible la degradación de celulosa y hemicelulosa del rastrojo de trigo dentro del microcosmos. La presencia del rastrojo de trigo no sólo estimuló a la comunidad bacteriana sino también a los hongos nativos del barro FP, dominando luego de 30 días por los géneros *Aspergillus* y *Talaromyces* (Eurotiales), siendo estrategias R con alta capacidad para esporular. Como se mencionó en el **Capítulo IV**, representantes del género *Aspergillus* han sido estudiados por su capacidad de metabolizar hidrocarburos de petróleo como única fuente de energía (Cerniglia, 2010; Al-Dhabaan, 2021). Resultados similares fueron descriptos por Lladó y colaboradores (2013), donde observaron dominancia de otro estrategia R, *Fusarium* sp (Hypocrales) en suelos contaminados con PAH y su capacidad para mantener interacciones estables con otras comunidades bacterianas degradadoras de PAH que abarcan los grupos Proteobacteria (alfa, beta y gamma) y Bacteroidetes.

Luego de 60 días se observaron cambios en la abundancia relativa de la comunidad fúngica que pudieron estar promovidos por la competencia desencadenada por el aporte del rastrojo de trigo. Esto se evidenció por un descenso de los representantes de Eurotiales y la aparición de *Colletotrichum* sp (Glomerellales). Este comportamiento puede ser atribuido a la producción de metabolitos antimicrobianos y antifúngicos por miembros de *Colletotrichum* sp contra *Aspergillus* sp (Lu *et al.*, 2000). Si bien *Colletotrichum* sp es endófito de plantas, fue reportado por primera vez en aguas asociadas a reservorios de crudo de petróleo (Edema & Okungbowa, 2011), y también en residuos oleosos en estrecha relación con una alta actividad lipasa extracelular (Rodrigues & Keller, 2015). Recientemente se han aislado tres cepas de *Colletotrichum* sp a partir plantas tropicales presentes en ambientes contaminados con crudo de

petróleo, removiendo entre un 70 y 97% de HTP en cultivos axénicos luego de 30 días (Marín *et al.*, 2018).

La presencia de LPSC 232 y LPSC 436 en los tratamientos de bioaumentación, no generaron cambios significativos sobre la diversidad bacteriana durante el monitoreo, como fue evidenciado por análisis de betadiversidad. La colonización del micelio de los hongos alóctonos en el sistema puede ser una de las causas que explica la presencia de ciertos grupos bacterianos aún luego de 60 días. Entre estos taxa se destacan las familias Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae, Sphingomonadaceae, Caulobacteraceae y Rhizobiaceae y los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Paenibacillus* y *Bacillus*, que han sido asociados a la degradación de hidrocarburos y crudo de petróleo (Roy *et al.*, 2014). Cabe destacar la presencia de desulfobacterias representantes de la familia Ectothiorhodospiraceae, que se incrementaron notablemente en presencia de ambos hongos, sugiriendo la existencia de microhábitat anóxicos. Este grupo de sulfobacterias se caracterizan por ser móviles y producir glóbulos de azufre por fuera de sus células contribuyendo con el aporte de azufre al sistema.

Respecto de la microbiota nativa, LPSC 232 generó un descenso en la riqueza y la abundancia de representantes de la familia Aspergillaceae luego de 30 días, lo que indicaría una respuesta competitiva con los hongos nativos. Si bien se detectó una baja frecuencia de la familia Polyporaceae, a la cual pertenece LPSC 232, los marcadores ITS *Gram* y *lcc1* revelaron su presencia. Hacia el final del monitoreo la presencia de representantes de las familias Symptoventuriaceae (Dothideomycetes) y una familia sin asignación taxonómica perteneciente a la clase Leotiomycetes, pudiéndose ser asociada a la eliminación HT en el microcosmos.

En cambio, LPSC 436 logró superar la competencia de la microbiota nativa y establecerse luego de 60 días como se pudo observar en el incremento de la familia Polyporaceae. Covino y colaboradores (2016) han reportado diferencias entre tratamientos de micorremediación con *Pleurotus ostreatus* (HPB) y *Botryosphaeria rhodina* (Dothideomycetes) sobre suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos utilizando un soporte lignocelulósico, siendo *P. ostreatus* quien logró la mayor detoxificación generando cambios en la microbiota nativa. Demostrando la capacidad de los HPB en iniciar la degradación de la lignina.

Los resultados obtenidos confirman las diferencias entre LPSC 232 y LPSC 436 observadas en los ensayos anteriores, en función de la capacidad de colonizar el sustrato lignocelulósico en presencia de la microbiota nativa influyendo en su capacidad degradadora. El pretratamiento oxidativo generó un impacto negativo sobre la microbiota nativa, disminuyendo un 90% según los resultados de la cuantificación del marcador 16S rARN, predominando representantes de Proteobacterias y Firmicutes.

La bioestimulación provocó el descenso del orden Pseudomonadales y el incremento de los miembros del phylum Firmicutes como respuesta de la comunidad bacteriana tras la incorporación del soporte lignocelulósico. El incremento de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* puede ser atribuido a su alta tolerancia a condiciones ambientales extremas debido a la capacidad de producir endosporas (Bender *et al.*, 2019) y posterior activación ante condiciones favorables pudiendo participar en la degradación de PAH (Song *et al.*, 2019).

El análisis taxonómico de la comunidad fúngica reveló la abundancia del orden Glomerellales luego de 30 días, reemplazando a Eurotiales, con el género *Collethotrichum*. El rastrojo de trigo adicionado al sistema pudo haber propiciado la actividad enzimática y producción de metabolitos antimicrobianos y antifúngicos de este hongo, ejerciendo un efecto antagónico sobre ciertos microorganismos post tratamiento oxidativo, favoreciendo su dominancia (Lu *et al.*, 2000). El incremento de los niveles de la actividad lacasa respecto de la condición axénica, sugieren la presencia de representantes de la microbiota nativa con capacidad para sintetizar estas enzimas, estimuladas por el soporte lignocelulósico y la disponibilidad de compuestos aromáticos del barro a consecuencia de la oxidación. Esto está en línea con la detención del marcador *lcc1* confirmando la presencia de una comunidad con actividad oxidativa potencial.

El bioaumentación con LPSC 232 sobre el barro oxidado reveló su establecimiento sobre la matriz respecto de la condición sin oxidar, a través de la temprana detección de la familia Polyporaceae (~90%). Esto demuestra que el efecto del tratamiento oxidativo sobre la microbiota nativa redujo la competencia para este hongo, facilitando así su colonización en el sustrato. Altos niveles de actividad lacasa y número de copias de los

marcadores ITS *Gram* y *Icc1* junto con los cambios estructurales de la matriz (FT-IR) avalan el alcance de este hongo como agente de biorremediación.

El análisis taxonómico de la comunidad bacteriana reveló la permanencia de miembros de la familia Pseudomonadaceae durante el tratamiento con LPSC 232 a los 30 días, pudiendo interpretarse como una asociación de éstas con el hongo en la transformación de los hidrocarburos del sistema. Hay evidencias que sugieren que la competencia por el espacio y los nutrientes entre HPB y ciertas bacterias podría favorecer a la degradación de la lignina y elevar la producción de enzimas como lacasas y manganeso peroxidasa (Ijoma & Tekere, 2017). La dominancia de representantes del orden Glomerellales hacia el final del tratamiento reveló la sucesión microbiana, acompañada de un cambio en la comunidad bacteriana con el predominio del género *Bacillus*, sugiriendo la reducción de la disponibilidad de oxígeno.

A diferencia de LPSC 232, LPSC 436 no logró detectarse por secuenciación masiva del gen 18S rARN durante el tratamiento de bioaumentación. Sin embargo, los altos niveles de actividad lacasa, similares a los registrados en tratamiento con LPSC 232, y un incremento en el número de copias del marcador ITS *Gram* respecto de los tratamientos bioestimulados, sugerirían su presencia, aunque son necesarios estudios de expresión de los genes lacasa específicos para LPSC 436 (ARN) y sus variaciones durante el proceso de bioaumentación. Luego de 30 días, la comunidad bacteriana registró cambios en su estructura ante la presencia de LPSC 436, con un incremento de los representantes de la familia Paenibacillaceae, asociados a la degradación de hidrocarburos como se mencionó anteriormente. Estos cambios sugerirían un impacto del hongo sobre la comunidad bacteriana nativa, lo que confirmaría un comportamiento diferencial respecto de LPSC 232. Si bien LPSC 436 demostró ser más competitivo sobre la microbiota original del barro, la dominancia de las Proteobacterias luego de la oxidación con PSA habría limitado la extensión de la colonización del hongo. Respecto de la comunidad fúngica, los cambios tuvieron lugar luego de los 60 días con el incremento de representantes de las familias Sordariaceae (Sordariales) y Ajellomycetaceae (Onygenales). Es conocida la capacidad de hongos de estos grupos, que tiene representantes termofílicos, para metabolizar compuestos celulósicos, tal como lo observado durante la fase avanzada del compostaje (Busk & Lange, 2013; Robledo-

Mahón *et al.*, 2020) y la transformación de PAH en suelo (Marco-Urrea *et al.*, 2015). La participación de estos hongos autóctonos en el sistema bioaumentado pudo haber sido favorecida luego de la actividad degradativa de LPSC 436 sobre los componentes recalcitrantes del sistema.

VI.6 Conclusiones

✓ Bajo condiciones axénicas y luego de 90 días de incubación, *Gloeophyllum sepiarium* LPSC 735 presenta una habilidad superior en la remoción de fenantreno artificialmente aplicado a un suelo, seguido de *Coriolopsis rigida* LPSC 232 y *Grammothele subargentea* LPSC 436.

✓ En presencia de la microbiota nativa sobre microcosmos de suelo contaminado artificialmente con FEN, LPSC 436 y 735 aceleran la remoción del PAH a partir de 30 días, independientemente de sus estrategias fisiológicas, resultando LPSC 436 más competitivo en la colonización del sistema. Mientras que LPSC 232, bajo las mismas condiciones, no revela sinergismo en la remoción del hidrocarburo, sin inhibir a la microbiota el suelo.

✓ El co-cultivo de los hongos LPSC 436 y 735 disminuye la habilidad individual de cada uno para remover fenantreno, tanto en condiciones axénicas como en presencia de la microbiota nativa de un suelo.

✓ La aplicación de rastrojo de trigo a un suelo contaminado con barro FP al 10% contribuye, después de 90 días de incubación, a la remoción de HT y a la generación de compuestos fitotóxicos por parte de la actividad de microbiota del sistema.

✓ Luego de 90 días y en presencia de la microbiota nativa, LPSC 232 es más eficiente en la remoción de HT de un suelo contaminado con barro FP al 10% y su fitotoxicidad respecto a LPSC 436.

✓ A pesar de la baja capacidad de remoción y transformación de HT de un suelo contaminado con barro FP al 10%, la mayor actividad lacasa expresada por LPSC 436

luego de 60 días de tratamiento, sugiere que este tipo de enzima puede ser un parámetro indicador de su habilidad competitiva frente a la microbiota del sistema.

✓ La estrategia de inoculación de los hongos alóctonos para la biorremediación de sistemas con barro FP al 25% condiciona el alcance del proceso, siendo prometedor la aplicación de una suspensión miceliar en adición a un sustrato lignocelulósico en comparación a la utilización de este último como un simple vehículo de inoculación. Esto puede tener relación con los niveles de actividad lacasa detectados en los sistemas de estudio.

✓ En condiciones axénicas la remoción de HA y PAH en tratamientos de bioaumentación sería producto de la actividad degradadora del sustrato lignocelulósico y barro FP debido a la actividad lacasa extracelular del sistema.

✓ La estimación de biomasa de los hongos alóctonos en los sistemas con barro FP al 25% bajo condiciones axénicas puede inferirse a través de la utilización de marcadores moleculares y/o de los niveles de la actividad lacasa extracelular del sistema. Específicamente, el marcador ITS *Gram* lo es para LPSC 232, mientras que el marcador *lcc1* y la actividad lacasa extracelular para LPSC 436.

✓ Las variaciones en la relación entre las copias de los marcadores ITS *Gram* y *lcc1* sugieren la acción mutagénica del barro FP sobre los hongos alóctonos.

✓ Existe una respuesta diferencial en la remoción de hidrocarburos entre los tratamientos de bioaumentación frente a su interacción con la microbiota nativa del barro, resultando más eficaz en presencia de LPSC 436.

✓ El tratamiento combinado de oxidación del barro FP seguido de bioestimulación con rastrojo de trigo, promueve a la remoción de HT por parte de la microbiota, principalmente hongos nativos.

✓ El tratamiento combinado de oxidación del barro FP seguido de bioaumentación con LPSC 232 y LPSC 436 promueve la recuperación de las comunidades bacterianas y fúngicas de manera diferencial.

✓ Luego de 60 días, *C. rigida* LPSC 232 genera cambios sobre los hidrocarburos del barro FP, asociados a la formación de quinonas y a la desorganización de los núcleos

aromáticos. Dichos cambios se evidencian tempranamente cuando la microbiota nativa está presente.

✓ Futuros estudios con espectrofotometría FT-IR completarían el análisis sobre los tratamientos con LPSC 436, por lo que no se puede descartar su potencial como agente de micorremediación en el tratamiento combinado de oxidación del barro FP.

✓ La no intervención de los microcosmos fue evidenciada durante el tratamiento de bioestimulación, a través de la mayor abundancia relativa de bacterias del *phylum* Chloroflexi y archaeas metanogénicas hidrogénicas, junto con *Colletotrichum* sp, hongo asociado a ambientes poco oxigenados.

Capítulo VII

Conclusiones generales



VII Conclusiones generales

Sobre lo discutido en este trabajo de tesis, se presentan las conclusiones generales en base a las hipótesis planteadas:

✓ Hongos saprótrofos específicos como, *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436, posiblemente a través de procesos cometabólicos, tienen capacidad para tolerar bajo ciertas condiciones determinados PAH, incluyendo los más complejos disponibles en el barro FP. Estos hongos revelan respuestas diferenciales en su metabolismo por el efecto causado por los mencionados xenobióticos, que bajo ciertas condiciones y en presencia de hidrocarburos específicos, alteran los procesos de glucólisis y síntesis de ácidos grasos así como la remoción y/o mineralización de compuestos tóxicos.

✓ La estrategia de aplicación de estos hongos con actividad lacasa y potencial en la biorremediación resulta clave en el alcance del bioaumentación para la remoción, detoxificación y/o mineralización de los compuestos presentes en microcosmos con barro FP al 25%.

✓ Existen interacciones entre los hongos inoculados en microcosmos conteniendo el barro FP y su microbiota nativa, la cual es potenciada para la remediación de esta matriz contaminante. Específicamente, el tratamiento de bioaumentación con *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436 promueve la biodisponibilidad de nutrientes y contaminantes a la microbiota a través del micelio fúngico.

Sobre estas premisas se considera aceptada la hipótesis de que *C. rigida genera cambios en la microbiota asociada a matrices contaminadas con barro de fondo de pileta API y promueve una activa degradación de hidrocarburos.*

✓ El tratamiento en microcosmos con el barro FP previamente expuesto a un oxidante químico seguido del bioaumentación con hongos específicos como *C. rigida* LPSC 232 y *G. subargentea* LPSC 436, conduce a cambios en la microbiota. Bajo estas condiciones, *C. rigida* LPSC 232 resulta prometedor en la degradación oxidativa de la matriz contaminada.

Sobre lo anteriormente expuesto, se acepta parcialmente la hipótesis de que *el tratamiento con un oxidante químico, previo a la inoculación con C. rigida, incrementa la eficiencia del bioaumentación.*

Futuros estudios, utilizando espectrofotometría FT-IR, contribuirán a confirmar si los tratamientos con *G. subargentea* LPSC 436 son también prometedores.

VIII Bibliografía

- Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C., Chen, S. 1998. (1998). Characteristics of Soils, phenanthrene-degrading bacteria isolated from contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.*, 44(8), 743–752.
- Al-Dhabaan, F. A. (2021). Mycoremediation of crude oil contaminated soil by specific fungi isolated from Dhahran in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.033>
- Alonso-Monge, R., Navarro-García, F., Román, E., Negredo, A. I., Eisman, B., Nombela, C., & Pla, J. (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 2(2), 351–361. <https://doi.org/10.1128/EC.2.2.351-361.2003>
- Amaral-Zettler, L. A., McCliment, E. A., Ducklow, H. W., & Huse, S. M. (2009). A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE*, 4(7), e6372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006372>
- Anastasi, A., Coppola, T., Prigione, V., & Varese, G. C. (2009). Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1–3), 1229–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.032>
- Anastasi, A., Spina, F., Prigione, V., Tigini, V., Giansanti, P., & Varese, G. C. (2010). Scale-up of a bioprocess for textile wastewater treatment using *Bjerkandera adusta*. *Bioresource Technology*, 101(9), 3067–3075. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.067>
- Anderson, E. M., Stone, M. L., Katahira, R., Reed, M., Muchero, W., Ramirez, K. J., Beckham, G. T., & Román-Ishkov, Y. (2019). Differences in S/G ratio in natural poplar variants do not predict catalytic depolymerization monomer yields. *Nature Communications*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09986-1>
- Andersson, B. E., Lundstedt, S., Tornberg, K., Schnürer, Y., Öberg, L. G., & Mattiasson, B. (2003). Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(6), 1238–1243. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(2003\)022<1238:IDOPAH>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(2003)022<1238:IDOPAH>2.0.CO;2)
- Ariste, A. F., Batista-García, R. A., Vaidyanathan, V. K., Raman, N., Vaithyanathan, V. K., Folch-Mallol, J. L., Jackson, S. A., Dobson, A. D. W., & Cabana, H. (2020). Mycoremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons from a biorefinery wastewater and concomitant production of lignin modifying enzymes. *Journal of Cleaner Production*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119810>
- Arora, D. S. (1995). Biodelignification of wheat straw by different fungal associations. *Biodegradation*, 6(1), 57–60. <https://doi.org/10.1007/BF00702299>
- Asemani, M., & Rabbani, A. R. (2016). Oil-oil correlation by FTIR spectroscopy of asphaltene samples. *Geosciences Journal*, 20(2), 273–283. <https://doi.org/10.1007/s12303-015-0042-1>
- Baldrian, P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial*

- Technology*, 32(1), 78–91. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00245-4)
- 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>
- Bamforth, S. M., & Singleton, I. (2005). *Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons : current knowledge and future directions*. 736(January), 723–736. <https://doi.org/10.1002/jctb.1276>
- Banitz, T., Wick, L. Y., Fetzer, I., Frank, K., Harms, H., & Johst, K. (2011). Dispersal networks for enhancing bacterial degradation in heterogeneous environments. *Environmental Pollution*, 159(10), 2781–2788. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.008>
- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (2002). Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods*, 50(3), 227–236. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00031-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00031-3)
- Bartha, R., & Pramer, D. (1965). Features of a Flask and Method for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. In *Soil Science* (Vol. 100, Issue 1, pp. 68–70). <https://doi.org/10.1097/00010694-196507000-00011>
- Bava, Y. B., Geronés, M., Buceta, D., De La Iglesia Rodríguez, D., López-Quintela, M. A., & Erben, M. F. (2019). Elucidation of the Average Molecular Structure of Argentinian Asphaltenes. *Energy and Fuels*, 33(4), 2950–2960. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b04318>
- Bender, Madigan, Buckley, Sattley, & Stahl. (2019). *Brock Biology of Microorganisms* (15th ed.).
- Bernat, P., Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P., Słaba, M., Szewczyk, R., & Różalska, S. (2018). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. *PLoS ONE*, 13(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199677>
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P., Cerniglia, C. E., Bezalel, L. E. a, Hadar, Y., Fu, P. P., & Freeman, J. P. (1996). *Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus Pleurotus ostreatus*. These include : *Metabolism of Phenanthrene by the White Rot Fungus Pleurotus ostreatus*. 62(7), 2547–2553.
- Binder, M., Justo, A., Riley, R., Salamov, A., Lopez-Giraldez, F., Sjökvist, E., Copeland, A., Foster, B., Sun, H., Larsson, E., Larsson, K. H., Townsend, J., Grigoriev, I. V., & Hibbett, D. S. (2013). Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia*, 105(6), 1350–1373. <https://doi.org/10.3852/13-003>
- Black, J., Dean, T., Byfield, G., Foarde, K., & Menetrez, M. (2013). Determining fungi rRNA copy number by PCR. *Journal of Biomolecular Techniques*, 24(1), 32–38. <https://doi.org/10.7171/jbt.13-2401-004>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). *A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION*. 37.
- Boddy, L. (2000). Interspecific combative interactions between wood-decaying basidiomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(99\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(99)00093-8)
- Boddy, L. (2008). *Ecology Of Saprotrophic Basidiomycetes* (Lynne; Boddy, J. C. Frankland; & P. van West (eds.); First). Academic Press Elsevier.
- Boddy, Lynne, & Hiscox, J. (2017). *Fungal Ecology: Principles and Mechanisms of Colonization*

- and Competition by Saprotrophic Fungi. *The Fungal Kingdom*, 293–308. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch13>
- Bogardt, A. H., & Hemmingsen, B. B. (1992). Enumeration of Phenanthrene-Degrading Bacteria by. *58*(8), 2579–2582.
- Boran, F., & Yeşilada, O. (2011). Enhanced production of laccase by fungi under solid substrate fermentation condition. *BioResources*, *6*(4), 4404–4416. <https://doi.org/10.15376/biores.6.4.4404-4416>
- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, *19*(3), 209–215. <https://doi.org/10.1007/BF02772892>
- Borrego, A. G., Blanco, C. G., Prado, J. G., Díaz, C., & Guillén, M. D. (1996). ¹H NMR and FTIR Spectroscopic Studies of Bitumen and Shale Oil from Selected Spanish Oil Shales. In *Energy & Fuels* (Vol. 10, Issue 1, pp. 77–84). <https://doi.org/10.1021/ef950111x>
- Bosch, A., Golowczyc, M. A., Abraham, A. G., Garrote, G. L., Antoni, G. L. De, & Yantorno, O. (2006). Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *111*, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.05.010>
- Boudet, M. (1998). A new view of lignification. *Trends in Plant Science*, *3*(2), 67–71.
- Breedveld, G. D., & Sparrevik, M. (2000). Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, *11*(6), 391–399. <https://doi.org/10.1023/A:1011695023196>
- Brodkorb, T. S., & Legge, R. L. (1992). Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with Phanerochaete chrysosporium. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(9), 3117–3121. <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.3117-3121.1992>
- Buenrostro-Gonzalez, E., Andersen, S. I., Garcia-Martinez, J. A., & Lira-Galeana, C. (2002). Solubility/molecular structure relationships of asphaltenes in polar and nonpolar media. *Energy and Fuels*, *16*(3), 732–741. <https://doi.org/10.1021/ef0102317>
- Busk, P. K., & Lange, L. (2013). Cellulolytic Potential of Thermophilic Species from Four Fungal Orders. *AMB Express*, *3*, 1–10. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-47>
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.: The Off. J. Span. Soc. Microbiol.*, *3*, 3–8.
- Cahoon, E. B., & Ohlrogge, J. B. (1994). Metabolic evidence for the involvement of a $\Delta 4$ -palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in petroselinic acid synthesis in coriander endosperm and transgenic tobacco cells. *Plant Physiology*, *104*(3), 827–837. <https://doi.org/10.1104/pp.104.3.827>
- Cajthaml, T., Möder, M., Kacer, P., Sasek, V., & Popp, P. (2002). Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography. A*, *974*(1–2), 213–222. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12458938>
- Calonne, M., Fontaine, J., Debiane, D., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Sahraoui, A. L. H. (2014). Impact of anthracene on the arbuscular mycorrhizal fungus lipid metabolism1. *Botany*, *92*(2), 173–178. <https://doi.org/10.1139/cjb-2013-0094>
- Camarero, S., Sarkar, S., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., & Martínez, Á. T. (1999). Description

- of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10324–10330. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10324>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1000080107>
- Carabajal, M., Perullini, M., Jobbágy, M., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Levin, L. (2016). Removal of Phenol by Immobilization of *Trametes versicolor* in Silica-Alginate-Fungus Biocomposites and Loofa Sponge. *Clean - Soil, Air, Water*, 44(2), 180–188. <https://doi.org/10.1002/clen.201400366>
- Casillas, R. P., Crow, S. A., Heinze, T. M., Deck, J., & Cerniglia, C. E. (1996). Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, 16(4), 205–215. <https://doi.org/10.1007/BF01570023>
- Castillo Morales, G. (2004). *Ensayos toxicologicos y metodos de evaluacion de calidad de aguas*.
- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2010). Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4>
- Cerniglia C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3, 351–368.
- Chapelle, F. H., Bradley, P. M., & Casey, C. C. (2005). Behavior of a chlorinated ethene plume following source-area treatment with Fenton's reagent. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 25(2), 131–141. <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2005.0020.x>
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33, 745–755. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
- Chen, W., Hambleton, S., Seifert, K. A., Carisse, O., Diarra, M. S., Peters, R. D., Lowe, C., Chapados, J. T., & Lévesque, C. A. (2018). Assessing performance of spore samplers in monitoring aeromycobiota and fungal plant pathogen diversity in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9), 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02601-17>
- Chiba, A., Uchida, Y., Kublik, S., Vestergaard, G., Buegger, F., Schloter, M., & Schulz, S. (2021). Soil Bacterial Diversity Is Positively Correlated with Decomposition Rates during Early Phases of Maize Litter Decomposition. *Microorganisms*, 9(2), 357. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020357>
- Chukwunonso, I., Ahmed, A., Hassan, A., & Shahul, F. (2020). Environmental Technology & Innovation Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon : A review. *Environmental Technology & Innovation*, 17, 100526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>
- Collins, P. J., Kotterman, M. J. J., Field, J. A., & Dobson, A. D. W. (1996). Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4563–4567. <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4563-4567.1996>

- Colombo, J. C., Cabello, M., & Arambarri, A. M. (1996). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure culture of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental Pollution*, *94*(3), 355–362. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00044-9)
- Comeau, A. M., Douglas, G. M., & Langille, M. G. I. (2017). *crossm Microbiome Helper : a Custom and Streamlined Workflow for Microbiome*. *2*(1), 1–11.
- Coppotelli, B. M., Ibarrolaza, A., Dias, R. L., Del Panno, M. T., Berthe-Corti, L., & Morelli, I. S. (2010). Study of the degradation activity and the strategies to promote the bioavailability of phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *Microbial Ecology*, *59*(2), 266–276. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9563-3>
- Covino, S., Čvančarová, M., Muzikář, M., Svobodová, K., D'annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Křesinová, Z., & Cajthaml, T. (2010). An efficient PAH-degrading *Lentinus* (*Panus*) *tigrinus* strain: Effect of inoculum formulation and pollutant bioavailability in solid matrices. *Journal of Hazardous Materials*, *183*(1–3), 669–676. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.078>
- Covino, S., Stella, T., D'Annibale, A., Lladó, S., Baldrian, P., Čvančarová, M., Cajthaml, T., & Petruccioli, M. (2016). Comparative assessment of fungal augmentation treatments of a fine-textured and historically oil-contaminated soil. *The Science of the Total Environment*, *566–567*, 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.018>
- Cui, B., Cui, F., Jing, G., Xu, S., Huo, W., & Liu, S. (2009). Oxidation of oily sludge in supercritical water. *Journal of Hazardous Materials*, *165*(1–3), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.10.008>
- Da Silva, L. J., Alves, F. C., & De França, F. P. (2012). A review of the technological solutions for the treatment of oily sludges from petroleum refineries. *Waste Management and Research*, *30*(10), 1016–1030. <https://doi.org/10.1177/0734242X12448517>
- Dagley, S. (1981). New perspectives in aromatic catabolism. In R. H. & J. N. T. Leisinger, A. M. Cook (Ed.), *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*. (pp. 181–186). Academic Press Elsevier.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, *2011*, 1–13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- de Souza e Silva, P. T., da Silva, V. L., Neto, B. de B., & Simonnot, M. O. (2009). Potassium permanganate oxidation of phenanthrene and pyrene in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, *168*(2–3), 1269–1273. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.007>
- Del Panno, M. T., Morelli, I. S., Engelen, B., & Berthe-Corti, L. (2005). Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation. *FEMS Microbiology Ecology*, *53*(2), 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.01.014>
- Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I. L., Agellon, L. B., & Xia, J. (2017). *MicrobiomeAnalyst : a web-based tool for comprehensive statistical , visual and meta-analysis of microbiome data*. *45*(April), 180–188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx295>
- Di Martino, C., López, N. I., & Raiger lustman, L. J. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *67*, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.004>

- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., M.G., B., L., G., M., T., & C.W., R. (2008). *InfoStat* (No. 2008). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <https://www.infostat.com.ar/>
- Dias, R. L. (2011). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias*. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/18082/Documento_completo.pdf%3Fsequence%3D1
- Díaz, R., Saparrat, M. C. N., Jurado, M., García-Romera, I., Ocampo, J. A., & Martínez, M. J. (2010). Biochemical and molecular characterization of *Corioloopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *88*(1), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2723-z>
- Dickson, U. J., Coffey, M., Mortimer, R. J. G., Di Bonito, M., & Ray, N. (2019). Mycoremediation of petroleum contaminated soils: Progress, prospects and perspectives. *Environmental Science: Processes and Impacts*, *21*(9), 1446–1458. <https://doi.org/10.1039/c9em00101h>
- Dijksterhuis, J., Meijer, M., van Doorn, T., Samson, R., & Rico-Munoz, E. (2018). Inactivation of stress-resistant ascospores of Eurotiales by industrial sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, *285*(February), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.018>
- Dittmer, J.K., Patel, N.J., Dhawale, S.W., Dhawale, S. S. (1997). Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiol. Lett.*, *149*, 65–70.
- DOWSON, C. G., RAYNER, A. D. M., & BODDY, L. (1988). The form and outcome of mycelial interactions involving cord-forming decomposer basidiomycetes in homogeneous and heterogeneous environments. *New Phytologist*, *109*(4), 423–432. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb03718.x>
- Edema, N. E., & Okungbowa, F. I. (2011). Fungi Isolated from Produced Water and Water-Soluble Fraction of Crude Oil. *Pak. j. Sci. Ind. Res. Ser. B: Biol. Sci.*, *54*(3), 163–166.
- Eichlerova, I., Snajdr, J., & Baldrian, P. (2012). Laccase activity in soils: Considerations for the measurement of enzyme activity. *Chemosphere*, *88*(10), 1154–1160. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.019>
- El Naggat, A. Y., Saad, E. a, Kandil, a T., & Elmoher, H. O. (2010). Petroleum cuts as solvent extractor for oil recovery from petroleum sludge. *Journal of Petroleum Technology*, *1*(November), 10–19.
- Eriksson, K. E., L, B., & P, A. (1990). *Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components*. Springer US.
- Ezekoye, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2018). Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *10*, 148–152. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.11.003>
- Feisthauer, S., Wick, L. Y., Kästner, M., Kaschabek, S. R., Schlömann, M., & Richnow, H. H. (2008). *Brief Report Differences of heterotrophic ¹³C₂ assimilation by Pseudomonas knackmussii strain B13 and Rhodococcus opacus 1CP and potential impact on biomarker stable isotope probing*. *10*, 1641–1651. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01573.x>
- Fernandez, I., & Cadisch, G. (2003). Discrimination against ¹³C during degradation of simple and complex substrates by two white rot fungi. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *17*(23), 2614–2620. <https://doi.org/10.1002/rcm.1234>

- Festa, S., Coppotelli, B. M., & Morelli, I. S. (2016). Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. *Applied Soil Ecology*. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.025>
- Field, J. A., De Jong, E., Costa, G. F., & De Bont, J. A. M. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(7), 2219–2226. <https://doi.org/10.1128/aem.58.7.2219-2226.1992>
- Fingas, M., Michel, J., Mabile, N., & Lambert, P. (2018). *In-Situ Burning for Oil Spill Countermeasures* (M. Fingas (ed.)). CRC Press Taylor & Francis Group.
- Fogel, S., & Welch, J. W. (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *79*(17), 5342–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.17.5342>
- Fujii, T., Hayashi, R., Kawasaki, S. I., Suzuki, A., & Oshima, Y. (2011). Water density effects on methanol oxidation in supercritical water at high pressure up to 100 MPa. *Journal of Supercritical Fluids*, *58*(1), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2011.04.004>
- Fukasawa, Y., Osono, T., & Takeda, H. (2011). Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. *103*(3), 474–482. <https://doi.org/10.3852/10-246>
- Furman, O. S., Teel, A. L., Ahmad, M., Merker, M. C., Watts, R. J., & Asce, M. (2011). Effect of Basicity on Persulfate Reactivity. *Journal Of Environmental Engineering*, *137*, 241–247. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000323](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000323).
- Furuno, S., Foss, S., Wild, E., Jones, K. C., Semple, K. T., Harms, H., & Wick, L. Y. (2012). Mycelia promote active transport and spatial dispersion of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es300810b>
- Furuno, S., Pätzolt, K., Rabe, K., Neu, T. R., Harms, H., & Wick, L. Y. (2010). Fungal mycelia allow chemotactic dispersal of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria in water-unsaturated systems. *Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02022.x>
- Gadd, G. M. (2001). Fungi in Bioremediation. *System*, *16*(3), 497. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511541780>
- Galhaup, C., Wagner, H., Hinterstoisser, B., Haltrich, D. (2002). Production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enz. Microbiol. Technol.*, *30*, 529–536.
- Gamarra, A., & Ossa, E. A. (2016). Thermo-oxidative aging of bitumen. *International Journal of Pavement Engineering*, *19*(7), 641–650. <https://doi.org/10.1080/10298436.2016.1199876>
- Gan, S., Yap, C. L., Ng, H. K., & Venny. (2013). Investigation of the impacts of ethyl lactate based Fenton treatment on soil quality for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, *262*, 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.09.023>
- Gems, D., & Partridge, L. (2008). Stress-Response Hormesis and Aging: “That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger.” *Cell Metabolism*, *7*(3), 200–203. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.01.001>
- Gilbertson, R. L. (1980). Wood-Rotting Fungi of North America. *Mycologia*, *72*(1), 1–49.

<https://doi.org/https://doi.org/10.2307/3759417>

- Gómez, José, Pazos, M., Couto, S. R., & Sanromán, M. Á. (2005). Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering*, 68(3), 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.06.005>
- Gómez, Jose, Rodríguez Solar, D., Pazos, M., & Sanromán, M. Á. (2006). Applicability of *Coriolopsis rigida* for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Letters*, 28(13), 1013–1017. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9039-1>
- Gou, Y., Zhao, Q., Yang, S., Wang, H., Qiao, P., Song, Y., Cheng, Y., & Li, P. (2020). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the response of indigenous bacteria in highly contaminated aged soil after persulfate oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190(December 2019), 110092. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110092>
- Goveas, L. C., Krishna, A., Salian, A., Menezes, J., Alva, M., Basavapattan, B., & Sajankila, S. P. (2020). Isolation and characterization of bacteria from refinery effluent for degradation of petroleum crude oil in seawater. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1), 473–484. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.49>
- GRIFFITH, G. S., & BODDY, L. (1991). Fungal decomposition of attached angiosperm twigs: II. Moisture relations of twigs of ash (*Fraxinus excelsior* L.). *New Phytologist*, 117(2), 251–257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1991.tb04906.x>
- Gutiérrez, A., Del Río, J. C., Martínez-Íñigo, M. J., Martínez, M. J., & Martínez, Á. T. (2002). Production of new unsaturated lipids during wood decay by ligninolytic basidiomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1344-1350.2002>
- Ha, H. C., Y, H., T, W., & M., K. (2001). Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin- degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 55, 704–11.
- Hammel, K. E., Wen Zhi Gai, Green, B., & Moen, M. A. (1992). Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 1832–1838. <https://doi.org/10.1128/aem.58.6.1832-1838.1992>
- Hammel, Kenneth E, Kapich, A. N., Jr, K. A. J., & Ryan, Z. C. (2002). Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 445–453. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00011-X)
- Harayama, S., Reik, M. (1989). Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem*, 264(26), 15328–15333.
- Harms, G., Layton, A.C., Dionisi, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G., Saylor, G. S. (2003). Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.*, 343–351.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, 9(3), 177–192. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2519>
- Hatakka, A. (2001). Biodegradation of lignin. In A. Hofrichter, M., Steinbüchel (Ed.), *Lignin, Humic Substances and Coal Biopolymers* (pp. 129–179). Wiley-VCH.

- Helm, D., & Naumann, D. (1995). *Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy*. *126*, 75–79.
- Hermosilla, E., Rubilar, O., Schalchli, H., da Silva, A. S. A., Ferreira-Leitao, V., & Diez, M. C. (2018). Sequential white-rot and brown-rot fungal pretreatment of wheat straw as a promising alternative for complementary mild treatments. *Waste Management*, *79*(September), 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.07.044>
- Hernández Trejo, F., Muñoz Rodríguez, A. F., Tormo Molina, R., & Palacios, I. S. (2013). Airborne spores of basidiomycetes in Mérida (SW Spain). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *20*(4), 657–663.
- Hiscox, J., O’Leary, J., & Boddy, L. (2018). Fungus wars: basidiomycete battles in wood decay. *Studies in Mycology*. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.02.003>
- Howlett, N. G., & Avery, S. V. (1997). Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(8), 2971–2976. <https://doi.org/10.1128/aem.63.8.2971-2976.1997>
- Hu, G., Li, J., & Zeng, G. (2013). Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. *Journal of Hazardous Materials*, *261*, 470–490. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.069>
- Hu, J., Gan, J., Li, J., Luo, Y., Wang, G., Wu, L., & Gong, Y. (2017). Extraction of crude oil from petrochemical sludge: Characterization of products using thermogravimetric analysis. *Fuel*, *188*, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.09.068>
- Hui, K., Tang, J., Lu, H., Xi, B., Qu, C., & Li, J. (2020). Status and prospect of oil recovery from oily sludge: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, *13*(8), 6523–6543. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.06.009>
- Hungate, R. E. (1969). A Roll Tube Method for Cultivation of Strict Anaerobes. In *Methods in Microbiology* (Vol. 3, Issue PART B, pp. 117–132). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8)
- Ichinose, H., Nakamizo, M., Wariishi, H., & Tanaka, H. (2002). Metabolic response against sulfur-containing heterocyclic compounds by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*(4), 517–526. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0926-z>
- Ijoma, G. N., & Tekere, M. (2017). Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. In *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1269-3>
- Ivlev, A. A. (2001). Carbon isotope effects ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in biological systems. *Separation Science and Technology*, *36*(8–9), 1819–1914. <https://doi.org/10.1081/SS-100104762>
- James, T. Y., Stenlid, J., Olson, Å., & Johannesson, H. (2008). Evolutionary significance of imbalanced nuclear ratios within heterokaryons of the basidiomycete fungus *Heterobasidion parviporum*. *Evolution*, *62*(9), 2279–2296. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00462.x>
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczynski, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial Technology*, *52*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.10.003>

- Jeon, C. O., Park, W., Padmanabhan, P., DeRito, C., Snape, J. R., & Madsen, E. L. (2003). Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(23), 13591–13596. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735529100>
- Jiang, Y., Dennehy, C., Lawlor P., G., Hu, Z., McCabe, M., & Cormican, P. (2019). Exploring the roles of and interactions among microbes in dry co-digestion of food waste and pig manure using high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Biotechnol. Biofuels*, *12*(5). <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1344-0>
- Jing, G., Luan, M., Han, C., Chen, T., & Wang, H. (2011). An effective process for removing organic compounds from oily sludge using soluble metallic salt. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *18*(4), 1446–1449. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.02.002>
- Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, *133*(1), 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>
- Johnson, O. A., & Affam, A. C. (2019). Petroleum sludge treatment and disposal: A review. *Environmental Engineering Research*, *24*(2), 191–201. <https://doi.org/10.4491/EER.2018.134>
- Kakosová, E., Hrabák, P., Černík, M., Novotný, V., Czinnerová, M., Trögl, J., Popelka, J., Kuráň, P., Zoubková, L., & Vrtoch, L. (2017). Effect of various chemical oxidation agents on soil microbial communities. *Chemical Engineering Journal*, *314*, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.12.065>
- Kanally, R.A., and Harayama, S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol*, *182*, 2059–2067.
- Kelley I, Freeman JP, C. C. (1990). Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a Mycobacterium sp. *Biodegradation*, *1*, 283–90.
- Kim, C. H., & Kim, D. S. (1995). Purification and specificity of a specific endo-[beta]-1, 4-glucanase (Avicelase II) resembling exo-cellobiohydrolase from *Bacillus circulans*. *Enzyme Microb Technol*, *17*, 248–54.
- Kim, M. J., Lee, H., Choi, Y. S., Kim, G. H., Huh, N. Y., Lee, S., Lim, Y. W., Lee, S. S., & Kim, J. J. (2010). Diversity of fungi in creosote-treated crosstie wastes and their resistance to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *97*(4), 377–387. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9416-6>
- Kohlmeier, S., Smits, T. H. M., Ford, R. M., Keel, C., Harms, H., & Wick, L. Y. (2005). Taking the fungal highway: Mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environmental Science and Technology*, *39*(12), 4640–4646. <https://doi.org/10.1021/es047979z>
- Kolthoff, I. M., & Miller, I. K. (1951). The Chemistry of Persulfate. I. The Kinetics and Mechanism of the Decomposition of the Persulfate Ion in Aqueous Medium. *J. Am. Chem. Soc.*, *73*(7), 3055–3059. <https://doi.org/10.1021/ja01151a024>
- Kragelund, C., Levantesi, C., Borger, A., Thelen, K., Eikelboom, D., Tandoi, V., Kong, Y., Van Der Waarde, J., Krooneman, J., Rossetti, S., Thomsen, T. R., & Nielsen, P. H. (2007). Identity, abundance and ecophysiology of filamentous Chloroflexi species present in activated sludge treatment plants. *FEMS Microbiology Ecology*, *59*(3), 671–682. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00251.x>
- Kubicek, C. P. (Ed.). (2012). *Fungi and lignocellulosic biomass*. Wiley-Blackwell.

- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W. A., González, A., Caporaso, J. G., & Knight, R. (2012). *Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from Microbial Communities*. 1–28. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1007s36>. Using
- Kulik, N., Goi, A., Trapido, M., & Tuhkanen, T. (2006). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, *78*, 382–391. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.05.005>
- Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource Technology*, *254*, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>
- Lee, H., Jang, Y., Choi, Y. S., Kim, M. J., Lee, J., Lee, H., Hong, J. H., Lee, Y. M., Kim, G. H., & Kim, J. J. (2014). Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *Journal of Microbiological Methods*, *97*(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.12.007>
- Lehmann, J., & Rondon, M. (2006). *Bio-Char Soil Management on Highly Weathered Soils in the Humid Tropics*. June 2014, 517–529. <https://doi.org/10.1201/9781420017113.ch36>
- Leonowicz, A., Cho, NamSeokRogalski, J., Wesenberg, D., Luterek, J., Hofrichter, M., Matuszewska, A., & Wilkolazka, A. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology*, *41*(3-4), 185–227. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200107\)41:3/43.O.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200107)41:3/43.O.CO;2-T)
- Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtaś-Wasilewska, M., Cho, N. S., Hofrichter, M., & Rogalski, J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal Genetics and Biology*, *27*(2–3), 175–185. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1150>
- Leturia, M. F., & Nugoli, S. C. (2013). La contaminación por hidrocarburos. El caso “Magdalena.” *Revista Anales de La Facultad de Ciencias Jurídicas y Sociales*. UNLP, 46–2016(1).
- Li, D. A. N., Alic, M., Brown, J. A., & Gold, M. H. (1995). *Regulation of Manganese Peroxidase Gene Transcription by Hydrogen Peroxide, Chemical Stress, and Molecular Oxygen*. *61*(1), 341–345.
- Liang, B., Wang, L. Y., Mbadinga, S. M., Liu, J. F., Yang, S. Z., Gu, J. D., & Mu, B. Z. (2015). Anaerolineaceae and Methanosaeta turned to be the dominant microorganisms in alkanes-dependent methanogenic culture after long-term of incubation. *AMB Express*, *5*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0117-4>
- Liang, C., Huang, C. F., Mohanty, N., & Kurakalva, R. M. (2008). A rapid spectrophotometric determination of persulfate anion in ISCO. *Chemosphere*, *73*(9), 1540–1543. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.043>
- Liang, C., Lee, I. L., Hsu, I. Y., Liang, C. P., & Lin, Y. L. (2008). Persulfate oxidation of trichloroethylene with and without iron activation in porous media. *Chemosphere*, *70*(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.077>
- Liao, X., Zhao, D., Yan, X., & Huling, S. G. (2014). Identification of persulfate oxidation products of polycyclic aromatic hydrocarbon during remediation of contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, *276*, 26–34. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.05.018>
- Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2011). Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS Microbiology Ecology*, *78*(1), 91–102.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01144.x>

- Lim, M. W., Lau, E. Von, & Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. In *Marine Pollution Bulletin* (Vol. 109, Issue 1, pp. 14–45). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.023>
- Lin, C. C., & Lee, L. T. (2015). Degradation of polyvinyl alcohol in aqueous solutions using UV/oxidant process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 569–574. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.03.020>
- Lin, L., & Xu, J. (2020). Fungal Pigments and Their Roles Associated with Human Health. *Journal of Fungi*, 567–584. <https://doi.org/10.1002/9783527619658.ch32>
- Linder, T. (2018). Assimilation of alternative sulfur sources in fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2435-6>
- Liu, Bing, Wang, C., Liu, D., He, N., & Deng, X. (2017). Hg tolerance and biouptake of an isolated pigmentation yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *PLoS ONE*, 12(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172984>
- Liu, Boqun, Liu, J., Ju, M., Li, X., & Wang, P. (2017). Bacteria-white-rot fungi joint remediation of petroleum-contaminated soil based on sustained-release of laccase. *RSC Advances*, 7(62), 39075–39081. <https://doi.org/10.1039/c7ra06962f>
- Lladó, S., Covino, S., Solanas, A. M., Petruccioli, M., D’annibale, A., & Viñas, M. (2015). Pyrosequencing reveals the effect of mobilizing agents and lignocellulosic substrate amendment on microbial community composition in a real industrial PAH-polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 283, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.065>
- Lladó, S., Covino, S., Solanas, A. M., Viñas, M., Petruccioli, M., & D’annibale, A. (2013). Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 248–249(1), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.020>
- Lladó, S., Gràcia, E., Solanas, A. M., & Viñas, M. (2013). Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.010>
- Lladó, S., Solanas, A. M., de Lapuente, J., Borràs, M., & Viñas, M. (2012). A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 435–436, 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.032>
- Lladó, Salvador, Jiménez, N., Viñas, M., & Solanas, A. M. (2009). Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil. *Biodegradation*, 20(5), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9247-1>
- López Anadón, E. (2015). El abecé de los Hidrocarburos de Reservorios No Convencionales. *Iapg*, 1–13.
- Lozupone, C., Lladser, M. E., Knights, D., Stombaugh, J., & Knight, R. (2011). UniFrac: An effective distance metric for microbial community comparison. *ISME Journal*, 5(2), 169–172. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>
- Lu, H., Zou, W. X., Meng, J. C., Hu, J., & Tan, R. X. (2000). New bioactive metabolites produced

- by Colletotrichum sp., an endophytic fungus in Artemisia annua. *Plant Science*, 151(1), 67–73. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00199-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00199-5)
- Lundell, T. K., Mäkelä, M. R., & Hildén, K. (2010). Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *Journal of Basic Microbiology*, 50, 5–20. <https://doi.org/10.1002/jobm.200900338>
- Ma, J., Xu, L., & Jia, L. (2013). Characterization of pyrene degradation by Pseudomonas sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge. *Bioresource Technology*, 140, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.184>
- Magnelli, P., & Forchiassin, F. (1999). Regulation of the cellulase complex production by Saccobolus saccoboloides: induction and repression by carbohydrates. *Mycologia*, 91(2), 359–364. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061027>
- Marco-Urrea, E., García-Romera, I., & Aranda, E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology*, 32(6), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.005>
- Marín, F., Navarrete, H., & Narvaez-Trujillo, A. (2018). Total Petroleum Hydrocarbon Degradation by Endophytic Fungi from the Ecuadorian Amazon. *Advances in Microbiology*, 08(12), 1029–1053. <https://doi.org/10.4236/aim.2018.812070>
- Marín, J. A., Moreno, J. L., Hernández, T., & García, C. (2006). Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, 17(3), 251–261. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-5020-2>
- Martínez-Pascual, E., Grotenhuis, T., Solanas, A. M., & Viñas, M. (2015). Coupling chemical oxidation and biostimulation: Effects on the natural attenuation capacity and resilience of the native microbial community in alkylbenzene-polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 300, 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.06.061>
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., & Del Río, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulose: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8(3), 195–204. <https://doi.org/10.2436/im.v8i3.9526>
- Martinez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J., Guillen, F., & Martinez, A. T. (1996). Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from Pleurotus eryngii. *Eur. J. Biochem.*, 237, 424–432.
- Martins, L. F., Antunes, L. P., Pascon, R. C., de Oliveira, J. C. F., Digiampietri, L. A., Barbosa, D., Peixoto, B. M., Vallim, M. A., Viana-Niero, C., Ostroski, E. H., Telles, G. P., Dias, Z., da Cruz, J. B., Juliano, L., Verjovski-Almeida, S., da Silva, A. M., & Setubal, J. C. (2013). Metagenomic Analysis of a Tropical Composting Operation at the São Paulo Zoo Park Reveals Diversity of Biomass Degradation Functions and Organisms. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061928>
- Matcham, S. E., Jordan, B. R., & Wood, D. A. (1985). Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21(1–2), 108–112. <https://doi.org/10.1007/BF00252371>
- Mayer, A. M., & Staples, R. C. (2002). Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6), 551–565. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00171-1)
- Mc Donald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R., & Hugenholtz, P. (2011). An improved Greengenes taxonomy with explicit

- ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6(3), 610–618. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.139>
- Meckenstock, R. U., Safinowski, M., & Griebler, C. (2004). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(1), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.02.019>
- Medina, R. (2017). *Remediación de un suelo crónicamente contaminado con Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos*. Universidad Nacional de La Plata.
- Medina, R., David Gara, P. M., Fernández-González, A. J., Rosso, J. A., & Del Panno, M. T. (2018). Remediation of a soil chronically contaminated with hydrocarbons through persulfate oxidation and bioremediation. *Science of the Total Environment*, 618, 518–530. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.326>
- Medina, R., Fernández-gonzález, A. J., García-rodríguez, F. M., Villadas, P. J., Rosso, J. A., Fernández-lópez, M., & Del, M. T. (2020). Exploring the effect of composting technologies on the recovery of hydrocarbon contaminated soil post chemical oxidative treatment. *Applied Soil Ecology*, June, 103459. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103459>
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362–1375. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.003>
- Militon, C., Boucher, D., Vachelard, C., Perchet, G., Barra, V., Troquet, J., Peyretailade, E., & Peyret, P. (2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 669–681. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00982.x>
- Miller, C. M., Valentine, R. L., Roehl, M. E., & Alvarez, P. J. J. (1996). Chemical and microbiological assessment of pendimethalin-contaminated soil after treatment with Fenton's reagent. *Water Research*, 30(11), 2579–2586. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00151-0)
- Molla, A. H., Fakhru'l-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanafi, M. M., & Alam, M. Z. (2001). In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(9), 849–856. <https://doi.org/10.1023/A:1013844306960>
- Monrroy, M., Freer, J., Baeza, J., & Rodríguez, J. (2006). Degradation of tribromophenol by wood-rot fungi and hamilton system. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3), 253–257. <https://doi.org/10.2225/vol9-issue3-26>
- Mora, V. C., Madueño, L., Peluffo, M., Rosso, J. A., Panno, M. T. Del, & Morelli, I. S. (2014). *Remediation of phenanthrene-contaminated soil by simultaneous persulfate chemical oxidation and biodegradation processes*. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2687-0>
- Mora, V. C., Rosso, J. A., Carrillo Le Roux, G., Mártire, D. O., & Gonzalez, M. C. (2009). Thermally activated peroxydisulfate in the presence of additives: A clean method for the degradation of pollutants. *Chemosphere*, 75(10), 1405–1409. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.038>
- Morelli, I. S., Del Panno, M. T., Costanza, O. R., Vecchioli, G. I., & Pinceira, M. T. (2001). Técnicas de bioremediación ensayos de tratabilidad. *UNLP*, 115, 1–10.
- Morelli, I. S., Saparrat, M. C. N., Del Panno, M. T., Coppotelli, B., & Arrambari, A. (2013). Bioremediation of PAH-Contaminated Soil by Fungi. In E. M. G. et Al. (Ed.), *Soil Biology* (Vol. 32, pp. 203–226). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642->

- Morelli, I. S., Vecchioli, G. I., Costanza, O. R., Schäfer, R., Berthe-Corti, L., & Paineira, M. T. (1999). Effect of storage on the toxic potential of hydrocarbon containing sludges. *Environmental Toxicology*, *14*(2), 227–233. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7278\(199905\)14:2<227::AID-TOX3>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7278(199905)14:2<227::AID-TOX3>3.0.CO;2-H)
- Morelli, I. S., Vecchioli, G. I., Del Panno, M. T., & Paineira, M. T. (2001). Effect of petrochemical sludge concentrations on changes in mutagenic activity during soil bioremediation process. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *20*(10), 2179–2183. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201007>
- Moritz, C. (1994). Defining ESUs for conservation. *TREE*, *9*(10), 373–375. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed15&NEWS=N&AN=71069547>
- Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals From Lipids. *Journal of Lipid Research*, *5*(4), 600–608. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40190-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40190-7)
- Mrayyan, B., & Battikhi, M. N. (2005). *Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludge*. *120*, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.12.033>
- Muangchinda, C., Pansri, R., Wongwongsee, W., & Pinyakong, O. (2013). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. *Journal of Applied Microbiology*, *114*(5), 1311–1324. <https://doi.org/10.1111/jam.12128>
- Nam, K., Rodriguez, W., & Kukor, J. J. (2001). *Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction*. 45.
- Naumann, D. (2000). Infrared Spectroscopy in Microbiology. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1–32. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a0117.pub2>
- Nazir, R., Warmink, J. A., Boersma, H., & Van Elsas, J. D. (2010). Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*, *71*(2), 169–185. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00807.x>
- Nisbet, I. C. T., & LaGoy, P. K. (1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *16*(3), 290–300. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-X)
- Nopcharoenkul, W., Pinphanichakarn, P., & Pinyakong, O. (2011). The development of a liquid formulation of *Pseudoxanthomonas* sp. RN402 and its application in the treatment of pyrene-contaminated soil. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(1), 36–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05037.x>
- Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(11), 3519–3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-06>
- Palmroth, M. R. T., Langwaldt, J. H., Aunola, T. A., Goi, A., Münster, U., Puhakka, J. A., & Tuhkanen, T. A. (2006). Effect of modified Fenton's reaction on microbial activity and removal of PAHs in creosote oil contaminated soil. *Biodegradation*, *17*(2), 131–141. <https://doi.org/10.1007/s10532-005-6060-3>

- Pardo, F., Rosas, J. M., Santos, A., & Romero, A. (2015). Remediation of soil contaminated by NAPLs using modified Fenton reagent: Application to gasoline type compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(4), 754–764. <https://doi.org/10.1002/jctb.4373>
- Pasi, P., Hultman, J., Paulin, L., Auvinen, P., & Romantschuk, M. (2010). Bacterial diversity at different stages of the composting process. *BMC Microbiology*, 10(94). <https://doi.org/10.1209/epl/i1998-00540-7>
- Pearce, M. H. (1990). In vitro interactions between *Armillaria luteobubalina* and other wood decay fungi. *Mycological Research*, 94(6), 753–761. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81374-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81374-9)
- Peluffo, M., Pardo, F., Santos, A., & Romero, A. (2016). Use of different kinds of persulfate activation with iron for the remediation of a PAH-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 563–564, 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.034>
- Peluffo, Marina, Mora, V. C., Morelli, I. S., & Rosso, J. A. (2018). Persulfate treatments of phenanthrene-contaminated soil: Effect of the application parameters. *Geoderma*, 317(July 2017), 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.12.016>
- Petersen, J. C. (2009). A review of the fundamentals of asphalt oxidation chemical, physicochemical, physical property, and durability relationships. *Transportation Research E-Circular*, E-C140, 1–78.
- Petriglieri, F., Nierychlo, M., Nielsen, H., & McIlroy, S. J. (2018). *In situ* visualisation of the abundant *Chloroflexi* populations in full-scale anaerobic digesters and the fate of immigrating species. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206255>
- Pickard, M. A., Roman, R., Tinoco, R., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3805–3809. <https://doi.org/10.1128/aem.65.9.3805-3809.1999>
- Pineda-Flores, G., & Mesta-Howard, A. M. (2001). Petroleum asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(3), 143–150.
- Pointing, S. B., Parungao, M. M., & Hyde, K. D. (2003). Production of wood-decay enzymes, mass loss and lignin solubilization in wood by tropical Xylariaceae. *Mycol. Res.*, 107, 231–235.
- Poveda-Jaramillo, J. C., Molina-Velasco, D. R., Bohorques Toledo, N. A., Torres, M. H., & Ariza-León, E. (2016). Chemical characterization of the asphaltenes from colombian colorado light crude oil. *CT y F - Ciencia, Tecnología y Futuro*, 6(3), 105–122.
- Praveckova, M., M.V., B., Holliger, C., F., D. A., & Rossi, P. (2016). Indirect evidence link PCB dehalogenation with Geobacteraceae in anaerobic sediment-free microcosms. *Front Microbiol*, 7, 933.
- Prenafeta-Boldú, F. X., de Hoog, G. S., & Summerbell, R. C. (2019). Fungal Communities in Hydrocarbon Degradation. In *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60063-5_8-2
- Prince, R. C., Garrett, R. M., Bare, R. E., Grossman, M. J., Townsend, T., Suflita, J. M., Lee, K., Owens, E. H., Sergy, G. A., Braddock, J. F., Lindstrom, J. E., & Lessard, R. R. (2003). The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel

- oils. *Spill Science and Technology Bulletin*, 8(2), 145–156. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00017-3)
- Puglisi, E., Cappa, F., Fragoulis, G., Trevisan, M., & Del Re, A. A. M. (2007). Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soils. *Chemosphere*, 67(3), 548–556. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.09.058>
- Qiao, M., Qi, W., Liu, H., Bai, Y., & Qu, J. (2016). Formation of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons from polycyclic aromatic hydrocarbons during aerobic activated sludge treatment and their removal process. *Chemical Engineering Journal*, 302, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.139>
- Quarantino, D., Federici, F., Petruccioli, M., Fenice, M., & D’Annibale, A. (2007). Production, purification and partial characterisation of a novel laccase from the white-rot fungus *Panus tigrinus* CBS 577.79. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 91(1), 57–69. <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9096-4>
- Quintella, C. M., Mata, A. M. T., & Lima, L. C. P. (2019). Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of Environmental Management*, 241(April), 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.019>
- Ranjan, R. S., Qian, Y., & Krishnapillai, M. (2006). Effects of Electrokinetics and Cationic Surfactant Cetyltrimethylammonium Bromide [CTAB] on the Hydrocarbon Removal and Retention from Contaminated. *Environmental Technology*, 27(7), 767–776. <https://doi.org/10.1080/09593332708618686>
- Reading, N. S., Welch, K. D., & Aust, S. D. (2003). Free Radical Reactions of Wood-Degrading Fungi WOOD STRUCTURE AND FREE-RADICALS. In *Wood Structure And Free-Radicals* (pp. 16–31).
- Reasoner, D. J., & Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/aem.49.1.1-7.1985>
- Redondo, M. A., Berlin, A., Boberg, J., & Oliva, J. (2020). Vegetation type determines spore deposition within a forest-agricultural mosaic landscape. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(6), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa082>
- Rhodes, C. J. (2014). Mycoremediation (bioremediation with fungi) - growing mushrooms to clean the earth. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 26(3), 196–198. <https://doi.org/10.3184/095422914X14047407349335>
- Rivas, J., Gimeno, O., de la Calle, R. G., & Beltrán, F. J. (2009). Ozone treatment of PAH contaminated soils: Operating variables effect. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.136>
- Robledo-Mahón, T., Calvo, C., & Aranda, E. (2020). Enzymatic potential of bacteria and fungi isolates from the sewage sludge composting process. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(21), 1–13. <https://doi.org/10.3390/app10217763>
- Rodrigues, C., & Keller, R. D. P. (2015). Lipase and Surfactant Production by Fungi Isolated of Oily Residues of. *International Journal of Applied Sciences and Technology*, 5(3), 46–54.
- Rodriguez, S., Vasquez, L., Costa, D., Romero, A., & Santos, A. (2014). Oxidation of Orange G by persulfate activated by Fe(II), Fe(III) and zero valent iron (ZVI). *Chemosphere*, 101, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.037>

- Rodriguez-Couto, S., Gudín, M., Lorenzo, M., & Sanromán, M. A. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, *38*, 249–255.
- Roldán-Carrillo, T., Castorena-Cortés, G., Zapata-Peñasco, I., Reyes-Avila, J., & Olguín-Lora, P. (2012). Aerobic biodegradation of sludge with high hydrocarbon content generated by a Mexican natural gas processing facility. *Journal of Environmental Management*, *95*(SUPPL.), S93–S98. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.04.014>
- Romero, M. C., Cazau, M. C., Giorgieri, S., & Arambarri, A. M. (1998). Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*, *101*(3), 355–359. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00056-6)
- Roy, A. S., Baruah, R., Borah, M., Singh, A. K., Deka Boruah, H. P., Saikia, N., Deka, M., Dutta, N., & Chandra Bora, T. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *94*, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.024>
- Ruess, L., Tiunov, A., Haubert, D., Richnow, H. H., Häggblom, M. M., & Scheu, S. (2005). Carbon stable isotope fractionation and trophic transfer of fatty acids in fungal based soil food chains. *Soil Biology and Biochemistry*, *37*(5), 945–953. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.015>
- Ruiz-Dueñas, F. J., Morales, M., García, E., Miki, Y., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2009). Substrate oxidation sites in versatile peroxidase and other basidiomycete peroxidases. *J. Exp. Bot.*, *60*, 441–452.
- Ruiz-hidalgo, K., Chin-pampillo, J. S., Masís-mora, M., R, E. C., & Rodríguez-rodríguez, C. E. (2014). Degradation of carbofuran by *Trametes versicolor* in rice husk as a potential lignocellulosic substrate for biomixtures : From mineralization to toxicity reduction. *Process Biochemistry*, *49*(12), 2266–2271. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.006>
- Sack, U. T. E., Heinze, T. M., Deck, J., Cerniglia, C. E., Martens, R., & Zadrazil, F. (1997). *Comparison of Phenanthrene and Pyrene Degradation by Different Wood-Decaying Fungi*. *63*(10), 3919–3925.
- Samanta, S. K., Singh, O. V, & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons : environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, *20*(6), 243–248.
- Sanjeeb, K. M., & Nilanjana, D. (2017). Biodegradation of benzo[a]pyrene by *Rhodotorula* sp. NS01 strain isolated from contaminated soil sample. *Research J. Pharm. and Tech.*, *10*(6), 1751–1757. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00309.2>
- Saparrat, M., Balatti, P. a., Martínez, M. J., & Jurado, M. (2010a). Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology*, *114*(11–12), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.010>
- Saparrat, M., Balatti, P. A., Martínez, M. J., & Jurado, M. (2010b). Differential regulation of laccase gene expression in *Coriopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology*, *114*(11–12), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.09.010>
- Saparrat, M. C. N., & Hammer, E. (2006). Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no . 786 strain. *J. Basic Microbiol.*, *46*(1), 28–33. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410543>
- Saparrat, Mario C.N., Balatti, P. A., Arambarri, A. M., & Martínez, M. J. (2014). *Coriopsis rigida*,

- a potential model of white-rot fungi that produce extracellular laccases. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 607–617. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1408-5>
- Saparrat, Mario C.N., Jurado, M., Díaz, R., Romera, I. G., & Martínez, M. J. (2010). Transformation of the water soluble fraction from “alpeorujo” by *Corioloopsis rigida*: The role of laccase in the process and its impact on *Azospirillum brasiliense* survival. *Chemosphere*, 78(1), 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.050>
- Saparrat, Mario C N, Guillén, F., Arambarri, A. M., & Marti, A. T. (2011). *Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white- rot basidiomycete Corioloopsis rigida*. 68(4), 1534–1540. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1534>
- Saparrat, Mario C N, Mocchiutti, P., Liggieri, C. S., Aulicino, M. B., Caffini, N. O., Balatti, P. a., & Martínez, M. J. (2008). Ligninolytic enzyme ability and potential biotechnology applications of the white-rot fungus *Grammothele subargentea* LPSC no. 436 strain. *Process Biochemistry*, 43(4), 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.12.016>
- Saparrat, Mario Carlos Nazareno, Martínez, M. J., Cabello, M. N., & Arambarri, A. M. (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología : Organo de La Asociacion Espanola de Especialistas En Micología*, 19(3), 181–185. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-5774-z>
- Sarkar, J., Kazy, S. K., Gupta, A., Dutta, A., Mohapatra, B., Roy, A., Bera, P., Mitra, A., & Sar, P. (2016). Biostimulation of indigenous microbial community for bioremediation of petroleum refinery sludge. *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01407>
- Savinova, O. S., Moiseenko, K. V., Vavilova, E. A., Chulkin, A. M., Fedorova, T. V., Tyazhelova, T. V., & Vasina, D. V. (2019). Evolutionary relationships between the laccase genes of polyporales: Orthology-based classification of laccase isozymes and functional insight from *trametes hirsuta*. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00152>
- Savitzky, A., & Golay, M. E. (1964). Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 36(8), 1627–1639.
- Sayara, T., Sarrà, M., & Sánchez, A. (2010). Effects of compost stability and contaminant concentration on the bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting. *Journal of Hazardous Materials*, 179(1–3), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.104>
- Scheel, T., Hoëfer, Ludwig, S., & Hoëlker, T. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Appl Microbiol Biotechno*, 54, 686–691.
- Schmidt-Heydt, M., Stoll, D., Schütz, P., & Geisen, R. (2015). Oxidative stress induces the biosynthesis of citrinin by *Penicillium verrucosum* at the expense of ochratoxin. *International Journal of Food Microbiology*, 192, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.008>
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., Warshawsky, D. (1996). Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(1), 13–19.
- Schnürer, J., & Thomas, R. (1982). Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total

- Microbial Activity in Soil and Litter. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1256–1261.
- Semple, K. T., Reid, B. J., & Fermor, T. R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with diesel fuel.pdf. *Environmental Pollution*, 112, 269–283.
- Semple, Kirk T., Doick, K. J., Wick, L. Y., & Harms, H. (2007). Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environmental Pollution*, 150(1), 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.023>
- Semple, Kirk T., Morris, A. W. J., & Paton, G. I. (2003). *Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils : fundamental concepts and techniques for analysis*. December, 809–818. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2003.00564.x>
- Semple, Kirk T, Doick, J., Jones, K. C., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). *Defining BIOAVAILABILITY and Bioaccessibilityof Contaminated Soil and Sediment isComplicated*.
- Siles, J. A., Rachid, C. T. C. C., Sampedro, I., García-Romera, I., & Tiedje, J. M. (2014). Microbial diversity of a Mediterranean soil and its changes after biotransformed dry olive residue amendment. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103035>
- Silfer, J. A., Engel, M. H., Limited, V. G. I., Way, A., & Oht, C. C. (1991). *Stable Carbon Isotope Analysis of Amino Acid Enantiomers by Conventional Isotope Ratio Mass Spectrometry and Combined Gas Chromatography1 Isotope Ratio Mass Spectrometry*. 370–374.
- Silva, I. S., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(2), 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.09.008>
- Silva, R. D. C. F. S., Almeida, D. G., Rufino, R. D., & Luna, J. M. (2014). Applications of Biosurfactants in the Petroleum Industry and the Remediation of Oil Spills. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 12523–12542. <https://doi.org/10.3390/ijms150712523>
- Sirguy, C., Tereza de Souza e Silva, P., Schwartz, C., & Simonnot, M. O. (2008). Impact of chemical oxidation on soil quality. *Chemosphere*, 72(2), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.01.027>
- Slater, C., Preston, T., & Weaver, L. T. (2001). Stable isotopes and the international system of units. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 15(15), 1270–1273. <https://doi.org/10.1002/rcm.328>
- Smith, E., Thavamani, P., Ramadass, K., Naidu, R., Srivastava, P., & Megharaj, M. (2015). Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: Evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 101, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.03.029>
- Sokal, R. R. and, & Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull*, 28, 1409–1438.
- Song, G., Lu, C., & Lin, J. (2007). *Application of surfactants and microemulsions to the extraction of pyrene and phenanthrene from soil with three different extraction methods*. 596, 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.004>
- Song, Y., Fang, G., Zhu, C., Zhu, F., Wu, S., Chen, N., Wu, T., Wang, Y., Gao, J., & Zhou, D. (2019). Zero-valent iron activated persulfate remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-

- contaminated soils: An in situ pilot-scale study. *Chemical Engineering Journal*, 355(August 2018), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.126>
- Steenwyk, J. L., & Rokas, A. (2018). Copy number variation in fungi and its implications for wine yeast genetic diversity and adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00288>
- Stella, T., Covino, S., Čvančarová, M., Filipová, A., Petruccioli, M., D'Annibale, A., & Cajthaml, T. (2017). Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 701–710. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.11.044>
- Stoeck, T., Bass, D., Nebel, M., Christen, R., Jones, M. D. M., Breiner, H. W., & Richards, T. A. (2010). Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. *Molecular Ecology*, 19(SUPPL. 1), 21–31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04480.x>
- Strom, N. B., & Bushley, K. E. (2016). Two genomes are better than one: history, genetics, and biotechnological applications of fungal heterokaryons. *Fungal Biology and Biotechnology*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40694-016-0022-x>
- Strong, P. J. (2011). Improved laccase production by *Trametes pubescens* MB89 in distillery wastewaters. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/379176>
- Sutherland, J. B., Selby, A. L., Freeman, J. P., Evans, F. E., & Cerniglia, C. E. (1991). Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3310–3316.
- Sutton, N. B., Grotenhuis, T., & Rijnaarts, H. H. M. (2014). Impact of organic carbon and nutrients mobilized during chemical oxidation on subsequent bioremediation of a diesel-contaminated soil. *Chemosphere*, 97, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.005>
- Sutton, N. B., Langenhoff, A. A. M., Lasso, D. H., Van Der Zaan, B., Van Gaans, P., Maphosa, F., Smidt, H., Grotenhuis, T., & Rijnaarts, H. H. M. (2014). Recovery of microbial diversity and activity during bioremediation following chemical oxidation of diesel contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2751–2764. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5256-4>
- Sverdrup, L. E., Ekelund, F., Krogh, P. H., Nielsen, T., & Johnsen, K. (2002). Soil microbial toxicity of eight polycyclic aromatic compounds: Effects on nitrification, the genetic diversity of bacteria, and the total number of protozoans. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(8), 1644–1650. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210815>
- Teefy, D. A. (1997). Remediation technologies screening matrix and reference guide: Version III. *Remediation*, 8(1), 115–121. <https://doi.org/10.1002/rem.3440080111>
- Thalman, A. (1968). Zur methodik der Bestimmung der Dehydrogenase activit ? t im Boden Mittels Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Forsch*, 21, 249–258.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19–26.
- Tian, J. H., Pourcher, A. M., Bouchez, T., Gelhaye, E., & Peu, P. (2014). Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(23), 9527–9544. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6142-4>
- Tien, M., Kirk, T. K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.*, 161, 238–249.

- Tran, Q. N. M., Mimoto, H., Koyama, M., & Nakasaki, K. (2019). Lactic acid bacteria modulate organic acid production during early stages of food waste composting. *Science of the Total Environment*, 687, 341–347. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.113>
- Troncozo, M. I., Figoli, C. B., Franco, M. E. E., Mirífico, M. V., Bosch, A., Rajchenberg, M., Balatti, P. A., & Saparrat, M. C. N. (2020). Biotransformation of grape pomace from *Vitis labrusca* by *Peniophora albobadia* LPSC # 285 (Basidiomycota). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 92(1), 1–16. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020181174>
- Troncozo, M. I., Lješević, M., Beškosi, V. P., Anđelković, B., Balatti, P. A., & Saparrat, M. C. N. (2019). Fungal transformation and reduction of phytotoxicity of grape pomace waste. *Chemosphere*, 237, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124458>
- Tsai, J., Kumar, M., & Lin, J. (2009). Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *Journal of Hazardous Materials*, 164, 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.08.101>
- Tsibart, A. S. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Sources, behavior, and indication significance (a review). *Eurasian Soil Science*, 46(7), 728–741. <https://doi.org/10.1134/S1064229313070090>
- Tsitonaki, A., Petri, B., Crimi, M., Mosbk, H., Siegrist, R. L., & Bjerg, P. L. (2010). In situ chemical oxidation of contaminated soil and groundwater using persulfate: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 40(1), 55–91. <https://doi.org/10.1080/10643380802039303>
- USEPA. (1996). Total Recoverable Petroleum Hydrocarbons By Infrared Spectrophotometry. *United States Environmental Protection Agency*.
- USEPA. (2007). Treatment technologies for site cleanup: Annual Status Report 12th edition. In *United States Environmental Protection Agency. Service Center for Environmental Publications (NSCEP)*. www.epa.gov/tio
- USEPA. (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet. *United States Environmental Protection Agency*, 1–3. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01943-1](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01943-1)
- Usman, M., Faure, P., Ruby, C., & Hanna, K. (2012). Application of magnetite-activated persulfate oxidation for the degradation of PAHs in contaminated soils. *Chemosphere*, 87(3), 234–240. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.001>
- Valderrama, C., Alessandri, R., Aunola, T., Cortina, J. L., Gamisans, X., & Tuhkanen, T. (2009). Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 166(2–3), 594–602. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.108>
- Valentín, L., Lu-Chau, T. A., López, C., Feijoo, G., Moreira, M. T., & Lema, J. M. (2007). Biodegradation of dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene in a soil slurry reactor by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *Process Biochemistry*, 42(4), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.11.011>
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Vecchioli, G. I., Del Panno, M. T., & Paineira, M. T. (1990). Use of selected autochthonous soil bacteria to enhanced degradation of hydrocarbons in soil. *Environmental Pollution*, 67(3), 249–258. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(90\)90190-N](https://doi.org/10.1016/0269-7491(90)90190-N)

- Venny, Gan, S., & Ng, H. K. (2012). Modified Fenton oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soils and the potential of bioremediation as post-treatment. *Science of the Total Environment*, *419*, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.053>
- Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., & Durand, R. (2006). Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. *Mycological Research*, *110*(4), 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2005.12.003>
- Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., & Durand, R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution*, *133*(2), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.040>
- Vicente, F., Santos, A., Romero, A., & Rodriguez, S. (2011). Kinetic study of diuron oxidation and mineralization by persulphate: Effects of temperature, oxidant concentration and iron dosage method. *Chemical Engineering Journal*, *170*(1), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.03.042>
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. J., & Solanas, A. M. (2005). Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 7008–7018. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005>
- Visioli, G., Conti, F. D., Gardi, C., & Menta, C. (2014). Germination and root elongation bioassays in six different plant species for testing ni contamination in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *92*(4), 490–496. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1166-5>
- Voisin, A. I. (2016). *Extracción y balance de nutrientes para el cultivo de trigo y para distintas secuencias en el área de influencia de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales*.
- Volke Sepúlveda, T., & Velasco Trejo, J. A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. In *Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Waigi, M. G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., & Gao, Y. (2015). Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *104*, 333–349. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.008>
- Walter, M., Boul, L., Chong, R., & Ford, C. (2004). Growth substrate selection and biodegradation of PCP by New Zealand white-rot fungi. *Journal of Environmental Management*, *71*(4), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.04.002>
- Wang, D., Ma, J., Li, H., & Zhang, X. (2018). Concentration and potential ecological risk of PAHs in different layers of soil in the petroleum-contaminated areas of the loess plateau, China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph15081785>
- Wang, Q., Feng, J., Sun, Z., Jiang, G., Ma, G., Li, S., Sun, M., & Ma, G. (2018). *Effects of Oxidative Stress on Hyphal Growth and Chlamydospore Formation of Clonostachys rosea*. *34*, 168–173.
- Warmink, J. A., Nazir, R., & Van Elsas, J. D. (2009). Universal and species-specific bacterial “fungiphiles” in the mycospheres of different basidiomycetous fungi. *Environmental Microbiology*, *11*(2), 300–312. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01767.x>

- Weber, Nikolaus; Vosman, K. L. B. and K. D. M. (1997). Metabolism of dietary petroselinic acid: a dead-end metabolite of desaturation/chain elongation reactions. *Icassp*, 21(3), 295–316.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., & Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1–2), 161–187. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.08.011>
- Wick, L. Y., Ruiz de Munain, A., Springael, D., & Harms, H. (2002). Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 378–385. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0898-z>
- Wick, Lukas Y., Remer, R., Würz, B., Reichenbach, J., Braun, S., Schäfer, F., & Harms, H. (2007). Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil. *Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1021/es061407s>
- Winqvist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K. T., Jørgensen, K. S., & Tuomela, M. (2014). Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi - From laboratory to field scale. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.012>
- Worrich, A., Wick, L. Y., & Banitz, T. (2018). Ecology of Contaminant Biotransformation in the Mycosphere: Role of Transport Processes. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.005>
- Wrenn, B. A., & Venosa, A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 252–258. <https://doi.org/10.1139/m96-037>
- Xie, G., & Barcelona, M. J. (2003). Sequential chemical oxidation and aerobic biodegradation of equivalent carbon number-based hydrocarbon fractions in jet fuel. *Environmental Science and Technology*, 37(20), 4751–4760. <https://doi.org/10.1021/es026260t>
- Yamada, T., Imachi, H., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., Kamagata, Y., & Sekiguchi, Y. (2007). *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum Chloroflexi isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2299–2306. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65098-0>
- Ye, D., Siddiqi, M.A., Maccubin, A.E., Kumar, S., Sikka, H. C. 1995. (1995). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Env. Sci. Technol.*, 30(1), 136–142.
- Ye, Q., Liang, C., Wang, C., Wang, Y., & Wang, H. (2018). Characterization of a phenanthrene-degrading methanogenic community. *Frontiers of Environmental Science and Engineering*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1083-2>
- Yuan Y., Wang S., Liu Y., Li B., Wang B., P. Y. (2015). Long-term effect of pH on short-chain fatty acids accumulation and microbial community in sludge fermentation systems. *Bioresour. Technol.*, 197, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.025>
- Zhang, D., Junjian, W., & Hui, Z. (2016). Soil Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Across Urban Density Zones in Shenzhen, China: Occurrences, Source Apportionments, and Spatial Risk Assessment. *Pedosphere: An International Journal*, 26(5), 676–686. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60076-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60076-5)
- Zhu, X., Kougiyas, P.G., Treu, L. et al. (2017). Microbial community changes in methanogenic granules during the transition from mesophilic to thermophilic conditions. *Appl Microbiol*

Biotechnol, 101, 1313–1322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00253-016-8028-0>

Zimmermann, W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13(2–3), 119–130. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90098-V](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90098-V)

IX Anexo

Tablas

Tabla A. 1. Resumen de la normativa ambiental internacional y nacional, con enfoque a los residuos peligrosos.

Norma	Observaciones
Ley N° 24.295	Convención Marco de Naciones Unidas sobre el Cambio Climático Global.
Ley N° 25.438	Protocolo de Kioto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático
Ley N° 26.011	Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes
Ley N° 25.278	Convenio de Rotterdam sobre Plaguicidas y Productos Químicos Peligrosos
Ley N° 23.922	Convenio de Basilea sobre el Control de los Movimientos Transfronterizos de Residuos Peligrosos.
Constitución Nacional	Art. 43 Amparo Ambiental Art. 121 Delegación Poder Art. 124 Dominio Provincial Originario de los Recursos Naturales
Ley N° 25.675 Ley General del Ambiente	Establece los presupuestos mínimos para una gestión sustentable y adecuada del ambiente, la preservación y protección de la diversidad biológica y la implementación del desarrollo sustentable. Regula: el régimen de daño ambiental colectivo, las Evaluaciones de Impacto Ambiental (EIA) para establecimientos industriales y emprendimientos productivos, la responsabilidad colectiva ambiental, reglas ambientales procesales, la obligación de contratar un seguro ambiental de cobertura, con entidad suficiente. Establece la obligación de recomponer en caso de daño ambiental.

Ley N° 25.612	Establece los presupuestos mínimos de protección ambiental sobre la gestión integral de residuos de origen industrial y de actividades de servicio, que sean generados en todo el territorio nacional, y sean derivados de procesos industriales o de actividades de servicios. La importación de residuos peligrosos está prohibida por la Constitución Nacional y por la LRP.
Ley N° 24.051 Ley Nacional de Residuos Peligrosos (LRP)	Regula la generación, manipulación, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos en lugares sujetos a la jurisdicción nacional; o cuando el residuo peligroso trascienda las fronteras provinciales por cualquier medio. Decreto Reglamentario 831/93. Crea el Registro Nacional de Generadores y Operadores de Residuos Peligrosos, en el que deberán inscribirse las personas físicas o Jurídicas responsables de la generación, transporte, tratamiento y disposición final de residuos peligrosos (independientemente de las obligaciones locales de cada jurisdicción).
Resolución SADS N° 897/02 modificada por la Resolución N° SADS 830/08	Agrega al Anexo I de la LRP la Categoría sometida a Control Y 48, referente a todos los materiales y/o elementos diversos contaminados con alguno o algunos de los residuos peligrosos identificados en el Anexo I o que presenten alguna o algunas de las características peligrosas enumeradas en el Anexo II de la LRP, cuyo destino sea o deba ser una Operación de Eliminación según el Anexo III de la Ley.
Ley N° 22.428 Conservación de Suelo	Establece el régimen para el fomento de la acción privada y pública de la conservación de los suelos. Decreto reglamentario 681/81.
Resolución SADS N° 97/01	Reglamento para el Manejo Sustentable de Barros Generados en Plantas de Tratamiento de Efluentes Líquidos.
Resolución SADS N°231/93.	Fija como LIMITE DE CARGA CONTAMINANTE PONDERADA TOTAL (LCPT) al que se refieren los art. 4º y 5º del Decreto N° 674/89 el valor de 1.500
Resolución MPFIPyS N° 266/08	Crea el Registro de Universidades Nacionales para realización de auditorías técnicas, ambientales y de seguridad en áreas de almacenaje, plantas de procesamiento, de fraccionamiento y almacenamiento, refinerías, tanques de almacenaje y no subterráneos, cisternas para transporte de hidrocarburos y sus derivados.

Tabla A. 2. Datos de concentración y calidad de ADN extraído a partir de muestras de los microcosmos FP y FP+PSA no estériles.

<i>Tratamiento</i>	<i>Tiempo (días)</i>	<i>Concentración ADN (ng/μl)</i>	<i>A260/A280</i>	
FPNE	<i>Control</i>	0	9,7	1,81
		30	14,1	1,73
		60	20,4	1,70
	<i>LPSC 232</i>	30	25	1,77
		60	13,7	1,80
		<i>LPSC 436</i>	30	28,1
	60	23,9	1,70	
PSANE	<i>Control</i>	0	0,4	3,07
		30	1,4	1,6
		60	3,4	1,72
	<i>LPSC 232</i>	30	3,1	1,8
		60	0,9	1,00
		<i>LPSC 436</i>	30	3,8
	60	1,7	2,13	

Tabla A. 3. Datos de secuenciación del gen 16S rARN (Bacteria y Archaea) y diversidad alfa.

<i>Tratamiento</i>	<i>Tiempo (días)</i>	<i>OTUs obs</i>	<i>Índice de Good (%)</i>	<i>Chao1</i>	<i>Shannon</i>	<i>Inversa de Simpson</i>	
FPNE	<i>Control</i>	0	356	96	448	6,08	1,04
		30	400	95	509	6,29	1,03
		60	342	97	388	6,50	1,03
	<i>LPSC 232</i>	30	420	96	491	6,71	1,02
		60	391	97	448	6,32	1,03
		<i>LPSC 436</i>	30	408	98	502	6,81
	60	394	97	490	6,43	1,03	
PSANE	<i>Control</i>	0	280	98	393	3,35	1,47
		30	258	98	377	3,85	1,17
		60	237	97	374	3,69	1,21
	<i>LPSC 232</i>	30	225	98	407	2,72	1,71
		60	218	98	378	3,21	1,38
		<i>LPSC 436</i>	30	239	98	344	3,82
	60	224	97	322	3,94	1,17	

Tabla A. 4. Datos de secuenciación del gen 18S rARN (Fungi) y alfa diversidad.

Tratamiento	Tiempo (días)	OTUs observado	Indice de Good (%)	Chao1	Shannon	Inversa de Simpson	
FPNE	0	134	98,30	157,50	3,30	1,10	
	Control	30	175	95,20	320,68	2,45	1,31
		60	240	95,30	310,43	3,31	1,12
	LPSC 232	30	163	95,60	349,36	1,68	2,23
		60	213	93,60	483,19	3,21	1,11
	LPSC 436	30	164	96,00	269,13	2,03	1,68
60		159	95,90	282,50	2,26	1,43	
PSANE	0	88	97,70	182,27	1,02	3,28	
	Control	30	227	95,00	357,40	3,19	1,21
		60	212	95,30	345,03	3,07	1,20
	LPSC 232	30	94	98,60	110,88	1,07	3,42
		60	211	96,20	278,00	3,09	1,22
	LPSC 436	30	205	95,80	323,00	2,63	1,41
		60	229	95,50	321,00	3,53	1,12

Figuras

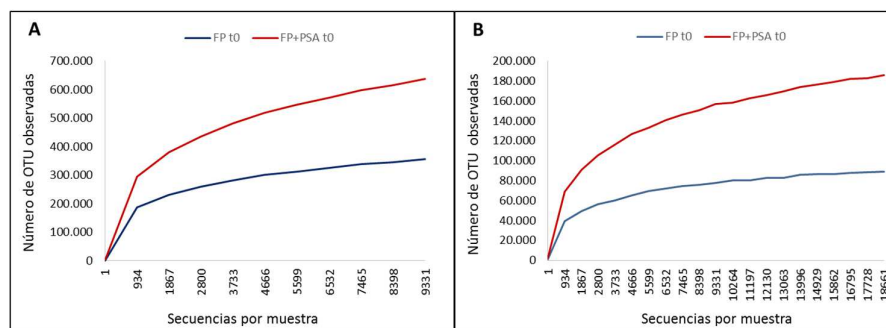


Figura A. 1. Curvas de rarefacción correspondiente a la secuenciación del gen 16S rARN (A) y 18S rARN (B) del barro FP oxidado (rojo) y sin oxidar (azul).

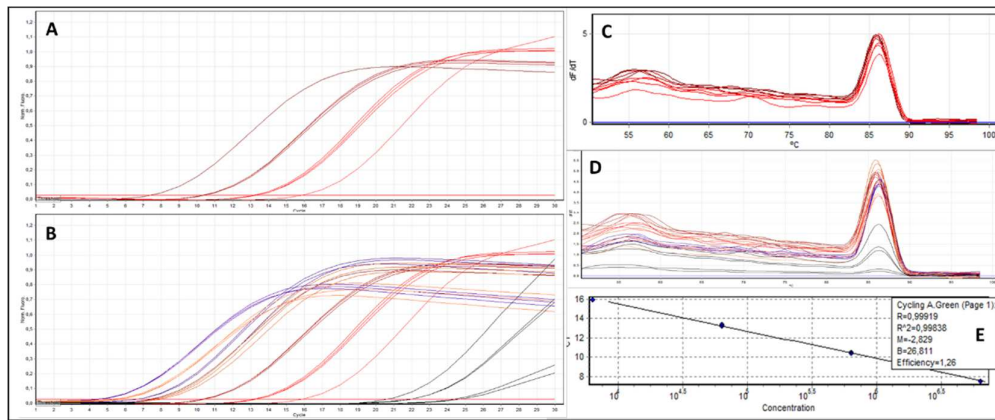


Figura A. 2. Cuantificación del gen ITS Gram por qPCR. Curvas de amplificación para las diluciones (-4 a -7) del plásmido (A) y muestras de cultivos puros de LPSC 232 (naranjas) y LPSC 436 (violetas)(B). Curvas de melting para los patrones (C) y las muestras (D). Curva estándar con una eficiencia de 1,26. Tamaño del amplicon 250pb.

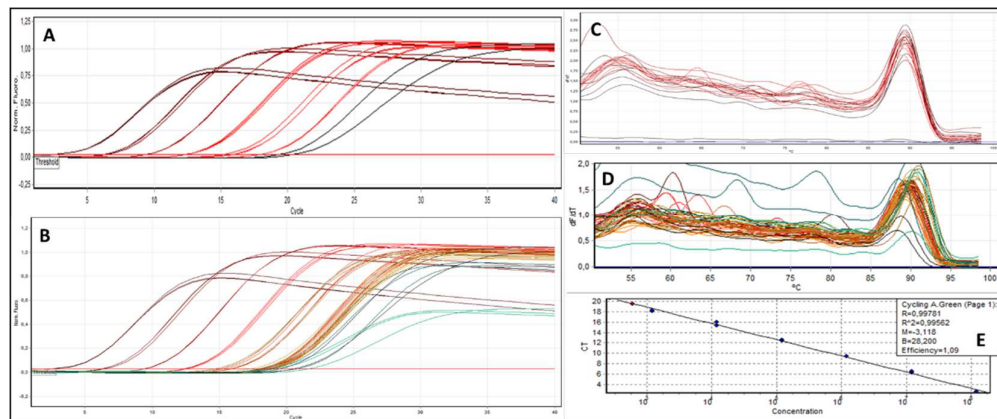


Figura A. 3. Cuantificación del gen lcc1 por qPCR para C. rigida LPSC 232. Curvas de amplificación para las diluciones (-3 a -8) del producto de PCR (A), muestras de cultivos puros de LPSC 232 y de microcosmos FP y FP+PSA inoculados con LPSC 232 en condiciones axénicas (naranjas). (B). Curvas de melting de los patrones (C) y las muestras (D). Curva estándar con una eficiencia de 1,09. Tamaño del amplicon de PCR 123pb.

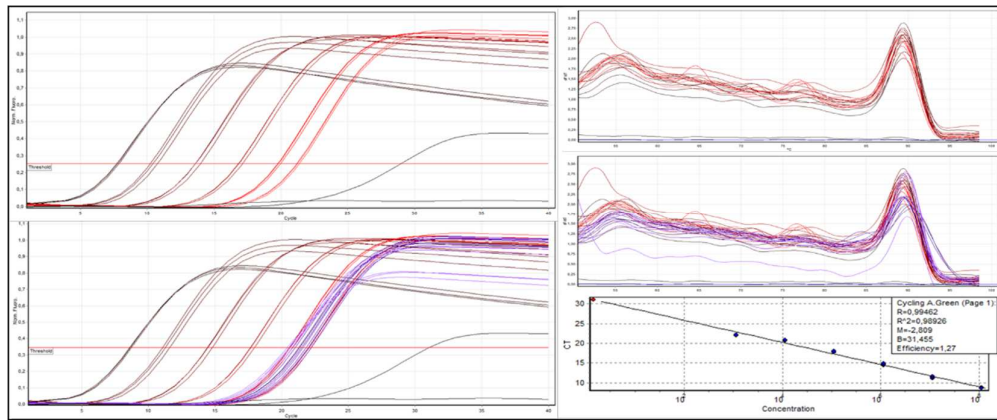


Figura A. 4. Cuantificación del gen *lcc1* por qPCR para *G. subargentea* LPSC 436. Curvas de amplificación para las diluciones (-3 a -8) del producto de PCR (A) y muestras de cultivos puros de LPSC 436 (violetas)(B). Curvas de melting para los patrones (C) y las muestras (D). Curva estándar con una eficiencia de 1,27. Tamaño del amplicon de PCR 236pb.

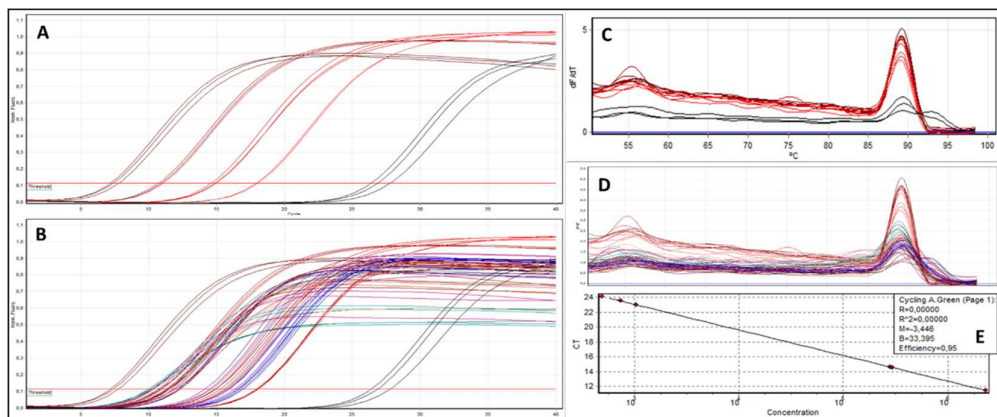


Figura A. 5 A. Cuantificación del gen 16S rARN por qPCR. Curvas de amplificación para las diluciones (-3 a -6) del plásmido 16S rARN (A) y de muestras de los microcosmos FPNE y FP+PSANE a los 60 días (B). Curvas de melting de los patrones (C) y las muestras (D). Curva estándar con una eficiencia de 0,95.

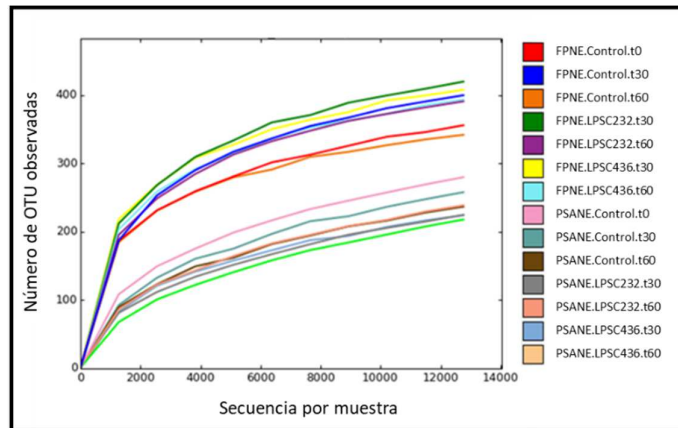


Figura A. 6. Curvas de rarefacción normalizadas correspondientes a las secuencias del gen 16S rARN de los tratamientos en condiciones no estériles. En el eje X se representa el número total de secuencias obtenidas para cada microcosmos, mientras que en el eje Y el número de secuencias observadas (OTUs) en cada uno de ellos.

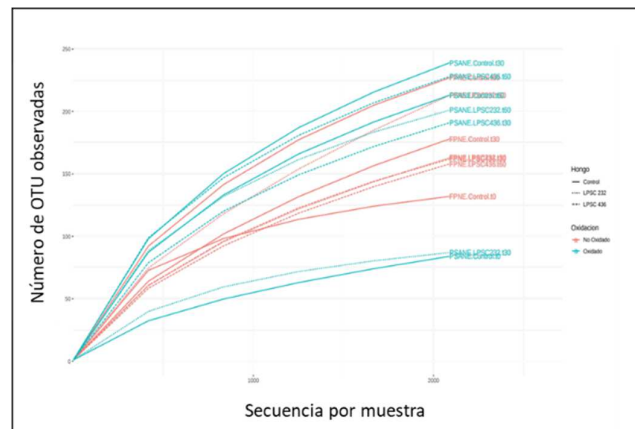


Figura A. 7. Curvas de rarefacción normalizadas correspondientes a las secuencias 18S rARN de los tratamientos en condiciones no estériles. En el eje X se representa el número total de secuencias obtenidas para cada microcosmos, mientras que en el eje Y el número de secuencias observadas (OTUs) en cada uno de ellos.

