



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Degradación de restos vegetales y nonilfenol etoxilado por hongos  
lignocelulolíticos de hojarasca**

Tesis presentada para optar al título de Doctor en la Universidad de Buenos Aires en el área de  
Ciencias Biológicas

**Lic. Julieta Mallerman**

Licenciada en Ciencias Biológicas, FCEyN-UBA

Directores de tesis: Dra. Laura N. Levin

Dr. Mario C. N. Saparrat

Consejera de estudios: Dra. Laura N. Levin

Lugar de trabajo: Lab. de Micología Experimental, INMIBO-CONICET y FCEyN-UBA

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 28 de marzo de 2017.

# Degradación de restos vegetales y nonilfenol etoxilado por hongos lignocelulolíticos de hojarasca

## RESUMEN

Los hongos descomponedores de hojarasca (LDF) son un grupo ecofisiológico de hongos, mayormente basidiomicetes, que crecen sobre material vegetal muerto colonizando las capas superiores del suelo presentes en bosques y pastizales. Son numerosos los estudios existentes que apuntan a la búsqueda de enzimas lignocelulolíticas de interés industrial provenientes de hongos causantes de pudrición blanca. Contrariamente, los LDF son un grupo poco explorado con similar poder enzimático y, su habilidad para colonizar el suelo, sobrevivir durante largo tiempo y competir con otros microorganismos, les confiere ventajas para su utilización en procesos de biorremediación de suelos.

Con el fin de coleccionar especímenes de hongos basidiomicetes LDF, se realizó un relevamiento en distintos sitios localizados dentro de la ecoregión del Delta del Río Paraná y Ribera Platense, con un total de 19 cepas aisladas e identificadas exitosamente. Las mismas, fueron evaluadas en función de su habilidad para producir sistemas enzimáticos extracelulares lignocelulolíticos. Además, se investigó la capacidad de *Marasmiellus candidus* (BAFC 4532), *Leratiomyces ceres* (BAFC 4533) y *Marasmius haematocephalus* (BAFC 4531) para descomponer *in vitro* la hojarasca de la especie nativa *Celtis tala* y la hojarasca de la especie exótica *Ligustrum lucidum*, dos representantes vegetales abundantes en la región de estudio. Sólo para *L. ceres* se registraron diferencias significativas entre los dos tipos de hojarasca, con una mayor pérdida de peso con la hojarasca exótica, lo que estuvo asociado principalmente a la producción de la enzima ligninolítica Manganese peroxidasa y a la degradación preferencial de compuestos carbonados alquílicos y lignificados. Por otro lado, *Hypholoma fasciculare* (BAFC 4546) fue seleccionada en función de su mayor velocidad de crecimiento en un medio agarizado conteniendo 1 g/L del detergente NP10EO, la clase más común de nonilfenol etoxilado (NP<sub>n</sub>EO). En dicho medio, *H. fasciculare* removió hasta un 75% aprox. del detergente sin la formación de productos de degradación como el nonilfenol, más tóxicos y recalcitrantes. Por último, se evaluó el efecto del NP10EO en la descomposición de hojarasca de *C. tala* y *L. lucidum*.

Esta tesis aporta una contribución al conocimiento de la biodiversidad de hongos LDF pertenecientes a la ecoregión del Delta del Río Paraná y Ribera Platense y su potencial aplicación en procesos tecnológicos de bioconversión de biomasa vegetal y degradación de uno de los surfactantes no iónicos más ampliamente utilizados en el comercio y la industria, el nonilfenol etoxilado.

*Palabras claves: Basidiomicetes; Descomposición de hojarasca; Enzimas lignocelulolíticas; Biorremediación; Surfactante.*

# Degradation of plant debris and nonylphenol ethoxylate by lignocellulolytic litter fungi

## ABSTRACT

Litter decomposing fungi (LDF) are an ecophysiological group of fungi, mostly basidiomycetes, growing on dead plant material and colonizing the upper layers of soil and humus in forests and grasslands. The search of novel enzymes for industrial applications produced by white-rot fungi has been the subject of numerous investigations. Conversely, LDF are an unexplored group of fungi, with similar enzyme potential but with the ability to colonize the soil, survive there over long periods, and compete with other microorganisms, features that can make them more suitable for soil bioremediation applications.

A total of 19 basidiomycetes LDF strains were successfully isolated and identified from different sites located within the Delta of Río Paraná and Ribera Platense ecoregion. Their ability to produce extracellular lignocellulolytic enzyme systems was evaluated. In addition, the capacity of *Marasmiellus candidus* (BAFC 4532), *Leratiomyces ceres* (BAFC 4533) and *Marasmius haematocephalus* (BAFC 4531) to degrade *in vitro* leaf litter of two abundant and representative vegetable species in the studied region was investigated: the native *Celtis tala* and the exotic *Ligustrum lucidum*. Significant differences between the two litter types were found only for *L. ceres*, with a greater mass loss with the exotic leaf litter, which was associated mainly with ligninolytic Manganese peroxidase enzyme production and preferential degradation of alkyl and lignified carbon compounds. On the other hand, *Hypholoma fasciculare* (BAFC 4546) was selected based on its faster growth rate in an agarized media supplemented with 1 g/L of NP10EO, the most common type of nonylphenol ethoxylate surfactant (NP $n$ EO). In this medium, *H. fasciculare* removed approx.75% of the detergent without the formation of more toxic or more recalcitrant by-products like nonylphenol. At last, the effect of NP10EO in *L. lucidum* and *C. tala* litter decomposition was evaluated.

This thesis provides a contribution to increase the knowledge on the biodiversity of LDF belonging to Delta del Río Paraná and Ribera Platense ecoregion and their application in technological processes

such as plant biomass conversion and the degradation of one of the non-ionic surfactants most widely commercially and industrially used: the nonylphenol ethoxylate.

*Keywords: Basidiomycetes; Litter decomposition; Lignocellulolytic enzymes; Biorremediation; Surfactant.*

# AGRADECIMIENTOS

Antes que nada quiero agradecer a mis directores, la Dra. Laura Levin y el Dr. Mario Saparrat, por aceptar dirigirme luego de la pérdida invaluable de mi por entonces director, el Dr. Leandro Papinutti. Por guiarme a lo largo de este camino, por su generosidad y aliento constante. A Lean, por iniciarme en el fantástico mundo de los hongos y contagiarme con su pasión, por enseñarme a formar un pensamiento crítico y confiar en mí cuando me encontré en momentos académicos difíciles.

A todos los integrantes del INMIBO, por la buena onda y el compañerismo. En particular a mis antiguos compas del labo 7: Sandy, Sol, Juan y Maxi; A Franco por ayudarme siempre desde su cargo de técnico. A todo el equipo del labo 8: Laura, Luis, Marce, Isita, Euge, Flavia, Nora, Vale, Raúl, Ema, Leo, Flor B., Maira, Pili, Pol, Oli, Flor O. y Ani, porque hacen de la cotidianidad de ir a trabajar un momento que disfruto mucho. Al Dr. Raúl Itria por permitirme continuar con su línea de investigación, por su valioso aporte de conocimientos y por hacer de puente para que puedan salir colaboraciones que son fundamentales para mejorar la calidad del trabajo.

De la CNEA, a la Dra. Paola Babay, gracias a quien pude realizar los ensayos de HPLC y además la suerte de encontrar una persona maravillosa. A Marisa Martínez, del INTI, por tener siempre la mejor predisposición y ofrecerme todo lo que necesitara. Al Dr. Enrique Alarcón Gutiérrez, por aceptarme pasar una estancia en la Universidad Veracruzana, Xalapa (México), junto a su equipo de trabajo.

A mi familia, porque a pesar del intento frustrado porque no se me ocurra estudiar una carrera científica como a ellos, me apoyaron en todo momento en esta elección, enseñándome a ser perseverante cuando uno quiere algo. A mis amigas eternas Fiore, Gaby y Vicky. A Juan, por su poesía, música y amor. A los chicos de la facu, el Funky, por los momentos compartidos. A Nahue, por su cariño y paciencia, y por ayudarme a que mis días de tesis sean menos rutinarios. A Río, Puré y Huayra, porque los animales son lo más grande que hay.

Creyendo y defendiendo día a día en la Universidad pública, gratuita y de calidad, quiero agradecer también a la UBA, por formarme en mi carrera profesional y al CONICET, por financiar mi plan de investigación.

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO 1: Introducción general**

1.1. La hojarasca y el proceso de descomposición .....	13
1.2. Estructura de la pared celular vegetal y principales constituyentes de la hojarasca foliar .....	18
1.2.1. Celulosa.....	20
1.2.2. Hemicelulosa.....	22
1.2.3. Lignina.....	23
1.3. Hongos saprótrofos descomponedores de sustratos lignocelulósicos.....	27
1.3.1. Hongos de pudrición de madera (WRF).....	27
1.3.2. Hongos descomponedores de hojarasca (LDF).....	31
1.4. Degradación de los principales constituyentes de la hojarasca .....	33
1.4.1. Descomposición de celulosa.....	33
1.4.2. Descomposición de hemicelulosa .....	42
1.4.3. Descomposición de lignina.....	45
1.5. Las enzimas fúngicas aplicadas a la biorremediación .....	60
1.5.1. El nonilfenol etoxilado.....	62
1.6. Hipótesis.....	69
1.7. Objetivos .....	69
1.7.1. Objetivo general.....	69
1.7.2. Objetivos específicos.....	69

## **CAPÍTULO 2: “Relevamiento de hongos basidiomicetes degradadores de hojarasca del Delta del Río Paraná y Ribera Platense: Aislamiento, identificación y prospección de actividades enzimáticas”**

2.1. Introducción .....	71
2.2. Hipótesis y Objetivos .....	74
2.3. Materiales y Métodos .....	75
2.3.1. Área de estudio y planificación de muestreos .....	75
2.3.2. Aislamiento de cepas .....	75
2.3.3. Mantenimiento de las cepas .....	75

2.3.4. Identificación de las cepas .....	75
2.3.5. Inóculos .....	77
2.3.6. Temperatura óptima de crecimiento .....	78
2.3.7. Velocidad de crecimiento en MEA .....	78
2.3.8. Bioprospección de enzimas extracelulares .....	78
2.3.9. Análisis estadístico .....	79
2.4. Resultados .....	81
2.4.1. Relevamiento de LDF en áreas forestales de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense.....	81
2.4.2. Temperatura óptima de crecimiento.....	83
2.4.3. Ensayos cualitativos para la detección de enzimas extracelulares .....	83
2.5. Discusión .....	89

### **CAPÍTULO 3: “Descomposición *in vitro* de hojarasca de *Celtis tala* y *Ligustrum lucidum*”**

3.1. Introducción .....	94
3.2. Hipótesis y Objetivos .....	96
3.3. Materiales y Métodos .....	97
3.3.1. Crecimiento en placa con extractos de hojarasca .....	97
3.3.2. Cultivos fúngicos sobre hojarasca en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF) ...	97
3.3.3. Fracción soluble acuosa (WSF) y fracción sólida (SF) a partir de la hojarasca.....	98
3.3.4. Tasas de descomposición .....	98
3.3.5. Determinaciones analíticas .....	98
3.3.5.1. <i>pH</i> .....	98
3.3.5.2. <i>Azúcares reductores</i> .....	98
3.3.5.3. <i>Amonio</i> .....	99
3.3.5.4. <i>Proteínas</i> .....	99
3.3.5.5. <i>Polifenoles</i> .....	99
3.3.6. Actividades enzimáticas .....	99
3.3.6.1. <i>Endo-β-D-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4)</i> .....	100
3.3.6.2. <i>β-glucosidasa (EC 3.1.2.21)</i> .....	100
3.3.6.3. <i>Endo-β-D-1,4-xilanasasa (EC 3.2.1.8)</i> .....	100
3.3.6.4. <i>Lacasa (EC 1.10.3.2)</i> .....	101



3.3.6.5. <i>Manganeso Peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13)</i> .....	101
3.3.7. RMN C <sup>13</sup> CPMAS .....	101
3.3.8. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la $\beta$ -glucosidasa .....	102
3.3.9. Análisis estadístico .....	103
3.4. Resultados .....	105
3.4.1. Crecimiento en placa con extractos de hojarasca .....	105
3.4.2. Descomposición de hojarasca bajo SSF .....	105
3.4.3. Composición química de la WSF .....	107
3.4.4. Actividades enzimáticas extracelulares .....	108
3.4.5. Composición química de la SF .....	112
3.4.6. Análisis de Co-inercia (CoiA).....	115
3.5. Discusión .....	117

## **CAPÍTULO 4: “Degradación fúngica de nonilfenol polietoxilado”**

4.1. Introducción .....	124
4.2. Hipótesis y Objetivos .....	126
4.3. Materiales y Métodos .....	127
4.3.1. Crecimiento en GA-NP10EO .....	127
4.3.2. Ensayos de toxicidad .....	127
4.3.3. Cultivos fúngicos sobre hojarasca con NP10EO bajo SSF .....	127
4.3.4. Extracción de NP10EO .....	128
4.3.5. Biodegradación de NP10EO .....	130
4.3.5.1. <i>Cromatografía en capa delgada (CCD)</i> .....	130
4.3.5.2. <i>Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)</i> .....	131
4.3.6. Actividades enzimáticas en placa .....	132
4.3.6.1. <i>Lacasa</i> .....	132
4.3.6.2. <i>Manganeso Peroxidasa</i> .....	133
4.3.7. Análisis estadístico .....	133
4.4. Resultados .....	134
4.4.1. Crecimiento en GA-NP10EO .....	134
4.4.2. Ensayos de toxicidad .....	136
4.4.3. Biodegradación de NP10EO de los cultivos en placa .....	137

4.4.4. Actividades enzimáticas en placa .....	141
4.4.5. Crecimiento en placa con extractos de hojarasca .....	142
4.4.6. Cultivos fúngicos sobre hojarasca con NP10EO bajo SSF .....	143
4.4.7. Biodegradación de NP10EO de los cultivos bajo SSF .....	144
4.5. Discusión .....	146
<b>Conclusiones Generales .....</b>	<b>152</b>
<b>Perspectivas Futuras .....</b>	<b>155</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>156</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>159</b>

# **CAPÍTULO 1**

## **Introducción general**

Los hongos son un grupo muy diverso de organismos eucariotas de distribución cosmopolita. Constituyen un reino monofilético, el reino Fungi, con 10 phyla identificados hasta la fecha y un número total de especies comparable al de los animales y superior al de las plantas. Se han descrito cerca de 99.000 especies hasta la fecha (Blackwell, 2011; Kirk *et al.*, 2008) aunque estudios recientes basados en métodos de secuenciación de alto rendimiento estiman entre 3,5 y 5,1 millones el número total de especies existentes (O'Brien *et al.*, 2005).

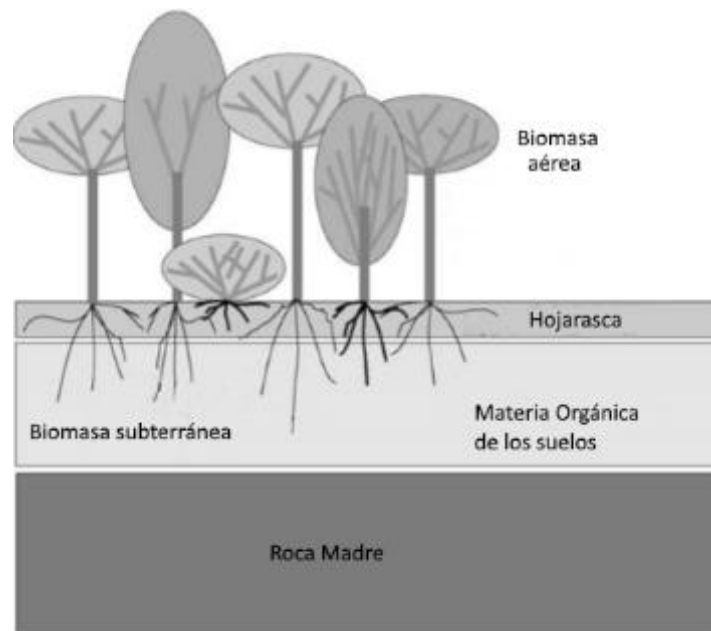
Estos organismos, que incluyen levaduras y hongos filamentosos, son altamente versátiles, y pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats, incluyendo ambientes terrestres y acuáticos, y muchos son capaces de sobrevivir en condiciones extremas (Carlile *et al.*, 2001).

Poseen una nutrición heterotrófica de naturaleza absorbitiva, es decir que se nutren de la materia orgánica presente en el medio ambiente y sólo son capaces de incorporar moléculas pequeñas a través de su degradación extracelular. Algunos son parásitos o simbioses y obtienen su alimento a partir de organismos vivos. Otros hongos son saprófitos, obteniendo sus nutrientes de materia orgánica muerta. Estos últimos son los principales responsables del reciclado de restos vegetales (Carlile *et al.*, 2001). A través de la digestión enzimática, los nutrientes presentes en la materia orgánica pueden ser mineralizados y el carbono que fue fijado por la actividad fotosintética de las plantas vuelve a la atmósfera como CO<sub>2</sub> junto a la liberación de energía en forma de calor. La degradación de estos restos vegetales también es importante para el ciclo de otros elementos, como por ejemplo nitrógeno, fósforo y potasio. Sin descomposición, y considerando que existe una producción primaria anual de materia orgánica cercana a los 4 kg por m<sup>2</sup> en los bosques tropicales, los ecosistemas más productivos (Berg y Laskowski, 2005), la superficie de la Tierra se encontraría cubierta de materia orgánica rápidamente. De esta cantidad, hasta un 25% se encuentra en forma de restos leñosos, que sólo pueden ser degradados por hongos especializados. Teniendo en cuenta esto, podemos afirmar que la actividad de estos organismos es esencial para la vida en la Tierra.

## **1.1. La hojarasca y el proceso de descomposición**

La hojarasca es un recurso heterogéneo que comprende una mezcla de sustratos de alta calidad, como son las hojas verdes, flores, frutos, semillas, microorganismos y animales muertos, y sustratos de menor calidad, principalmente materiales leñosos (Dance, 2008). Estos sustratos se reconocen como hojarasca dado que se encuentran recientemente muertos, y en la mayoría de los casos, han sido liberados al suelo donde comienza su transformación y descomposición. Hay ocasiones en que ciertas estructuras

que hacen parte de la hojarasca, quedan adheridas al sustrato luego de haber muerto y comienzan a descomponerse antes de llegar al suelo.



**Figura 1.** Principales grupos de materia orgánica en un bosque templado típico: biomasa vegetal (aérea y subterránea) y materia orgánica muerta (hojarasca y materia orgánica de los suelos). Adaptado de Berg y Laskowski (2005).

En los bosques, la hojarasca representa el principal aporte de nutrientes a la formación del humus y a las demás capas orgánicas del suelo (**Figura 1**). La cantidad y calidad de la hojarasca varían ampliamente entre los ecosistemas forestales y determinan la calidad de la materia orgánica del suelo (Regina *et al.*, 2005), así como la naturaleza de la microbiota asociada, incluyendo su tamaño, composición, función y propiedades fisiológicas. A su vez, la composición de la comunidad microbiana influye el curso de la descomposición y los cambios químicos de la hojarasca durante el proceso (Berg y McLaugherty, 2003).

Se entiende por descomposición, al proceso por el cual la materia orgánica es convertida a formas más estables y, junto con la fotosíntesis, explican la mayor parte de la transformación del carbono del planeta (Berg y McLaugherty, 2003). Involucra numerosos procesos, físicos, químicos y biológicos, en los que compuestos orgánicos complejos son llevados a formas más simples y nutrientes minerales. Bajo ciertas circunstancias, no todos los elementos químicos regresan a su forma inorgánica natural (como las sustancias húmicas o los combustibles fósiles: carbón, petróleo y metano), e incluso, la descomposición

puede significar procesos opuestos a la degradación, como la polimerización o condensación de compuestos fenólicos o productos de degradación de la lignina, lo cual, combinado al importe de algunos nutrientes, resulta en la acumulación de nuevas sustancias formadas (Berg y Laskowski, 2005; Berg y McLaugherty, 2003). La descomposición puede ocurrir gradualmente y a distintos niveles, y es posible gracias a toda una comunidad de organismos, principalmente bacterias y hongos pero también organismos vertebrados e invertebrados así como a reacciones que son puramente fisicoquímicas. A lo largo de esta tesis, se considera como “descomposición” o “pérdida de masa de hojarasca” a la suma del CO<sub>2</sub> liberado y la lixiviación de nutrientes y compuestos orgánicos degradados de forma incompleta y que se pierden como resultado del transporte por agua hacia afuera de la hojarasca remanente sin descomponer (Berg y McLaugherty, 2003).

Los microorganismos sintetizan múltiples enzimas extracelulares, libres o asociadas a pared celular, para degradar la materia orgánica que les servirá como fuente de carbono y energía. Estos sistemas enzimáticos descomponen los sustratos que se encuentran insolubles en la naturaleza, convirtiéndolos a productos solubles que posteriormente serán transportados al interior celular. Por lo tanto, el carbono asimilado a partir de la descomposición de hojarasca foliar puede ser mineralizado a CO<sub>2</sub> o ser convertido en biomasa microbiana. La hojarasca foliar consiste de distintos grupos de compuestos y las cantidades relativas de los mismos varían según la especie de planta de procedencia y el tipo de tejido (hojas, tallos, raíces, cortezas), así como también de las condiciones de su formación y deposición. De manera amplia, la hojarasca foliar está constituida principalmente por compuestos orgánicos solubles como azúcares, compuestos fenólicos de bajo peso molecular, hidratos de carbono y glicéridos, así como por los principales polímeros de pared celular de origen vegetal: celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina. Además, polisacáridos vegetales de reserva como el almidón, y otros biopolímeros como las proteínas son otros componentes menores disponibles en algunos tipos de hojarasca (Berg y McLaugherty, 2003).

Generalmente, la descomposición de la hojarasca foliar sigue un patrón secuencial con diferentes clases de compuestos orgánicos dominando el decaimiento a medida que procede en el tiempo. Los patrones y velocidades de descomposición ( $k$ ) suelen estimarse utilizando una medida de la pérdida de peso acumulada en el tiempo o peso de hojarasca remanente.

Se han definido tres modelos principales que describen la descomposición de hojarasca previa a la formación de humus:

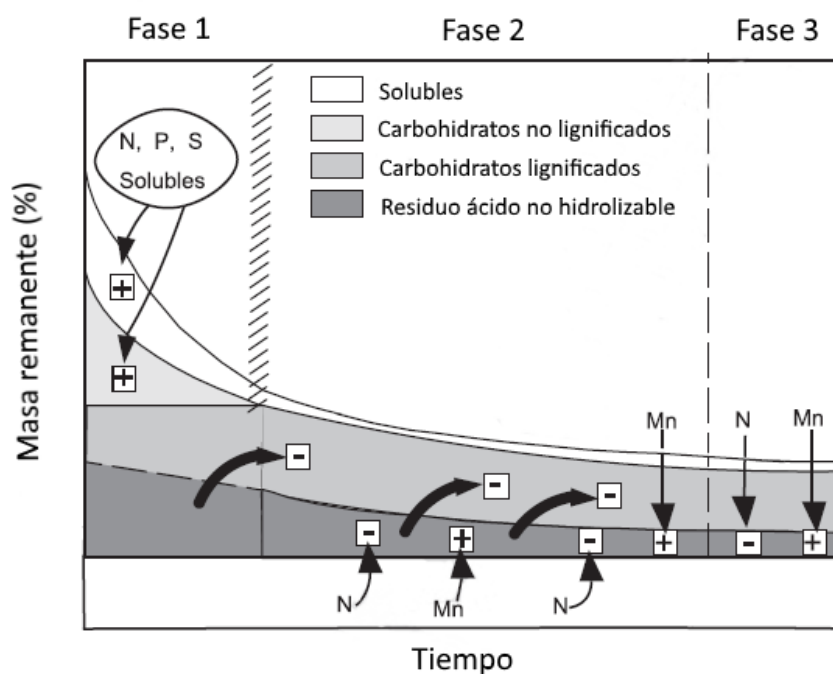
1. El modelo exponencial simple, propuesto por primera vez por Jenny *et al.* (1949) y elaborado por Olson (1963), es un modelo cinético de primer orden basado en el precepto que el proceso de

descomposición ocurre a una tasa que es constante en el tiempo, independientemente de la cantidad de material remanente. Por lo tanto, la descomposición es total y procede como si se tratase de un único tipo de material a ser degradado. La función es descrita según la siguiente ecuación:  $M_t = M_0 e^{-k t}$ , la cual suele utilizarse en la forma linealizada  $\ln (M_t/M_0) = -k t$ , en donde  $M_t$  es la masa a un tiempo  $t$  (normalmente en años) y  $k$  es la constante o tasa de decaimiento (expresada en años<sup>-1</sup>), la cual es negativa debido a que la masa remanente disminuye con el tiempo. Este modelo, suele ser una buena primera aproximación a la función de degradación de materia orgánica, especialmente en las etapas tempranas del proceso (Berg y McClaugherty, 2003).

2. El modelo doble exponencial (Bunnell *et al.*, 1977; Lousier y Parkinson, 1976) se puede considerar como una variación del exponencial simple y surge de la observación de la existencia de tasas  $k$  más bajas en compuestos de tipo recalcitrante (por ej. lignina, Fogel y Cromack, 1977). Se representa mediante la ecuación  $M_t = M_1 e^{-k_1 t} + M_2 e^{-k_2 t}$ . Si bien este modelo también asume una descomposición total del sustrato, existen dos componentes o fases para la descomposición de hojarasca. Una primer fase o fase inicial, representa la fracción del sustrato que se encuentra más accesible y es más fácilmente degradada (con una tasa  $k_1$ ) dada por la lixiviación de compuestos solubles y la descomposición de materiales lábiles (principalmente azúcares, compuestos fenólicos de bajo peso molecular, iones inorgánicos, almidones y proteínas), y una segunda fase que presenta una descomposición más lenta (con una tasa  $k_2 < k_1$ ), como resultado de la lenta descomposición de elementos recalcitrantes como celulosa, hemicelulosa, taninos y lignina.

3. El modelo de tres fases (**Figura 2**), es una modificación realizada por Berg y Matzner (1997) del modelo de dos fases, al agregar una tercer fase con una tasa de descomposición extremadamente lenta. En la fase temprana se produce la descomposición de compuestos solubles y de celulosa y hemicelulosa no asociada a estructuras lignificadas. Esta etapa está fuertemente influenciada por el clima y por nutrientes como el nitrógeno, fósforo y azufre. En una segunda fase o fase tardía, la influencia del clima disminuye hasta no ejercer ningún efecto sobre la descomposición. El nitrógeno y la lignina causan un efecto negativo sobre la descomposición a través de la represión de la síntesis *de novo* de enzimas ligninolíticas y/o mediante la interacción entre la lignina remanente y el nitrógeno vía enlaces químicos que constituyen una barrera para la degradación (Berg y McClaugherty, 2003). Contrariamente, la descomposición de hojarasca se incrementa con el contenido de Mn en suelo (Berg *et al.*, 2007). En la tercer y última fase, cercana a la formación de humus, la descomposición alcanza un valor límite. La función asume una disminución en las tasas de pérdida de masa a medida que procede la descomposición hasta eventualmente alcanzar un valor de cero. Esta asíntota representa un límite a la pérdida de masa

acumulada debido a la existencia de un residuo resultante que es recalcitrante o se encuentra estabilizado (Berg y Ekbohm, 1991; Howard y Howard, 1974; Wieder y Lang, 1982). Berg y Ekbohm (1991) definieron la función:  $L_t = m (1 - e^{-k_i t / m})$ , donde  $L_t$  es la pérdida de masa acumulada (en porcentaje),  $t$  es el tiempo y  $k_i$  es la tasa de descomposición al inicio del proceso de decaimiento. La tasa  $k$  es máxima para  $k_i$  y disminuye a medida que aumenta la pérdida de masa acumulada. Por último  $m$ , representa el nivel asintótico para la pérdida de masa, el cual normalmente está por debajo del 100%. Algunos estudios sobre descomposición de hojarasca realizados a campo por el método de “litter-bag” o bolsas de descomposición, han reportado una tasa constante para la descomposición, la cual fue seguida en el tiempo hasta alcanzar un 80% de pérdida de masa (por ej. Aber *et al.*, 1990). Por el contrario, muchas hojarascas se descompusieron más rápido inicialmente y presentaron tasas  $k$  más bajas en estadios más avanzados, a medida que la hojarasca “envejeció”. La disminución en las tasas de descomposición puede ser lenta o relativamente rápida, creando diferentes patrones como lo reflejan los valores límites (Berg, 2014). En algunos casos se encontraron valores límites muy bajos, cercanos al 40% (Faituri, 2002), mientras que en otros, los valores límites fueron de hasta el 100%, es decir que presentaron una descomposición completa de la hojarasca. Por lo tanto, existe una gran variación en los patrones de descomposición con valores límites que dependerán de las especies de hojarasca involucradas, su composición química y del ambiente (Berg *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Modelo de descomposición de tres fases. Fuente: Berg (2014)

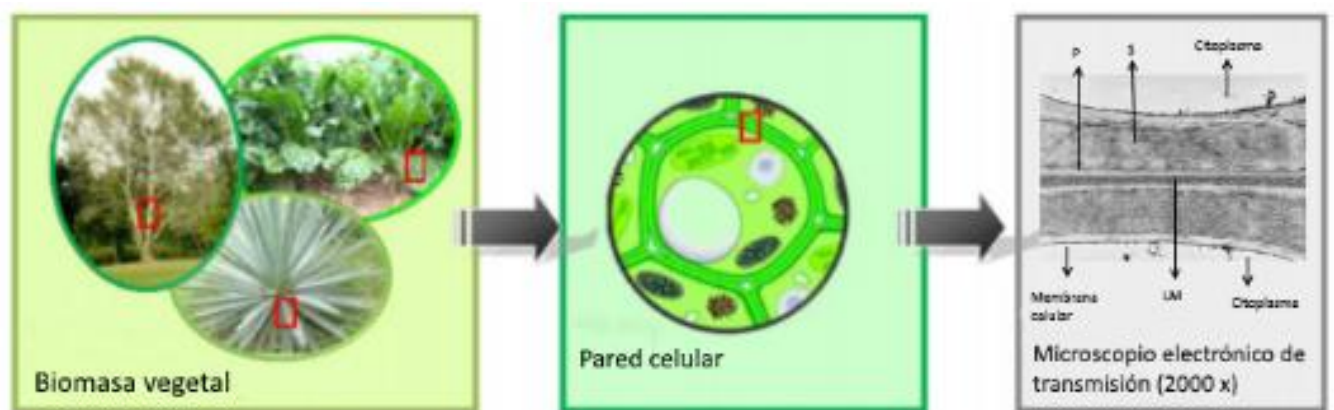


## 1.2. Estructura de la pared celular vegetal y principales constituyentes de la hojarasca

La pared celular vegetal representa aproximadamente el 50% del peso seco de la biomasa vegetal. Es la estructura más externa de las plantas y, su principal función es la de conferirle rigidez, esencial para resistir el estrés mecánico y mantener su forma. A pesar de ello, la pared celular vegetal es una entidad dinámica y metabólicamente activa que juega un rol crucial en el crecimiento, protección, diferenciación y comunicación célula-célula (Kubicek, 2012).

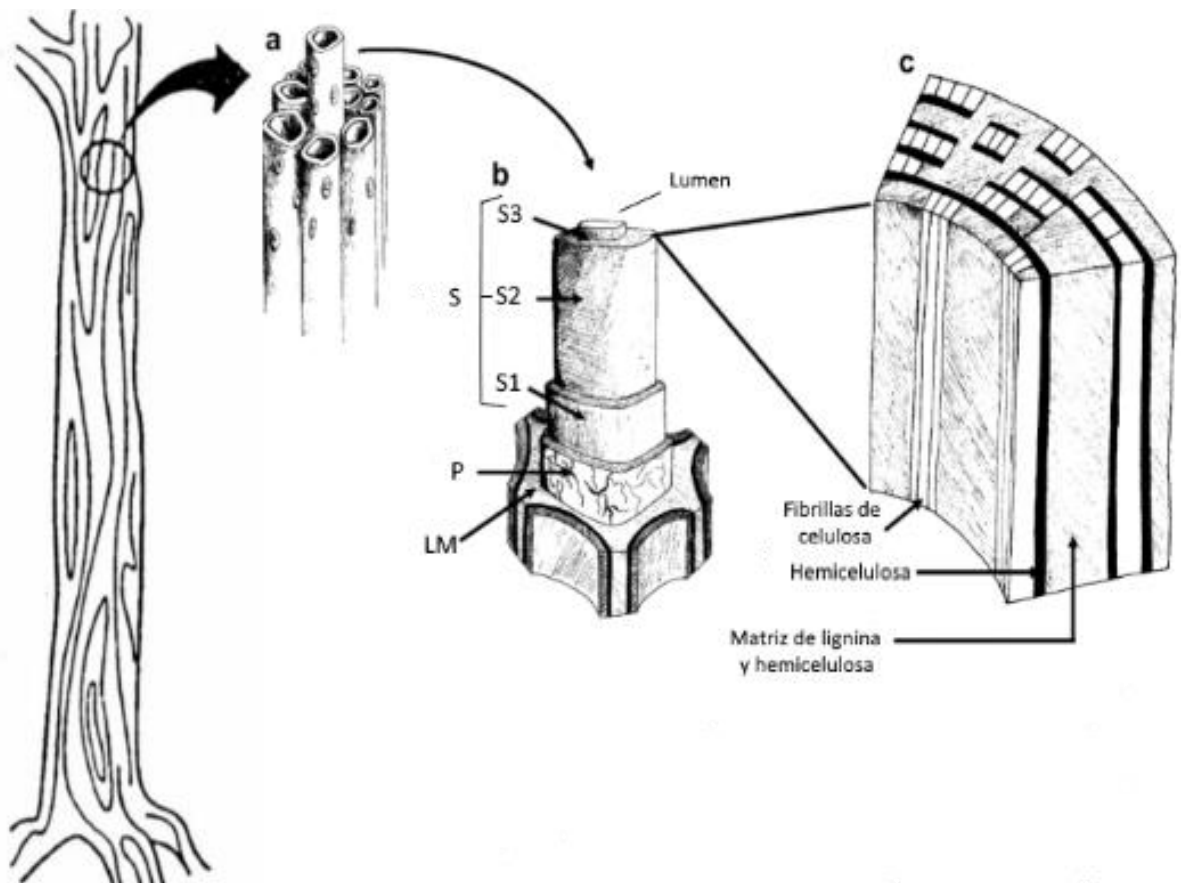
Consistente con la gran cantidad de funciones asociadas a la pared, su estructura es muy variada, no sólo entre las distintas especies de plantas sino también entre los distintos tipos de tejidos y durante la ontogenia de una misma célula vegetal, sin embargo en esta Tesis se presenta una estructura generalizada con el fin de dar un panorama del ambiente al que se enfrentan los organismos en el proceso de descomposición de la hojarasca.

La pared celular se origina *de novo* durante la división celular y se deposita como una serie de capas, separando físicamente a las dos células hijas, con la presencia de angostas conexiones intercelulares citosólicas o plasmodesmos, integradas en su estructura. Todas las células vegetales poseen una pared celular primaria (P), que consta de una delgada capa en continua expansión producida por células en crecimiento, y una laminilla media (LM), una capa más externa que mantiene unidas a células adyacentes. Ciertas células depositan a su vez una pared celular secundaria (S), que forma una capa gruesa entre la pared primaria y la membrana plasmática (**Figura 3**).



**Figura 3:** Pared celular vegetal. Adaptado de Lavoine *et al.* (2012)

La pared primaria está compuesta por celulosa, hemicelulosa y pectina (Rose *et al.*, 2004). La celulosa forma microfibrillas, las cuales se encuentran covalentemente unidas a las cadenas de hemicelulosa formando así una red de celulosa-hemicelulosa embebida en una matriz de pectina. La pared secundaria se forma sólo en algunos tipos celulares y algunos taxones, como en las fibras de la madera, cuando se alcanza un tamaño o desarrollo crítico y provee a las células de una gran rigidez. Se entiende como una adaptación crucial que permitió a las plantas terrestres soportar y facilitar el crecimiento vertical. Está compuesta por celulosa, hemicelulosa (principalmente xilano) y lignina. Este último compuesto es un polímero aromático complejo que llena los espacios entre la celulosa, hemicelulosa y componentes pectínicos de la pared celular. Debido a su carácter hidrofóbico, expulsa el agua y fortalece la pared. Se pueden diferenciar tres capas dentro de la pared secundaria, llamadas S1, S2 y S3, ésta última localizada hacia el lumen celular. Estas capas resultan de las diferentes orientaciones de las microfibrillas de celulosa (**Figura 4**).



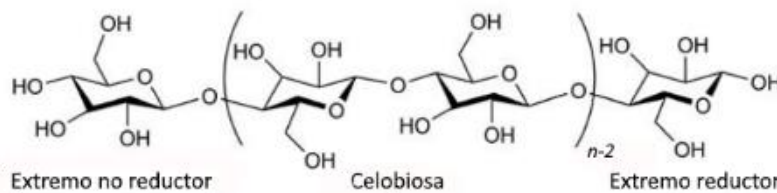
**Figura 4.** Configuración de los tejidos vegetales. **a.** Células adyacentes. **b.** Pared celular vegetal; P: Pared celular primaria; S: Pared celular secundaria (abarcando las capas S1, S2 y S3); LM: Laminilla media. **c.** Distribución de la lignina, hemicelulosa y celulosa en la pared secundaria. Adaptado de Pérez *et al.* (2002).

Otros componentes como las proteínas estructurales (1-5%) forman parte de las paredes celulares vegetales. Se encuentran altamente glicosiladas, y se cree que a partir de estos motivos es que se unirían a polisacáridos presentes en la pared celular, contribuyendo a la fuerza mecánica (Albenne *et al.*, 2009). Suelen clasificarse como glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), proteínas arabinogalactanos (AGPs) y proteínas ricas en glicina (GRPs) (Albenne *et al.*, 2009). Por ejemplo, las extensinas son HRGPs que estarían involucradas en la unión cruzada entre la lignina y la hemicelulosa.

La composición relativa de carbohidratos, compuestos secundarios y proteínas varía entre las diferentes especies de plantas, tipos celulares y según la edad (Popper, 2008). Las paredes secundarias pueden contener capas adicionales de lignina, como ocurre en las células xilemáticas, y sustancias incrustantes como la cutina y suberina, que tornan impermeables las paredes, especialmente a aquellas expuestas al aire.

### 1.2.1. Celulosa

La celulosa es el principal componente estructural de la pared celular de las plantas y por ende, el biopolímero más abundante de la Tierra. También es producido por algunos animales (por ej. tunicados), hongos, algas y raramente por bacterias. Se trata de un polisacárido lineal de estructura molecular relativamente sencilla ya que consta de residuos de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos, sin formar cadenas laterales (Figura 5).

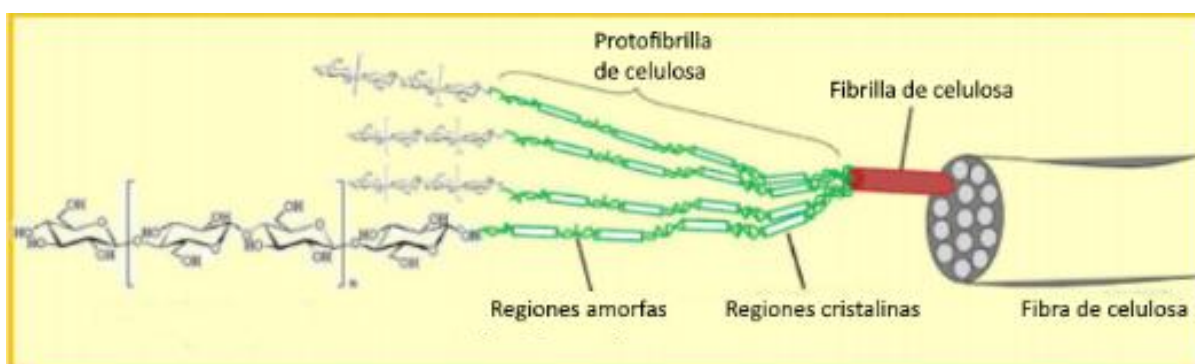


**Figura 5.** Estructura química de la celulosa. Adaptado de Kovalenko (2010).

El grado de polimerización de la celulosa nativa es altamente variable y dependiente del organismo, así como de su edad y estado metabólico (Chanzy, 1990), pudiendo contar con 1.000 y hasta 30.000 residuos de glucosa, lo que corresponde a una longitud de polímero entre 500 y 15.000 nm. A pesar de las diferencias en la composición y estructura anatómica de la pared celular de los distintos taxones de

plantas, típicamente la celulosa conforma entre el 35 al 50% del peso seco de las plantas (Lynd *et al.*, 1999).

El arreglo de las moléculas de celulosa en la pared celular de las plantas es jerárquico (**Figura 6**). A lo largo de la cadena de celulosa se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de la misma cadena o de distintas cadenas yuxtapuestas. En el lugar de biosíntesis de la celulosa, aproximadamente unas 30 moléculas lineales adyacentes se autoensamblan para formar una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar la fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd *et al.*, 2002). Dentro de las fibras de celulosa se distinguen zonas con propiedades cristalinas, donde las cadenas están unidas ordenadamente entre sí por formación de puentes de hidrógeno, y zonas de regiones amorfas o paracristalinas donde las cadenas se encuentran desorganizadas (Hon, 1994), por ello la celulosa se considera un polímero semicristalino.



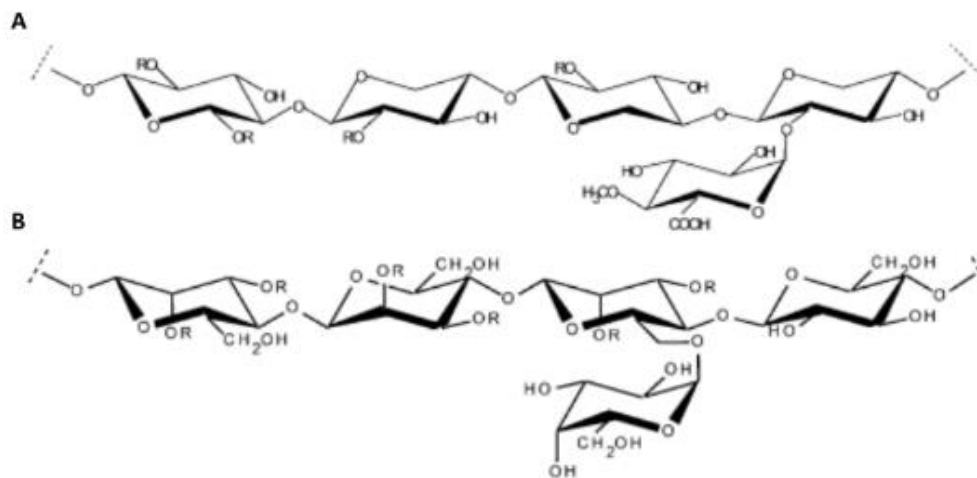
**Figura 6.** Estructura de la fibra de celulosa. Adaptado de Lavoine *et al.* (2012).

Existen 7 polimorfos en los que se presenta la celulosa ( $I_{\alpha}$ ,  $I_{\beta}$ , II, III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>, IV<sub>I</sub>, y IV<sub>II</sub>), los cuales pueden ser interconvertidos. De ellos, sólo la celulosa I ocurre naturalmente, por lo que se la llama también celulosa nativa y presenta una forma cristalina. Las dos formas de celulosa I difieren en sus patrones de unión intramolecular y la proporción varía según la fuente de la cual provienen. La celulosa  $I_{\alpha}$  predomina en bacterias y algas y la  $I_{\beta}$ , forma más estable y mayoritaria, es la forma predominante en plantas superiores (Yamamoto *et al.*, 1996). El resto de los polimorfos surgen de tratamientos artificiales y de ellas, la celulosa II presenta también una forma cristalina pero en este caso, las cadenas de glucosa son antiparalelas (Brown, 2004).

En contados casos, como en las fibras de algodón, la celulosa se encuentra en una forma prácticamente pura. En general, las fibras de celulosa están embebidas en una matriz junto a otros biopolímeros estructurales, principalmente hemicelulosa y lignina (Lynd *et al.*, 1999). Esta conformación limita el grado y la tasa de utilización de los materiales lignocelulósicos sin tratar (Wilson y Hatfield, 1997).

### 1.2.2. Hemicelulosa

Las hemicelulosas son heteropolímeros complejos formados por monómeros de diversas hexosas (D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, ácidos 4-O-metil-glucurónico, D-glucurónico y D-galacturónico) y pentosas (D-xilosa, L-arabinosa), unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y, ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3. Suelen estar ramificados y se clasifican según los azúcares residuales mayoritarios en: xiloglucano, manano y xilano (Van Den Brink y De Vries, 2011). Comprenden del 20 al 35% del peso seco de la madera con un peso molecular que es menor al de la celulosa. La similitud estructural que tienen con la celulosa resulta en una homología conformacional que puede llevar a una fuerte asociación no covalente, contribuyendo así a la integridad estructural de la pared celular.



**Figura 7.** Estructura química de las hemicelulosas. **A:** O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano de angiospermas. Siendo R un H o grupo acetilo. Las gimnospermas tienen la misma estructura básica pero carecen de grupos acetilo y residuos  $\alpha$ -1,3-L-arabinosa. **B:** O-acetilgalactoglucomanano de gimnospermas. Las angiospermas contienen menor cantidad de glucomanos, los cuales nunca presentan una D-galactosa. Fuente: Pérez *et al.* (2002).

En dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramináceas, la hemicelulosa predominante en la pared celular es el xiloglucano, cuyo eje estructural está compuesto, al igual que el de la celulosa, por residuos

de  $\beta$ -D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, pero en este caso hasta el 75% de dichos residuos está anexado a cadenas laterales mono-, di- o triglicósidas. Se conocen dos tipos de xiloglucanos: tipo XXXG y tipo XXGG. El primer tipo consiste en unidades repetidas de tres residuos de D-glucosa sustituidos con D-xilosa a través de un enlace  $\alpha$ -1,6, las cuales están separadas entre sí por un residuo de glucosa sin sustituyentes. En el segundo tipo de xiloglucanos, la estructura es de dos residuos de glucosa sustituidos con xilosa, separados por dos residuos de glucosa sin sustituir. En ambos casos, a los residuos de xilosa pueden adherirse residuos de D-galactosa, a veces L-fucosa y grupos O-acetilos.

En cereales y plantas leñosas la hemicelulosa predominante es el xilano. Éste tiene una cadena principal compuesta por D-xilas unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 a la cual pueden estar unidas cadenas laterales de diferentes estructuras resultando en una gran variedad de estructuras de xilano. El xilano presente en cereales a menudo contiene grandes cantidades de L-arabinosa (denominado arabinoxilano) en cambio, en las maderas duras, el xilano contiene mayor cantidad de ácido D-glucurónico (glucuronoxilano, **Figura 7A**; Scheller y Ulvskov, 2010).

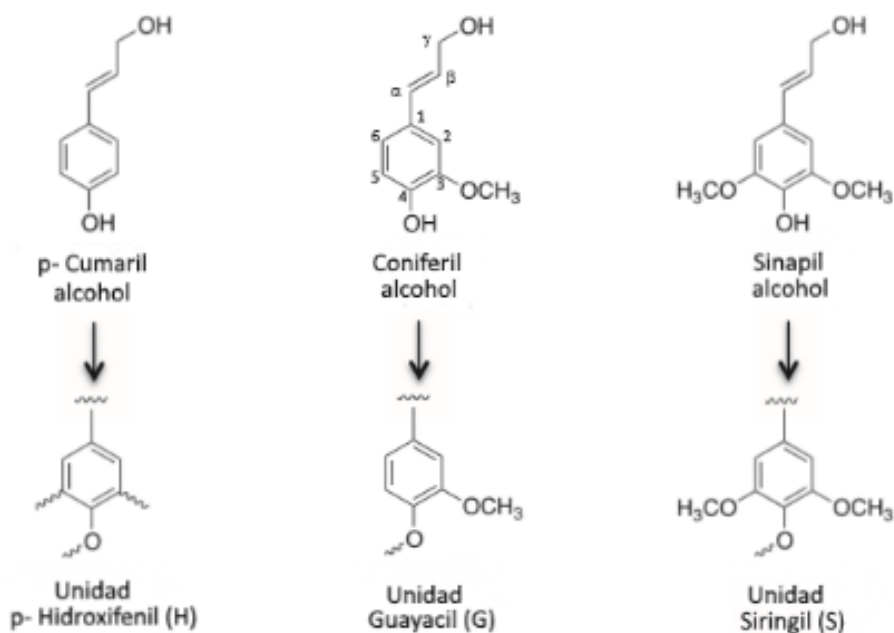
En gimnospermas, los galactomananos y galactoglucomananos son las hemicelulosas mayoritarias y consisten en un esqueleto de residuos de D-manosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4, que pueden estar ligados con D-galactosas en posición  $\alpha$ -1,6, en una relación entre 1:1 y 5:1 según su origen (**Figura 7B**).

### 1.2.3. Lignina

La lignina es el segundo polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Suele representar entre el 15 y 40% del peso de la hojarasca pero, en algunos casos extremos, puede estar en muy baja proporción (por ej. 4% en la hojarasca foliar de *Cornus florida*) o muy elevada (valores cercanos al 50% han sido reportados en hojas de *Fagus sylvatica*; Berg y Laskowski, 2006).

Se trata de un heteropolímero ramificado, insoluble en agua y ópticamente inactivo. Se caracteriza por tener una estructura compleja derivada de la unión oxidativa de tres hidroxicinamil-alcoholes: el coniferil-alcohol, y sus derivados metoxi-sustituidos, el sinapil-alcohol y *p*-cumaril-alcohol. Estos precursores originan en la molécula de lignina, los monómeros fenilpropanoides de unidades guayacil- (G), siringil- (S) y *p*-hidroxifenil- (H), respectivamente (**Figura 8**). La conversión de fenilalanina y tirosina a ácido cumárico por la amonio liasa en la vía metabólica shikímica es el punto de partida de la vía fenilpropanoide que lleva a la formación de monolignoles (monómeros de lignina y precursores monoméricos).

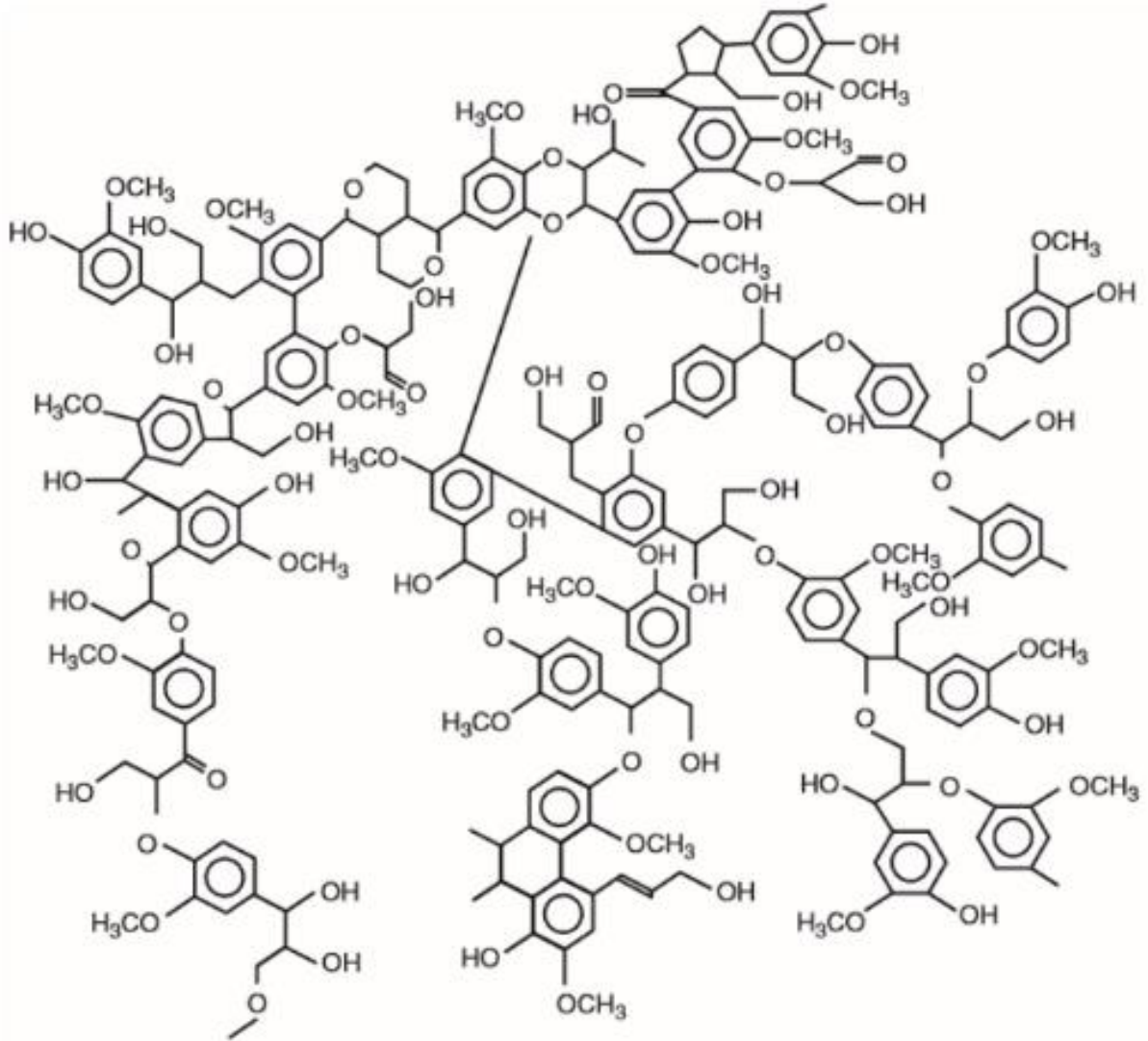
La proporción de las unidades G/S/H y, consecuentemente la composición de la lignina, varía entre diferentes especies de plantas. Las gimnospermas contienen el mayor contenido de lignina, cuya composición mayoritaria son las unidades G, con muy bajos niveles de S y trazas de H (G/S/H = 96: 4:  $\lambda$ ). En contraste, la lignina de la madera de angiospermas consiste de unidades G y S en similares cantidades y trazas de H (G/S/H = 50: 50:  $\lambda$ ), y la lignina de monocotiledóneas (por ej. pastos) contiene las tres unidades en una proporción aproximada G/S/H = 70: 25: 5 (Calvo-Flores y Dobado, 2010; Davin y Lewis, 2005). A su vez, la composición de la lignina entre los diferentes componentes celulares de la madera y capas de la pared celular también varía. Por ejemplo, la lignina de la laminilla media tiene típicamente una mayor relación G/S que la lignina de la pared secundaria (Faix, 1991; Kleinert y Barth, 2008; Wong, 2009).



**Figura 8.** Precursores primarios de la lignina y sus correspondientes monómeros estructurales en el polímero. Adaptado de Abdel-Hamid *et al.* (2013).

La síntesis de lignina comienza por reacciones de polimerización que involucran el acoplamiento progresivo de radicales fenoxi presentes en los monómeros de la lignina, con la consecuente formación de dímeros, trímeros y oligómeros, hasta dar lugar a polímeros heterogéneos ramificados, que pueden a su vez reaccionar con otros polímeros, resultando en una estructura muy compleja, amorfa y variable (**Figura 9**; Pandey y Kim, 2011; Reale *et al.*, 2004). Las uniones entre monómeros son catalizadas por

enzimas lacasas y peroxidasas (Barros *et al.*, 2015; Vanholme *et al.*, 2008) que, al generar radicales libres, provocan su activación dando lugar a una polimerización azarosa.

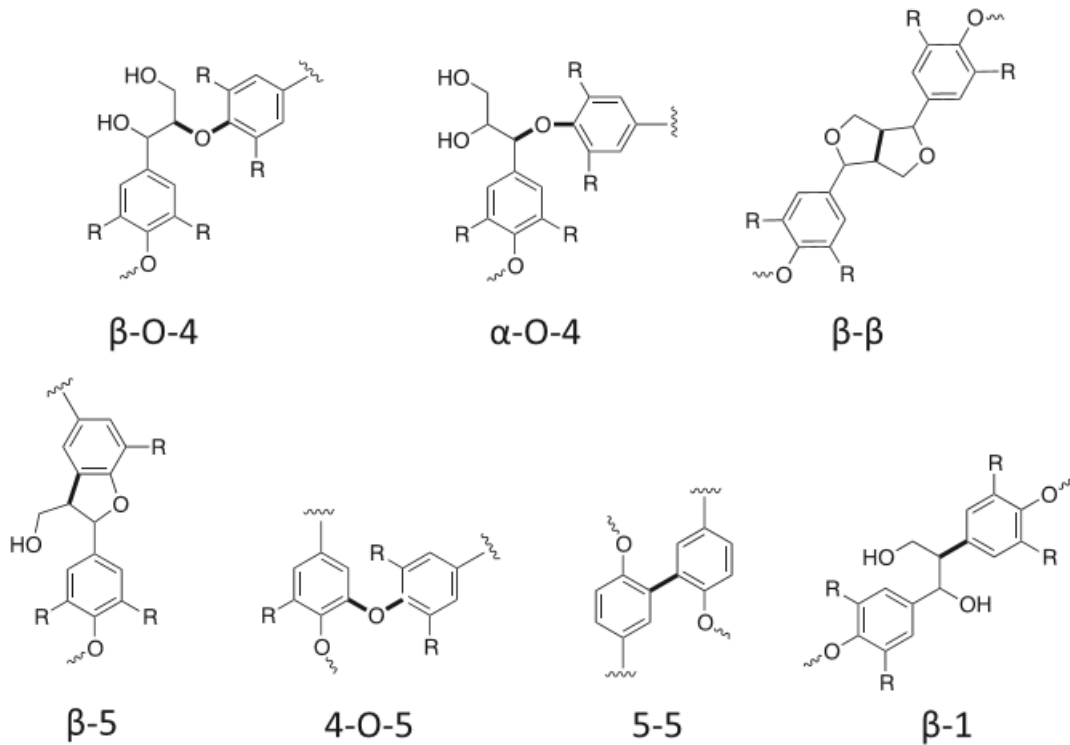


**Figura 9.** Estructura modelo propuesta para la lignina de gimnospermas. Fuente: Paul (2007).

Los enlaces presentes en la lignina se pueden dividir en dos grandes grupos: uniones éter C–O y uniones C–C (**Figura 10**). Las reacciones de acoplamiento de un monómero al polímero en crecimiento dan origen a estructuras con uniones  $\beta$ , incluyendo al más común de este tipo, el arilglicerol- $\beta$ -aril éter ( $\beta$ -O-4), el cual representa cerca del 50% de las unidades fenilpropanoides en la lignina de gimnospermas y el 80% de la de angiospermas (Adler, 1977). La dimerización para originar una estructura  $\beta$ - $\beta$  es un evento poco usual en la naturaleza, aunque ocurre frecuentemente en la síntesis de lignina sintética



(Wong, 2009). Las uniones  $\beta$ -5 y  $\beta$ -1 conforman el 10% y el 2% respectivamente de uniones en la lignina de gimnospermas (Brunow, 2001). Por otro lado, el acoplamiento de dos oligómeros/polímeros de lignina origina uniones del tipo 5-5 y 5-O-4, las cuales cuentan el 25% y 4% respectivamente en la lignina de gimnospermas (Brunow, 2001). Por último, la formación de grupos terminales se produce en reacciones de acoplamiento en zonas de la cadena que no están en posición  $\beta$  (Kubicek, 2012).



**Figura 10.** Uniones típicas encontradas en la molécula de lignina. Fuente: Abdel-Hamid *et al.* (2013).

Algunas ligninas tienen alta frecuencia de unidades acetiladas (por ejemplo 4-propoxi-sinapyl- $\gamma$ -acetato) y, los ácidos hidroxicinamínicos de la lignina de los pastos pueden estar esterificados en la posición  $\gamma$  de las cadenas propílicas. La abundancia relativa de los diferentes tipos de uniones depende de la contribución relativa de los monómeros al proceso de polimerización durante la biosíntesis de lignina (Kubicek, 2012). La lignina interactúa con las fibras de celulosa aumentando la rigidez de la pared celular. Además, forma tres tipos de uniones covalentes con la hemicelulosa: por formación de puentes de ácido diferúlico con arabinosilanos, polímeros de pectina y xilano; por uniones éster con residuos de ácido glucurónico y participando de la unión, proteína y pH dependiente, de la pectina y glucuronarabinosilano al xiloglucano (De Vries y Visser, 2001). La naturaleza densa de la lignina, su

hidrofobicidad y su compleja estructura de carácter no específico hacen que este polímero sea extremadamente recalcitrante a la degradación (Himmel *et al.*, 2007; Wong, 2009).

### **1.3. Hongos saprótrofos descomponedores de sustratos lignocelulósicos**

Los hongos saprótrofos pueden clasificarse en cinco grupos según su ecofisiología: los hongos de pudrición blanca, hongos de pudrición castaña, hongos de pudrición blanda (subdivididos en tipo I y tipo II), los hongos descomponedores de hojarasca y los hongos coprófilos. Los primeros tres grupos colonizan la madera muerta compacta (árboles, troncos, tocones) mientras que los últimos dos colonizan las capas superficiales de los suelos (Blanchette, 1995; Dix y Webster, 1995; Hatakka y Hammel, 2010; Sutherland y Crawford, 1981). Debido a que la mayor parte de los trabajos que tratan sobre enzimología de hongos basidiomicetes saprótrofos se han realizado en especies de hongos de pudrición de la madera, una introducción sobre los mismos se expone más abajo. Cabe aclarar, que muchas especies de hongos no se encuentran estrictamente en un tipo de grupo y pueden facultativamente colonizar otros hábitats, como es el caso de *Hypholoma fasciculare* y *Mycena crocata*, especies ligninolíticas con superposición en los grupos descomponedores de madera y de hojarasca (Šnajdr *et al.*, 2010). A su vez, ciertas especies pueden causar una pudrición “inespecífica”, que no puede ser asignada inequívocamente a un tipo de pudrición, como ocurre con algunos hongos coprófilos creciendo sobre madera muerta parcialmente descompuesta (Dix y Webster, 1995). Se cree que todos los hongos tienen la habilidad de degradar sustratos lignocelulósicos, al menos hasta cierto punto. Sin embargo, utilizan diferentes mecanismos que se distinguen por la forma en que hacen accesible a la celulosa y hemicelulosa para su degradación, por las enzimas involucradas, y por el comportamiento y forma de ataque del sustrato (Kubicek, 2012).

#### **1.3.1. Hongos causantes de pudrición de madera**

Cuando el ataque se produce sobre la madera, estos diferentes mecanismos se clasifican como pudrición blanca, pudrición castaña y pudrición blanda, según el aspecto que adquiere la madera resultante (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características estructurales y químicas de los diferentes tipos de pudrición de la madera. Basado en Baldrian, 2008.

	Pudrición Blanca		Pudrición Castaña	Pudrición Blanda
	Degradación Simultánea	Degradación Selectiva		
<b>Propiedades de la madera atacada</b>	Apariencia de blanqueado, coloración más clara que la madera sana, húmeda, suave, esponjosa. Pérdida de fuerza en estadios avanzados		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
	Fractura por fragilidad	Aspecto fibroso		
<b>Hospedador (Tipo de madera)</b>	Angiospermas, raramente gimnospermas	Angiospermas y gimnospermas	Gimnospermas, casi nunca angiospermas	Generalmente angiospermas (gimnospermas muy levemente degradadas), ecosistemas boscosos, maderas anegadas
<b>Componentes de pared celular degradados</b>	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
<b>Características anatómicas</b>	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)
<b>Agentes causales</b>	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 subvermispota</i> , <i>Pleurotus</i> spp., <i>Phellinus pini</i> )	Basidiomicetes exclusivamente (ej. <i>Gloeophyllum</i> spp., <i>Laetiporus 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> ).

Los hongos que causan pudrición blanca 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 (**Figura 11A**). Atacan tanto maderas blandas como duras y este tipo de pudrición es característico de los basidiomicetes, aunque también algunos ascomicetes miembros de las familias Diatrypaceae y Xylariaceae fueron reportados como agentes causales de pudrición blanca (Eriksson *et al.*, 1990; Pointing *et al.*, 2003). La pudrición blanca, al igual que la blanda, puede encontrarse extendida en la madera o estar confinada a ciertas zonas de la misma (Eriksson *et al.*, 1990).

Se pueden distinguir dos patrones generales que se diferencian en el tipo de ataque y el orden de degradación de los diferentes compuestos: (i) delignificación simultánea y (ii) delignificación selectiva. Debido a que la mayoría de los hongos que degradan selectivamente lignina son capaces también de causar degradación simultánea, el sustrato o factores ambientales que regulan las actividades celulolítica y hemicelulolítica, serían los responsables en última instancia de la selectividad hacia la lignina observada, por ej. *Phlebia chrysocrea* causa una delignificación simultánea en *Laurelia philippiana* pero una selectiva en *Encryphia cordifolia* (Barrasa *et al.*, 1992). Incluso estos dos patrones pueden ser producidos por el mismo hongo, dependiendo del grado de decaimiento, en el mismo sustrato.

Los hongos causantes de pudrición castaña 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). Representan sólo el 7% de las especies de basidiomicetes que generan pudrición sobre madera (Gilbertson, 1980), de los cuales se sabe que los *Gloeophyllales* habrían surgido durante el periodo cretáceo, luego del origen de las coníferas *Pinaceae*, indicando una co-evolución planta-hongo (García-Sandoval *et al.*, 2011). En general se produce un primer ataque a la celulosa que debilita la madera, seguido por la degradación completa de la celulosa y la 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 (**Figura 11B**). Los hongos de pudrición castaña tienen un importante rol en los ecosistemas de coníferas ya que contribuyen significativamente a la formación de humus, que puede ser utilizado por otros microorganismos (Lundell *et al.*, 2010).

La habilidad para descomponer la madera y los tipos de pudrición ocasionada dependen no sólo de la gama de enzimas y especies reactivas producidas sino también de la localización en la que éstas actuarán (Baldrian, 2008a). La movilidad de las enzimas está limitada al lumen celular y a poros formados

durante el proceso de degradación. Se sugiere que compuestos de bajo peso molecular son los que inician el ataque a la celulosa y la lignina ya que pueden difundir desde las hifas y atravesar la trama de la pared celular (Hammel *et al.*, 2002; Reading *et al.*, 2003). Debido a la limitada difusibilidad de las enzimas y a que muchas de ellas están asociadas a la pared de las hifas, la mayoría de las reacciones de degradación ocurren próximas a las hifas. En los hongos de pudrición blanca, la acción enzimática provoca zonas de erosión en la cercanía de las hifas, que resultan en un adelgazamiento gradual de la pared desde el lumen hacia la laminilla media. En los hongos de pudrición castaña, los carbohidratos son removidos desde la capa S2, pese a que las hifas se encuentran en el lumen sobre la capa S3.



**Figura 11.** Aspecto de la madera degradada. **A.** Pudrición blanca y **B.** pudrición castaña.

La pudrición blanda es característica de ascomicetes e involucra la presencia de microhifas especializadas (0,3-0,4  $\mu\text{m}$ ). Se puede clasificar en dos tipos: (i) tipo 1, en la cual el hongo forma cavidades longitudinales paralelas a las microfibrillas de celulosa dentro de la pared secundaria (ii) tipo 2, en donde la pared secundaria es atacada en toda su extensión (con remoción selectiva y localizada de la capa S2 de la pared secundaria, dejando laminilla media y S3 intactas). Luego de ser degradada, la madera adquiere una apariencia blanda y débil, 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. En estos últimos, la apariencia macroscópica de la madera es indistinguible de la de una pudrición castaña. Dos son las principales diferencias con la pudrición blanca: en la pudrición blanda no es atacada la laminilla media y no están involucradas las ligninasas. Las únicas enzimas responsables de la degradación son celulasas y hemicelulasas (Kubicek, 2012).

Actualmente, se cuestiona el paradigma de clasificación de hongos de pudrición en las categorías mencionadas anteriormente. Esto se debe a que el análisis de varios genomas fúngicos registró la existencia de incongruencias por ejemplo, la existencia de especies causantes de pudrición que no poseen

peroxidasas degradadoras de lignina (PODs) y por ende se asemejan más a especies de pudrición castaña, pero poseen todo el aparato de degradación de celulosa típico de los hongos de pudrición blanca y, más aún son capaces de degradar la lignina. Se propone entonces que este sistema de clasificación no es suficiente para describir toda la diversidad de hongos causantes de pudrición de maderas (Riley *et al.*, 2014), sin embargo, es el sistema más empleado en la actualidad.

### **1.3.2. Hongos descomponedores de hojarasca (LDF)**

Los hongos asociados a la descomposición de la hojarasca foliar y materiales presentes en los suelos de los bosques son agrupados funcionalmente como hongos descomponedores de hojarasca. Sin embargo, hongos pertenecientes a otros grupos funcionales, como los hongos causantes de pudrición de madera y hongos micorrícicos, pueden tener también un rol en la descomposición de la lignocelulosa presente en la hojarasca (Osono, 2007). Por eso resulta importante aclarar que a lo largo de esta Tesis se trabajó con hongos basidiomicetes saprótrofos lignocelulolíticos descomponedores de hojarasca.

Es escasa la información disponible sobre la fisiología de los hongos saprótrofos de hojarasca y suelos, en comparación con la existente acerca de los hongos degradadores de la madera. Menos información se tiene aún sobre los sistemas enzimáticos ligninolíticos involucrados en el proceso de degradación natural llevada a cabo por los LDF. Esto se debe principalmente a la dificultad de poder asociar la actividad enzimática detectada a especies particulares de hongos con habilidad para sintetizar estas enzimas así como a la heterogeneidad y complejidad del ambiente que representa el suelo y la hojarasca (Baldrian, 2008a).

La habilidad de los LDF para descomponer la lignina presente en la hojarasca varía considerablemente (Osono, 2007). En general, los LDF basidiomicetes se considera que poseen mayores habilidades ligninolíticas que los ascomicetes (Osono y Takeda, 2006, 2002). Esta mayor capacidad ligninolítica se asocia a mayores pérdidas de masa de la hojarasca. Sin embargo, durante la descomposición de hojarasca se produce una sucesión de microorganismos y por lo tanto, la contribución de los LDF basidiomicetes al proceso de descomposición puede no ser dominante durante ciertas fases del proceso (Osono, 2007; Voříšková y Baldrian, 2013).

En los LDF, no se estableció aún una categorización de los diferentes mecanismos de descomposición, como sucede para los hongos que atacan madera. La selectividad en la descomposición de lignina resulta altamente variable entre las distintas especies de LDF. La descomposición de lignina y otros componentes como la holocelulosa, expresada como la relación entre la lignina y la pérdida de masa

de hojarasca, ocasionada por basidiomicetes, varía en proporción. Por ejemplo, algunas especies de *Clitocybe* y *Collybia* spp descomponen preferencialmente la lignina, mientras que especies de *Mycena* spp suelen causar la descomposición simultánea de lignina y otros componentes. Por otro lado, los LDF ascomicetes generalmente descomponen la celulosa selectivamente por sobre la lignina, aunque *Coccomyces* spp es capaz de descomponer la lignina selectivamente (Osono, 2007).

Se ha reportado que la eficiencia en la descomposición de lignina por los LDF es menor para hojarasca proveniente de especies de coníferas respecto de especies de hoja caduca (Mikola, 1956; Osono y Takeda, 2006), con una diferencia más marcada para especies de ascomicetes. Esto se atribuyó, al menos parcialmente, a la presencia de unidades de lignina guayacil en gimnospermas, la cual es más recalcitrante que las unidades de lignina guayacil-siringil presente en angiospermas (Eriksson *et al.*, 1990).

En una revisión de la diversidad de especies de hongos ligninolíticos descomponedores de hojarasca y material presente en suelos de bosques realizada por Osono (2007), se encontraron 31 géneros reportados en la bibliografía (23 basidiomicetes y 8 ascomicetes) capaces de degradar lignina en condiciones de laboratorio y/o de campo. Los géneros más frecuentes incluyeron a *Clitocybe*, *Collybia*, *Marasmius*, y *Mycena*. También se han aislado desde micelio de hojarasca foliar especies de *Xylaria* y su anamorfo *Geniculosporium*, así como especies de *Coccomyces*, todos ellos considerados ligninolíticos vigorosos. A su vez, también fueron encontradas especies de hongos imperfectos como *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. pero con una actividad ligninolítica mucho menor.

En un trabajo experimental de laboratorio en el que se hizo una prospección de hongos de hojarasca con capacidad para mineralizar lignina sintética marcada ( $C^{14}$  DHP), se reportó que los géneros *Stropharia* y *Agrocybe* resultaron los más activos, pudiendo mineralizar hasta un 25% de la lignina a  $CO_2$ , esto es la mitad de la eficiencia que se detecta comúnmente con los hongos de pudrición blanca más potentes (por ejemplo especies del género *Phanerochaete*; Steffen *et al.*, 2000). Las principales enzimas ligninolíticas detectadas en hongos como *Agaricus bisporus* (Bonnen *et al.*, 1994) *Collybia dryophila* (Steffen *et al.*, 2002a) y *Stropharia rugosoannulata* (Steffen *et al.*, 2002b) fueron la lacasa y Mn-peroxidasa (MnP). En muchos otros LDF se reportó la producción de lacasas pero no de peroxidasas ligninolíticas (Baldrian, 2006).

La actividad varía también en relación a la abundancia de micelio, incrementándose bajo los anillos de brujas de *Marasmius oreades* o *Agaricus arvensis* (Gramss, 1997; Gramss *et al.*, 2005), y disminuyendo a mayores profundidades del suelo (Luis *et al.*, 2004). Además de su papel en la degradación de lignina, las actividades oxidorreductasas asociadas a suelos fueron relacionadas con la transformación de compuestos

húmicos como los ácidos húmicos (AH), fúlvicos (AF) y humina (Kästner y Hofrichter, 2001). La enzima MnP tendría un rol más importante que la lignina peroxidasa (LiP) en el proceso de descomposición, siendo capaz de despolimerizar y mineralizar los AH (Steffen *et al.*, 2002a, 2000). A su vez, la interacción de las lacasas con sustancias húmicas llevaría no sólo a su descomposición sino a su síntesis a partir de precursores monoméricos (Zavarzina *et al.*, 2004).

En cuanto a la producción de celulasas por LDF en suelos poco se sabe aún, sin embargo dicha actividad suele atribuirse a este grupo (Criquet *et al.*, 2002). Se ha reportado la producción de lacasa, MnP, mananasa y xilanasas por *Mycena galopus* creciendo sobre hojarasca de *Picea sitchensis* (Ghosh *et al.*, 2003), provocando la denominada pudrición blanca de hojarasca (Frankland, 1998). *Lepista nuda* fue capaz de producir lacasa, endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -xilosidasa en hojas enterradas de *Fagus sylvatica* (Colpaert y Van Laere, 1996).

## 1.4. Degradación de los principales constituyentes de la hojarasca

### 1.4.1. Descomposición de celulosa

Las enzimas capaces de clivar enlaces glicosídicos entre carbohidratos o entre un carbohidrato y un motivo no-carbohidrato se denominan glicosil hidrolasas (GHs; EC 3.2.1.x; **Recuadro 1**). Las celulasas representan un subconjunto de enzimas GHs que clivan enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4, presentes en oligo- y polisacáridos, como los presentes en la celulosa. Al hacerlo, las celulasas forman un azúcar hemiacetal y la correspondiente aglicona libre.

Las GHs pueden clasificarse según su modo de acción sobre el sustrato en: exo-GHs y endo-GHs (**Figura 12A**). Las primeras, clivan el sustrato en el extremo del polímero (generalmente en los extremos no reductores), mientras que las segundas, lo hacen dentro de la cadena. Así, las endo-GHs aumentan el número de oligómeros que pueden ser atacados por las exo-GHs, lo que se traduce en una acción sinérgica entre ambos tipos de enzimas (sinergismo exo-endo), aumentando las tasas de hidrólisis (Wood y McCrae, 1972). A su vez, las enzimas GHs se agrupan en glucanasas si actúan sobre polímeros o sustratos de alto peso molecular, mientras que son glucosidasas si lo hacen sobre oligómeros (Kubicek, 2012). Esta clasificación trae problemas a la hora de diferenciar las exoglucanasas de las glucosidasas ya que pueden actuar sobre los mismos oligómeros solubles y desde el mismo extremo. Se propuso que cuando ambas enzimas actúan sobre un mismo sustrato, la afinidad de las exoglucanasas será mayor a



medida que aumenta el largo de polimerización (menor  $K_m$ ), mientras que lo contrario ocurre con las  $\beta$ -glucosidasas (Reese *et al.*, 1968).

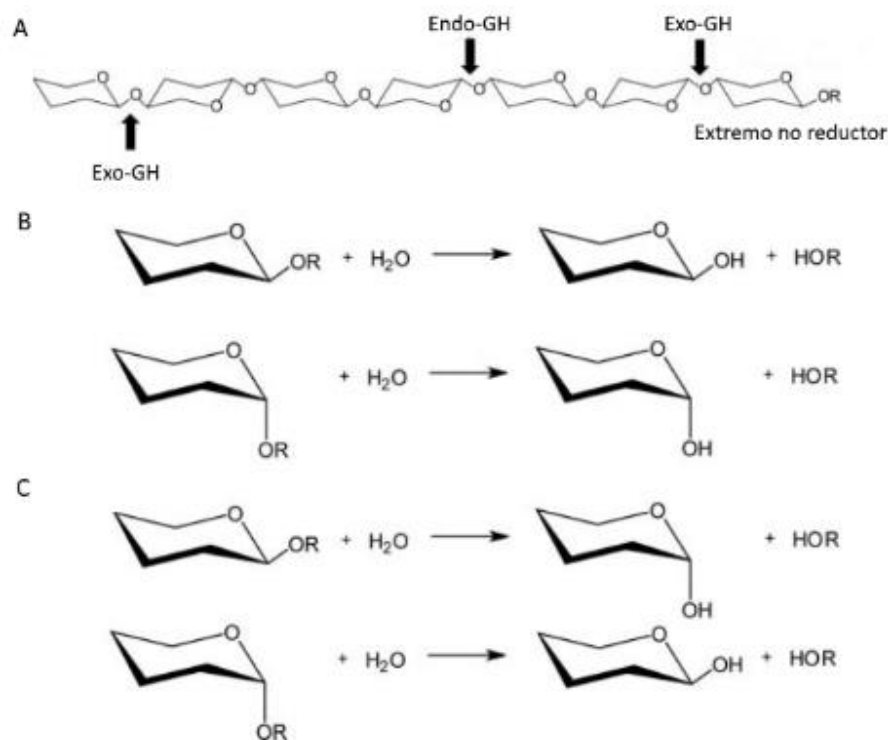
#### Recuadro 1

Las enzimas son designadas según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) por los números de EC (de sus siglas en inglés “Enzyme Commission”), en base a la reacción que catalizan. Sin embargo, el número EC no distingue entre enzimas que son genéticamente o estructuralmente diferentes y, adicionalmente una determinada enzima puede ser multifuncional o bien, hidrolizar muchos sustratos relacionados. Por ello se desarrolló un sistema de clasificación alternativa que complementa la anterior. En este sistema, las enzimas son agrupadas en familias según la similitud de la secuencia aminoacídica (Henrissat *et al.*, 1991). De esta manera, se reflejan mejor las características estructurales de las enzimas (no sólo por la especificidad de sustrato), pueden revelarse relaciones filogenéticas entre ellas y se tiene un mejor panorama del mecanismo de acción. La clasificación en familias se extendió a todas las enzimas que actúan sobre polisacáridos o en su síntesis, y se denominan enzimas CAZY (Carbohydrate Active enZYme). Toda la información sobre las mismas se encuentra disponible en una base de datos que es frecuentemente actualizada y se puede visitar en la página: <http://www.cazy.org>. Hasta la fecha, 135 familias de GHs, organizadas en 14 clanes han sido determinadas.

En la mayoría de los casos, la hidrólisis enzimática del enlace glicosídico es catalizada por dos residuos aminoacídicos presentes en la enzima: un ácido (donor de protones) y una base o nucleófilo (Davies y Henrissat, 1995). Según la posición espacial de estos residuos catalíticos, la hidrólisis provoca una retención o una inversión de la configuración del grupo hidroxilo ubicado en el C1 (C anomérico) del azúcar (**Figura 12B y C**). En algunos casos, el nucleófilo catalítico no se encuentra en la enzima sino que es reemplazado por el grupo acetamida del C2 del sustrato (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1995). Un mecanismo totalmente independiente se demostró recientemente para dos familias de glucosidasas utilizando  $NAD^+$  como cofactor (Liu *et al.*, 2007; Rajan *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, la descomposición de la celulosa en hongos se atribuyó a la acción sinérgica y coordinada de tres tipos principales de enzimas: las endoglucanasas (EG, endo-1,4- $\beta$ -glucanasas, EC 3.2.1.4), las exoglucanasas (incluyendo a las celodextrinasas, EC 3.2.1.74 y celobiohidrolasas, las cuales pueden actuar sobre los extremos reductores (CBH-I, EC 3.2.1.176) o no reductores (CBH-II, EC 3.2.1.91)) y las  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.1.2.21).

Las endoglucanasas producen rupturas al azar dentro de regiones amorfas localizadas en el interior de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de largo variable y por ende, nuevos extremos. Las exoglucanasas clivan de manera procesiva los extremos accesibles de la celulosa (como los generados por la acción de la endoglucanasa), reductores y no reductores, para liberar como productos mayoritarios celobiosa (CBH) o glucosa (glucohidrolasas). Los celo-oligosacáridos solubles resultantes o la celobiosa, son hidrolizados por las  $\beta$ -glucosidasas a glucosa. Tanto la celobiosa como la glucosa pueden ser absorbidas por la hifa fúngica para su posterior asimilación (**Figura 13**).



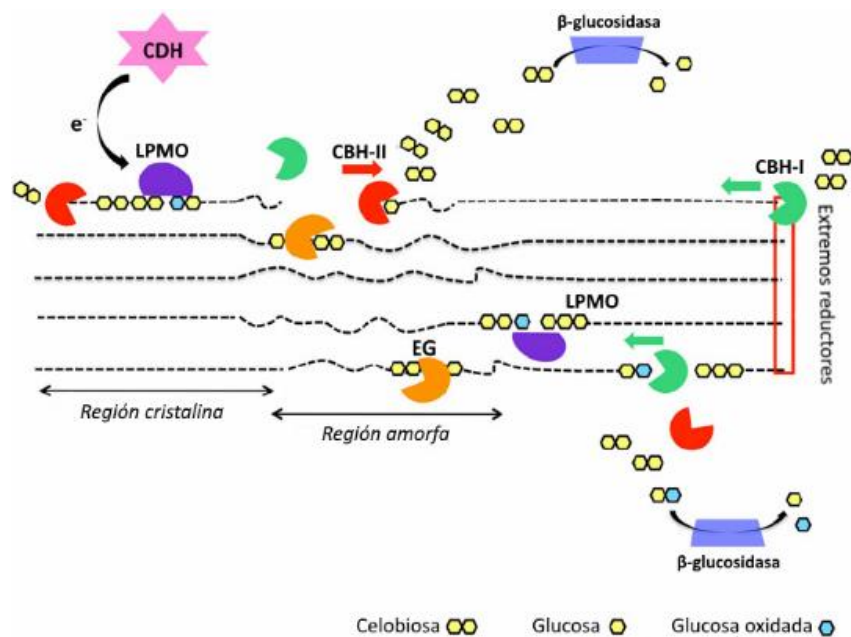
**Figura 12.** Mecanismo de acción de las glicosil hidrolasas (GHs). **A.** Hidrólisis tipo exo-GH y endo-GH. **B.** Mecanismo de retención. **C.** Mecanismo de inversión. Fuente: Kubicek (2012).

Las endoglucanasas son activas frente a diversos sustratos incluyendo la carboximetilcelulosa (CMC, un derivado de celulosa obtenido por modificación química de la celulosa natural), la celulosa amorfa y los celo-oligosacáridos, mientras que no atacan significativamente la celulosa cristalina, como las fibras de algodón o el avicel. Para el estudio de la actividad endoglucanasa suele utilizarse como sustrato CMC, que tiene por ventaja respecto de la celulosa, la de ser estructuralmente uniforme y por sobre todo, la de ser soluble en agua. Esta actividad se puede ensayar a través de la reducción en la viscosidad de la

solución de CMC o por un aumento en el número de extremos reductores. Pese a que algunos organismos que son incapaces de degradar celulosa pueden hidrolizar CMC vía enzimas  $\beta$ -glucano (Fields *et al.*, 1998), es un sustrato ampliamente utilizado. Las exoglucanasas en cambio, son activas frente a la celulosa cristalina como el avicel, la celulosa amorfa, y los celooligosacáridos. Sin embargo, son inactivas frente a la celobiosa o las celulosas solubles sustituidas como el CMC.

Actualmente, se conoce que otros mecanismos complementarios al sinergismo endo-exo mencionado anteriormente están involucrados en la degradación fúngica de celulosa, siendo claves en el proceso y generando un aumento de la eficiencia. Tal es el caso de enzimas rédox con actividades auxiliares (AA), como la celobiosa deshidrogenasa (CDH, EC 1.1.99.18). Las CDHs pueden oxidar celobiosa, celodextrinas y lactosa, utilizando diferentes aceptores de electrones entre los que se destacan las quinonas, los radicales fenoxi, el citocromo *c*,  $\text{Fe}^{3+}$  acomplejado, manganeso y oxígeno, produciendo como resultado peróxido de hidrogeno (Kremer y Wood, 1992). Las CDHs potencian la degradación de la celulosa al acoplar el ataque oxidativo de la celobiosa con la activación por reducción de las monooxigenasas polisacárido líticas dependientes de cobre (LPMOs; Phillips *et al.*, 2011). Estas últimas pertenecen a una clase de enzimas recientemente descubiertas, por ejemplo AA9, que catalizan la inserción de oxígeno entre uniones C-H adyacentes al enlace glicosídico, resultando en la oxidación de terminaciones tanto reductoras como no reductoras de la cadena glicosídica, mecanismo que estaría ampliamente distribuido en el reino Fungi (**Figura 13**). Así, son capaces de degradar formas más recalcitrantes de la celulosa como la celulosa altamente cristalina (Langston *et al.*, 2011) o celulosa que está fuertemente ligada a la lignina u otros constituyentes de la pared celular (Harris *et al.*, 2010).

Por otro lado, cuando los aceptores de la CDH son el  $\text{Fe}^{3+}$  o el  $\text{Cu}^{3+}$ , los iones metálicos reducidos pueden reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (que puede formarse por la misma CDH o por otras enzimas productoras de peróxido) generando radicales hidroxilo que pueden modificar y despolimerizar distintos polisacáridos de pared vegetal por reacciones tipo Fenton (Baldrian y Valášková, 2008). Estas propiedades hacen de la CDH una enzima capaz de combinar la descomposición de celulosa con la de hemicelulosa y lignina (Peterbauer y Volc, 2010; Zamocky *et al.*, 2006). Además, muchos de los aceptores utilizados durante la oxidación de la celobiosa son generados durante la degradación de la lignina (Zamocky *et al.*, 2006). Por este motivo, se propone que la CDH tiene varias funciones como la de reducir la inhibición por sustrato dada por los productos de la celulólisis, impedir que las uniones  $\beta$ -1,4-glicosídicas se vuelvan a formar luego de haber sido clivadas por la acción de las endoglucanasas o la de remover productos finales que pueden provocar represión catabólica o inhibición de la actividad de las principales enzimas (Kubicek, 2012).



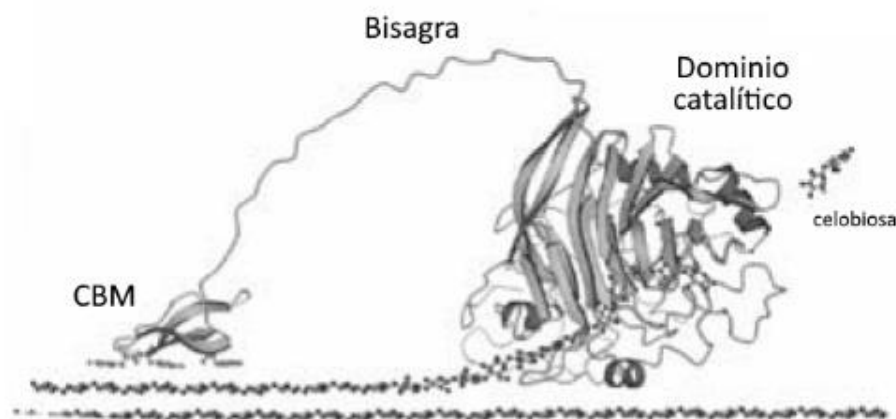
**Figura 13.** Degradación enzimática de la celulosa. Fuente: Dimarogona *et al.* (2013)

Otras proteínas que ejercen su acción potenciando la actividad de las celulasas (“cellulase enhancing proteins”), pero no exhiben actividad enzimática sobre la celulosa por sí mismas, también fueron involucradas recientemente en el proceso. Tal es el caso de la “endoglucanasa” no hidrolítica CEL61 (Harris *et al.*, 2010; Saloheimo *et al.*, 2002) y de las proteínas tipo expansina, swollenina y lusenina, involucradas en un mecanismo de acción que se denominó “amorfogénesis” del sustrato. Estas proteínas alteran los enlaces puentes de hidrógeno entre cadenas de azúcares adyacentes, lo que provoca un desagregado de la matriz fibrilar de la celulosa, favoreciendo así el acceso de las celulasas a su sustrato.

En general, las celulasas presentan una estructura modular en la que se incluye un dominio catalítico y un dominio de unión a carbohidrato (CBMs). El efecto del dominio CBM es el de unirse a la superficie de la celulosa y aproximar, mediante una bisagra flexible de aminoácidos hidroxilados y altamente glicosilados (Ser y Tre), el dominio catalítico al sustrato que es insoluble, facilitando y potenciando su hidrólisis (sinergismo intramolecular; **Figura 14**; Horn *et al.*, 2012). La presencia del dominio CBM es particularmente importante en el modo de acción procesivo de las exoglucanasas (Teeri *et al.*, 1998). Existen enzimas compuestas de varios CBM y dominios catalíticos. Los CBM se clasifican también en familias y los CBM fúngicos constituyen mayoritariamente la familia 1. Los CBM contienen desde 30 y hasta 200 aminoácidos, y se localizan normalmente hacia los extremos carboxi o amino terminal de la cadena polipeptídica, aunque ocasionalmente pueden hallarse en el centro. Cada familia de CBMs posee

cualidades únicas, sin embargo se sabe que la presencia de una superficie plana compuesta de aminoácidos aromáticos le proporciona hidrofobicidad, la cual le confiere afinidad por la celulosa (Hildén y Johansson, 2004).

Las enzimas celulolíticas están distribuidas en varias familias GH con muchos representantes para las endoglucanasas en las familias 5, 9 y 12, exoglucanasas en las familias 6 y 7 y  $\beta$ -glucosidasas en las familias 1 y 3. Algunas GHs consisten en más de un dominio catalítico pertenecientes a diferentes familias o están conectadas con otros dominios como los CBMs para el reconocimiento del sustrato.



**Figura 14.** Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa. Se puede observar el dominio catalítico, en forma de túnel, liberando una molécula de celobiosa, la bisagra y el CBM unido a la celulosa. Fuente: Martínez-Anaya *et al.* (2008).

El material celulósico resulta particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y gran abundancia. Sin embargo, sólo ciertos organismos son capaces de producir las enzimas necesarias para utilizarlo. Se han identificado dos importantes grupos con habilidades celulolíticas (Martínez-Anaya *et al.*, 2008). El primero corresponde al grupo anaeróbico, que comprende especies bacterianas y fúngicas habitantes de aguas residuales y el rumen y tracto intestinal de animales herbívoros y algunos insectos como escarabajos y termitas. Entre las bacterias celulolíticas se encuentran especies de los géneros *Clostridium* y *Ruminococcus*, mientras que *Anaeromyces mucronatus*, *Cyllamyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, entre otros, corresponden a ejemplos de especies fúngicas. El segundo grupo incluye especies aeróbicas habitantes de los suelos, especialmente los boscosos, tales como las bacterias (por ejemplo especies de *Cellulomonas* y *Streptomyces*), y hongos basidiomicetes responsables de pudrición de madera y hojarasca, estos últimos considerados como los degradadores de celulosa más potentes (Baldrian y Valášková, 2008). Los sistemas celulolíticos en hongos difieren respecto a los complejos sistemas de bacterias (celulosomas, aunque éstos también se identificaron en algunos hongos unicelulares

anaerobios) mientras que las diferencias entre grupos taxonómicos individuales son menos pronunciadas (Lynd *et al.*, 2002). Los sistemas celulolíticos mejor estudiados remiten a ascomicetes, como *Trichoderma reesei* (Lynd *et al.*, 2002). En hongos causantes de pudrición blanca los sistemas celulolíticos recibieron menor atención; sin embargo, los estudios existentes en *P. chrysosporium* demuestran que estos sistemas son análogos a los de *T. reesei* (Lynd *et al.*, 2002). El estudio más exhaustivo del proceso de celulólisis en un organismo de pudrición castaña fue realizado en *Gloeophyllum trabeum* (Cohen *et al.*, 2005).

### *Endoglucanasas*

La actividad endo-1,4- $\beta$ -glucanasa es común entre los basidiomicetes, existiendo probablemente en todos los hongos de pudrición, tanto blanca como castaña. También fue detectada en cultivos de hongos descomponedores de hojarasca (Steffen *et al.*, 2007; Valášková *et al.*, 2007) y de hongos ectomicorrícicos. Es una enzima monomérica, de peso molecular entre 22 y 45 kDa aunque casi hasta el doble de este peso molecular fue encontrado en *Sclerotium rolfsii* y *Gloeophyllum sepiarium* (Bhattacharjee *et al.* 1993; Sadana *et al.*, 1984). Las endoglucanasas de clase 7 producidas por ej. por *P. chrysosporium* contienen un dominio catalítico largo y un dominio de unión a celulosa (CBD) mientras que ciertas endoglucanasas más pequeñas pueden no presentar CBD (Henriksson *et al.*, 1999). Las endoglucanasas están típicamente glicosiladas (aunque hay excepciones) con una cantidad relativa de carbohidratos de entre el 1 y el 12% (Henriksson *et al.*, 1999). El punto isoeléctrico es normalmente ácido, entre 2,6 y 4,9, aunque en algunas especies se encontraron puntos isoeléctricos arriba de 7 (Ding *et al.*, 2001). Múltiples endoglucanasas fueron halladas en varios hongos. Por lo menos tres enzimas diferentes fueron aisladas de *G. trabeum*, *P. chrysosporium*, *S. rolfsii* y *Serpula incrassata*. El pH óptimo se encuentra entre 4 y 5, cercano a los valores de pH encontrados en la madera colonizada por hongos (Suzuki *et al.*, 2006; Valášková y Baldrian, 2006) y la temperatura óptima oscila entre los 50°C y 70°C (Valášková y Baldrian, 2006). Una actividad significativa hacia la celulosa cristalina fue hallada sólo para casos puntuales por ejemplo, la celulasa de 65 kDa de *I. lacteus* (Kanda *et al.*, 1978), Cel5A de *G. trabeum* (Cohen *et al.*, 2005) y EG35 de *Fomitopsis palustris* (Yoon y Kim, 2005), las últimas dos denominadas endoglucanasas procesivas, ya que actúan como una combinación de endoglucanasa y celobiohidrolasa y fueron inicialmente encontradas en bacterias celulolíticas.

### *Exoglucanasas*

Las CBHs son enzimas usualmente monoméricas con muy poca o nula glicosilación, de peso molecular típicamente entre 39 y 65 kDa. La actividad catalítica óptima de la mayoría de CBHs de basidiomicetes ocurre entre pHs 4 y 5, y a una temperatura entre 37°C y 60°C, dependiendo de la isoenzima específica y el sustrato (Manavalan *et al.*, 2015). Se han caracterizado CBHs en muchos hongos causantes de pudrición blanca como diferentes especies de *Ganoderma*, *I. lacteus*, *Schizophyllum commune*, *P. chrysosporium*, entre otros (Adav *et al.*, 2012; Chukeatirote *et al.*, 2012; Hamada *et al.*, 1999). En hongos de hojarasca se ha aislado una CBH dimérica a partir de *A. arvensis* (Lee *et al.*, 2011). La actividad exoglucanasa no fue hallada en hongos de pudrición castaña, salvo contadas excepciones en la familia *Coniophoraceae* (Nilsson y Ginns, 1979).

### *β-Glucosidasas*

Estas enzimas están distribuidas ampliamente en la naturaleza, ocurriendo en todos los dominios de organismos vivos, Archaea, Bacteria y Eukarya, en los que tienen variadas funciones (Woodward y Wiseman, 1982). Representan un importante grupo de enzimas ya que pueden utilizarse en numerosos procesos biotecnológicos, entre los que se destacan la producción de bioetanol (Machara *et al.*, 2013), la liberación de compuestos aromáticos en la industria alimenticia (Ghorai *et al.*, 2010), la síntesis de β-glucósidos (Makropoulou *et al.*, 1998) y la degradación de biomasa (Zaldívar *et al.*, 2001).

La deficiencia en actividad β-glucosidasa causa la acumulación de celobiosa, llevando a la represión de la biosíntesis enzimática y la inhibición por producto de enzimas que están río arriba, lo que resulta en una tasa de hidrólisis limitada (Zaldívar *et al.*, 2001). Es por este motivo que las preparaciones comerciales de celulasas, como las de *T. reesei*, suelen ser suplementadas con β-glucosidasa (Chauve *et al.*, 2010).

Los principales productores de β-glucosidasas se consideran especies de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (Jäger *et al.*, 2001; Sørensen *et al.*, 2011). Altas actividades han sido reportadas también para hongos causantes de pudrición blanca como *Flammulina velutipes* (Mallerman *et al.*, 2015). Se han aislado y caracterizado β-glucosidasas a partir de hongos de pudrición como *P. chrysosporium* (Tsukada *et al.*, 2006) y de hongos descomponedores de hojarasca (Steffen *et al.*, 2007).

Las β-glucosidasas exhiben alta variabilidad estructural, reflejando en parte la localización tanto extracelular como de unión a pared celular y también intracelular. Los pesos moleculares reportados se encuentran entre los 35 y 640 kDa.

### *Celobiosa deshidrogenasa*

La actividad CDH ha sido caracterizada en varios hongos de pudrición blanca como *H. annosum*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *S. commune* y *T. versicolor* (Henriksson *et al.*, 2000), en el hongo de pudrición castaña *C. puteana* (Schmidhalter y Canevascini, 1992) y en varios ascomicetes.

### *Descomposición no enzimática de la celulosa*

Recientemente, sistemas de descomposición de celulosa no enzimática se han reportado en hongos causantes de pudrición castaña. Esta vía degradativa está basada en una modificación de la reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$ ), por la cual el peróxido de hidrógeno se descompone en presencia de iones férricos, generando radicales libres reactivos (Goodell, 2003). Estos radicales tienen una vida media de nanosegundos (Eastwood *et al.*, 2011) y son los agentes oxidantes más potentes de origen biológico. Además, ciertos estados hipervalentes del hierro a los que les permanecen asociados los radicales, también son considerados potentes oxidantes (Baldrian y Valášková, 2008). Los dos sistemas con mayor soporte experimental están basados en estudios con *G. trabeum* y *C. puteana*.

Consistente al mencionado rol del hierro, se ha reportado que cuando *P. placenta* crece sobre celulosa, se inducen genes que codifican para reductasas del hierro, quinona reductasas y diversas oxidasas que podrían estar involucradas en la generación de  $\text{Fe}^{2+}$  (el cual no se encuentra normalmente en ambientes oxigenados y se produce por la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Martínez *et al.*, 2009). Los radicales hidroxilo generados, pueden difundir a gran distancia de la hifa fúngica y abstraer átomos de hidrógeno a partir de las subunidades glucosídicas de la celulosa y otros polisacáridos, produciendo radicales transientes de carbono que pueden reaccionar rápidamente con el  $\text{O}_2$  para dar lugar a especies de peroxiradicales ( $\text{ROO}^\bullet$ , Ek *et al.*, 1989). Si los  $\text{ROO}^\bullet$  llevan un hidroxilo en el mismo carbono, van a eliminar  $^\bullet\text{OOH}$  (Halliwell y Gutteridge, 1999), mientras que si no hay un grupo  $\alpha$ -hidroxilo presente, la molécula sufrirá una serie de oxidorreducciones, algunas de las cuales pueden resultar en el clivaje de la cadena de celulosa (Kirk *et al.*, 1991).

Otro compuesto de bajo peso molecular que juega un rol importante en la degradación no enzimática de la celulosa es el ácido oxálico, el cual es producido en grandes cantidades por hongos de pudrición castaña como *P. placenta*, probablemente por enzimas descomponedoras de oxalato (Shimada *et al.*, 1997). Esto genera una gran acidificación de la madera colonizada (con un pH cercano a 2) que puede hidrolizar lentamente la celulosa por sí misma (Green *et al.*, 1991) pero además puede funcionar



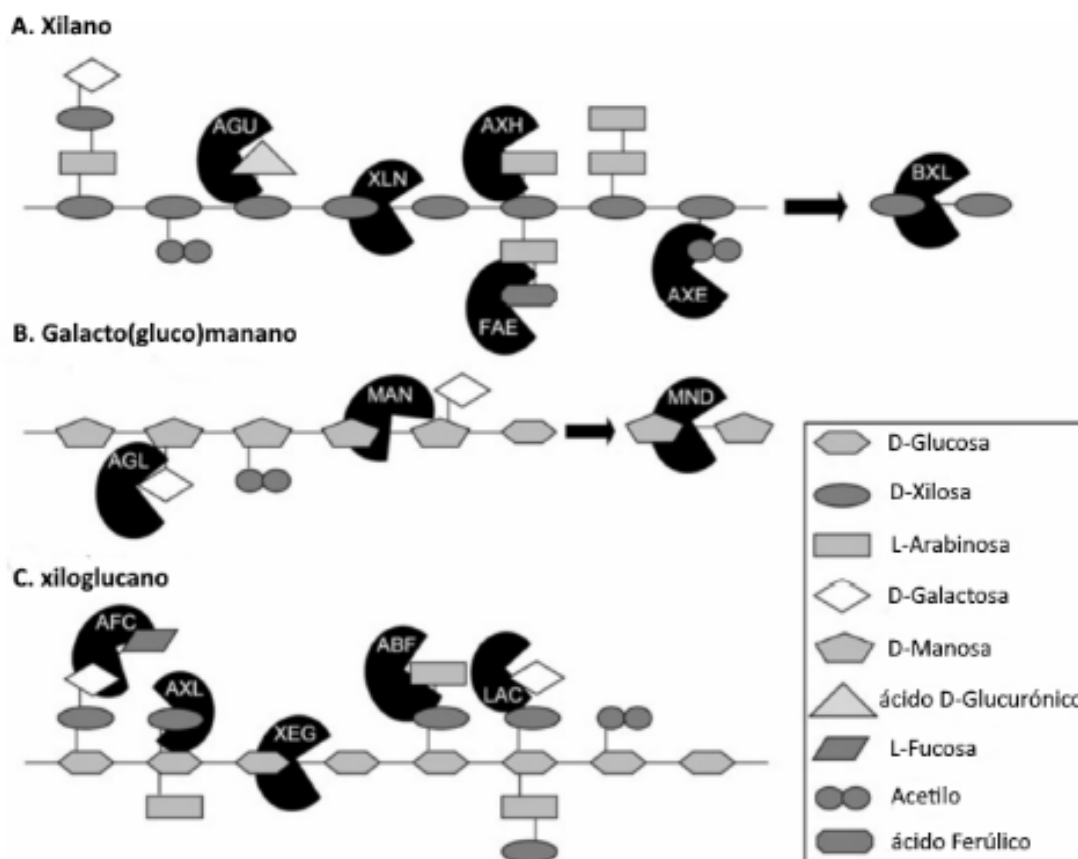
como dador de protones para la hidrólisis enzimática y no enzimática, y como quelante del sistema  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{H}_2\text{O}_2$  para la generación de radicales hidroxilo (Shimada *et al.*, 1997).

#### 1.4.2. Descomposición de hemicelulosas

Las hemicelulasas son producidas por un amplio grupo de organismos pertenecientes a los tres dominios Archaea, Bacteria y Eukarya. Este último dominio incluye diversos tipos de hongos, protozoos, gasterópodos, artrópodos y plantas superiores (Beg *et al.*, 2001; Dashtban *et al.*, 2009; Kulkarni *et al.*, 1999). Entre ellos, los hongos son considerados los organismos más eficientes en la producción de hemicelulasas.

Las hemicelulasas y, principalmente las xilanasas, han sido estudiadas extensivamente debido a su gran importancia biotecnológica. En la industria de la pulpa y papel, la hidrólisis del xilano facilita la liberación de lignina reduciendo los niveles de utilización de cloro como agente blanqueador. Viikari *et al.* (1986) fueron los primeros en demostrar la aplicación de xilanasas para la delignificación en los procesos de blanqueo, y su uso se incrementa día a día, siendo hasta el presente más utilizadas que las ligninasas (Subramaniyan y Prema, 2002). Otras aplicaciones para las hemicelulasas incluyen la bioconversión de material lignocelulolítico y agroresiduos para la generación de bioetanol, clarificación de jugos y mejoramiento de la digestibilidad del alimento para ganado (Shallom y Shoham, 2003).

Como se mencionó anteriormente, las hemicelulasas están compuestas por tres tipos de esqueletos principales que presentan residuos y enlaces glicosídicos específicos para cada tipo, y diferentes ramificaciones laterales. Por lo tanto, cada uno de los tres tipos de esqueletos es hidrolizado por un grupo específico de enzimas:  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) y  $\beta$ -1,4-xilosidasas (EC 3.2.1.37) para el xilano,  $\beta$ -1,4-endomananasas (EC 3.2.1.78) y  $\beta$ -1,4-manosidasas (EC 3.2.1.25) para el manano, y  $\beta$ -1,4-endoglucanasas y  $\beta$ -1,4-glucosidasas para el xiloglucano (De Vries y Visser, 2001). Para la despolimerización de las cadenas laterales intervienen enzimas “desramificantes” tales como xilano esterases (EC 3.1.1.6), feruloil-esterases y p-cumaril esterases (EC 3.1.1.73),  $\beta$ -arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) y 4-O-metil glucuronidasas (3.2.1.139), entre otras (Kubicek, 2012). Todas ellas difieren en la especificidad respecto a los sustituyentes vecinos y al largo de la cadena (**Figura 15**).



**Figura 15.** Enzimas hemicelulolíticas que intervienen en la degradación de **A.** Xilano **B.** Manano y **C.** Xiloglucano. ABF:  $\alpha$ -arabinofuranosidasa, AFC:  $\alpha$ -fucosidasa, AGL:  $\alpha$ -1,4-galactosidasa, AGU:  $\alpha$ -glucuronidasa, AXE: acetil (xilano) esterasa, AXH: arabinoxilano  $\alpha$ -arabinofuranosidasa, AXL:  $\alpha$ -xilosidasa, BXL:  $\beta$ -1,4-xilosidasa, FAE: feruloil esterasa, LAC:  $\beta$ -1,4-galactosidasa, MAN:  $\beta$ -1,4-endomananasa, MND:  $\beta$ -1,4-manosidasa, XEG: xiloglucano  $\beta$ -1,4-endoglucanasa, XLN:  $\beta$ -1,4-endoxilanas. Fuente: de Vries *et al.* (2001).

Las xilanasas, al igual que las celulasas cuando hidrolizan la celulosa, actúan sinérgicamente para convertir el polímero de hemicelulosa en unidades solubles. Las endoxilanasas hidrolizan enlaces  $\beta$ -1,4 en el esqueleto de xilano liberando xilooligómeros, los cuales serán clivados por las  $\beta$ -xilosidasas a xilosa. Como resultado de la acción de las xilanasas, se liberan monosacáridos o disacáridos que pueden ser utilizados por los hongos, y ácido acético. Las endoxilanasas fúngicas pertenecen a las familias GH10 y 11 (más de 300 secuencias génicas). Las endoxilanasas de la familia GH10 presentan generalmente un rango más amplio de sustratos que las endoxilanasas de la familia GH11. Las primeras, además de degradar cadenas lineales de residuos de 1,4-D-xilosa, pueden también degradar esqueletos principales con un alto grado de sustituciones, y pequeños xilo-oligosacáridos (Pollet *et al.*, 2010; Vardakou *et al.*, 2003). La mayoría de las  $\beta$ -xilosidasas fúngicas pertenecen a la familia GH3 (Mozolowski y Connerton,

2009), aunque muchas también son asignadas a la familia GH43 (por ejemplo, en *Penicillium berquei* y *Aspergillus oryzae*; Ito *et al.*, 2003; Machida *et al.*, 2005). Las enzimas desramificantes son responsables de remover las cadenas laterales y actúan sinérgicamente con las xilanasas al permitir su acceso al esqueleto principal de xilano. Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas hidrolizan los extremos no reductores de grupos de arabinanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos. Esta actividad es típica de hongos filamentosos aunque, en hongos ligninolíticos, ha sido demostrada únicamente en *Aureobasidium pullulans* (Baldrian, 2008a). Las  $\alpha$ -D-glucuronidasas hidrolizan las uniones glicosídicas  $\alpha$ -1,2 entre la xilosa y el ácido D-glucurónico o 4-O-metil glucurónico y representan el cuello de botella en la hidrólisis enzimática del xilano. Las acetilxilano-esterasas clivan los enlaces éster entre la xilosa y el ácido acético. Pertenecen a las familias de acetil esterases CE1, 4, 5 y 16. Las feruloil-esterasas y cumaril-esterasas clivan residuos de L-arabinosa, un residuo muy común presente en las cadenas laterales, que se encuentran unidos a la lignina por enlaces éster con el ácido ferúlico y el ácido cumárico respectivamente, colaborando así con la remoción de la lignina. Pertenecen a la familia CE1.

La despolimerización del esqueleto principal de galactoglucomananos involucra la acción de endomananasas, las cuales hidrolizan las uniones dentro de las cadenas de manano liberando oligómeros  $\beta$ -1,4-mananos y de  $\beta$ -manosidasas, que utilizan estos últimos dando lugar a manosa. La habilidad de las endomananasas de degradar el esqueleto de manano depende de varios factores tales como la distribución de los sustituyentes y la relación de residuos de manosa y glucosa (McCleary, 1991). Las endomananasas se encuentran en las familias GH 5 y 26, aunque las fúngicas pertenecen principalmente a la familia GH5, y han sido descritas en *T. reesei*, *Aspergillus aculeatus* y *A. bisporus*, entre otros (Kubicek, 2012). Miembros de ambas familias tienen un mecanismo de desplazamiento doble con retención de la configuración del carbono anomérico. Las  $\beta$ -manosidasas pertenecen casi exclusivamente a las familias GH 1 y 2. Generalmente estas enzimas son capaces de catalizar también reacciones de transglicosilación. La hidrólisis completa de los galactomananos depende a su vez, de la participación de  $\alpha$  y  $\beta$ -galactosidasas. En *A. niger*, la presencia de galactosa próxima a residuos de manosa disminuye la actividad de las  $\beta$ -manosidasas entre un 18% y un 43%, dependiendo del largo del oligosacárido (De Vries y Visser, 2001).

Para la despolimerización del esqueleto principal de xiloglucano, los hongos utilizan enzimas  $\beta$ -1,4-endoglucanasas específicas e inespecíficas. Endoglucanasas con actividad xiloglucanasa pueden encontrarse en las familias GH5, 12 y 16 (Kubicek, 2012), mientras que una actividad xiloglucanasa específica en hongos pertenece a la familia GH74 (muy baja actividad frente a CMC y  $\beta$ -glucanos). El modo de acción de las diferentes xiloglucanasas fue recientemente dilucidado (Desmet *et al.*, 2007; Powlowski *et al.*, 2009). Por ejemplo, la xiloglucanasa GH12 de *A. niger*, a diferencia de la GH74 de *T. reesei*, no cliva residuos ramificados de glucosa, sino que muestra predilección por xiloglucooligosacáridos

que contengan más de seis residuos de glucosa con, al menos, un residuo de glucosa no ramificado (Desmet *et al.*, 2007; Master *et al.*, 2008).

Las hemicelulasas fúngicas son enzimas monoméricas con pesos moleculares en el rango de los 18 y 360 kDa, con funcionalidad en pHs ácidos a neutros (desde 2 hasta 8) y con temperaturas óptimas de 37°C y 85°C (Conejo Saucedo *et al.*, 2011). La expresión de hemicelulasas en *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* es inducible principalmente por fuentes carbonadas. En presencia de D-glucosa, la transcripción es suprimida mientras que una fuerte inducción tiene lugar en ausencia de D-glucosa o en presencia de hemicelulosa (Conejo Saucedo *et al.*, 2011). Además, las enzimas hemicelulolíticas pueden ser co-inducidas por muchos mono- y disacáridos como la sofrosa, xilobiosa, lactosa, D-xilosa y L-sorbosa (Suto y Tomita, 2001). Sin embargo, se ha reportado que dicha inducción no se encuentra tan estrictamente controlada por sustrato como ocurre con la producción de celulasas (Valášková y Baldrian, 2006). Una expresión basal de hemicelulasas y permeasas ocurre de manera constitutiva permitiendo la incorporación de los inductores correspondientes.

### **1.4.3. Descomposición de lignina**

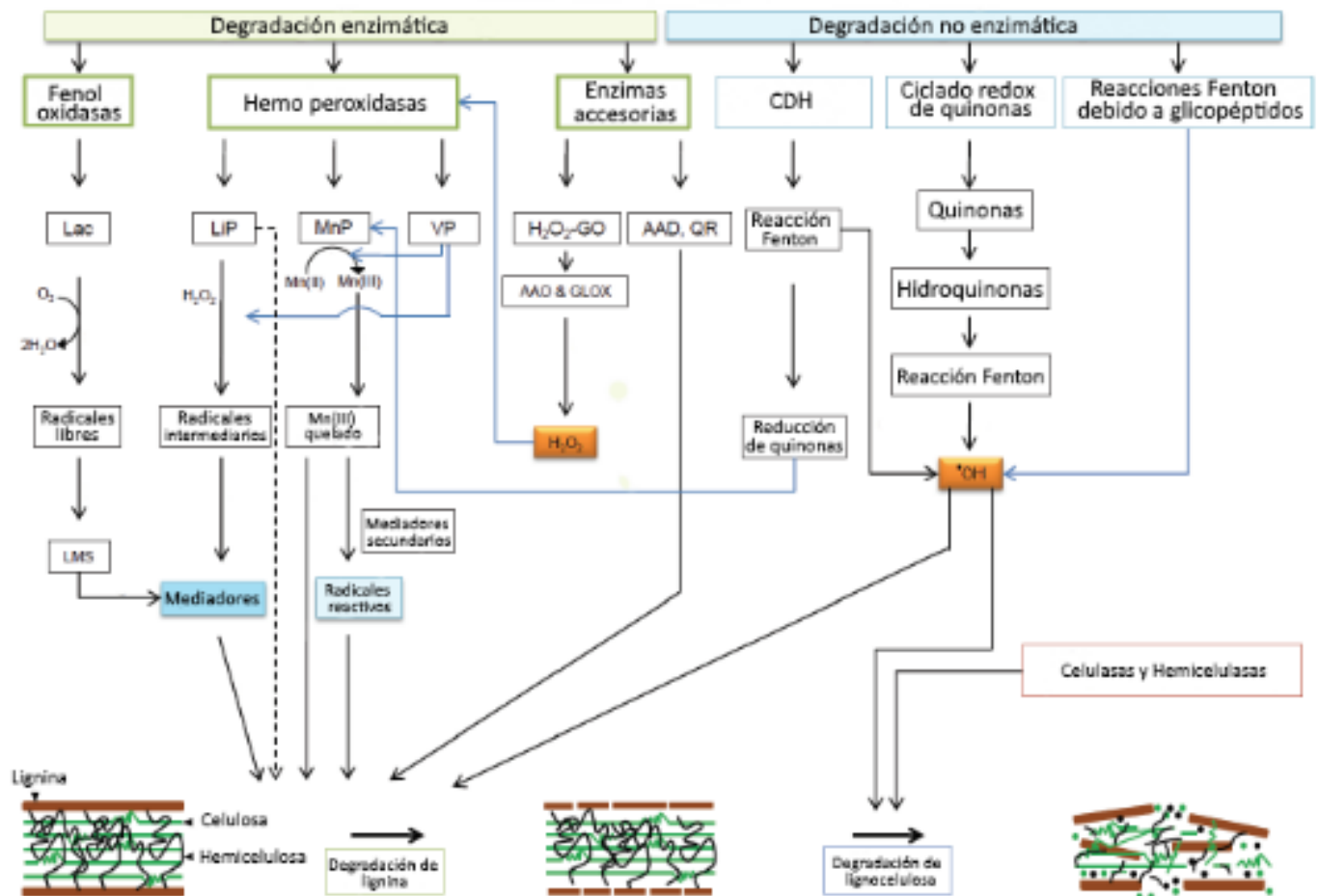
La lignina es químicamente recalcitrante para la mayoría de organismos debido a su compleja e irregular estructura. Por un lado, los organismos son incapaces de producir especies nucleofílicas tan potentes en sus sitios activos enzimáticos ya que la gran reactividad de los mismos terminaría por dañarlos. Además, debido a la superficie variable de la lignina y a la gran diversidad de enlaces no hidrolizables presentes, la ligninólisis no puede ser llevada a cabo por enzimas hidrolíticas como ocurre con el resto de los componentes de pared celular, sino que requiere de mecanismos oxidativos poco específicos (Hammel y Cullen, 2008). La lignina no representa una fuente fácilmente accesible de carbono y energía, sino que su degradación abre paso a la utilización de otros sustratos que están covalentemente ligados a ella y/o protegidos, como son la celulosa y hemicelulosa, que constituyen fuentes asimilables. Sólo organismos especializados son capaces de degradar lignina, dentro de los cuales, los hongos filamentosos y, particularmente los hongos causantes de pudrición blanca se consideran los más eficientes.

La despolimerización de la lignina es posible gracias a la producción de enzimas modificadoras de lignina (LMEs), colectivamente denominadas “ligninasas”, las cuales son metalo-oxidoreductasas extracelulares, principalmente hemo-peroxidasas: lignina peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13) y peroxidasa versátil (VP; EC 1.11.1.16); y fenol oxidasas (lacasas; EC 1.10.3.2). Las hemo-peroxidasas LiP, MnP y VP, pertenecen a la familia de peroxidasas fúngicas secretadas clase II, las cuales a su vez son miembro de la superfamilia de peroxidasas microbianas y de

plantas (que incluyen las peroxidasas clase I y III respectivamente; Hofrichter *et al.*, 2010). Estas enzimas oxidan sustratos mediante transferencia monoeléctrica en múltiples pasos. Una segunda superfamilia de hemo-peroxidasas denominada DyPs (EC 1.11.1.19) ha sido identificada recientemente en hongos y bacterias (Sugano, 2009). Se reportó que las DyPs oxidan colorantes de alto potencial redox así como estructuras no fenólicas con uniones  $\beta$ -O-4 presentes en compuestos modelo de lignina (Liers *et al.*, 2010). La degradación de lignina es estimulada por la acción cooperativa de enzimas oxidoreductasas accesorias, que incluyen a la glioxal oxidasa (GLOX; EC 1.2.3.5), aril alcohol oxidasa (AAO; EC 1.1.3.7), piranosa 2-oxidasa (glucosa 1-oxidasa; EC 1.1.3.4), celobiosa/quinona oxidoreductasa (EC 1.1.5.1) y celobiosa deshidrogenasa (CDH; EC 1.1.99.18). La función de estas enzimas accesorias es la de reducir radicales metoxi generados por las LMEs. Además, la glioxal oxidasa, glucosa oxidasa y veratril alcohol oxidasa producen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el cual es necesario para el accionar de las peroxidasas (Ander y Marzullo, 1997) y/o la generación de reacciones tipo-Fenton (Guillén *et al.*, 1990). En la **Figura 16** se esquematiza el rol de las principales enzimas y los mecanismos no enzimáticos involucrados en la degradación de la lignina.

Sólo 5-25% de las unidades fenilpropano en la macromolécula de lignina presentan su grupo hidroxilo libre (unidades de tipo fenólico) ya que la mayor parte de ellos participan en enlaces éter entre unidades monoméricas. Los oxidantes deben ser suficientemente fuertes para atacar las unidades de tipo no fenólicas de la lignina, con uniones aril éter que resultan más difíciles de oxidar que los fenoles (Hammel y Cullen, 2008). A su vez, los oxidantes deben ser especies pequeñas capaces de penetrar la pared celular secundaria lignificada de las plantas. Aunque cierta biodegradación ocurre por erosión de la superficie de la pared celular, la lignina también es removida desde el interior de la pared y la porosidad de la lignocelulosa es muy pequeña para permitir el ingreso de las enzimas extracelulares.

Por lo tanto, las ligninasas inician, pero no dirigen, las reacciones oxidativas en la lignina. La degradación se produce de forma desordenada en el interior del polímero, oxidando al mismo tiempo anillos aromáticos y cadenas laterales propanoides, incrementando la solubilidad del núcleo y liberando fragmentos de tamaño variable. Las enzimas activan la lignina, superando un umbral energético a partir del cual comienza una fragmentación oxidativa, proceso que ha sido denominado “combustión enzimática” (Kirk y Farrell, 1987). Por tal motivo, participan además metabolitos que son secretados como compuestos fenólicos y otros compuestos aromáticos, péptidos pequeños, ácidos orgánicos, iones metálicos y especies reactivas del oxígeno (Lundell *et al.*, 2010).



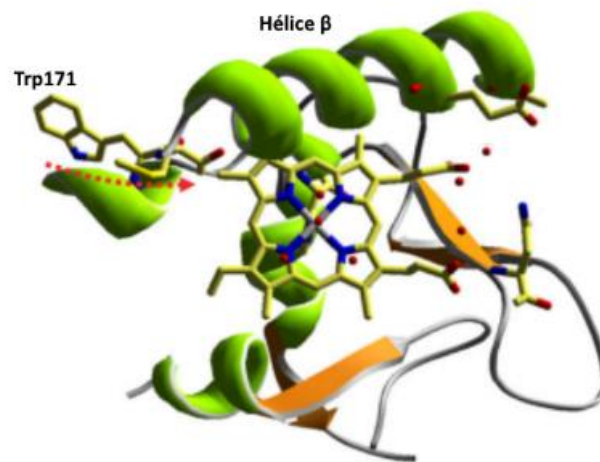
**Figura 16.** Principales mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de la degradación de lignina. Lac: lacasa, LMS: sistema lacasa-mediador, LiP: lignina peroxidasa, MnP: manganeso peroxidasa, VP: peroxidasa versátil, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-GO: enzimas productoras de peróxido de hidrógeno, AAO: aryl alcohol oxidasa, GLOX: glicoxal oxidasa, AAD: aryl alcohol deshidrogenasa, QR: quinona reductasa. Fuente: Dashtban *et al.*, 2010.

### *Lignina peroxidasa (EC 1.11.1.14)*

Las lignina peroxidadas (1,2-bis (3,4-dimetoxifenil) propano-1,3-diol: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) fueron descubiertas por primera vez en el hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* a mediados de la década de 1980, y se consideran verdaderas ligninasas ya que catalizan directamente la oxidación de lignina, de forma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependiente. Son relativamente inespecíficas por sus sustratos y pueden oxidar, sustratos aromáticos fenólicos, así como una variedad de compuestos de lignina modelo no fenólicos y un amplio rango de compuestos orgánicos con un potencial redox de hasta 1,4 V (Valli *et al.*, 1990).

Estas proteínas forman una familia de enzimas extracelulares glicosiladas (hasta el 20-30%), monoméricas y contienen una protoporfirina IX conteniendo un átomo de hierro (hemo) por molécula. Existen diversas isoenzimas, de masa molecular entre 35 y 48 kDa, con punto isoeléctrico (pI) entre 3,1 y 4,7. Una propiedad distintiva de las LiP es su bajo pH óptimo, cercano a 3.

La primer estructura cristalina en conocerse fue la de la isoenzima H<sub>2</sub> de *P. chrysosporium* (Poulos *et al.*, 1993), la cual reveló una estructura globular en una organización de dos dominios, uno proximal (C- terminal) y otro distal (N-terminal), constituidos por ocho  $\alpha$ -hélices mayores, 8  $\alpha$ -hélices menores y una pequeña hoja  $\beta$ -plegada (**Figura 17**).



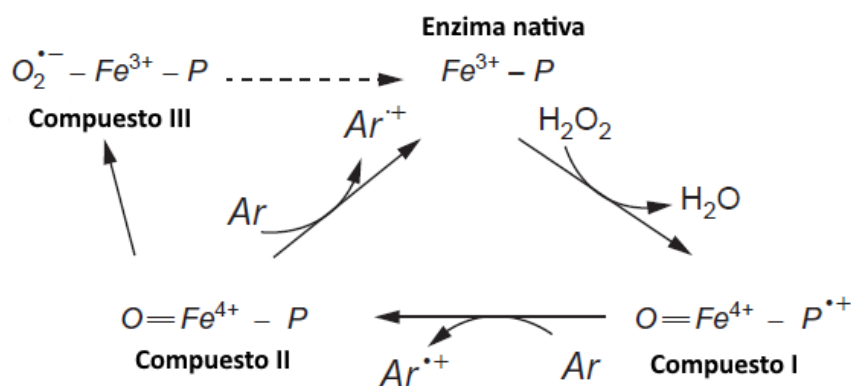
**Figura 17. A.** Estructura tridimensional de la Lignina peroxidasa de *P. chrysosporium* H<sub>2</sub> por difracción de rayos X (número de acceso en <http://www.rcsb.org>, PDB #1LLP). Fuente: Ruiz-Dueñas *et al.* (2009).

Los dos dominios se encuentran unidos por cuatro puentes disulfuro y, en la hendidura formada entre ellos, se encuentra el sitio activo de la enzima. El mismo está compuesto por un grupo hemo conteniendo un átomo de hierro (Fe III), el cual está accesible desde el exterior por medio de dos pequeños canales. Como las clásicas peroxidases, por ejemplo la peroxidasa del rabanito (HRP), el Fe III está pentacoordinado con cuatro átomos de nitrógeno que forman parte de una estructura tetrapirrólica y un átomo de nitrógeno presente en un residuo de histidina. La estructura tridimensional se encuentra estabilizada por dos iones de calcio (Ca<sup>2+</sup>), uno en cada dominio. Se ha reportado más recientemente, la hidroxilación post-traducciona de un residuo de triptófano (Trp171) (Blodig *et al.*, 1998), que tiene un rol esencial en la actividad catalítica de la enzima, probablemente mediante la unión y oxidación del sustrato a través de transferencias electrónicas, aunque su función no está del todo clara.

La reacción que cataliza la LiP es representada como:

1,2-bis (3,4-dimetoxifenil) propano-1,3-diol + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ↔ 3,4-dimetoxibenzaldehido + 1-(3,4-dimetoxifenil) etano-1,2-diol + H<sub>2</sub>O.

Esta reacción se desarrolla mediante un ciclo catalítico de una peroxidasa típica y sucede en dos pasos (Renganathan y Gold, 1986; **Figura 18**). La enzima es oxidada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y pasa a un compuesto intermediario deficiente en 2 electrones, el cual se llama Compuesto I (LiP-I), en el cual el hierro está presente en una forma oxiferril O = Fe (IV) con la formación de un aril catión radical libre, el cual puede estar localizado en el grupo hemo o en un residuo de la proteína, dependiendo de la isoenzima, dando O = Fe<sup>4+</sup> - P<sup>•+</sup>. En un segundo paso, LiP-I es reducido por 1 electrón que dona un sustrato reductor aromático (A), como el veratril alcohol (VA, sustrato preferido de la LiP), lo que provoca la formación del Compuesto II O = Fe<sup>4+</sup> - P (LiP-II). LiP-II retorna a su estado primario Fe<sup>3+</sup> - P por medio de una segunda oxidación que provoca otra molécula de sustrato, completando así el ciclo. En algunos casos, LiP-I puede volver a su estado nativo, mediante la reducción directa por 2 electrones.



**Figura 18.** Ciclo catalítico de la LiP. Fuente: Sigoillot *et al.* (2012).

En condiciones oxidativas extremas (exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ausencia de un sustrato reductor), el compuesto II reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar un complejo férrico superóxido Fe(III)O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, una forma catalíticamente inactiva de la enzima, llamada Compuesto III. LiP-III puede ser convertida a su forma nativa por autooxidación espontánea o por la oxidación mediante un radical aril catiónico (Ar<sup>•+</sup>), a través del desplazamiento del superóxido del sitio activo. Este mecanismo de protección de la LiP de la inactivación por exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Valli *et al.*, 1990) se ha propuesto frente a la observación de que el VA es producido en *P. chrysosporium* concomitantemente con LiP (Fenn y Kirk, 1981). Por otro lado, también se ha propuesto que el radical catiónico VA y otros radicales aril catiónicos (Ar<sup>•+</sup>) actúan como mediadores redox en la oxidación no enzimática de la lignina, lo que genera numerosos productos como



el glicolato y oxalato. El decaimiento del radical catiónico depende de la naturaleza de los sustituyentes presentes en el anillo aromático del sustrato y se ha reportado que grupos donadores de electrones, como son los grupos alcoxi (R—O), favorecen su estabilización (Walling *et al.*, 1984).

La LiP es única en su capacidad de oxidar sustratos de alto potencial redox, lo cual se debe a que LiP-I almacena en sí mismo un alto potencial ( $E'_{0} \approx 1,2$  V a pH 3), lo que le permite oxidar sustratos aromáticos no fenólicos sin la participación de mediadores para la oxidación. Estos sustratos no pueden ser oxidados por otras peroxidases, por ej. la MnP, en ausencia de mediadores (Wong, 2009). Para la medición de la actividad LiP, se utiliza el sustrato VA (3,4-dimetoxibenzil alcohol) y se monitorea su oxidación a veratraldehído (VAD) por el aumento de absorbancia a 310 nm. La LiP, al igual que otras peroxidases, puede oxidar sustratos fenólicos (guayacil, vainillil alcohol, catecol, ácido siríngico, acetosiringona, etc.). De hecho, la oxidación de compuestos fenólicos es catalizada a una tasa más rápida que la de los no fenólicos (Harvey *et al.*, 1993) pero su oxidación está asociada a un rápido descenso en la actividad enzimática (Harvey y Palmer, 1990). Esto tendría que ver con una acumulación de LiP-III que no puede ser revertido a su forma nativa por los radicales fenoxi formados durante la reducción de LiP-I y LiP-II, a diferencia de lo que ocurre con el compuesto no fenólico VA.

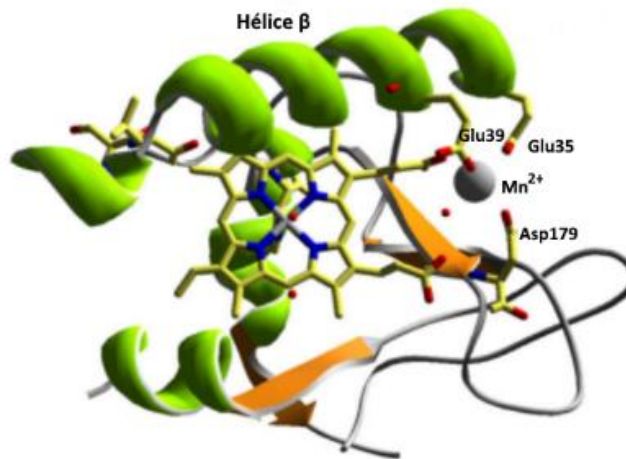
La producción de LiP se describió, en unos pocos hongos de pudrición blanca además de *P. chrysosporium*, incluyendo a *T. versicolor*, *Trametes cervina*, *Phlebia radiata*, *Bjerkandera adusta*, y *Nematoloma frowardii* (Miki *et al.*, 2010; Morgenstern *et al.*, 2008). La expresión en otros grupos, como en los LDF, parece estar limitada (Hofrichter *et al.*, 2010).

### *Manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13)*

Las Manganeso peroxidases (Mn (II): peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) utilizan  $Mn^{2+}$  como sustrato reductor del peróxido de hidrógeno mediante su oxidación a  $Mn^{3+}$ , que a su vez podrá oxidar una gran cantidad de sustratos fenólicos monoméricos. Se describen como verdaderas ligninasas debido a su gran potencial redox.

Las MnPs son glicoproteínas extracelulares (4-18% de glicosilación) con puntos isoelectrónicos entre 2,9 y 7,1, y con un peso molecular entre 38 y 62,5 kDa. Existe un gran número de isoenzimas detectadas, producto de modificaciones post-traduccionales. La estructura de la MnP (**Figura 19**) fue dilucidada por primera vez en *P. chrysosporium* a mediados de 1980 (Sundaramoorthy *et al.*, 1994). Tiempo después, la

actividad MnP fue reportada en más de 50 basidiomicetes de pudrición de madera y hongos de hojarasca (Hofrichter, 2002; Hatakka, 2001).

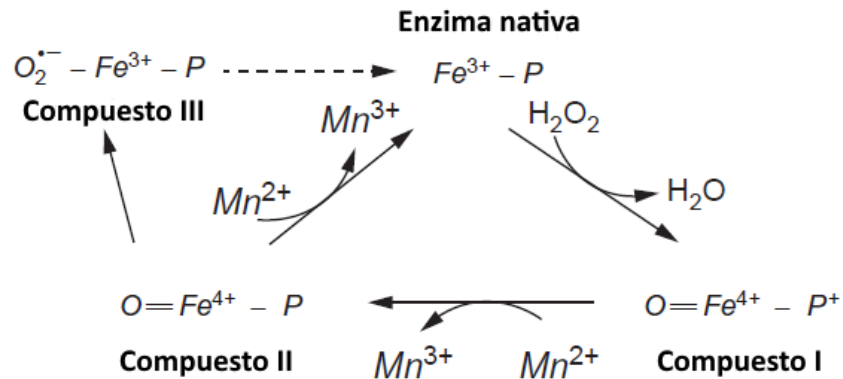


**Figura 19.** Estructura tridimensional de la Manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium* (PDB #1YYD). Fuente: Ruiz-Dueñas *et al.* (2009).

Al igual que la LiP, la MnP posee dos dominios estructurales entre los cuales se encuentra un grupo férrico protohemo IX. En el caso de la MnP, estos dominios están compuestos por diez  $\alpha$ -hélices mayores y una menor. Presenta un sitio de unión al  $Mn^{2+}$ , desde donde el  $Mn^{2+}$  se coordina a moléculas de oxígeno presentes en: grupos carboxilatos de los aminoácidos Glu35, Glu39 y Asp179, del grupo hemo propionato y de dos moléculas de agua. Además, entre los dominios hay cinco puentes disulfuro (a diferencia de los cuatro que existen en la LiP), siendo el enlace adicional probablemente necesario para estabilizar el sitio de unión al  $Mn^{2+}$  (Wong, 2009). Se ha demostrado que cuando el sitio de unión al  $Mn^{2+}$  es introducido por mutagénesis sitio-dirigida en la LiP de *P. chrysosporium*, la enzima resultante tiene actividad MnP (Mester y Field, 1998), y contrariamente, cuando el residuo de triptófano hidroxilado involucrado en la interacción de LiP con VA se introdujo en la posición correspondiente al Trp 171 de la MnP, esta enzima adquirió actividad LiP (Timofeevski *et al.*, 1998).

El ciclo catalítico de la MnP (**Figura 20**) es similar al de otras hemo-peroxididasas con la cualidad única de que las MnP utilizan  $Mn^{2+}$  como donador único de electrones. El ciclo es iniciado mediante la reacción entre el hierro presente en la enzima nativa y el  $H_2O_2$  para formar el compuesto I (MnP-I), el cual es un intermediario que consiste en un complejo radical catiónico  $Fe^{4+}$ -oxo-porfirin  $P - Fe(IV) = O^{\bullet+}$ . Este compuesto se reduce mediante un electrón donado por el  $Mn^{2+}$  que pasa a  $Mn^{3+}$ , para formar el compuesto II (MnP-II),  $P - Fe(IV) = O$ . Una segunda reducción restablece a la enzima nativa,  $P - Fe(III)$ , a la vez que se produce otro ión  $Mn^{3+}$ . Al igual que con la LiP, MnP-II puede reaccionar con

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicional para formar un compuesto III inactivo, correspondiente a un complejo Fe(III) superóxido, sin embargo, el grado de inactivación es menor que en la LiP (Wariishi y Gold, 1990). La reactivación del compuesto III está mediada por el Mn<sup>3+</sup>, el cual interactúa oxidando el hierro superóxido coordinado o bien, reaccionando con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en una actividad tipo catalasa (Timofeevski *et al.*, 1998).



**Figura 20.** Ciclo catalítico de la MnP. Fuente: Sigoillot *et al.* (2012).

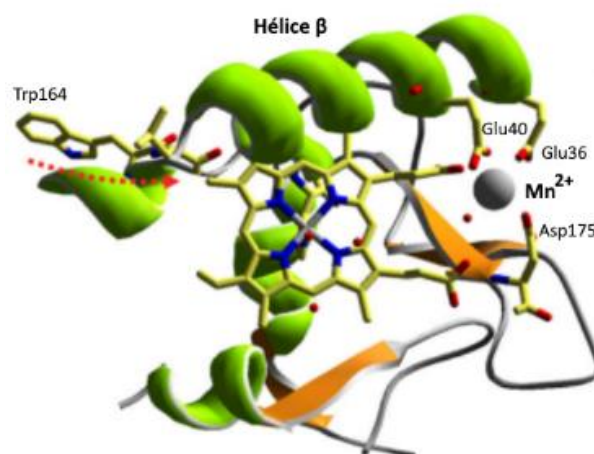
Los iones Mn<sup>3+</sup> generados actúan como mediadores difusibles, siendo capaces de penetrar la estructura lignocelulósica y permitiendo la oxidación de una gran variedad de sustratos fenólicos monoméricos como fenoles simples, aminas, colorantes y compuestos de lignina modelo (Hofrichter *et al.*, 2010; Wariishi *et al.*, 1991). Estos iones son estabilizados por ácidos orgánicos quelantes como el oxalato, fumarato y malato (Martínez *et al.*, 2005).

Debido al relativo bajo potencial redox del sistema Mn<sup>2+</sup>- Mn<sup>3+</sup> (cerca de 0,8 V), la oxidación se produce en estructuras fenólicas presentes en la lignina. La oxidación de forma directa en estructuras no fenólicas se reportó recientemente con compuestos de lignina modelo. Las MnPs fueron capaces de clivar enlaces C $\alpha$ - C $\beta$  y enlaces  $\beta$ -aril éter (Martínez *et al.*, 2005), por oxidación indirecta mediante la acción de pequeños mediadores como son los radicales tiol o lipídicos. Este mecanismo estaría acoplado al rol que tiene la MnP en la peroxidación de lípidos, por ejemplo en la peroxidación MnP dependiente del ácido linoleico, a partir del cual se genera oxalato:glioxal que puede ser convertido por la glioxal oxidasa a oxalato y glioxalato (Watanabe *et al.*, 2001). La asociación entre la peroxidación de lípidos y el clivaje de estos enlaces se observó también en cultivos líquidos del LDF *Stropharia coronilla* (Kapich *et al.*, 2005) y su participación en la ligninólisis fue demostrada en el hongo de pudrición blanca *Ceriporiopsis subvermispora* (Enoki *et al.*, 1999). Sin embargo, en contraste a la LiP, la MnP no es capaz de oxidar los compuestos no fenólicos más recalcitrantes.

### *Peroxidasa versátil (EC 1.11.1.16)*

Las peroxidadas versátiles (VP) son hemo-peroxidadas con una arquitectura molecular híbrida que combina diferentes sitios oxidativos característicos de otras típicas peroxidadas ligninolíticas (Ruiz-Dueñas *et al.*, 2009). Las VPs oxidan  $Mn^{2+}$ , al igual que la MnP, pero en ausencia de  $Mn^{2+}$  pueden oxidar sustratos fenólicos y no fenólicos de alto potencial redox, como lo hace la LiP. Fue descrita por primera vez en 1996, en el hongo de pudrición blanca *Pleurotus eryngii* (Martinez *et al.*, 1996), como una isoenzima de MnP, pero luego fue reconocida como representante de un nuevo tipo de peroxidada. Posteriormente se aisló esta enzima a partir de otras especies de hongos, todos pertenecientes a los géneros *Pleurotus* y *Bjerkandera* (Heinfling *et al.*, 1998a, 1998b; Mester y Field, 1998; Moreira *et al.*, 2007).

Las VPs son glicoproteínas producidas como diferentes isoformas, las cuales tienen un peso molecular entre 40 y 45 kDa, y un pI entre 3,4 y 3,9 (Mester y Field, 1998). La estructura molecular de la VP (**Figura 21**) consiste de 12  $\alpha$ -hélices, estabilizadas por cuatro puentes disulfuro y un bolsillo hemo conteniendo dos residuos de His, dos sitios de unión a  $Ca^{2+}$  y un sitio de unión a  $Mn^{2+}$ . Este último contiene los residuos Glu/Glu/Asp, típicos de la MnP, y se encuentra cercano a un residuo propionato presente en el anillo III del grupo hemo, el cual es responsable de la fijación de  $Mn^{2+}$  y la transferencia electrónica directa desde el  $Mn^{2+}$  al compuesto I o compuesto II.



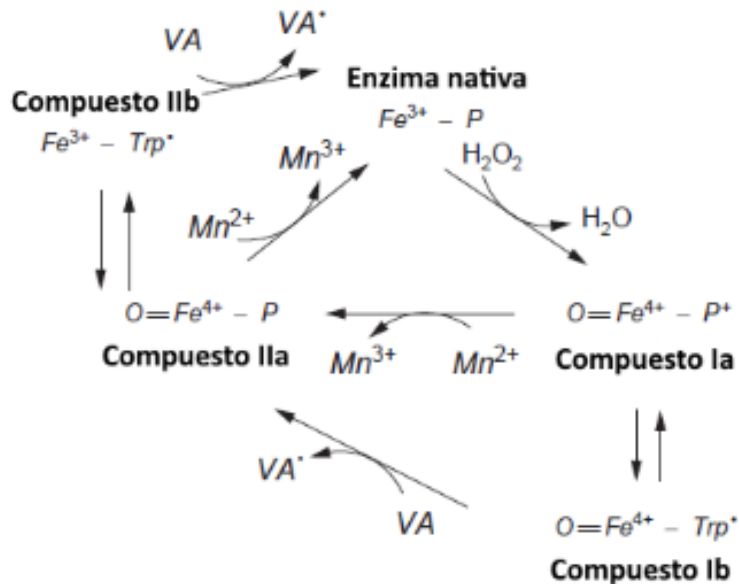
**Figura 21.** Estructura tridimensional de la Peroxidasa versátil (PDB # 2BOQ). Fuente: Ruiz-Dueñas *et al.* (2009).

Además, las VPs presentan un residuo de triptófano (Trp164) análogo al Trp171 de la LiP, involucrado en la interacción con VA y otros sustratos aromáticos de alto potencial redox (Camarero *et al.*, 1999; Mester y Field, 1998). La oxidación de estos compuestos se produce en la superficie proteica

mediante transferencia electrónica de amplio rango hacia el grupo hemo por una vía proteica (Martínez *et al.*, 2005). Este mecanismo es necesario ya que muchos sustratos aromáticos, incluyendo los polímeros de lignina, no pueden penetrar al interior del sitio activo de la proteína para ser oxidados directamente por el cofactor.

Por lo tanto, las VPs tienen un ciclo catalítico que combina las actividades de LiPs y MnPs (**Figura 22**). La versatilidad catalítica de las VPs hace posible la oxidación de sustratos compartidos por ambas enzimas, mediada por  $Mn^{2+}$  así como independientemente de él, aunque se ha reportado que la afinidad de las VPs por estos sustratos es menor que la de las LiPs (Higuchi, 2004). Las VPs pueden oxidar a su vez, hidroquinonas y fenoles sustituidos de manera directa, mientras que éstos no son oxidados eficientemente por las LiPs o MnPs cuando están ausentes VA o  $Mn^{2+}$ , respectivamente (Sigoillot *et al.*, 2012). Se ha reportado también la oxidación directa de colorantes de alto potencial redox como el “Reactive Black 5” (Heinfling *et al.*, 1998). El pH óptimo de las VPs es cercano a 5 cuando se produce la oxidación de  $Mn^{2+}$ , mientras que para la oxidación de compuestos aromáticos el pH óptimo está cerca de 3, similar a los valores de pH óptimo de las MnP y LiPs (Martínez, 2002).

Recientemente, se han encontrado otras peroxidasas híbridas clase II, como se observó en *P. radiata* (Hofrichter *et al.*, 2010), mientras que los datos genómicos existentes predicen la presencia de estas actividades en *Trametes* spp. (Lundell *et al.*, 2010), así como en especies de hongos basidiomicetes descomponedores de hojarasca (Hofrichter *et al.*, 2010), por ejemplo *A. bisporus*, *Agrocybe praecox* y *Stropharia coronilla*.



**Figura 22.** Ciclo catalítico de la VP. Fuente: Sigoillot *et al.* (2012).

## Otras Peroxidasas

En los últimos tiempos se han descubierto nuevas peroxidasas secretadas por hongos como por ejemplo las peroxigenasas aromáticas (APOs, EC 1.11.2.1; Hofrichter *et al.*, 2010; Ullrich *et al.*, 2004) y la peroxidasa inespecífica independiente de manganeso (MiP), designada también como peroxidasa decolorizante de tintes (DyPs, EC 1.11.1.19; Kim *et al.*, 1995; Liers *et al.*, 2010; Sugano, 2009).

Las APOs catalizan diversas reacciones de transferencia de oxígeno que pueden resultar en el clivaje de enlaces éter (Hofrichter y Ullrich, 2010; Kinne *et al.*, 2009). Se identificaron por primera vez en *Agrocybe aegerita* y posteriormente en otros hongos relacionados como *Coprinellus radians*, *Coprinopsis cinerea* y *Marasmius rotula*, hongos lignocelulolíticos de suelos, hojarasca y estiércol (Dau *et al.*, 2007; Hofrichter *et al.*, 2010; Pecyna *et al.*, 2009). Las APOs son proteínas hemo-tiolato que combinan capacidades únicas de las monooxigenasas P450 y propiedades de las clásicas peroxidasas. Su función fisiológica no ha sido completamente elucidada, pero se cree que serían importantes en la bioconversión y detoxificación de químicos orgánicos y materiales con los que se encuentran los hongos en su hábitat natural.

Recientes análisis de secuencias genómicas muestran que las DyPs predominan en bacterias, mientras que sólo un pequeño número se encuentra en hongos y eucariotas superiores. La primer DyP identificada en basidiomicetes, correspondió a la de *B. adusta* (Sugano, 2009) y posteriormente han sido descritas otras DyPs en basidiomicetes incluyendo la de *Pleurotus ostreatus* (Faraco *et al.*, 2007), la del hongo de hojarasca *Mycetinis scorodonius* (Scheibner *et al.*, 2008) y la del hongo gelatinoso *Auricularia auricula-judae* (Liers *et al.*, 2010). Las DyPs poseen cualidades únicas: un rango muy amplio de especificidad de sustrato, falta de homología con la mayoría de las demás peroxidasas y capacidad de actuar a pH más bajo que el resto de peroxidasas. Oxidan todos los sustratos típicos de peroxidasas pero también colorantes sintéticos de alto potencial redox de tipo antraquinónico, lo que les valió su nombre de “dye peroxidasas” (Kubicek, 2012). Existen cerca de 5.000 DyPs registradas actualmente en la base de datos PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>). Aunque sólo hay unos pocos estudios caracterizando su estructura y función, estas enzimas parecen ser bifuncionales con actividad hidrolasa y oxigenasa, además de la típica actividad peroxidasa (Sugano, 2009).

Si bien se describió la actividad ligninolítica de las DyPs y las APOs microbianas, su rol fisiológico aún no es claro y se requieren más estudios para comprender su producción en lignocelulosa natural (Sugano, 2009; Liers *et al.* 2010).

### *Lacasas (EC 1.10.3.2)*

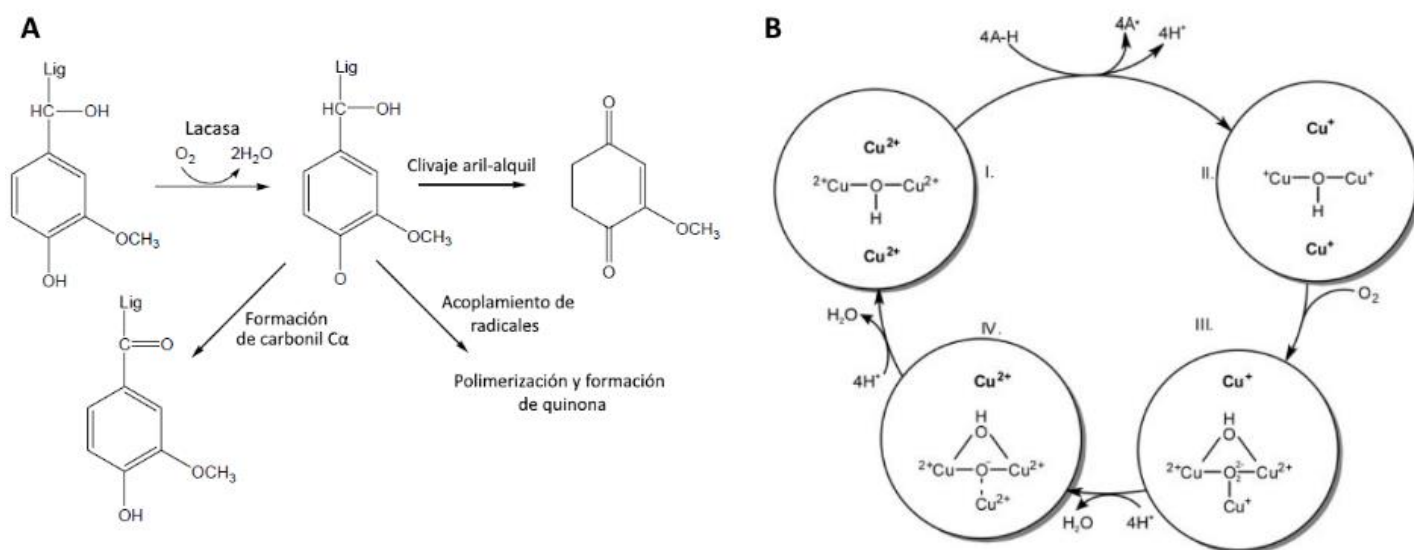
Las lacasas (bencenodiol: oxígeno oxidoreductasas) pertenecen a una pequeña familia de enzimas, las oxidasas multicobre. Su nombre proviene de la planta en donde fueron detectadas por primera vez en el año 1883: *Rhus vernicifera*, cuyo nombre vulgar en inglés es “lacquer tree” (Wong, 2009). Se encuentran ampliamente distribuidas en hongos y plantas superiores, y se han encontrado también en insectos y recientemente en bacterias (Dwivedi *et al.*, 2011; Givaudan *et al.*, 1993). Las lacasas fúngicas poseen potenciales redox mucho más altos (más de 800 mV), con respecto a las identificadas en otros organismos y son muy abundantes en los hongos causantes de pudrición, lo cual puede tener relación con un rol clave en la degradación de lignina y remoción de compuestos fenólicos potencialmente tóxicos generados durante el proceso (Thurston, 1994). Además, se ha demostrado que las lacasas fúngicas pueden también intervenir en otras funciones fisiológicas como en morfogénesis, catalizando la formación de pigmentos extracelulares; en la interacción hongo fitopatógeno/hospedador y en la defensa frente a estrés ambiental, a través de la producción de melaninas (Giardina *et al.*, 2010; Henson *et al.*, 1999).

La mayoría de las lacasas son proteínas extracelulares monoméricas, aunque también se han reportado dímeros y trímeros en *A. bisporus* (Wood, 1980), *Podospora anserina* (Durrens, 1981) y *Trametes villosa* (Yaver *et al.*, 1996). La primer estructura tridimensional en ser reportada fue una forma inactiva de *Coprinus cinereus*, en el cual un centro de cobre está ausente (Ducros *et al.*, 1998). La organización se presenta en tres dominios compuestos por barriles  $\beta$ , los cuales se encuentran fuertemente asociados, típico de las proteínas conteniendo cobre (por ej. la azurina). Posteriormente, este tipo de estructura se confirmó por estudios cristalográficos en *T. versicolor*, *P. ostreatus* y *Melanocarpus albomyces* (Hakulinen *et al.*, 2002).

El sitio activo de las lacasas se encuentra bien conservado. Está compuesto usualmente por 4 átomos catalíticos de cobre, distribuidos en tres sitios distintos: tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3), definidos según sus propiedades espectroscópicas. Uno de los cobres se encuentra en el sitio T1, y es responsable de la oxidación del sustrato y del alto potencial redox de la enzima. El sitio T1, tiene una absorbancia característica a 610 nm, lo que le confiere la coloración azul-verdoso en el estado de reposo, cuando los cuatro cobres se encuentran totalmente reducidos, en el estado de oxidación  $\text{Cu}^{2+}$  (Alcalde, 2007). Los otros 3 átomos de cobre, están acomplejados en un centro tri-nuclear T2/T3, el cual permite la fijación y reducción del oxígeno molecular, que es el aceptor final de electrones. Los átomos de cobre se encuentran coordinados por 10 residuos de His y uno de Cys, que actúan como ligandos. Otras lacasas fúngicas “no azules” se han descrito, por ejemplo POXAW1w, la lacasa blanca de *P. ostreatus*, la cual contiene por molécula de proteína, sólo un átomo de cobre, dos átomos de zinc y un átomo de hierro.

Se han purificado lacasas blancas también de *P. sanguineus*, *Trametes hirsuta* y *P. radiata*. Además, se han encontrado lacasas llamadas “amarillas” debido al color que tomaban los sobrenadantes de hongos creciendo sobre sustratos lignocelulósicos naturales (Pozdniakova *et al.*, 2006). Estas lacasas son muy similares bioquímicamente a las peroxidazas azules pero no presentan la banda de absorción a 610 nm y pueden oxidar estructuras no fenólicas presentes en compuestos de lignina modelo sin la necesidad de mediadores redox. Cuando estos mismos hongos crecieron en medio líquido produjeron las típicas lacasas azules, por lo que se sugirió que el crecimiento fúngico bajo fermentación en estado sólido puede implicar la oxidación de mediadores de lacasa naturales dando lugar a radicales que pueden interactuar con ciertos aminoácidos de la proteína globular modificando la enzima.

Las lacasas catalizan la remoción directa de un único electrón a partir de grupos hidroxílicos fenólicos, presentes en un amplio rango de compuestos incluyendo, (di-) fenoles sustituidos y polifenoles (por ejemplo el vainillil-glicol o siringaldehído) así como (di-) aminas aromáticas, con la concomitante reducción de oxígeno molecular a agua y la formación de un radical libre (por ej. radical fenoxi en el caso de los fenoles). Estos radicales son inicialmente inestables y pueden experimentar una segunda oxidación enzimática o bien una serie de reacciones no enzimáticas como la polimerización vía el acoplamiento de radicales, la hidratación o demetilación, lo que produce la formación de una quinona y el clivaje del anillo (**Figura 23A**; Wong, 2009).



**Figura 23.** **A.** Oxidación de estructuras fenólicas de la lignina por la lacasa. **B.** Ciclo catalítico de la lacasa. Fuente: Kubicek, 2012; Kunamneni *et al.*, 2007.



Un ciclo catalítico de una lacasa corresponde a la transferencia de cuatro electrones desde el cobre T1 hacia el centro tri-nuclear vía el tripéptido His-Cys-His (Piontek *et al.*, 2002). La reacción puede representarse como:  $4 \text{ bezenodiol} + \text{O}_2 \leftrightarrow 4 \text{ benzosemiquinona} + 2 \text{ H}_2\text{O}$  (**Figura 23B**).

Las unidades de lignina fenólicas que pueden atacar directamente las lacasas, comprenden un bajo porcentaje del polímero. Si el rol de las lacasas estuviese limitado a este mecanismo, su papel en la delignificación resultaría improbable (Bourbonnais y Paice, 1990). Las lacasas son capaces de oxidar sustratos fenólicos de alto potencial redox y algunos sustratos no fenólicos en presencia de mediadores químicos vía el sistema lacasa-mediador, incluyendo la activación del oxígeno (Collins y Dobson, 1997; Eggert *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1994).

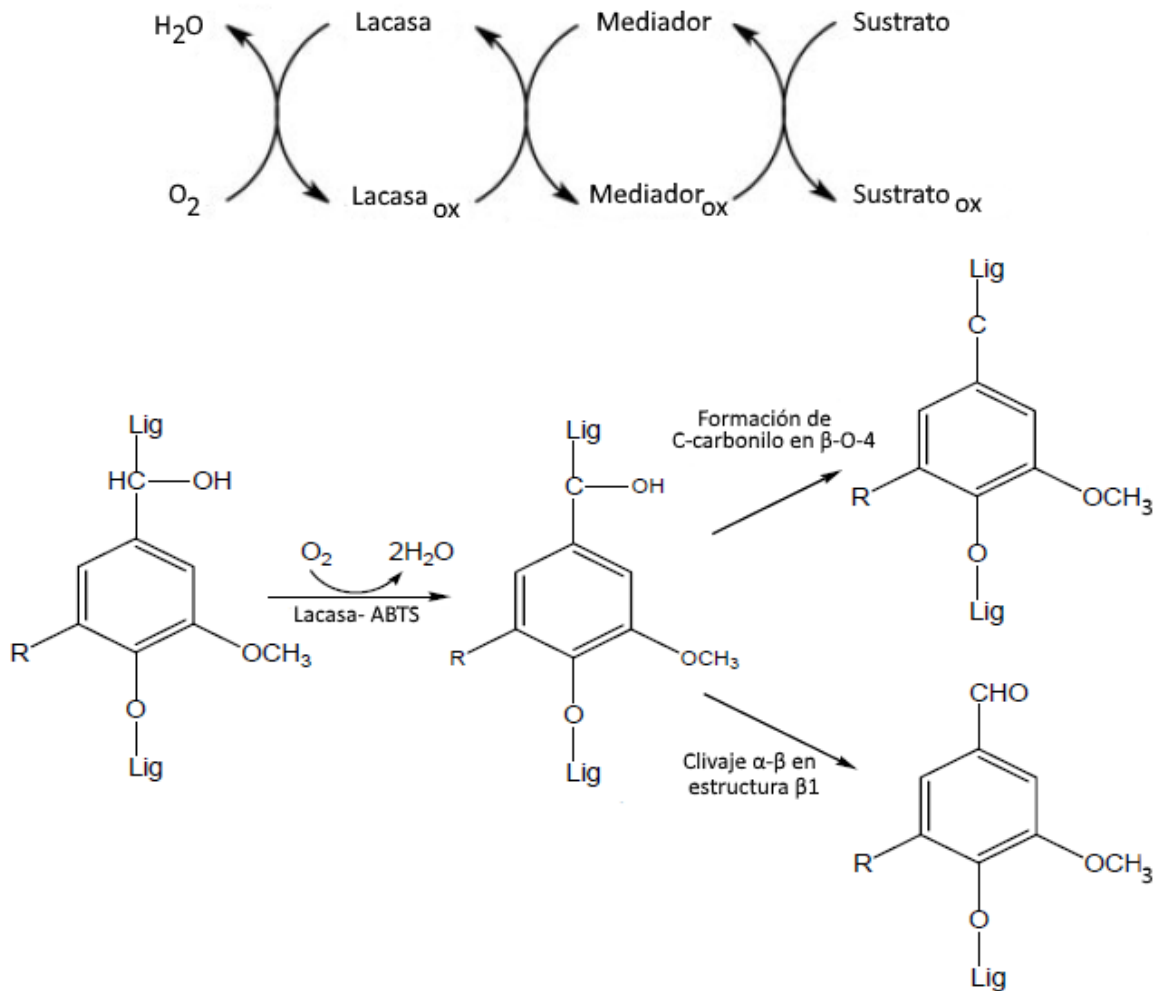
Los mediadores son compuestos de bajo peso molecular que una vez que son oxidados por la enzima a formas estables, pueden abandonar el sitio activo y actuar como mediadores redox. Los mediadores extienden el potencial oxidativo de las lacasas a otros compuestos que no son sustratos enzimáticos, como por ejemplo el ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), el HBT (1-hidroxibenzotriazol) o el HAA (ácido 3-hidroxiantranílico). Cuando hay mediadores presentes, las lacasas pueden atacar la lignina mediante cuatro tipos de mecanismos diferentes: clivaje  $\beta$ -eter, clivaje  $\text{C}\alpha$ - $\text{C}\beta$ , oxidación  $\text{C}\alpha$  y clivaje del anillo aromático (Kubicek, 2012). De esta manera, los mediadores pueden crear rutas no enzimáticas de reacciones oxidativas que tienen un importante rol en la ligninólisis. El sistema lacasa-mediador se muestra en la **Figura 24**. El ABTS es primero oxidado al radical catiónico  $\text{ABTS}^+$  y luego al dicatiónico  $\text{ABTS}^{2+}$ , el cual es responsable de la oxidación de sustratos no fenólicos.

Existen también reportes de la oxidación directa de  $\text{Mn}^{+2}$  por lacasas, con la consecuente producción de  $\text{Mn}^{+3}$ , el cual puede participar de eventos de oxidación no enzimáticos que conducen al ataque de estructuras no fenólicas de la lignina (Schlosser y Höfer, 2002).

La masa molecular de las lacasas se encuentra en el rango de 54-80 kDa. Son proteínas glicosiladas, representando del 10-20% del peso, aunque pueden alcanzar hasta el 49% en *Botrytis cinérea* (Slomczynski *et al.*, 1995). El alto grado de glicosilación protege a las lacasas contra la degradación térmica, convirtiéndolas en enzimas relativamente termoestables hasta los 70°C (Yaropolov *et al.*, 1994).

Las lacasas son clasificadas generalmente en tres grupos, según el potencial redox del cobre T1: bajo (0,4-0,5 V), medio (0,5-0,6) y alto (0,7-0,8; Xu *et al.*, 1996). Dentro de las lacasas de bajo potencial se encuentran las de *C. cinereus* y *Myceliophthora thermophila*, de potencial medio las de *Scytalidium thermophilum* y alto las lacasas de *Pycnoporus*, *T. versicolor*, *T. villosa* y *P. ostreatus* (Sigoillot *et al.*, 2004; Uzan *et al.*, 2010). Un mismo hongo puede tener lacasas de alto y bajo potencial redox, como es el caso de especies de

*Trametes* y *Corioloipsis* (Saparrat *et al.*, 2010). Estas diferencias se cree que podrían deberse a variaciones en el ambiente electrónico del cobre T1 así como a la sustitución de una metionina por una leucina en el sitio activo (Garavaglia *et al.*, 2004; Piontek *et al.*, 2002).



**Figura 24.** Oxidación de estructuras no fenólicas por el sistema lacasa-mediador. Fuente: Kubicek, 2012; Kunamneni *et al.*, 2007.

Los genomas fúngicos contienen muchos genes que codifican para lacasa, lo que produce diferentes isoenzimas que pueden ser constitutivas o inducibles. Muchas moléculas aromáticas son capaces de aumentar la actividad lacasa o de inducir su producción, incluyendo la vainillina, el ácido ferúlico (Chen *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 1997) y el VA, colorantes industriales, principalmente xilidina (Minussi *et al.*, 2007; Quaratino *et al.*, 2008; Revankar y Lele, 2006) y 2,6-dimetoxifenol (Myasoedova *et al.*, 2008). El

metanol y los alcoholes alifáticos más grandes también son eficientes inductores (Lomascolo *et al.*, 2003), determinados aminoácidos y vitaminas (Dhawan y Kuhad, 2002), y metales como cobre. Sin embargo, el efecto es dependiente de la cepa y el mecanismo de inducción no se encuentra del todo dilucidado.

## 1.5. Las enzimas fúngicas aplicadas a la biorremediación

Diariamente, distintas industrias: papeleras, textiles, petroquímicas, etc., vierten importantes volúmenes de agua residual, los cuales generan graves problemas de polución debido a su alto contenido en sustancias contaminantes muy peligrosas para la salud y el ambiente (Nicell *et al.*, 1993; Rodríguez-Couto, 2013). Estos efluentes deben ser tratados previamente a su descarga para eliminar o disminuir el nivel de sustancias tóxicas que contienen (Karam y Nicell, 1997).

Los procesos físicos y químicos utilizados para este fin típicamente remueven contaminantes orgánicos en bajos niveles además de ser muy selectivos en términos del tipo de sustancias que pueden ser eliminadas. Otro problema que presentan es su excesivo costo. Resulta por ello imperativo desarrollar métodos más eficientes, seguros y económicos. La biorremediación es una tecnología atractiva que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para sanear ambientes (Watanabe, 2001). La mayoría de los tratamientos de biorremediación emplean organismos procariontes, siendo el sistema de barros activados uno de los más utilizados por su elevada eficiencia de degradación (Ahmed *et al.*, 2016).

La posibilidad de usar hongos ligninolíticos en la degradación de contaminantes atrajo la atención hace más de 50 años, cuando se encontró que un hongo causante de pudrición blanca fue capaz de degradar un contaminante aromático (Lyr, 1963) y posteriormente en la década del 80, se conectó dicha capacidad con el metabolismo ligninolítico, al estudiar a *P. chrysosporium*, el hongo modelo en ligninólisis (Bumpus *et al.*, 1985; Šašek, 2003). A partir de ese momento, muchas investigaciones se enfocaron al empleo de los hongos de pudrición blanca con la finalidad de contribuir a la búsqueda de tecnologías sustentables que promuevan el saneamiento del ambiente mediante métodos biológicos.

Los hongos de pudrición blanca y sus enzimas ligninolíticas han demostrado su capacidad para degradar eficientemente un amplio rango de contaminantes aromáticos presentes en suelos (Schauer y Borriss, 2004). Contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorados (PCBs), nitroaromáticos, pesticidas, herbicidas, colorantes de distinta naturaleza química, entre otros, han sido degradados eficientemente por numerosos hongos de pudrición blanca (Grassi *et al.*, 2011; Rabinovich *et al.*, 2004; Singh, 2006). Para lograr una significativa degradación y/o detoxificación,

estos hongos cuentan con un sistema ligninolítico extracelular, lo cual presenta la ventaja, por sobre otros sistemas de biorremediación, de permitirles tratar sustancias insolubles. Son capaces asimismo de tolerar concentraciones considerablemente altas de sustancias tóxicas (Reddy y Mathew, 2001).

Existen dos estrategias para la aplicación de estos hongos en la degradación de compuestos recalcitrantes: utilizar directamente el cultivo activo o emplear las enzimas extraídas de él. El uso directo de los cultivos tiene un menor costo económico y la ventaja de contener no sólo las enzimas sino potencialmente todos los otros factores que pueden ser necesarios para mantener la actividad del proceso. Por otro lado, el uso de enzimas purificadas permite una mayor independencia con respecto a la composición del efluente contaminado, que puede afectar la actividad fúngica (por ejemplo, alta salinidad), pero los procesos de extracción y purificación incrementan el costo y afectan la estabilidad enzimática (Moreira *et al.*, 2001).

La mayoría de los trabajos realizados, no reflejan el hecho de que para lograr una aplicación real, la degradación debe ocurrir bajo condiciones no estériles en efluentes o suelos contaminados (Baldrian y Šnajdr, 2006; Pinedo-Rivilla *et al.*, 2009). Cepas de *P. ostreatus* o *T. versicolor*, consideradas como los mejores competidores entre los hongos de pudrición blanca, no fueron capaces de crecer en ambientes no estériles (Baldrian y Šnajdr, 2006). Para solucionar esta limitación, suele recurrirse a diferentes estrategias de bioaumentación (Anastasi *et al.*, 2013; Andersson *et al.*, 2003; Baldrian, 2008b; Steffen *et al.*, 2007b). Debido a que los suelos presentan menor contenido de nutrientes que la madera, el agregado de nitrógeno o carbono, preferentemente en forma de lignocelulosa (mazorcas de maíz, trigo, paja, corteza, etc.), resulta una condición necesaria (Baldrian, 2008b), los cuales suelen suministrarse con el hongo precrecido, cumpliendo una función dual al servir también como transportadores o “carriers” en la inoculación del hongo (Covino *et al.*, 2010). La bioaumentación ha resultado efectiva en la limpieza de sitios contaminados con varios compuestos orgánicos pero aun así enfrenta muchos problemas ambientales, siendo el principal la dificultad de supervivencia de las cepas de hongos de pudrición que son introducidas a los suelos, ambientes hostiles y diferentes a su hábitat natural, los sustratos leñosos (Anastasi *et al.*, 2013).

Por el contrario, los LDF presentan una serie de cualidades que hacen de ellos un grupo prometedor. Producen enzimas ligninolíticas tan activas como las de los hongos causantes de pudrición blanca (Steffen *et al.*, 2003). Muchos trabajos reportan la producción de un amplio rango de oxidoreductasas por hongos LDF en su mayoría basidiomicetes, frecuentemente lacasas y MnPs que, al igual que en los hongos de pudrición de madera, resultaron claves en la degradación de diferentes contaminantes orgánicos persistentes (Casieri *et al.*, 2010). El primer trabajo en demostrar la habilidad de

degradar un xenobiótico por un hongo LDF data de 1999 cuando Wunch y colaboradores (Wunch *et al.*, 1999) reportaron la degradación de benzo(a)pireno por *Marasmiellus trojanus* en cultivos líquidos.

Por otro lado, dado que el ambiente natural de los LDF es un estrato superficial del suelo rico en materia orgánica con lignocelulosa, es de esperar que crezcan activamente en él y sobrevivan durante periodos prolongados, así como que sean capaces de competir con otros microorganismos del suelo y también co-existir con bacterias y levaduras que podrían estimular la degradación de contaminantes (Potin *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 1996). Así, la capacidad degradativa de *M. trojanus* se confirmó en condiciones de microcosmos de suelos contaminados no estériles (Nemergut *et al.*, 2000). La aplicación de hongos LDF en estrategias de biorremediación de suelos contaminados fue también demostrada por Steffen *et al.* (2007b).

Por último, en estudios previos se ha reportado que los LDF son capaces de degradar HAPs (Aranda *et al.*, 2010a; Farnet *et al.*, 2009; Steffen *et al.*, 2003; Wunch *et al.*, 1999), metilnaftalenos y dibenzofuranos (Aranda *et al.*, 2010) y de degradar diferentes colorantes sintéticos (Baldrian y Šnajdr, 2006; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002).

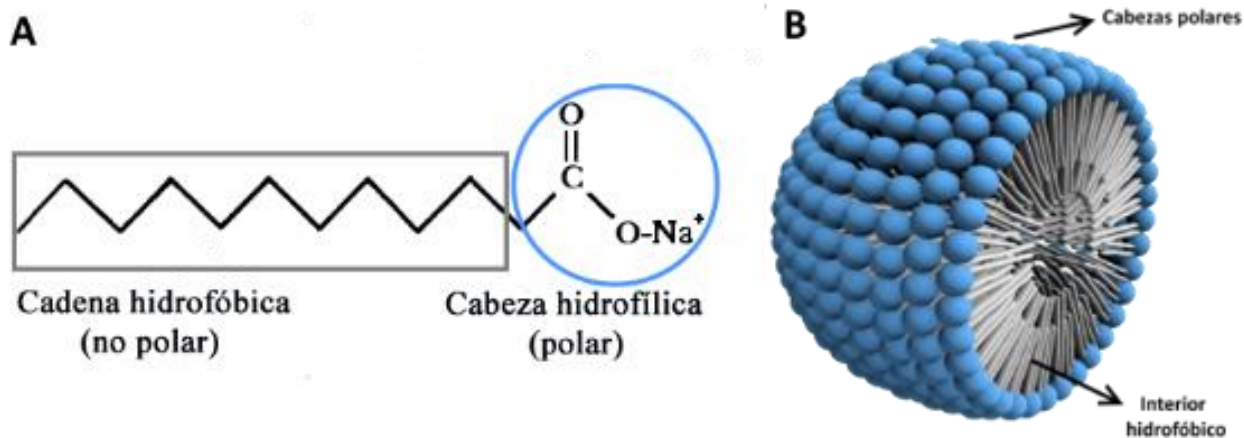
### 1.5.1. El nonilfenol etoxilado

En nuestras vidas cotidianas, nos ponemos frecuentemente en contacto con distintos tipos de surfactantes (del inglés surface active agents, agentes activos de superficie), también llamados tensioactivos. En los alimentos existen surfactantes naturales que actúan como emulsificantes, tal es el caso de la caseína en la leche. En nuestros hogares, los surfactantes sintéticos forman parte de los ingredientes activos de los detergentes, cosméticos y productos farmacéuticos. En la industria, los surfactantes se utilizan en la manufactura de pulpa y papel, en la recuperación de aceites, y en muchas otras aplicaciones. La utilización de surfactantes se conoce desde los tiempos de la Antigua Babilonia ( $\approx$  2.800 años A.C), una mezcla de cenizas y grasa era hervida como método para la fabricación de jabón. Durante el siglo XIX, existió una producción de surfactantes a gran escala pero aún se basaban en cenizas y grasas. Con el tiempo, la búsqueda de surfactantes más eficientes se hizo necesaria y con el progreso en la industria química hacia 1950, fue posible la producción de surfactantes sintéticos y su empleo a nivel industrial.

Los surfactantes comprenden un grupo de compuestos con una estructura química anfifílica, ya que combinan dentro de la misma molécula, una parte soluble en un medio polar o hidrofílica, y una parte soluble en un medio no polar o hidrofóbica (**Figura 25A**). Esta estructura les confiere propiedades

únicas frente a diferentes medios. Los surfactantes se caracterizan por disminuir la tensión superficial de líquidos o interfaces con líquidos. Otra propiedad, es el cambio de orientación de las moléculas en solución de manera de asociarse y formar micelas (**Figura 25B**; Tadros, 2005). Durante el proceso de formación de micelas, los surfactantes son adsorbidos en interfaces en donde remueven partes hidrofóbicas presentes en el agua, reduciendo la energía libre del sistema. Por este motivo, los surfactantes son utilizados en la formulación de detergentes, en los que la eliminación química de la suciedad se produce mediante el atrapamiento de partículas poco solubles en agua. Los detergentes pueden contener un único surfactante o una mezcla de ellos y pueden adicionarse con compuestos auxiliares de limpieza, que variarán según el uso del detergente.

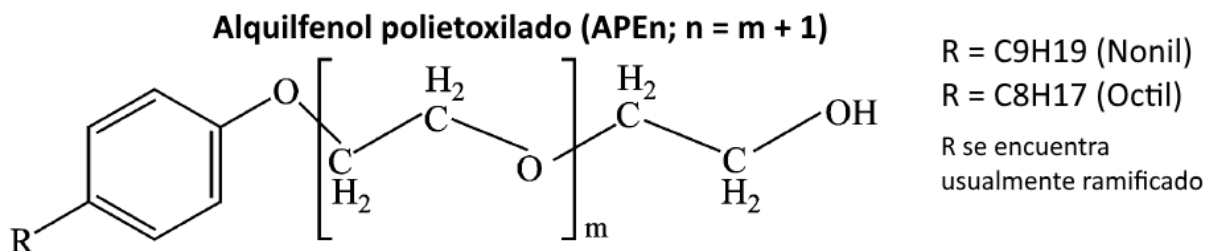
La principal clasificación de los surfactantes se basa en la carga que posee la parte hidrofílica de la molécula al disociarse en presencia de un electrolito: catiónica (con carga positiva, como las sales de amonio cuaternario por ej. cloruro de tetra alquil amonio), aniónica (con carga negativa, como el dodecilsulfato sódico o SDS y el alquil bencén sulfonato de sodio o ABS), no iónica (sin carga, como los alquifenol etoxilatos o APEs, alcoholes etoxilados, tiol etoxilatos terciarios y dietanol cocoamida) y anfótera (con cargas positivas y negativas, como los anfocarboxi-propionatos).



**Figura 25.** **A.** Esquema de una molécula anfótera de un estearato de sodio (jabón). **B.** Formación de una micela.

Los surfactantes no iónicos corresponden al segundo tipo de surfactantes con mayor producción mundial y, dentro de éstos, los APEs son los más ampliamente utilizados con fines tanto domésticos como industriales y son incorporados en formulaciones de detergentes, pesticidas, agentes dispersantes,

emulsificantes, espumantes, tinturas, cosméticos, espermicidas y otros productos (Jiménez-González *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2012; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006). Los más comunes en el mercado son los octilfenol etoxilatos (OPEs) y nonilfenol etoxilatos (NPEs), éstos últimos representan entre el 80 y 85% del volumen de APEs con una producción anual de 650.000 toneladas aproximadamente (Guenther *et al.*, 2002). Su estructura química se muestra en la **Figura 26**.

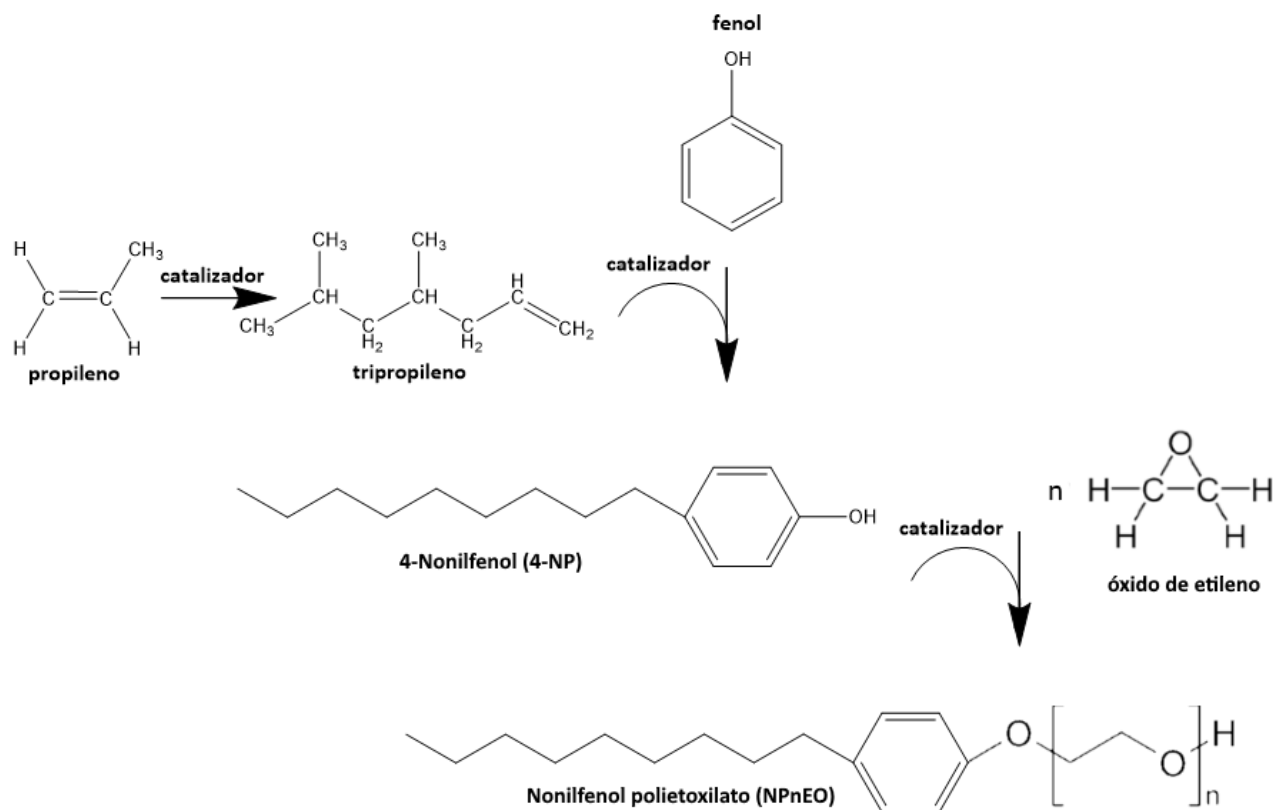


**Figura 26.** Estructura general de un alquilfenol etoxilado.

La parte no polar de la molécula corresponde al alquilfenol (AP), anillo fenólico al que se le adhiere un grupo alquilo de nueve carbonos, en el caso del nonilfenol (NP) y de ocho carbonos, en el caso del octilfenol (OP). La parte polar de la molécula corresponde a una cadena alquil éter o cadena etoxilada, la cual tiene un largo variable dado por el número de grupos etoxilos presentes, y que cuentan desde uno hasta cerca de cien. En general, cuánto más grupos etoxilos contiene, más hidrofílica es la molécula.

Para la generación de NPEOs, el NP debe ser sintetizado, lo cual involucra la alquilación de fenoles, resultando en una mezcla de isómeros NP, ya que el nonil puede estar adherido al fenol en diferentes posiciones del anillo, típicamente en posición *para* (4-NP). Asimismo, el nonil puede ser lineal o estar ramificado en una amplia variedad de configuraciones, cada una de las cuales representa un isómero de NP diferente. La forma comercial más común del NP es el denominado NP técnico, el cual consiste en una mezcla de hasta 22 isómeros 4-NP (Thiele *et al.*, 2004, 1997; Wheeler *et al.*, 1997). Este compuesto suele utilizarse también en experimentación y en el análisis de muestras ambientales (Bokern *et al.*, 1998; Ekelund *et al.*, 1993; Giger *et al.*, 1984; Sweetman, 1994). A su vez, la producción de NPEOs se realiza a partir de la reacción de polimerización entre el NP y el óxido de etileno (EO), con hidróxido de potasio o etanol como catalizadores. El grado de etoxilación y por ende, el largo de la molécula, depende de la relación molar entre el NP y el EO. Por ejemplo, para la producción de NP10EO, se utiliza una relación de 1 NP: 10 EO, lo que da por resultado la generación de una mezcla de nonilfenol

con distintos grados de etoxilación, los cuales siguen una distribución gaussiana y que en promedio presentan 10 etoxilaciones (**Figura 27**).

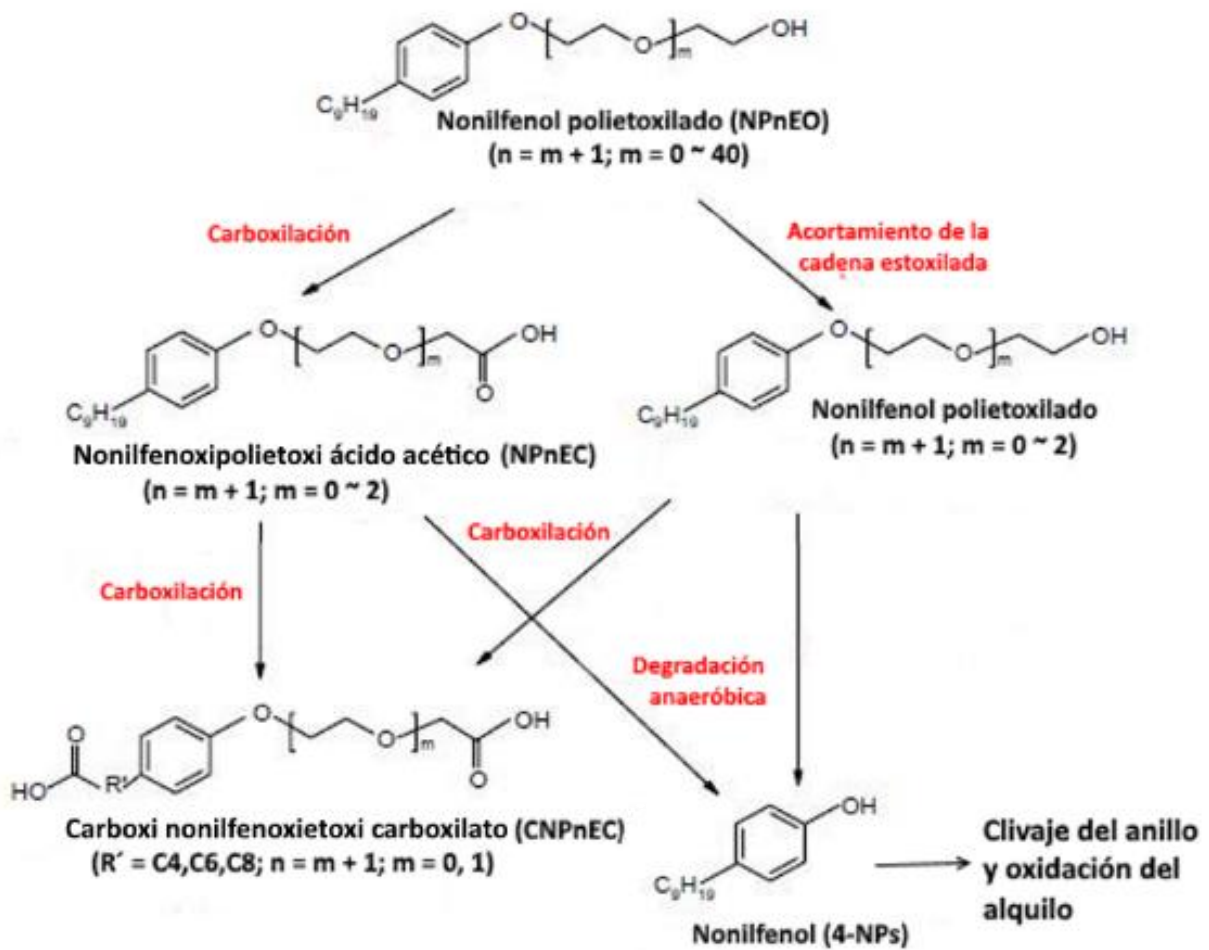


**Figura 27.** Síntesis de nonilfenol para la generación de nonilfenol polietoxilatos. Fuente: modificado de Vazquez-Duhalt *et al.* (2006).

Una vez que estos compuestos son utilizados, los NPEOs se descargan en plantas de tratamiento de aguas residuales o se liberan directamente al ambiente (Gabriel *et al.*, 2005; Langford *et al.*, 2005), donde generan grandes problemas de polución. Uno de los principales problemas deviene de la natural degradación biológica que sufren los APEs, en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, lo que resulta en una serie de transformaciones que acortan la cadena etoxilada, generando compuestos de cadena más corta, como los mono- o dietoxilatos (NP1EO y NP2EO), nonilfenoxi ácido acético (NP1EC), nonilfenoxietoxi ácido acético (NP2EC) y alquilfenoles, como el nonilfenol (**Figura 28**). Estos productos de degradación presentan una mayor toxicidad, hidrofobicidad y persistencia que los compuestos que los originaron. En general, la toxicidad aumenta conforme se reduce el número de grupos etoxilo (De Voogt *et al.*, 2000; Giger *et al.*, 1984; John y White, 1998; Toyooka *et al.*, 2012). Bajo



condiciones aeróbicas, el NPEO se acorta por eliminación secuencial de grupos etoxilados o bien, los grupos etoxilados, pueden carboxilarse. Al mismo tiempo, el grupo alquílico nonil puede carboxilarse dando lugar a compuestos doblemente carboxilados, los carboxi alquilfenoxietoxi carboxilatos, CAPECs. Bajo condiciones anaeróbicas, como las asociadas a la digestión en barros activados en plantas de tratamiento, el NP tiende a ser formado como producto final (Giger *et al.*, 1984).

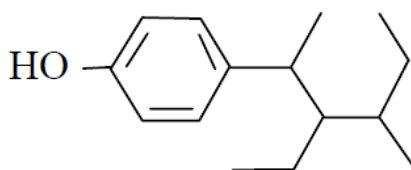


**Figura 28.** Vías de degradación de los NPnEOs. Fuente: adaptado de Ying *et al.* (2002).

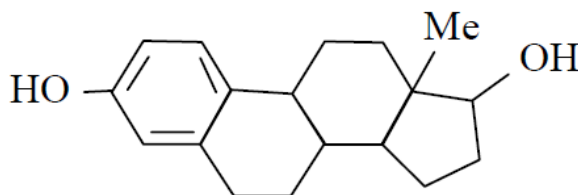
Los productos de degradación de los NPEOs, los NPEOs de cadena corta y el NP tienen una comprobada toxicidad intrínseca con efectos reportados en peces, anfibios, aves, mamíferos, invertebrados como crustáceos y moluscos, algas, levaduras y plantas (Frassinetti *et al.*, 2011; Rivero *et al.*, 2008; Sayed *et al.*, 2012). Además, al ser compuestos lipofílicos, los metabolitos tóxicos son bioacumulados en diferentes tejidos de organismos acuáticos (Ahel *et al.*, 1993; Vidal-Liñán *et al.*, 2015).

Las algas tienen mayor capacidad de acumulación y se ha reportado un factor de bioconcentración de NP de hasta 10.000. Por otro lado, estos compuestos son considerados disruptores endócrinos químicos (EDCs) debido a que son capaces de alterar el equilibrio hormonal, pudiendo interferir con las glándulas endócrinas y sus hormonas, así como con los órganos donde estas actúan (Mao *et al.*, 2012; Tanghe *et al.*, 1999). Los efectos estrogénicos, son inducidos debido a que el nonilfenol mimetiza la estructura que tienen las hormonas sexuales femeninas, los estrógenos (Gabriel *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 2003; **Figura 29**). Entre los efectos reportados se pueden mencionar la reducción en el número de espermatozoides, un aumento en el cáncer testicular y la feminización de especies acuáticas (John y White, 1998; Tanghe *et al.*, 1998).

#### 4- Nonilfenol



#### 17 $\beta$ Estradiol



**Figura 29.** Similitud estructural entre el NP y la hormona sexual estradiol.

Los nonilfenoles y nonilfenol etoxilados tienen un origen exclusivamente antrópico, por lo que se definen como compuestos xenobióticos (del griego ‘xenos’, extraño y ‘bio’, vida). Se consideran sustancias ubicuas en el ambiente. Se han encontrado en muestras de agua de numerosas localidades de todo el mundo (Blackburn y Waldock, 1995; Kuch y Ballschmiter, 2001; Rudel *et al.*, 1998), así como en una variedad de medios incluyendo sedimentos (Bennie *et al.*, 1997; Marcomini *et al.*, 1990), aire (Dachs *et al.*, 1999; Van Ry *et al.*, 2000), suelos (Chen *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 2010), organismos acuáticos (Ferrara *et al.*, 2005; Keith *et al.*, 2001; Lye *et al.*, 1999) y hasta comida humana (Guenther *et al.*, 2002). Generalmente, el NP y los NPEOs están presentes en bajas concentraciones en soluciones acuosas, con valores que abarcan desde lo indetectable hasta los 30  $\mu\text{g/L}$  y 330  $\mu\text{g/L}$  aprox., respectivamente (Di Corcia *et al.*, 2000; Giger *et al.*, 1984; Snyder *et al.*, 1999). Esto es esperable basado en su baja solubilidad

y su alta hidrofobicidad ( $\log K_{ow} NP = 4.48$ ). En cambio, los biosólidos y los sedimentos suelen mostrar mayores concentraciones. Las concentraciones de NP asociadas a los biosólidos se encuentran en el orden de los cientos de mg/kg hasta 1 g o más/kg (Giger *et al.*, 1984; Sekela *et al.*, 1999; Sweetman, 1994). En los suelos, el NP puede ser introducido por diferentes medios y actividades por ejemplo, a partir de la deposición atmosférica, debido a la aplicación de barros de desechos en la fertilización de suelos, por derrames accidentales, la utilización de herbicidas y pesticidas y en el relleno sanitario (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2002; Chen *et al.*, 2011; Dachs *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 2010). El lixiviado de esas fuentes terrestres constituye una vía adicional de ingreso de las sustancias al ambiente acuático (Scott y Jones, 2000).

Debido a la demostrada toxicidad, efecto estrogénico y persistencia de los productos de degradación de los NPEOs, sumado al uso extendido y a la frecuente detección de los mismos en el ambiente, su empleo ha sido prohibido o voluntariamente restringido. La directiva número 2003/53/EC prohíbe el uso de NP y NPEOs en toda la Unión Europea (European Commission, 2003). La agencia de protección ambiental de los Estados Unidos ha señalado un plan de acción específico para apoyar e incentivar la eliminación gradual voluntaria de los NPEOs en la industria de los detergentes (U.S. Environmental Protection Agency, 2010). Sin embargo, la demanda de los mismos en dicho país se encuentra actualmente en aumento, a una tasa del 2% anual (Vazquez-Duhalt *et al.*, 2006). Más preocupante es la situación en muchos otros países y específicamente en Latinoamérica, en donde el uso y la distribución de estos surfactantes se encuentra ampliamente extendida y no existe ningún tipo de prohibición o restricción (Soares *et al.*, 2008). Su incidencia en el ambiente en estos países se encuentra poco estudiada. Un número reducido de reportes muestra la presencia de compuestos parentales y sus metabolitos tóxicos en sistemas de barros activados y aguas de México (Belmont *et al.*, 2006; Gibson *et al.*, 2007) y Brasil (Araújo *et al.*, 2006; Fiedler *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2009). En Argentina, se han encontrado NP y NPEOs en muestras de agua (Babay *et al.*, 2008; Di Marzio *et al.*, 2005) y sedimentos (Romero-Ale *et al.*, 2009).

## 1.6. Hipótesis

- Las áreas forestales de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense son reservorio de una microbiota específica con representantes del phylum Basidiomycota claves en la descomposición de la lignocelulosa de la hojarasca disponible.

- Es posible aislar cepas silvestres de LDF saprótrofos que degradan *in-vitro* selectivamente la hojarasca según su fuente botánica de procedencia.

- Aislamientos específicos de LDF representan una fuente de sistemas enzimáticos extracelulares que pueden tener una aplicación en procesos tecnológicos sustentables implicados en la despolimerización de lignocelulosa y/o compuestos relacionados.

- Aislamientos de LDF seleccionados son eficientes degradadores de nonilfenol polietoxilado, un compuesto modelo de contaminantes emergentes, bajo diferentes condiciones de cultivo *in-vitro*.

## 1.7. Objetivos

### 1.7.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de los hongos saprótrofos basidiomicetes de hojarasca asociados a áreas forestales de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense y su rol en la transformación de hojas senescentes de diferente procedencia botánica y en la degradación de nonilfenol polietoxilado.

### 1.7.2. Objetivos específicos

- Relevar representantes LDF asociados a la hojarasca disponible en áreas forestales localizadas dentro de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense (Argentina).

- Aislar e identificar taxonómicamente los LDF a partir de basidiomas asociados al material de hojarasca bajo estudio.

- Evaluar mediante ensayos cualitativos en cultivos agarizados la actividad enzimática lignocelulolítica de los aislamientos obtenidos.

- Analizar la habilidad de aislamientos seleccionados para degradar hojas senescentes de *Celtis tala* y de *Ligustrum lucidum* bajo condiciones de fermentación en estado sólido y monitorear los cambios de diferentes parámetros fisicoquímicos y enzimáticos relacionados con la transformación fúngica del material vegetal.

- Evaluar la habilidad de aislamientos seleccionados para tolerar y degradar nonilfenol polietoxilado bajo diferentes condiciones de cultivo, y su relación con la producción de enzimas lignocelulolíticas.

## **CAPÍTULO 2**

**“Relevamiento de hongos basidiomicetes degradadores de hojarasca  
del Delta del Río Paraná y Ribera Platense:**

**Aislamiento, identificación y prospección de actividades enzimáticas”**

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos reconocidos por su participación en la transformación y degradación de materia orgánica presente en los ecosistemas terrestres a través de la producción de complejos enzimáticos extracelulares. Entre ellos, los basidiomicetes son los principales organismos responsables de la degradación de lignocelulosa (Kirk y Farrell, 1987) y particularmente, los hongos de pudrición blanca y los hongos de hojarasca son los únicos capaces de mineralizar eficientemente la lignina (Hatakka, 2001).

Las enzimas lignocelulolíticas de estos hongos además, tienen potencial aplicación en numerosos procesos industriales y biotecnológicos, entre los que se puede mencionar la degradación de una amplia variedad de compuestos xenobióticos (Grassi *et al.*, 2011; Pointing, 2001; Pointing *et al.*, 2005; Wesenberg *et al.*, 2003), la bioconversión de residuos forestales y agroindustriales para producir productos de valor como el bioetanol (Isroi *et al.*, 2011), el bioblanqueado y biopulpado en la industria papelera (Archibald *et al.*, 1997), la elaboración de panificados, la extracción de jugo de frutas y el aumento de la digestibilidad del alimento para ganado, entre muchísimas otras aplicaciones (Ja'afaru, 2013). En este sentido, la descripción de nuevos aislamientos a partir de fuentes naturales asociadas a una rica biodiversidad, pobremente explorada, puede revelar capacidades enzimáticas innovadoras que pueden resultar en una potencial aplicación tecnológica (Fonseca *et al.*, 2014; Levin *et al.*, 2004; Saparrat *et al.*, 2002).

Existe un creciente interés en el estudio de las enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos causantes de pudrición blanca, no sólo con el objetivo de incrementar el conocimiento acerca de los mecanismos involucrados en el proceso de degradación, sino con el objetivo de promover la búsqueda de mejores sistemas lignocelulolíticos para su aplicación con fines tecnológicos. Sin embargo, resulta escasa la información existente sobre la producción de oxidoreductasas por aislamientos autóctonos pertenecientes a otros taxones ecofisiológicos y taxonómicos (Dhouib *et al.*, 2005). Los basidiomicetes descomponedores de hojarasca (LDF) son considerados eficientes productores de las enzimas ligninolíticas lacasa y MnP (Baldrian y Šnajdr, 2006; Hofrichter, 2002) y secretan además enzimas hidrolíticas involucradas en la degradación de celulosa y hemicelulosa (Baldrian, 2008b). Por lo tanto, resultan de suma relevancia, nuevas investigaciones orientadas al estudio de los mecanismos implicados en la fisiología de la producción enzimática y las características de sus sistemas enzimáticos en este grupo de hongos.

La región del “Delta del Río Paraná y la Ribera Platense” llamada así en esta Tesis, es un fragmento de la Ecorregión Delta e Islas de los Ríos Paraná y Uruguay (Burkart *et al.* 1999). Comprende la porción

terminal de la cuenca del Plata, incluyendo el corredor fluvial y las planicies aluviales del tramo inferior del Río Paraná, así como el cauce y la franja de la ribera del Río de la Plata (Bo, 2005; Burkart *et al.*, 1999).

En su límite norte se encuentra el sur de la ciudad de Diamante (provincia de Entre Ríos) y hacia el sur, por la ribera platense hasta el Sur de la Bahía de Samborombón, el límite se encuentra en una línea imaginaria que divide la localidad de Punta Rasa, en la Argentina, con Punta del Este, en la República Oriental del Uruguay. Estrictamente incluye sólo el cauce del río pero, debido a su cercanía, posee una interacción mutua con la costa de los partidos de la provincia de Buenos Aires que lo bordean (Morello *et al.*, 2012).



**Figura 30.** Región del Delta del Río Paraná y Ribera Platense, indicando los sitios de muestreo que fueron considerados en la Tesis. Modificado de Bo (2005)

Esta región se considera un importante macrosistema de humedales con características ecológicas y biogeográficas únicas dentro de Argentina (Malvárez, 1999; Quintana *et al.*, 2002). Presenta una gran diversidad de especies (Kandus *et al.*, 2006; Quintana *et al.*, 2012; Ronchi-Virgolini *et al.*, 2010), la cual se asocia a la particular ubicación geográfica, a las características climáticas únicas y a la elevada heterogeneidad ambiental que presenta la región (Quintana *et al.*, 2002). El Río Paraná (y el Río Paraguay que hace a la Ecorregión del Delta), constituye un importante “corredor” es decir, una vía efectiva para la migración activa o pasiva de flora y fauna de linaje subtropical (especies de linaje paranaense) hacia zonas templadas (la región pampeana), permitiendo la coexistencia de especies típicas de ambas zonas. Aunque, dada la reciente génesis de la zona, se considera que no posee endemismos propios es decir, especies confinadas sólo a esta región (Burkart, 1957), existen escasos reportes que tratan sobre el estudio de los hongos en esta zona (Cabello y Arambarri, 2002; Quintana *et al.*, 2012; Romano *et al.*, 2013; Saparrat



*et al.*, 2008, 2000), y no se registran datos respecto de la producción de enzimas lignocelulolíticas en hongos descomponedores de hojarasca. Es por este motivo que la prospección de aislamientos fúngicos provenientes del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense, en cuanto a su rol en los procesos de descomposición y su capacidad de producir sistemas enzimáticos extracelulares de importancia tecnológica resulta atractiva. En la **Figura 30** se muestran los sitios de muestreo que se realizaron durante la Tesis y que comprenden al Parque Nacional Pre Delta, la Reserva Ciudad Universitaria y la Reserva Parque Pereyra Iraola.

Los ensayos cualitativos en placa constituyen una herramienta valiosa para detectar de forma rápida y sencilla cepas de hongos productoras de estas enzimas (Pointing, 1999; Saparrat *et al.*, 2000; Thurston, 1994). Una de las principales ventajas de esta metodología es que permite el análisis de un gran número de aislamientos para diferentes clases de enzimas en los que inicialmente no interesa una cuantificación de las mismas, reduciendo tiempo y costos frente a los ensayos cuantitativos. Aunque se han reportado limitaciones en estos métodos, especialmente de precisión (Ajijolakewu *et al.*, 2015; Takano *et al.*, 2001), tienen un importante rol en la selección primaria de microorganismos con potentes habilidades lignocelulolíticas para posteriormente analizar su producción enzimática en condiciones fisiológicas particulares.

## **2.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.2.1. Hipótesis**

Existen aislamientos específicos de hongos descomponedores de hojarasca (LDF) provenientes de áreas forestales de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense que presentan habilidades diferenciales para crecer sobre medios agarizados específicos y para producir enzimas extracelulares involucradas en la transformación de lignocelulosa.

### **2.2.2. Objetivos**

- Relevar representantes de LDF en áreas forestales localizadas dentro de la región del Delta del Río Paraná y Ribera Platense (Argentina).
  
- Obtener aislamientos de LDF a partir de la colección de basidiomas.
  
- Identificar mediante el análisis de los caracteres morfológicos y/o utilización de técnicas moleculares, los LDF coleccionados.
  
- Evaluar el crecimiento y la actividad enzimática lignocelulolítica de aislamientos de LDF cultivados sobre medios agarizados específicos.

## 2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1. Área de estudio y planificación de muestreos

Se realizaron salidas de muestreo dentro de la región del Delta del Río Paraná y Ribera Platense, con el fin de coleccionar basidiomas de hongos saprótrofos descomponedores de hojarasca (LDF) pertenecientes a la división Basidiomycota. Se registraron en todos los casos los respectivos datos de localidad, hábito y sustrato, además de las observaciones ecológicas pertinentes.

### 2.3.2. Aislamiento de cepas

Los organismos fueron aislados a partir de basidiomas que se encontraron creciendo en el área de estudio. Una porción de micelio de la parte interior del esporoma fue extraída en condiciones de esterilidad y transferida a cajas de Petri conteniendo 20 mL del medio de cultivo agarizado extracto de malta (MEA). Cuando los esporomas resultaron muy pequeños, el aislamiento se realizó por medio de la obtención de esporadas. Para ello, el estúpido de los esporomas fue cortado al ras del píleo y éste se mantuvo con cinta doble faz en la tapa de una caja de Petri conteniendo MEA durante 24 hs. aproximadamente, hasta que la esporada se observó a ojo desnudo. Se realizaron sucesivos repiques hasta la obtención del cultivo axénico. El término cepa se utiliza según la definición de “strain” que propone Kirk *et al.* (2008) y que está basada en Yoder *et al.* (1986), y refiere a un grupo de individuos clonalmente relacionados.

### 2.3.3. Mantenimiento de las cepas

Las cepas fueron mantenidas a 4°C, mediante resiembras periódicas, en tubos de ensayo en pico de flauta con medio MEA y a temperatura ambiente en agua destilada estéril. Las cepas aisladas se depositaron en el Cepario BAFCcult de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires bajo las siglas y numeración detalladas en la **Tabla 4**.

### 2.3.4. Identificación de las cepas

#### *Identificación morfológica*

- Estudio macroscópico: Los ejemplares fúngicos (basidiomas) colectados se fotografiaron con una cámara digital y se describieron macroscópicamente *in situ* según tamaño, forma, color, textura y

consistencia del basidioma. En el laboratorio, los ejemplares se secaron a 60°C por 24 hs y seguidamente se sometieron a un pasaje por freezer (-20°C) por 72 h con el fin de matar insectos asociados o larvas. Posteriormente, estos materiales se conservaron en sobres de papel debidamente rotulados y fueron depositados en el herbario micológico BAFC de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (Tabla 4). Para la descripción de los ejemplares, se tomaron en cuenta las siguientes características estructurales que fueron visualizadas con lupa estereoscópica (Leica MS5): caracteres del píleo (tamaño, forma, superficie, margen y rasgos del contexto), caracteres de las laminillas (forma de inserción al estípite, espaciamiento entre laminillas, grosor y color), caracteres del estípite (tamaño, superficie, adhesión al sustrato, presencia o ausencia de velo o anillo, presencia o ausencia de rizomorfos, etc).

- Estudio microscópico: Para la identificación microscópica, se realizaron cortes longitudinales a mano alzada de las diferentes partes de los basidiomas colectados y se montaron preparaciones temporales en soluciones de KOH al 3% y en Floxina al 1%. Los preparados fueron observados en un microscopio Olympus BX41. Sobre los preparados obtenidos se registraron datos morfológicos de importancia taxonómica tales como: presencia de fíbulas, morfología de los basidios, presencia y morfología de elementos estériles como cistidios y morfología de las esporas. Para la identificación de los ejemplares se utilizaron claves dicotómicas y literatura especializada.

- Validación de nomenclatura: Para la validación de la sinonimia y nomenclatura de los taxones estudiados se consultó vía on-line el Index Fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)).

#### *Identificación molecular*

- Extracción de DNA genómico y amplificación de la región ITS: La identidad de los aislamientos obtenidos se confirmó por la amplificación de la región ITS (ITS1-5,8S- ITS2) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y su secuenciación utilizando DNA genómico como molde. Para ello, los organismos fueron previamente crecidos en MEA a 25°C en oscuridad hasta cubrir la caja y posteriormente, el micelio se utilizó como material de partida para la extracción de DNA. En los casos en el que el micelio no pudo ser desprendido fácilmente de las cajas de Petri por crecer inmerso en el medio agarizado, el micelio fue tomado a partir de cultivos realizados en medio líquido extracto de malta (ME). Por último, cuando los cultivos líquidos tampoco resultaron favorables, generalmente por la presencia de lipopolisacáridos que interfirieron en la extracción, este paso se hizo a partir de una porción

del pseudotejido de los esporomas secos. En todos los casos se utilizó el kit “UltraClean Microbial DNA Isolation” (MO BIO-USA), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las reacciones de amplificación del DNA utilizaron los cebadores o primers universales específicos de hongos para la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del DNA ribosomal (**Tabla 3**):

**Tabla 3.** Primers utilizados para la amplificación de las regiones del DNAr ITS y 5,8S de los aislamientos fúngicos.

Primer	Secuencia	Referencia	Marca
ITS1 (forward)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	White <i>et al.</i> (1990)	Invitrogen
ITS4 (reverse)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'	White <i>et al.</i> (1990)	Invitrogen

Los parámetros empleados para los ciclos de PCR fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min., seguidos de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 seg., alineamiento a 55°C por 45 seg. y extensión a 72°C por 1 min., con una extensión final a 72°C durante 7 min.

- Separación electroforética y purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa: Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% p/v en buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA). Posteriormente, fueron purificados utilizando el kit “Charge Switch-Pro PCR Cleanup” (Invitrogen). La cuantificación del DNA se realizó con el kit “Qubit” (Life technologies).

- Secuenciamiento de los productos de amplificación y análisis *in silico* de las secuencias: La secuenciación fue llevada a cabo por el servicio de secuenciación del departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) utilizando los mismos primers que en la PCR. Las secuencias obtenidas se editaron mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5 (Hall, 1999) para ser analizadas utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se compararon con secuencias homólogas presentes en la base de datos de NCBI-GenBank (National Centre for Biotechnology Information) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Para la asignación taxonómica a nivel de especie se consideraron aquellas entidades taxonómicas que presentaron los mayores porcentajes de homología (> 97%) y que se encontraban publicadas en revistas reconocidas internacionalmente.

### 2.3.5. Inóculos

Para la preparación del inóculo, se extrajo con sacabocados un taco de agar cubierto con micelio de 9 mm de diámetro del borde de una colonia en activo crecimiento en el medio indicado en cada caso.

### **2.3.6. Temperatura óptima de crecimiento**

Las cepas fueron inoculadas en el centro de placas de Petri conteniendo 20 mL de medio MEA y se incubaron en oscuridad durante 30 días a las siguientes temperaturas: 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 28°C, 33°C y 37°C. Se realizaron mediciones diarias del diámetro de la colonia con calibre y a los 10 días de cultivo, cuando la fase de crecimiento fue lineal, se calculó el porcentaje de crecimiento como: diámetro de crecimiento de la colonia/ diámetro de la caja de Petri\* 100%. Se tomaron dos mediciones por caja y las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **2.3.7. Velocidad de crecimiento en MEA**

Las cepas aisladas fueron sembradas en el centro de placas de Petri conteniendo 20 mL de medio MEA e incubadas a 25°C en oscuridad durante 20 días. Se realizaron mediciones diarias del diámetro de la colonia con calibre y se calculó la velocidad de crecimiento (mm/día) a partir de la fase de crecimiento lineal. Se tomaron dos mediciones por caja y las determinaciones se realizaron por duplicado.

### **2.3.8. Bioprospección de enzimas extracelulares**

Las cepas aisladas fueron sometidas a los ensayos cualitativos para la detección de enzimas lignocelulolíticas. Para ello, se dispusieron 20 mL del medio de cultivo selectivo en placas de Petri de 90 mm y en el centro de la misma se sembró el inóculo. Los cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad. Se realizaron mediciones diarias del diámetro de crecimiento de la colonia y en la fase de crecimiento lineal, se calcularon las velocidades de crecimiento (mm/día). A su vez, se midieron los halos de actividad en los distintos medios y se calcularon las velocidades de producción enzimática en los distintos sustratos específicos (mm/día). En el caso de los ensayos para lacasa y MnP, el halo se observó como un precipitado que se fue registrando diariamente. En el resto de los ensayos, cuando la colonia alcanzó aproximadamente la mitad de la placa, se realizó el revelado de cada una de las actividades que se describen a continuación (métodos destructivos). Se calculó el índice enzimático (E) para cada aislamiento como el cociente entre el halo de actividad y el halo de crecimiento en el mismo medio (Fernandes *et al.*, 2012). Se tomaron dos mediciones por caja y las determinaciones se realizaron por duplicado.

### *Celulasas*

Para la detección de celulasas (endoglucanasas) se utilizó medio de cultivo agarizado (Asparagina 4 g/L; Agar 20 g/L; Medio Basal 1 L), adicionado con carboximetilcelulosa (CMC) 0,1 % como principal fuente de carbono. La presencia del polisacárido residual en el medio se reveló con el colorante azoico Rojo Congo y la actividad celulolítica se detectó como un halo decolorado alrededor de la colonia. Para ello, se inundó la caja con solución de Rojo Congo 0,3% y luego de 10 min, se volcó el colorante y se lavó el exceso con solución de NaCl 1 N (Magnelli y Forchiassin, 1999). Cuando fue necesario, se realizó un lavado con ácido acético al 5% para aumentar el contraste (Hankin y Anagnostakis, 1977).

### *Hemicelulasas*

El método de detección de xilanasas se realizó de la misma manera que para las celulasas excepto que el medio de cultivo fue adicionado con xilano 0,1% como fuente principal de carbono en lugar de CMC.

### *Ligninasas*

Para detectar la presencia de actividad lacasa se utilizó como medio de cultivo MEA adicionado con 2,6-dimetoxifenol (DMP) 1 mM. Las cepas que exhibieron actividad lacasa se evidenciaron por la formación de un halo de precipitado color amarillo alrededor de la colonia, producto de la oxidación del DMP (Fonseca *et al.*, 2010).

Para detectar la presencia de actividad MnP se utilizó MEA como medio de cultivo adicionado con cloruro de manganeso ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 1 mM. La actividad positiva para MnP se evidenció por la formación de un halo de precipitado color marrón oscuro producto de la oxidación del manganeso a óxido de manganeso ( $\text{MnO}_2$ ; Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2002).

## **2.3.9. Análisis estadístico**

Todos los resultados presentados corresponden a las medias obtenidas a partir de duplicados con una desviación estándar menor al 5%. Las diferencias entre las cepas para las velocidades de crecimiento, velocidades de producción enzimática e índices de eficiencia se pusieron a prueba mediante un test de ANOVA de una vía y fueron comparadas con la prueba post hoc de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC; Di Rienzo *et al.*, 2002) con un nivel de significancia del 5%. La asociación lineal entre las variables anteriormente mencionadas se evaluó calculando los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ) y las

probabilidades asociadas a la prueba de hipótesis de correlación nula entre variables. El análisis estadístico se realizó utilizando los software estadísticos STATISTICA 7.0 e INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013).



## 2.4. RESULTADOS

### 2.4.1. Relevamiento de LDF en áreas forestales de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense

Se realizaron salidas de muestreo durante el periodo 2012-2016 en la región del Delta del Río Paraná y Ribera Platense (Argentina), con el fin de coleccionar basidiomas de hongos descomponedores de hojarasca (LDF) pertenecientes a la división Basidiomycota. Las muestras recolectadas se identificaron morfológicamente. En la **Tabla 4** se listan los taxones que pudieron aislarse con éxito. Adicionalmente, 3 aislamientos anteriores a este trabajo, procedentes del cepario BAFC y que fueron aislados en zonas aledañas a la ecorregión de estudio, fueron caracterizados e incluidos en los ensayos, dando un total de 19 aislamientos con los que se trabajó a lo largo de la Tesis.

**Tabla 4.** LDF colectados en la región del Delta del Río Paraná y Ribera Platense y utilizados en la Tesis.

Taxón	Familia	Región Colecta	Núm.de Cepario (BAFCcult)	Núm.de Herbario (BAFC)
<i>Agaricus sp.*</i>	Agaricaceae	P.N. PreDelta, Entre Ríos	4557	52449
<i>Agrocybe aegerita*</i>	Strophariaceae	R.N. Ciudad Universitaria, Bs. As.	4548	-
<i>Calvatia sp.*</i>	Agaricaceae	P.N. PreDelta, Entre Ríos	4549	52629
<i>Coprinus comatus*</i>	Agaricaceae	R.N. Ciudad Universitaria, Bs. As.	4547	52645
<i>Gymnopus luxurians**</i>	Omphalotaceae	R.N. Santa Catalina, Bs. As.	2013	-
<i>Hypholoma fasciculare*</i>	Strophariaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4546	-
<i>Lepista nuda*</i>	Tricholomataceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4543	52651
<i>Leratiomyces ceres*</i>	Strophariaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4533	-
<i>Leucoagaricus sp.**</i>	Agaricaceae	Escobar, Bs. As.	2977	-
<i>Lycoperdon perlatum*</i>	Agaricaceae	P.N. PreDelta, Entre Ríos	-	52536
<i>Marasmiellus candidus*</i>	Omphalotaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4532	52648
<i>Marasmius haematocephalus*</i>	Marasmiaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4531	52646
<i>Marasmius oreades*</i>	Marasmiaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4558	52649
<i>Mycena sp. 1*</i>	Mycenaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4544	52650
<i>Mycena sp. 2*</i>	Mycenaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4545	52647
<i>Mycena sp. 3*</i>	Mycenaceae	R.N. Pereyra Iraola, Bs. As.	4559	52652
<i>Rhodocollybia pandipes 1*</i>	Omphalotaceae	P.N. PreDelta, Entre Ríos	4550	52630
<i>Rhodocollybia pandipes 2*</i>	Omphalotaceae	P.N. PreDelta, Entre Ríos	4551	52631
<i>Xerocomellus chrysenteron**</i>	Boletaceae	Vicente López, Bs. As.	1760	51513

\* Aislamientos realizados en esta Tesis

\*\* Aislamientos solicitados al BAFCcult

La identidad de la mayoría de los aislamientos fue corroborada con los resultados de los datos de secuenciación de la región ITS correspondiente (**Tabla 5**). Como excepción encontramos a *Leucoagaricus sp.* y *X. chrysenteron*, que crecieron totalmente inmersos en el medio de cultivo por lo que no pudo separarse el micelio para la extracción del DNA y, al ser solicitados al BAFC, tampoco presentaban material herborizado. Se trata de 18 aislamientos pertenecientes al grupo Agaricales, miembros de 6 familias distintas y 1 aislamiento que pertenece al grupo Boletales. Este último es *X. chrysenteron* (BAFC 1760), el cual es un hongo ectomicorrízico (ECM) que fue incorporado al estudio ya que es también un basidiomicete que se encuentra relacionado al ambiente de la hojarasca pero que no se considera como un degradador eficiente de lignina. Por lo tanto, resulta de utilidad como control negativo de actividad y para el análisis del rol de las enzimas ligninolíticas de los LDF en los procesos de degradación de restos vegetales y nonilfenol etoxilado.

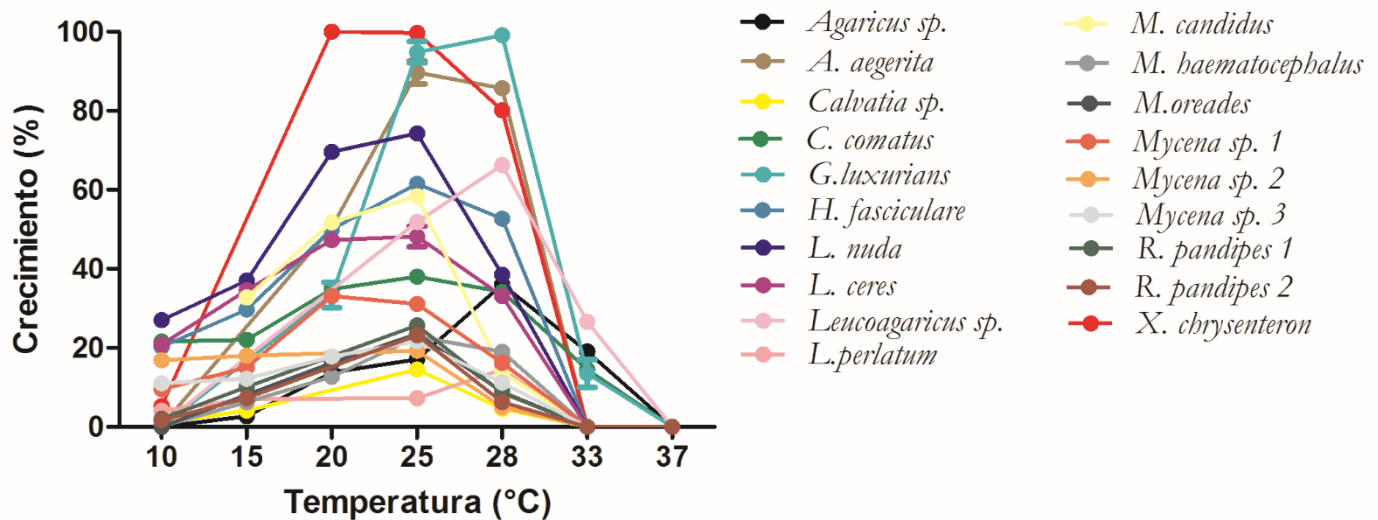
**Tabla 5.** Identificación molecular mediante ITS de los aislamientos obtenidos

<b>Taxón</b>	<b>% Cobertura</b>	<b>Valor E</b>	<b>% Identidad</b>	<b>Número de acceso Genbank</b>
<i>Agaricus sp.</i>	95	0,0	98	KY366488
<i>Agrocybe aegerita</i>	98	0,0	100	KY366489
<i>Calvatia sp.</i>	100	0,0	92	KY366490
<i>Coprinus comatus</i>	100	0,0	98	KY366491
<i>Gymnopus luxurians</i>	100	0,0	99	KY366492
<i>Hypholoma fasciculare</i>	96	0,0	99	KY366493
<i>Lepista nuda</i>	98	0,0	99	KY366494
<i>Leratiomyces ceres</i>	100	0,0	100	KX423791
<i>Leucoagaricus sp.</i>	ND	ND	ND	ND
<i>Lycoperdon perlatum</i>	99	0,0	93	KY579813
<i>Marasmiellus candidus</i>	99	0,0	93	KX423793
<i>Marasmius haematocephalus</i>	99	0,0	95	KX423792
<i>Marasmius oreades</i>	97	0,0	100	KY366495
<i>Mycena sp. 1</i>	100	0,0	100	KY366496
<i>Mycena sp. 2</i>	99	0,0	99	KY366497
<i>Mycena sp. 3</i>	98	0,0	99	KY366498
<i>Rhodocollybia pandipes 1</i>	98	0,0	99	KY366499
<i>Rhodocollybia pandipes 2</i>	99	0,0	97	KY366500
<i>Xerocomellus chrysenteron</i>	ND	ND	ND	ND

ND: No determinado

### 2.4.2. Temperatura óptima de crecimiento

La mayoría de los hongos estudiados presentó una temperatura óptima de crecimiento a 25°C, con la excepción de *A. aegerita*, *G. luxurians* y *L. perlatum* que tuvieron su óptimo a 28°C (**Figura 31**). Por este motivo, en los subsiguientes ensayos se estableció en 25°C la temperatura de incubación de los experimentos. El rango de crecimiento fue similar para todas las especies, con una temperatura máxima registrada a 28°C en la mayoría de los casos y a 33°C sólo para las cepas de *Agaricus sp.*, *C. comatus*, *G. luxurians* y *Leucoagaricus sp.* A 37°C ninguna cepa fue capaz de crecer. La temperatura mínima de crecimiento se encontró por debajo de los 10°C, excepto para *Agaricus sp.* que presentó una inhibición total del crecimiento a dicha temperatura.

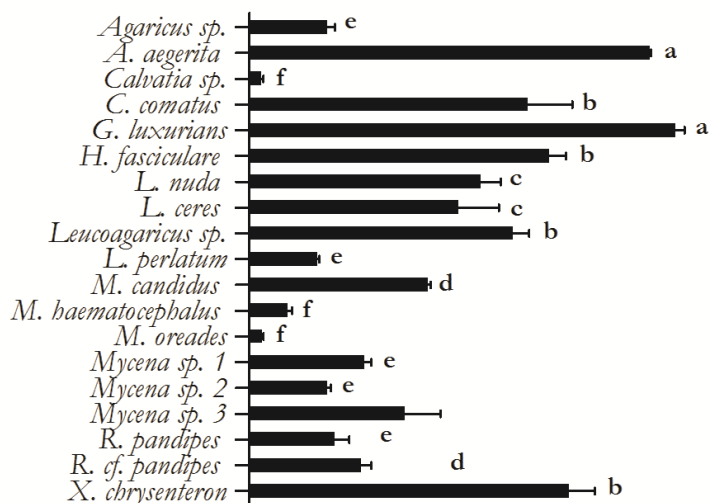


**Figura 31.** Rango de temperatura y temperatura óptima de crecimiento de las especies de hongos LDF aisladas en la región del Delta del Paraná y Ribera Platense.

### 2.4.3. Ensayos cualitativos para la detección de enzimas extracelulares

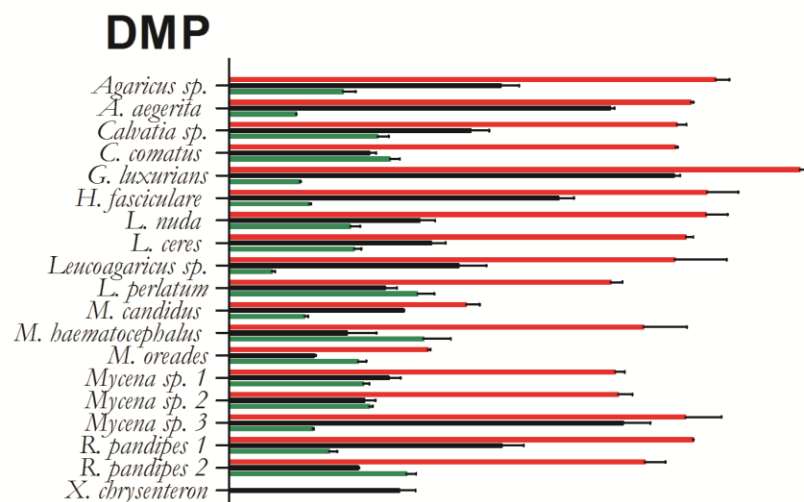
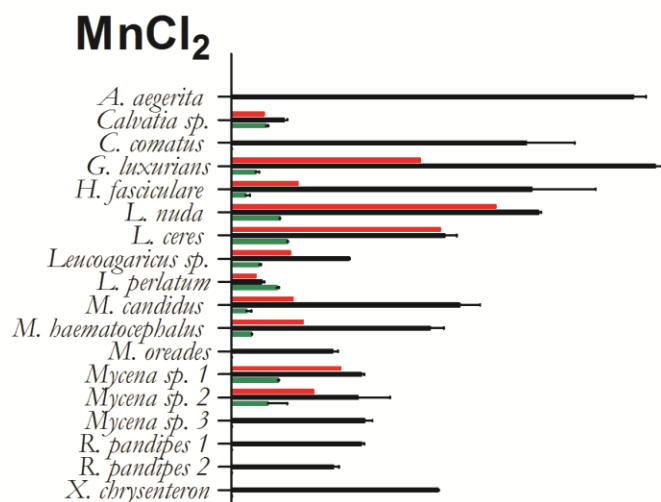
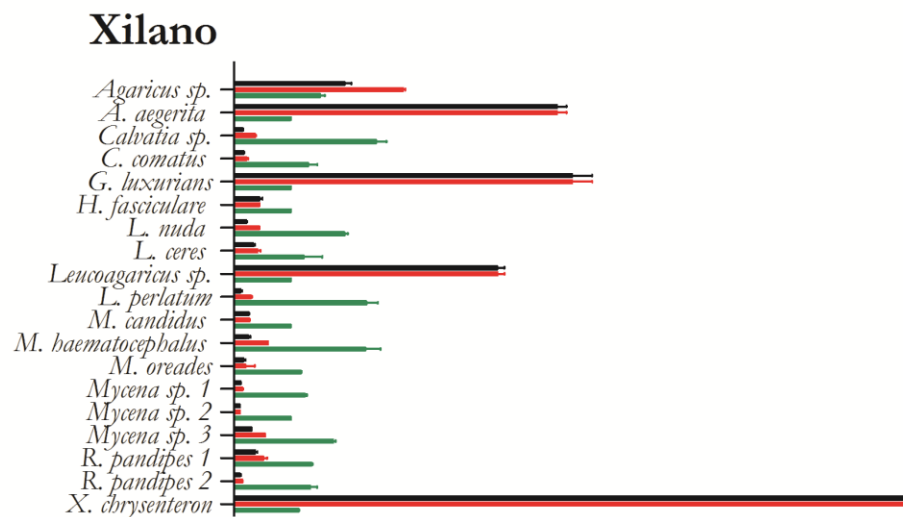
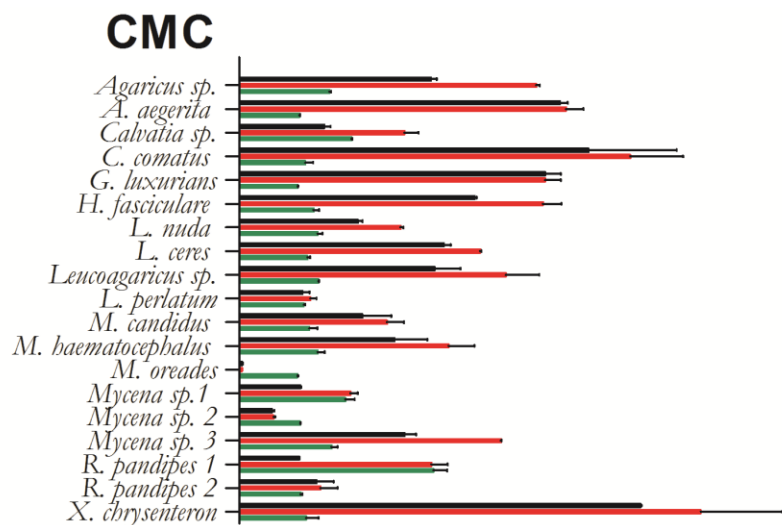
Se realizó una bioprospección de la capacidad que tienen los aislamientos de LDF relevados de la región Delta del Río Paraná y Ribera Platense para producir ligninasas (lacasa y MnP), xilanasas y celulasas en test en placa. Se determinaron las velocidades de crecimiento (mm/día) de cada uno de los aislamientos fúngicos en medio MEA y en los distintos medios selectivos ensayados. También, se valoró la producción enzimática medida como diámetro del halo de actividad (mm/día). Por último, se calcularon los índices enzimáticos (E) en cada medio selectivo como el cociente entre el diámetro de crecimiento radial y el diámetro del halo de actividad.

La mayor velocidad de crecimiento en MEA se registró en las cepas *A. aegerita* y *G. luxurians*, seguida por las cepas *X. chrysenteron*, *C.comatus*, *H. fasciculare* y *Leucoagaricus sp.* En el otro extremo, *Calvatia sp.*, *M. oreades* y *M. haematocephalus* fueron las cepas de crecimiento más lento (**Figura 32**).



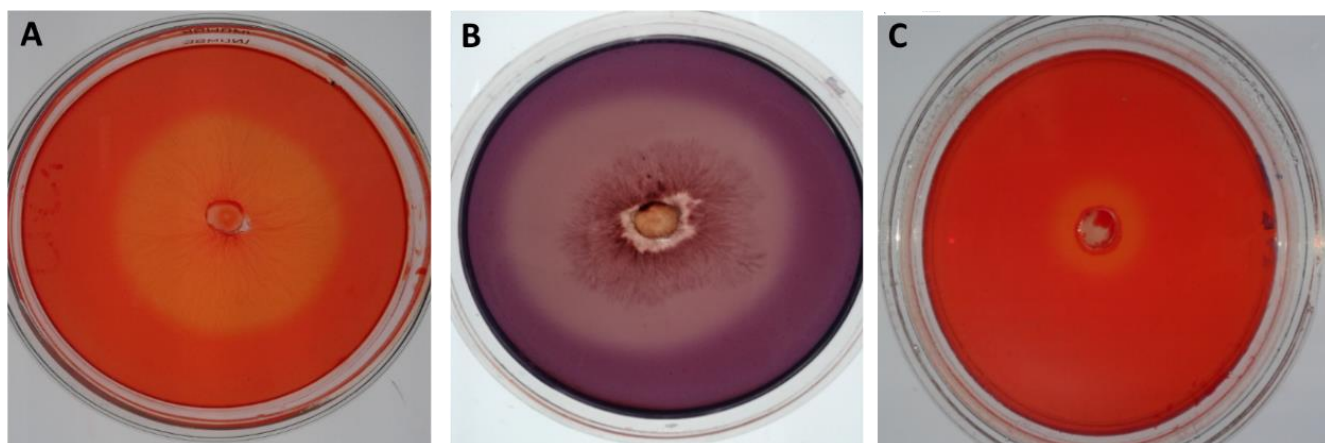
**Figura 32.** Velocidades de crecimiento (mm/día) en medio MEA de los hongos estudiados. Las diferentes letras indican diferencias significativas a partir de comparaciones post hoc DGC ( $P < 0,05$ ). Los valores representan la media de dos réplicas  $\pm$  el desvío estándar.

Cuando las cepas crecieron en el medio con CMC como principal fuente de carbono, el patrón de crecimiento anteriormente señalado se modificó ligeramente (**Figura 33**). En este caso, la cepa con mayor velocidad de crecimiento fue *X. chrysenteron*, ocupando el segundo lugar las cepas *G. luxurians*, *C. comatus* y *A. aegerita*. En el 84,2% de las cepas ensayadas se registró presencia de halo de hidrólisis de CMC, lo cual sugiere actividad extracelular celulasa, principalmente endoglucanasa (ya que parte de la hidrólisis puede deberse a la acción sinérgica con el resto de celulasas). Entre ellas, *X. chrysenteron* fue la cepa que presentó una mayor velocidad de producción enzimática, seguida por *C. comatus*. En cuanto a los índices de eficiencia celulolítica (E), *R. pandipes 1* fue la cepa que presentó los valores más altos ( $3,33 \pm 0,24$ ), seguida por *Calvatia sp.* ( $1,93 \pm 0,01$ ) y *Mycena sp. 2* ( $1,82 \pm 0,16$ ). Las cepas de menor eficiencia fueron *X. chrysenteron*, *G. luxurians*, *C. comatus* y *A. aegerita*, entre otras, contrariamente a lo hallado en los valores de velocidad de crecimiento para el mismo sustrato (**Figura 33**; **Figura 34**). Esto se condice con una asociación lineal negativa entre el índice de eficiencia para celulasas y la velocidad de crecimiento en el mismo medio ( $r = -0,31$ ;  $P = 0,05$ ).



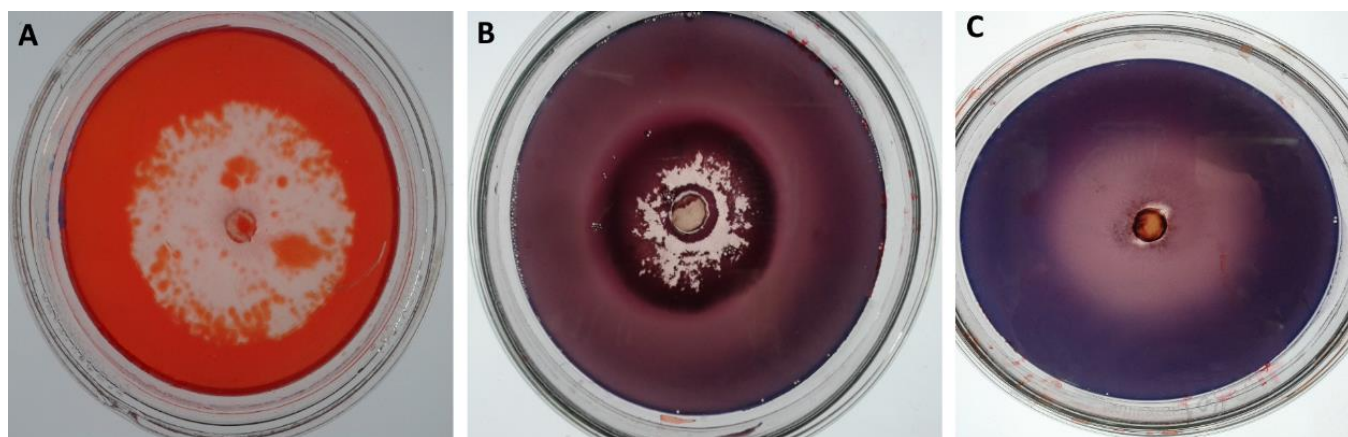
Veloc. crecimiento    
  Veloc. producción enzimática    
  Índice enzimático (E)

**Figura 33.** Velocidad de crecimiento (mm/día), velocidad de producción enzimática (mm/día) e índices enzimáticos (diámetro del halo de actividad/diámetro de crecimiento radial) de los hongos ensayados en los distintos medios para la detección de enzimas lignocelulolíticas. Los valores representan la media de dos réplicas  $\pm$  el desvío estándar.



**Figura 34.** Ensayo cualitativo en CMC para detección de celulasas. A) *G. luxurians*, una de las cepas que presentó mayor velocidad de crecimiento y menor índice de eficiencia B) *Agaricus sp.*, cepa de velocidad de crecimiento y eficiencia intermedia (con ácido acético para aumentar el contraste). C) *Mycena sp. 1*, cepa de lento crecimiento y alta eficiencia.

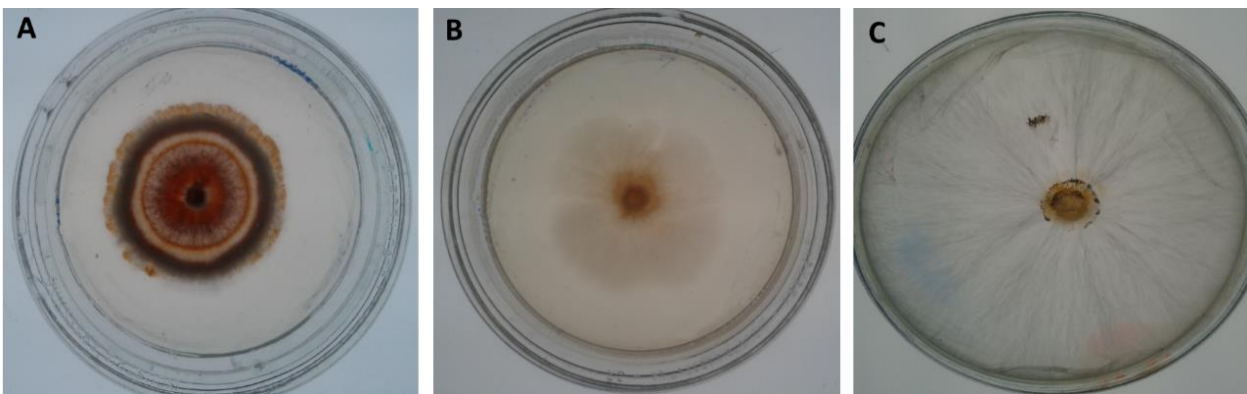
En el caso del medio adicionado con xilano, otra vez *X. chrysenteron* se destacó por su velocidad de crecimiento ( $11,82 \pm 0,45$  mm/día). Casi la mitad de esta velocidad registraron las cepas *G. luxurians*, *A. aegerita* y *Lencoagaricus sp.*, mientras que el crecimiento del resto de las cepas fue muy lento comparado con las anteriormente mencionadas. Estas cepas son también las que presentaron las mayores velocidades de producción enzimática. Al igual que sucedió para las celulasas, las cepas que presentaron mayores tasas de crecimiento resultaron ser las menos eficientes en la producción de enzimas xilanolíticas, mientras que las más eficientes fueron las de crecimiento más lento ( $r = -0,36$ ;  $P = 0,03$ ) (**Figura 33**; **Figura 35**).



**Figura 35.** Ensayo cualitativo en xilano para detección de xilanasas. A) *A. aegerita*, una de las cepas que presentó mayor velocidad de crecimiento y menor índice E. B) *R. pandipes 1*, cepa de crecimiento y producción intermedia (con ácido acético). C) *Calvatia sp.*, cepa con lento crecimiento y alta producción.



En el medio para la detección de MnP, las cepas *G. luxurians* y *A. aegerita* fueron las que presentaron mayor velocidad de crecimiento, seguidas por las cepas *C. comatus*, *H. fasciculare* y *L. nuda*. Por el contrario, *L. perlatum* y *Calvatia sp.* tuvieron un crecimiento muy lento. *Agaricus sp.* no presentó ningún tipo de desarrollo micelial por lo que el medio utilizado pudo haber tenido un efecto tóxico o inhibitorio sobre el hongo y no puede descartarse la producción de MnP en otras condiciones. Por otro lado, encontramos que sólo el 58% de los aislamientos fue capaz de precipitar el  $Mn^{2+}$  y en todos los casos, el halo de precipitado nunca superó el halo de crecimiento. Las velocidades de producción enzimática fueron mayores para *L. nuda*, seguido de *G. luxurians* y *L. ceres*, mientras que la mayor eficiencia de actividad MnP se registró con *L. ceres*, con un valor igual a 1. Para este medio, la velocidad de crecimiento fue independiente del índice de eficiencia de producción enzimática ( $P = 0,88$ ) (**Figura 32; Figura 36**).

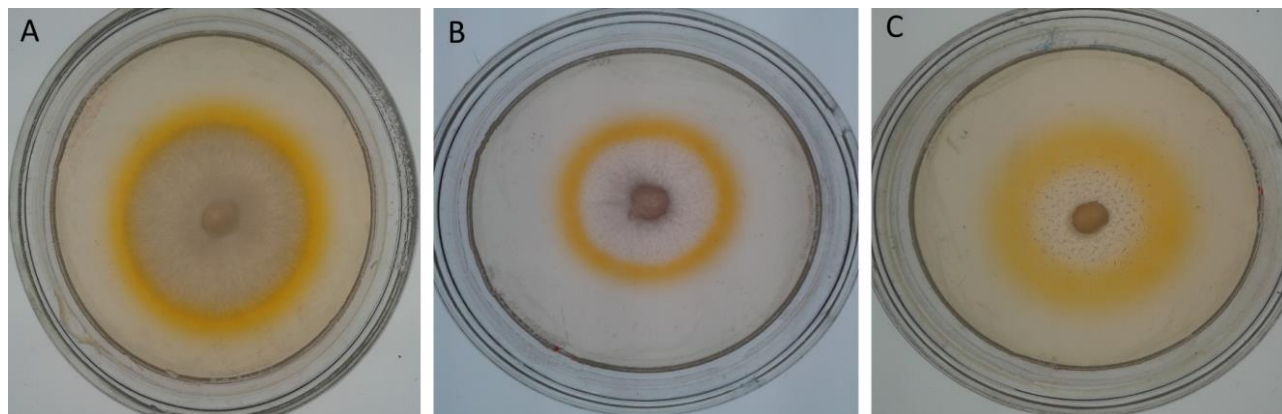


**Figura 36.** Ensayo cualitativo para detección de MnP. A) *L. ceres*, cepa con la mayor eficiencia. B) *M. haematocephalus*, cepa de eficiencia intermedia. C) *H. fasciculare*, otra cepa de eficiencia intermedia. En este medio, la velocidad de crecimiento resultó independiente de la eficiencia ( $P < 0,01$ ).

En el medio adicionado con DMP, *G. luxurians* fue la cepa que presentó la mayor tasa de crecimiento, seguida por *A. aegerita*. La cepa que menos creció fue *M. oreades*. Por otro lado, en todas las cepas, excepto *X. chrysenteron*, se detectó un halo de precipitado como consecuencia de la oxidación del sustrato vía enzimas tipo-lacasa.

En todos los casos el diámetro del halo de oxidación de DMP resultó mayor que el diámetro de crecimiento de la colonia. *R. pandipes 1* ( $3,20 \pm 0,18$ ) y *M. haematocephalus* ( $3,51 \pm 0,50$ ) fueron las más eficientes en la producción de lacasas. Como se observó para las celulasas y xilanasas, existió una fuerte relación lineal negativa entre velocidad de crecimiento e índice enzimático ( $r = -0,52$ ;  $P < 0,001$ ) (**Figura**

33; **Figura 37**). En la **tabla 6** se resumen las cepas que presentaron las mayores velocidades de crecimiento en MEA y producción enzimática.



**Figura 37.** Ensayo cualitativo en DMP para detección de lacasas. A) *A. aegerita*, cepa con alto crecimiento y baja eficiencia de producción. B) *M. candidus*, cepa de crecimiento y eficiencia intermedios. C) *R. pandipes 2*, cepa de poco crecimiento y alta eficiencia.

**Tabla 6.** Cepas que registraron las mayores velocidades de crecimiento en MEA y velocidades de producción enzimática en placa\*

Taxón	MEA	CMC	Xilano	MnCl <sub>2</sub>	DMP
<i>A. aegerita</i>	+++	+	++		++
<i>G. luxurians</i>	+++	+	++	++	+++
<i>H. fasciculare</i>	++	+		+	++
<i>L. ceres</i>	++	+		++	++
<i>Leucoagaricus sp.</i>	++	+	+	+	++
<i>X. chrysenteron</i>	++	+++	+++		

\* Los signos se adjudicaron a las cepas que presentaron los mayores valores para los distintos tratamientos en el test de Anova. El +++ equivale a una “a” en las comparaciones post hoc DGC, el ++ a una “b” y el + a una “c”. Las cepas con diferencias significativas distintas y menores a “c” no fueron computadas.



## 2.5. DISCUSIÓN

Representantes de los géneros *Agaricus*, *Agrocybe*, *Calvatia*, *Coprinus*, *Gymnopus*, *Hypholoma*, *Lepista*, *Leratiomyces*, *Leucoagaricus*, *Lycoperdon*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Mycena*, *Rhodocollybia* y *Xerocomellus*, fructifican en asociación al mantillo forestal del Delta del Río Paraná y Ribera platense (**Tabla 4**). Todos los taxones estudiados presentan una distribución cosmopolita, creciendo asociados a hojarasca de distintas regiones del mundo.

El crecimiento *in-vitro* de los hongos aislados a partir de los basidiomas desarrollados sobre mantillo del Delta del Río Paraná y Ribera platense fue diferente y estuvo condicionado por factores externos como la temperatura y la composición del medio de cultivo.

La temperatura es un importante factor físico externo que afecta casi todas las funciones de los organismos y condiciona el nicho ecológico que los mismos ocupan (Hudson, 1986). La respuesta de un hongo a las diferentes temperaturas representa el efecto combinado de numerosas reacciones químicas (como las enzimáticas), cada una de las cuales presenta una relación característica a la temperatura (Rayner y Boddy, 1988). De acuerdo al óptimo de temperatura de crecimiento de los hongos ensayados (25°C-28°C), así como sus temperaturas mínimas y máximas, se concluye que todos los hongos de hojarasca con los que se trabajó presentan un perfil de temperatura mesotérmico, resultados esperados para especies provenientes de regiones templadas (**Figura 31**; Griffin, 1994).

Por otro lado, las tasas de crecimiento del micelio fúngico dependieron del tipo de medio empleado así como de las cepas fúngicas (**Figura 32**, **Figura 33**; Bilay *et al.*, 2000). Al analizar el grado de asociación lineal entre las velocidades de crecimiento para el medio MEA y los medios específicos para las distintas actividades enzimáticas, se encontró que existió una fuerte asociación positiva en todos los casos ( $P \leq 0,01$ ). Así, la capacidad de invasión de un medio de cultivo estaría determinada por la naturaleza del hongo. En general, las cepas LDF con mayor velocidad de crecimiento en los distintos medios resultaron siempre *G. luxurians* y *A. aegerita*.

Muchos de los taxones con los que se trabajó durante la Tesis han sido reportados con actividad de blanqueamiento del sustrato en campo, por ejemplo especies de *Marasmius* y *Mycena* (Hintikka, 1970), dos géneros de LDF basidiomicetes saprótrofos ampliamente estudiados. A su vez, otros trabajos dan información sobre la producción de enzimas ligninolíticas lacasa y MnP en condiciones de laboratorio por distintos aislamientos pertenecientes a los géneros de *Agaricus*, *Hypholoma*, *Marasmius* y *Mycena*, y también en *Coprinus comatus*, *Lepista nuda* y *Agrocybe aegerita* (Gramss *et al.*, 1998; Liers *et al.*, 2011; Soponsathien, 1998; Steffen *et al.*, 2000). Por otro lado, la capacidad para degradar la lignina presente en

hojarasca se demostró en *Agaricus sp.* y *Marasmius sp.* (Miyamoto, 2000; Osono *et al.*, 2006), mientras que la capacidad de mineralizarla en *Agrocybe sp.* La degradación de compuestos relacionados como los ácidos húmicos a partir de cultivos de hojarasca, se describió en *Gymnopus sp.*, *H. fasciculare* y *Rhodocollybia butyracea* (Valášková *et al.*, 2007), siendo la enzima MnP considerada clave en dicho proceso.

En los ensayos de bioprospección de lignocelulasas, las cepas LDF *A. aegerita*, *G. luxurians*, *H. fasciculare*, *L. cereis* y *Leucoagaricus sp.* presentaron las mayores velocidades de producción enzimática en los sustratos específicos (**Tabla 6**). La presencia simultánea de MnP y lacasa ha sido descrita como una característica típica de los basidiomicetes ligninolíticos (Saparrat *et al.*, 2002; Tekere *et al.*, 2001), aunque estos hongos pueden producir una o ambas enzimas así como otras peroxidasas involucradas en la degradación de lignina reflejando la diversidad de estrategias que desarrollan los hongos para degradarla.

*X. chrysenteron* presentó las mayores velocidades de producción de celulasas (CMCasa) y hemicelulasas (xilanasas) aunque que no se detectó producción de enzimas ligninolíticas en esta especie (**Tabla 6**). La ausencia de reacción en *X. chrysenteron*, corroboraría su rol como hongo ectomicorrízico, en los cuales, si bien se conoce que producen lacasas y otras polifenol oxidasas, éstas son producidas en menores niveles en comparación a aquellas de los hongos saprótrofos (Osono, 2007). Se encuentra bien establecido que la condición ectomicorrízica surgió por divergencia evolutiva a partir de numerosos linajes de ancestros saprotróficos, en los cuales la habilidad para degradar polímeros de pared vegetal asociados a estructuras en descomposición se fue perdiendo (Cairney y Burke, 1994; Hibbett *et al.*, 1997). Sin embargo, muchas especies de hongos ectomicorrízicos pueden degradar parcialmente algunos componentes de pared y estudios recientes muestran que los genes de los sistemas enzimáticos hidrolíticos y oxidativos presentes en hongos saprótrofos están presentes en un amplio espectro de ECMs (Chen *et al.*, 2001). A pesar de ello, el grado de funcionalidad de las proteínas codificadas por estos genes permanece aún incierto (Burke y Cairney, 2002) y la actividad no ha sido demostrada en campo (Osono, 2007)

En cuanto a los índices enzimáticos encontramos una gran variabilidad entre cepas, lo cual resulta probablemente a partir de diferencias en sus funciones fisiológicas y/o ecológicas (Eggert *et al.*, 1996) pero puede ser también atribuible a distintos patrones de crecimiento en placa. En los procesos tecnológicos de conversión de material vegetal y compuestos orgánicos recalcitrantes es conveniente la utilización de cepas con una buena producción enzimática por unidad de biomasa fúngica. El índice enzimático permite una valoración aproximada de esta relación, teniendo en cuenta sus limitaciones. Cuando en distintos procesos industriales se utilizan cultivos fúngicos, el excesivo crecimiento puede resultar problemático debido principalmente a un menor transporte de gases y nutrientes en el biorreactor así como al menor porcentaje de recuperación del producto de interés formado que se pierde junto al

micelio durante su purificación (Berovic *et al.*, 1991; Dhillon *et al.*, 2011). Sin embargo, cuando la biomasa es escasa, y pese a que la cepa presente una elevada relación de producción enzimática vs. crecimiento en el medio en el cual se desarrolla, la producción de enzimas extracelulares neta puede no ser suficiente para alcanzar los altos títulos de actividad esperados.

Para todos los ensayos cualitativos, excepto para MnP, se encontró que las cepas con mayores índices enzimáticos presentaron un muy bajo desarrollo micelial y, por el contrario, las cepas de mayor crecimiento presentaron índices bajos. Por ejemplo para las celulasas, Florencio *et al.* (2012), reportó que las cepas con valores de E mayores a 1,5 pueden considerarse como potenciales productoras de celulasas. En esta Tesis, 5 cepas (equivalente al 26,3% del total) presentaron valores E por encima de 1,5, sin embargo su crecimiento fue muy lento. Este mismo fenómeno fue reportado por Ruegger y Tauk-Tornisielo (2004) en un ensayo de bioprospección de celulasas sobre la base de 80 hongos filamentosos aislados a partir de suelo, por lo que ellos concluyen que el índice enzimático no es un parámetro adecuado en la selección de cepas LDF productoras. Por el contrario, el índice enzimático puede ser útil para seleccionar entre cepas de una misma especie con potencial para la producción de enzimas lignocelulolíticas o como una metodología simple y rápida para la detección de mutantes para la producción de enzimas (Ruegger y Tauk-Tornisielo, 2004). Además, cuando el patrón de desarrollo micelial es muy diferente entre las cepas evaluadas se generan variaciones en la cantidad de micelio en áreas equivalentes de la placa agarizada (colonias de distinta densidad en superficie, que pueden crecer más o menos inmersas en la placa). En consecuencia, el diámetro de la colonia no representa una buena estimación de biomasa y por ende, el índice enzimático no funciona como una medida fiable de producción enzimática específica. Por lo tanto, como señalan otros autores (Montoya *et al.*, 2014; Ten *et al.*, 2004) el diámetro del halo de actividad (o la velocidad de producción enzimática) resulta útil en la selección de cepas que pueden degradar eficientemente polisacáridos y otros componentes de pared celular vegetal.

A diferencia de lo mencionado anteriormente, la actividad MnP resultó independiente del crecimiento y por ende podrían existir aislamientos con buena producción de MnP y de extendido crecimiento (altas velocidades de producción y altos valores E). Sin embargo, hay que considerar que pueden aparecer aislamientos que se vean gravemente afectadas por el método empleado (por ej. *Agaricus sp.*), por lo que sería necesario el empleo de otro método de evaluación de actividad.

Este estudio aporta datos sobre el crecimiento y la habilidad para producir enzimas lignocelulolíticas por 18 hongos degradadores de hojarasca (LDF) y 1 hongo ectomicorrízico (ECM), aislados a partir de basidiomas asociados a hojarasca del Delta de Río Paraná y Ribera Platense. Algunos

de estos aislamientos pueden resultar atractivos para promover futuras investigaciones relacionadas a su aplicación en fines biotecnológicos como la biorremediación.

## CAPÍTULO 3

“Descomposición *in vitro* de hojarasca de *Celtis tala* y *Ligustrum lucidum*”

### 3.1. INTRODUCCIÓN

La invasión de los ecosistemas terrestres por plantas exóticas es un problema ambiental de gran relevancia. Genera disturbios y altera a las comunidades vegetales presentes con el consecuente impacto en la actividad de organismos autóctonos asociados, así como de sus relaciones bióticas y abióticas.

La hojarasca presente en los suelos es la principal fuente de materia y energía en diversos ambientes, entre ellos los bosques. La calidad de dicho sustrato ejerce una marcada influencia sobre la composición microbiana y su actividad en los suelos (Ball *et al.*, 2014; Hättenschwiler *et al.*, 2005; Wardle *et al.*, 2004). A medida que la hojarasca se descompone, los nutrientes son liberados al ambiente. Sin embargo, existen pocos reportes acerca del efecto del input de hojas senescentes de plantas invasoras sobre los procesos de descomposición y humificación asociados a la actividad enzimática de los suelos. Se ha observado que las tasas de degradación de hojarasca para distintas especies que se descomponen en idénticas condiciones medioambientales difieren ampliamente (Cornelissen, 1996; Wardle *et al.*, 1997). Estas variaciones se atribuyen a cambios en características de la hojarasca tales como son la dureza de las hojas, el contenido de nitrógeno, lignina y polifenoles, así como la relación carbono/nitrógeno y lignina/nitrógeno (Perez-Harguindeguy *et al.*, 2000). La hojarasca consiste principalmente de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa y del polímero aromático lignina, este último considerado como el compuesto más recalcitrante. Los hongos son los organismos descomponedores primarios en bosques templados y boreales (Hättenschwiler *et al.*, 2005) y dentro de este grupo, los basidiomicetes saprótrofos son capaces de degradar los tres componentes principales de la hojarasca mediante la producción de una amplia variedad de enzimas extracelulares oxidoreductasas e hidrolasas (Purahong *et al.*, 2014; Steffen *et al.*, 2000). Dado que estos hongos juegan un rol clave en la degradación de hojarasca, influyendo fuertemente sobre las tasas de decaimiento, resultan necesarios estudios comparativos sobre su capacidad para descomponer hojarasca de especies tanto nativas como exóticas, con el fin de evaluar si la calidad del sustrato puede modificar la actividad fúngica.

En la actualidad, amplios sectores de las zonas bajas del Delta y principalmente de la Ribera Platense, se encuentran fuertemente alterados por la invasión de especies exóticas y urbanizaciones, con el consecuente reemplazo de las comunidades naturales y la degradación del hábitat (Quintana *et al.*, 2002). El Parque Pereyra Iraola, localizado en la Póvincia de Buenos Aires, Argentina, fue declarado Reserva de Biósfera en 2007 por la UNESCO. La Reserva fue creada con el fin de proteger este espacio que funciona como un “pulmón verde” entre Buenos Aires y La Plata. El área presenta zonas mixtas pertenecientes al típico ecosistema costero rioplatense y zonas parquizadas de forestación con una importante introducción de especies exóticas. Las primeras forman parte de un mosaico de comunidades

naturales en las cuales se desarrollan juncales costeros, pajonal, ceibal matorral ribereño, pastizales, espartillares y selva marginal o en galería, consideradas reservorio de un amplio espectro de biodiversidad, en el límite sur de distribución de los bosques subtropicales de Sudamérica. Mientras que *Celtis tala* Gillies ex Planch (Celtidaceae) es un árbol nativo típico dentro de la Reserva, *Ligustrum lucidum* Ait. (Oleaceae), también conocido como ligustro, es una especie de árbol monodominante, nativa de China, que ha sido introducida en la región con fines ornamentales y ha aumentado su cobertura desde entonces (Bo, 2005; Kalesnik *et al.*, 2013).

Estudios previos revelan la influencia de *L. lucidum* en la composición de la comunidad de especies vegetales invadidas y el efecto que ejerce en la degradación de su diversidad (Lichstein *et al.*, 2004). En zonas fuertemente invadidas, *L. lucidum* puede componer hasta un 80% de la cobertura arbórea y por fuera de las mismas, esta especie se distribuye en forma de individuos aislados junto a individuos de especies nativas (Gavier-Pizarro *et al.*, 2012). Se ha reportado que *L. lucidum* es tolerante a un amplio rango de suelos y condiciones de luz y además de reproducirse vegetativamente, produce un gran número de semillas, las cuales son fácilmente dispersadas por las aves. Estas características hacen de *L. lucidum* un invasor exitoso con una representación a nivel ecosistémico (Ayup *et al.*, 2014; Marano *et al.*, 2013). La invasión agresiva por parte de *L. lucidum*, ha sido reportada en otros países también, incluyendo a Australia y Nueva Zelanda (Cronk y Fuller, 1995). Sin embargo, el efecto de este material exótico en la actividad de hongos saprótrofos descomponedores de hojarasca y su rol en la degradación resulta aún desconocido.

Tres aislamientos de LDF, *Leratiomyces cereus*, *Marasmius haematocephalus* y *Marasmiellus candidus*, fueron seleccionados para este estudio debido a que es muy frecuente su aparición dentro de la Reserva fructificando en cercanías o sobre hojarasca tanto de *C. tala* como de *L. lucidum*. Además, estos hongos revelaron en tests en placa la habilidad para producir enzimas extracelulares que han sido involucradas en la degradación de lignocelulosas (celulasas, hemicelulasas y las ligninasas MnP y lacasa).

## 3.2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

### 3.2.1. Hipótesis

La calidad de la hojarasca de *C. tala* y *L. lucidum* condiciona la actividad lignocelulolítica de los LDF *L. cerea*, *M. haematocephalus* y *M. candidus*, y puede afectar marcadamente las tasas de descomposición ( $k$ ).

### 3.2.2. Objetivos

- Evaluar el potencial de aislamientos de LDF seleccionados, en la transformación de hojarasca de *C. tala* y *L. lucidum* en sistemas de fermentación en estado sólido.

- Evaluar el efecto de la composición química de la hojarasca foliar sobre la pérdida de masa de hojarasca y la actividad lignocelulolítica de los aislamientos seleccionados.



### 3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1. Crecimiento en placa con extractos de hojarasca

Las cepas *L. cerea*, *M. candidus* y *M. haematocephalus* fueron sembradas en el centro de placas de Petri conteniendo 20 mL de medio de cultivo: GA (control), GA en el que el agua destilada fue reemplazada por un extracto de hojas de *L. lucidum* (GAL), GA en el que el agua destilada fue reemplazada por un extracto de hojas de *C. tala* (GAT). Para la realización del extracto de hojas se siguió la norma Tappi 207 om 93: a 10 g de hojarasca seca y cortada en pedazos de 1 cm<sup>2</sup> aprox. se le agregó 300 mL de H<sub>2</sub>O destilada. La mezcla se mantuvo en agitación a 25°C durante 24 hs y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min. Las cajas se incubaron a 25°C en oscuridad durante 20 días y diariamente se realizaron mediciones del diámetro de la colonia con calibre (mm). Se tomaron dos mediciones por caja y las determinaciones se realizaron por duplicado.

#### 3.3.2. Cultivos fúngicos sobre hojarasca en condiciones de fermentación en estado sólido (SSF)

Se colectaron hojas senescentes de *L. lucidum* y *C. tala* (en etapa previa a la abscisión) a partir de varios individuos presentes en la Reserva Natural “Parque Pereyra Iraola”, Buenos Aires, Argentina (34°84'S 58°10'O). La hojarasca fue secada a temperatura ambiente y almacenada a 4°C hasta el momento de uso. Al comienzo del experimento, las hojas se cortaron en pedazos más pequeños (tamaño > 20 mm) y aproximadamente 2,5 g fueron colocados en frascos Erlenmeyer de 125 mL. Para calcular la masa inicial de hojarasca correspondiente, los frascos se secaron a 80°C en estufa hasta masa constante. La hojarasca se humectó con 20 mL de agua destilada (80% humedad final) y se autoclavó durante 20 min a 120°C. Una vez que los frascos se enfriaron, los mismos se inocularon en condiciones de esterilidad (apartado 4.3.5.) con los LDF *L. cerea*, *M. candidus* y *M. haematocephalus* y se cerraron con tapón de algodón y Parafilm, con el fin de evitar la pérdida de humedad por exceso de evaporación. Erlenmeyers sin inocular fueron usados como control para estimar la pérdida de masa por evaporación durante el periodo de cultivo, volumen que fue repuesto con agua destilada en cada uno de los muestreos. Los cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad y se siguieron a lo largo de 200 días, en los que se tomaron 5 muestras cada 30 días y una última muestra al día 200. Se realizaron tres réplicas por tratamiento (3 hongos y 1 control x 2 hojarasca x 3 réplicas x 6 tiempos de muestreo).

### 3.3.3. Fracción soluble acuosa (WSF) y fracción sólida (SF) a partir de la hojarasca

Para cada uno de los tiempos de muestreo se obtuvo una fracción soluble acuosa (WSF, por sus siglas en inglés Water Soluble Fraction) a partir de los cultivos SSF de la hojarasca tratada y la hojarasca sin inocular, según Saparrat *et al.*, (2008). Para ello, se adicionó 20 mL de agua destilada en los Erlenmeyers y la mezcla se mantuvo en agitación a 150 ppm durante 1 h. El contenido luego se filtró a través de una gasa y centrifugó a 4°C a 5000 × g por 10 min. Los sobrenadantes se separaron en alícuotas, las cuales se almacenaron a -20°C para realizar posteriormente las determinaciones analíticas y la medición de las actividades enzimáticas extracelulares. El pellet fue secado a 80°C conformando la fracción sólida (SF, de sus siglas Solid Fraction), la cual fue utilizada para estimar la pérdida de masa de hojarasca (Saparrat y Guillén, 2005) y el análisis químico de la hojarasca por RMN C<sup>13</sup> CPMAS.

### 3.3.4. Tasas de descomposición

Las constantes de descomposición ( $k$ ) se estimaron calculando el porcentaje de masa seca remanente de hojarasca luego del periodo de cultivo (porcentaje de reducción de masa en los tratamientos tratados respecto del control) utilizando un modelo de decaimiento simple exponencial (Olson, 2008; Petersen y Cummins, 1974)

$$M_t = M_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Donde  $M_0$  es la masa seca inicial,  $M_t$  es la masa seca remanente a tiempo  $t$ ,  $k$  es la constante de descomposición (año<sup>-1</sup>) y  $t$  es el tiempo (años).

### 3.3.5. Determinaciones analíticas

#### 3.3.5.1. pH

Se midió el pH de medios de cultivo y soluciones buffers utilizando un pHmetro Photovolt Modelo 110.

#### 3.3.5.2. Azúcares reductores

Se determinaron mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959). A 0,5 mL de muestra se le agregó 0.5 mL del reactivo DNS y se llevó a ebullición durante 5 min. Inmediatamente después, se realizó un choque térmico con agua helada y se leyó la absorbancia a 540 nm. Para la curva

de calibración se utilizó glucosa o xilosa como patrón. Para la preparación del reactivo DNS se utilizó: Tartrato de sodio y potasio o Sal de Rochelle ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 15 g; Hidróxido de sodio 1M 0,9 g; Ácido 3-5 dinitrosalicílico 0,5 g; Agua destilada 50 mL.

#### 3.3.5.3. *Amonio*

El contenido de amonio de los sobrenadantes de cultivo se determinó según los protocolos de Beecher y Whitten (1970) y Weatherburn (1967). Para ello, 0,1 mL de muestra se mezcló con 0,5 mL del Reactivo A (1% p/v fenol en 0,005% p/v de sodionitroprusiato) y 0,5 mL del reactivo B (0,5% p/v de hidróxido de sodio en 0,84% v/v de hipoclorito de sodio). Luego de 15 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de la solución a 635 nm. La curva patrón se realizó con cloruro de amonio y los resultados se expresaron en mg de amonio por g de hojarasca ( $\text{mg NH}^{4+}/\text{g}$ ).

#### 3.3.5.4. *Proteínas*

Las proteínas extracelulares se midieron en los sobrenadantes de cultivo utilizando el método de Bradford (1976) con el reactivo “BioRad protein assay” (Bio-Rad, Hercules, CA) y seroalbúmina bovina (BSA) como proteína estándar.

#### 3.3.5.5. *Polifenoles*

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó según Box (1983) y American Public Health Association *et al.* (1999). A 1 mL de muestra en la dilución apropiada, se le agregaron 20  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu y sucesivamente 0,2 mL de reactivo Carbonato-Tartrato. Luego de 30 min, se leyó la absorbancia a 700 nm. La curva de calibración se realizó con Fenol y los resultados se expresaron en mg equivalentes de fenol por g de hojarasca ( $\text{mg fenol/g}$ ).

### 3.3.6. **Actividades enzimáticas**

En todos los casos las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (U). Las actividades se calcularon según la siguiente ecuación:

$$U/\text{mL} = \frac{\Delta A * V}{v * \epsilon * t * d}$$

donde:

$\Delta A$  = Cambio de absorbancia registrado

$V$  = Volúmen total de reacción (mL)

$v$  = Volúmen de enzima (mL)

$\epsilon$  = Coeficiente de extinción molar ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$t$  = Tiempo de incubación (min)

$d$  = Ancho de la cubeta (cm)

#### 3.3.6.1. *Actividad Endo- $\beta$ -D-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4)*

Para la mezcla de reacción se utilizó 0,1 mL de sobrenadante en 0,4 mL de una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 0,5% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (Wood y Bhat, 1988). Se incubó a 50°C durante 30 min. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de DNS usando glucosa como standard. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto.

#### 3.3.6.2. *Actividad $\beta$ -glucosidasa (EC 3.1.2.21)*

La actividad  $\beta$ -glucosidasa se ensayó utilizando p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (pNPG; Sigma) como sustrato (Wood y Bhat, 1988). Primero, 0,45 mL de pNPG (0,02% en 50 mM de buffer acetato de sodio; pH 4,8) se mezclaron con 0,05 mL de una solución de enzima apropiadamente diluida. La solución se incubó a 50°C por 30 min y la reacción se detuvo por la adición de 1 mL de buffer Clark y Lubs 0,1 M (Clark y Lubs, 1916). El p-nitrofenol liberado se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la solución a 430 nm. Se definió una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo.

#### 3.3.6.3. *Actividad Endo- $\beta$ -D-1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8)*

Para la mezcla de reacción se agregó 0,1 mL de sobrenadante a 0,4 mL de una solución de xilano de madera de haya al 0,2% en buffer acetato de sodio 50 mM, pH 4,8 (Bailey *et al.*, 1992). Se incubó a 50°C durante 30 min. Se cuantificaron azúcares reductores liberados por el método de DNS usando xilosa como standard. Una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de xilosa por minuto.

#### 3.3.6.4. *Actividad Lacasa (EC 1.10.3.2)*

Se utilizó como sustrato 2,6-dimetoxifenol (DMP) 5 mM en buffer acetato de sodio 100 mM (pH 3,6; Paszczyński y Crawford, 1991). Se midió el incremento en la absorbancia a 469 nm ( $\epsilon = 27.5/\text{mM cm}$ ) a 30°C. Una unidad de actividad enzimática (U) fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en 1 min.

#### 3.3.6.5. *Actividad Manganese Peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13)*

Se determinó la actividad Manganese peroxidasa por la oxidación de rojo fenol en presencia de peróxido de hidrógeno y sulfato de manganeso a 610 nm ( $\epsilon = 22/\text{mM cm}$ ) en 0,2 M de buffer succinato de sodio (pH 4,5) según Glenn y Gold (1985). La medición se realizó a 30°C. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones estándar del ensayo.

### 3.3.7. **RMN C<sup>13</sup> CPMAS**

La técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de C<sup>13</sup> con polarización cruzada (CP) y giro al ángulo mágico (MAS), es una herramienta poderosa para la elucidación de estructuras a nivel atómico y molecular. Ha sido ampliamente utilizada para caracterizar los compuestos orgánicos presentes en la hojarasca (calidad de la hojarasca) y su grado de transformación debido a la actividad microbiana (Alarcón-Gutiérrez *et al.*, 2009; Baldock y Preston, 1995; Kögel-Knabner *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1983; y revisado por Cepáková y Frouz, 2015). Esta técnica presenta ventajas por sobre los análisis proximales usualmente empleados (Ryan *et al.*, 1990; Waksman *et al.*, 1928) en los que las fracciones operacionales son definidas según su susceptibilidad a la extracción o hidrólisis. Así, se define como lignina a la fracción o residuo ácido insoluble (también denominada lignina Klason). Sin embargo, esta fracción no se corresponde a una entidad química definida, e incluye otros componentes distintos de la lignina son incluidos (Berg, 1986; Gallardo y Merino, 1993; Waksman *et al.*, 1928), como es el caso de la cutina y los taninos, biopolímeros presentes en la hojarasca en cantidades significativas (a diferencia de lo que ocurre con la madera). Sumado a esto, los análisis proximales consumen una gran cantidad de tiempo y trabajo. Por lo tanto, aunque muchos compuestos son difíciles de identificar, la técnica de RMN C<sup>13</sup> CPMAS arroja valiosos resultados acerca de la composición química de los materiales vegetales.

El espectro de RMN C<sup>13</sup> CPMAS se obtuvo utilizando un espectrómetro 7T Bruker Avance II-300 (Bruker Instruments Inc., Alemania). Las muestras de hojarasca se secaron y dispusieron en un rotor de zirconio de 4-mm y un giro al ángulo mágico de 10 kHz. Todos los experimentos de RMN se realizaron

a temperatura ambiente. La técnica de RMN  $C^{13}$  se realizó con la secuencia de pulsos de CPMAS con rampa durante un tiempo de contacto de 3 ms para obtener la mejor relación señal-ruido. El desacople  $1H$  se realizó durante la adquisición con una secuencia TPPM15 para mejorar la resolución. El registro de los transientes 1 K con un tiempo de reciclado de 3 s representó la condición estándar. Las frecuencias operativas para los protones y carbonos fueron de 300,13 y 75,46 MHz, respectivamente. La glicina fue usada como referencia externa para el espectro de  $C^{13}$  y para la calibración de la condición de Hartmann-Hahn en los experimentos de polarización cruzada.

Se analizaron las muestras de hojarasca en las condiciones iniciales (0 días) y finales (luego de 200 días de descomposición). Las áreas relativas (porcentaje de intensidad total) se determinaron a partir de la integración de las curvas para las siguientes regiones del espectro para el carbono: C alquilo (0-45 ppm), C O-alquilo (45-110 ppm); C metoxilo (50-60 ppm); C aromático (110-140 ppm), C fenólico (140-160 ppm), y C carboxilo (160-190 ppm). La deconvolución de los espectros de RMN se realizó utilizando el software DmFit (Massiot *et al.*, 2002). El grado de humificación se calculó según Baldock *et al.* (1997) como la relación entre las áreas para los picos del espectro de C alquilo y C O-alquilo. La relación C alquilo y C carboxilo (Knicker *et al.*, 2000), se determinó integrando las áreas (A) respectivas como  $A(0-45 \text{ ppm}) / A(160-190 \text{ ppm})$ . El índice de aromaticidad (IA) se calculó como  $IA = 100 [A(110-160 \text{ ppm}) / A(0-160 \text{ ppm})]$  (Lorenz *et al.*, 2006). Por último, el contenido de lignina se estimó utilizando la ecuación establecida por Haw *et al.* (1984):  $\% \text{ lignina} = (100\%) ((183/9:92) \text{ l' lig} / (183/9:92) \text{ l' lig} + (162/6) \text{ l' carb})$ , la cual se normaliza según la relación entre los pesos moleculares y el número de carbonos de las fórmulas promedio para las unidades repetitivas de la lignina y la de carbohidratos.

### **3.3.8. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la $\beta$ -glucosidasa**

El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa se evaluó en los sobrenadantes de las muestras correspondientes a *M. haematocephalus* a los 120 días de la SSF creciendo sobre *C. tala*.

Para evaluar el efecto del pH se incubó el extracto enzimático durante 30 min a  $50^{\circ}\text{C}$  en pNPG 0,02% disuelto en 50 mM de buffer Universal modificado por Ostling y Virtama (1946) a pHs 4,8; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 y 10,0. La temperatura óptima de actividad  $\beta$ -glucosidasa se examinó luego de incubar el extracto enzimático por 30 min a  $30^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $60^{\circ}\text{C}$  y  $70^{\circ}\text{C}$  con pNPG 0,02% en 50 mM de buffer acetato de sodio (pH 4,8) como sustrato. La actividad enzimática relativa se calculó por comparación con los valores obtenidos para la actividad máxima (100%).

Para evaluar el efecto del pH en la estabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa, se preincubaron los sobrenadantes de cultivo con el mismo volumen de buffer Universal a los diferentes pHs (4,8-10,0) a 30°C durante 12 hs (Karnchanatat *et al.*, 2007). Se comprobó que el pH fuese el indicado mediante papel tornasol. Luego de este tiempo, se cuantificó la actividad  $\beta$ -glucosidasa según lo descripto anteriormente. El efecto de la temperatura en la estabilidad enzimática se evaluó incubando el extracto a las distintas temperaturas (30°C-70°C) y a intervalos de tiempo indicados se tomaron alícuotas para ensayar la actividad residual en las condiciones normales. En los ensayos de estabilidad, la actividad enzimática relativa se calculó por comparación con muestras que no fueron preincubadas (100% de actividad relativa).

### 3.3.9. Análisis estadístico

El efecto causado por las distintas especies fúngicas y del tipo de hojarasca sobre las constantes de descomposición ( $k$ ) se analizó mediante un análisis ANOVA de dos factores. Los datos fueron logarítmicamente transformados antes del análisis. Todas las comparaciones post hoc se realizaron con el test de Tukey con un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05.

Los cambios en las regiones analizadas para los carbonos en los espectros de RMN  $C^{13}$  CPMAS, así como los distintos índices calculados, se compararon a través de test  $t$  pareados, entre la hojarasca inicial y la hojarasca luego de 200 días de descomposición. Para evaluar las diferencias en las proporciones de las mismas categorías anteriormente mencionadas entre la hojarasca sin inocular y la inoculada con los LDF dentro de cada tipo de hojarasca, se realizó un análisis de ANOVA de un factor, seguido de un test de Tukey. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los software STATISTICA 7.0 e INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Para explorar las relaciones entre los componentes químicos (basado en las determinaciones analíticas de la WSF y el espectro de RMN de la fracción sólida) y las actividades enzimáticas de los tratamientos que incluyeron las distintas combinaciones hongo-hojasca, en primer lugar se construyeron dos matrices con cada grupo de variables. Se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) separado como método de ordenación para cada matriz de datos, de manera de encontrar ejes que maximicen la inercia. Dado que las variables tienen distintas unidades, los datos fueron estandarizados. Posteriormente, los resultados de la ordenación se conectaron mediante un análisis de Co-Inercia (CoiA), que correlaciona los primeros ejes de ordenación de las dos matrices. Este tipo de análisis de dos tablas de datos trabaja en matriz de covarianza y permite explorar las relaciones cuando

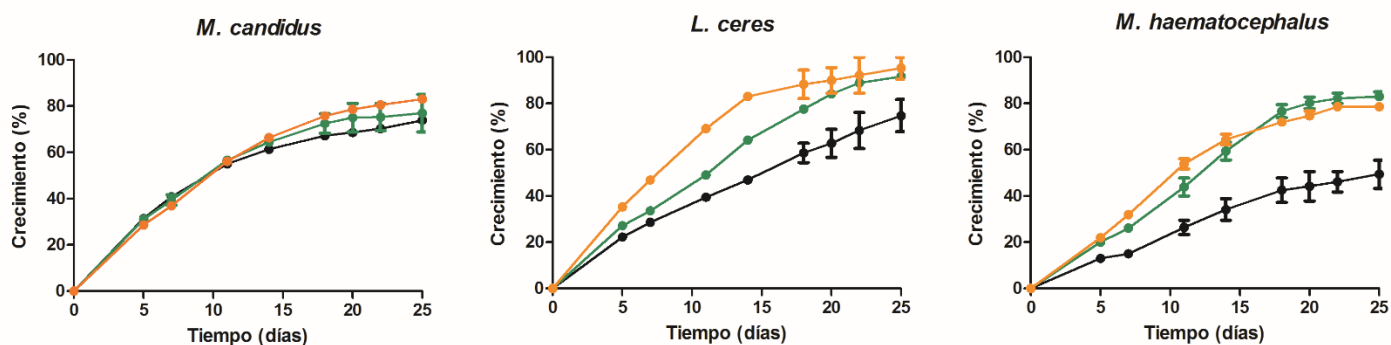
son consideradas muchas variables en pocas unidades experimentales (Dolédec *et al.*, 2000). El análisis de CoiA se desarrolló utilizando el paquete R (R Development Core Team, 2008).



### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1. Crecimiento en placa con extractos de hojarasca

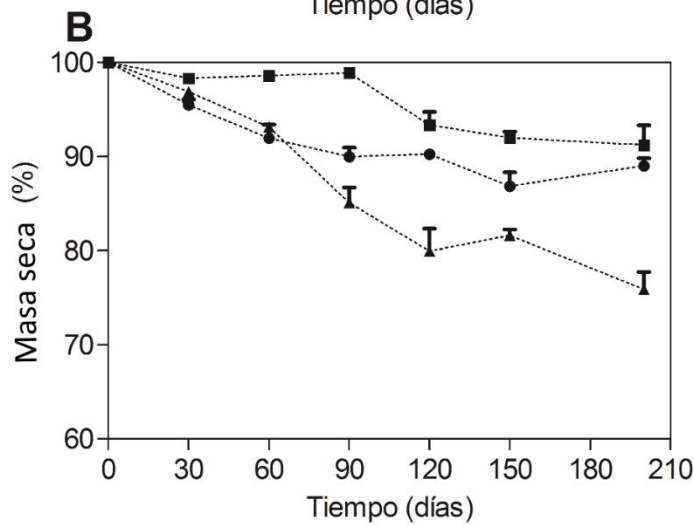
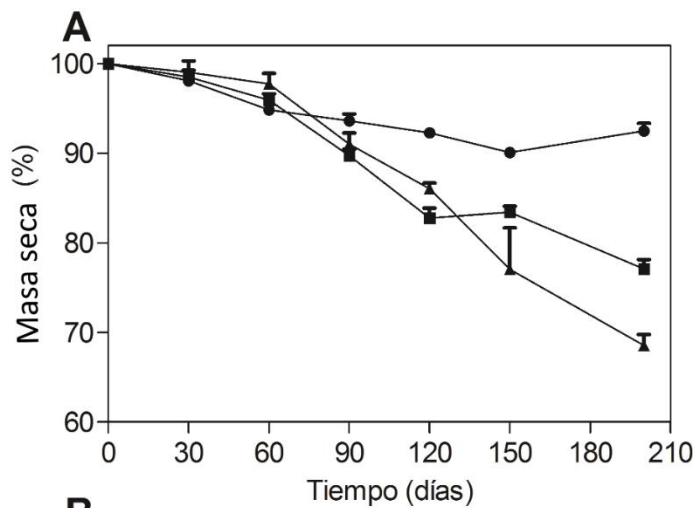
Todas las cepas pudieron crecer satisfactoriamente en el medio GA adicionado con extracto de *L. lucidum* (GAL) y *C. tala* (GAT). En *M. candidus* no se encontraron diferencias significativas entre los tres medios ensayados. En cambio, *M. haematocephalus* creció con mayor velocidad en los medios GAT y GAL que en el medio GA, aunque no se observó un efecto diferencial entre los dos tipos de extractos de hoja. Se registró mayor velocidad de crecimiento de *L. cerea* en el medio GAL con respecto al resto de los medios ensayados (**Figura 38**).



**Figura 38.** Efecto del extracto de hojas de *L. lucidum* (GAL —●—) y *C. tala* (GAT —▲—) sobre el crecimiento de los hongos LDF *M. candidus*, *L. cerea* y *M. haematocephalus* en medio GA —●—.

#### 3.3.2. Descomposición de hojarasca bajo Fermentación en estado sólido (SSF)

Las cepas de hongos LDF *M. candidus*, *L. cerea* y *M. haematocephalus* fueron capaces de crecer y colonizar la hojarasca de *L. lucidum* y *C. tala* como únicas fuentes de sustrato en los cultivos SSF. El porcentaje de masa seca remanente calculada en cada tiempo de muestreo se muestra en la **Figura 39**.



**Figura 39.** Masas secas remanentes durante 200 días en SSF con hojarasca de (A) *L. lucidum* y (B) *C. tala*, inoculadas con *M. candidus* (círculos), *L. ceres* (cuadrados), y *M. haematocephalus* (triángulos). Los datos representan la media de tres replicas y error estándar. A la derecha se muestran los cultivos fúngicos de fermentación en estado sólido (SSF).

La pérdida inicial de masa fue relativamente lenta durante los primeros 60 días de cultivo. Superado este tiempo, la descomposición del sustrato comenzó a acelerarse en *M. haematocephalus* y *L. ceres*, alcanzando el  $31,46 \pm 2,15\%$  y  $22,9 \pm 1,79\%$  de pérdida de masa respectivamente para el final del experimento. En *M. candidus*, se detectó una meseta en la tasa de descomposición a partir de los 90 días, con un  $7,52 \pm 1,49\%$  de pérdida de masa final. En *C. tala*, la degradación fúngica comenzó más

rápidamente que en *L. lucidum*, con la excepción de *L. ceres*, que luego de los 90 días comenzó a mostrar una significativa pérdida de masa ( $P < 0,01$ ). La descomposición de *C. tala* alcanzó el  $24,11 \pm 3,19\%$  con *M. haematocephalus*,  $10,97 \pm 1,12\%$  con *M. candidus* y  $8,78 \pm 3,64\%$  con *L. ceres* hacia el final del periodo fermentativo. Se encontraron diferencias significativas en las constantes de descomposición entre las especies de hojarasca ensayadas sólo para *L. ceres* (Tabla 7), con una tasa de decaimiento más rápida en *L. lucidum* ( $0,51 \pm 0,13 \text{ año}^{-1}$ ) que en *C. tala* ( $0,19 \pm 0,14 \text{ año}^{-1}$ ).

**Tabla 7.** Parámetros de la regresión lineal para la descomposición de *L. lucidum* y *C. tala* durante 200 días en SSF. Los datos representan la media de tres réplicas  $\pm$  el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las tasas de descomposición a partir de las comparaciones post hoc (Test de Tukey;  $P < 0,05$ ).

Parámetros de Regresión	<i>L. lucidum</i>			<i>C. tala</i>		
	<i>M. haematocephalus</i>	<i>M. candidus</i>	<i>L. ceres</i>	<i>M. haematocephalus</i>	<i>M. candidus</i>	<i>L. ceres</i>
Pendiente ( $k$ )	$0,72 \pm 0,06^a$	$0,19 \pm 0,02^{cd}$	$0,51 \pm 0,03^{ab}$	$0,52 \pm 0,04^{ab}$	$0,23 \pm 0,03^{bc}$	$0,19 \pm 0,03^d$
y-Intercepción	$19,75 \pm 6,35$	$3,76 \pm 2,46$	$-5,69 \pm 3,48$	$0,46 \pm 3,94$	$10,00 \pm 3,80$	$-2,69 \pm 3,24$
R <sup>2</sup> ajustado	0,90	0,78	0,93	0,92	0,69	0,70
Valor <i>P</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

### 3.3.3. Composición química de la WSF

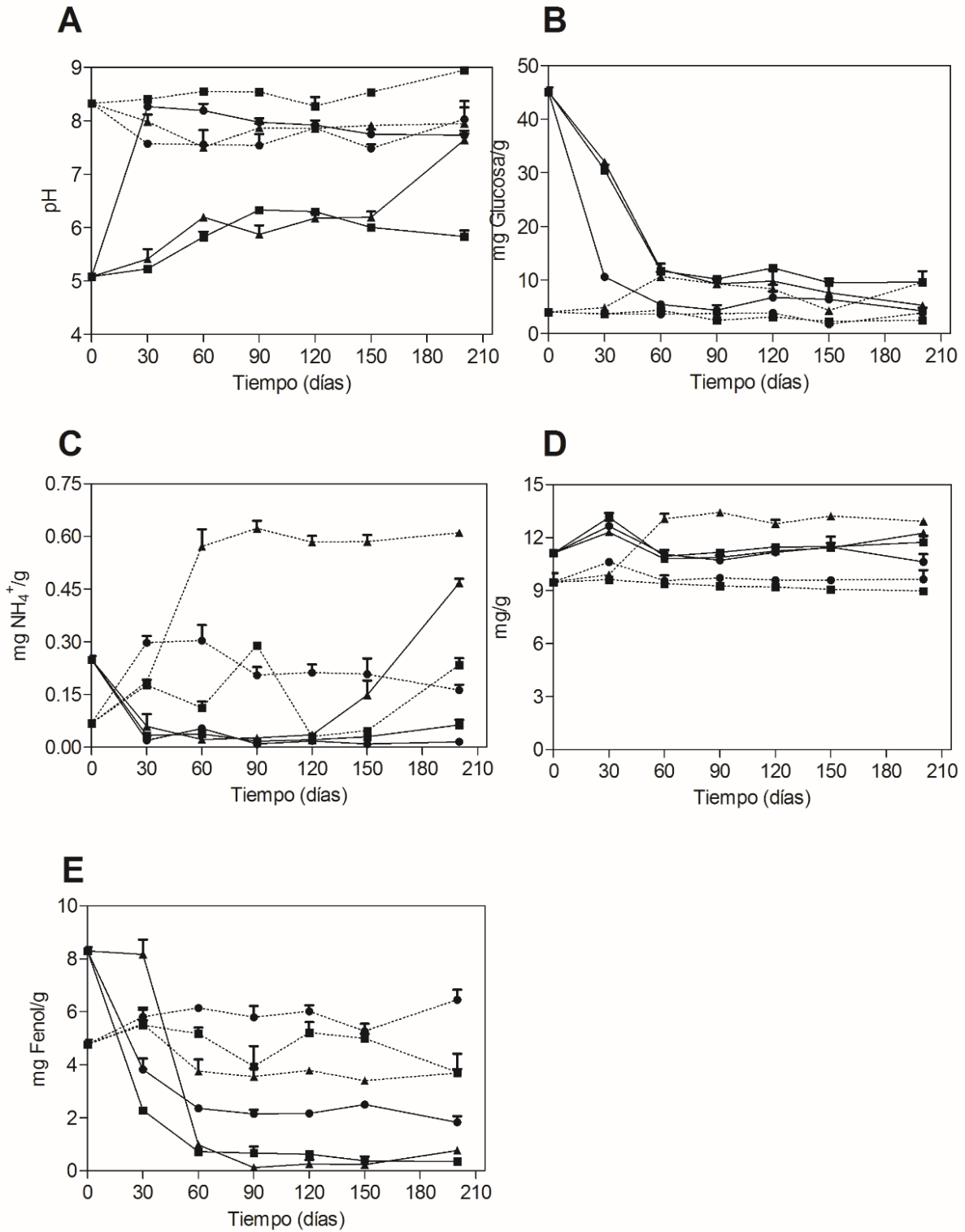
La composición química de la fracción soluble acuosa (WSF) de *L. lucidum* y *C. tala* resultó notoriamente diferente, siendo la primera más acídica ( $5,08 \pm 0,03$  vs.  $8,32 \pm 0,01$ ) y con mayor contenido de azúcares ( $45,07 \pm 1,51 \text{ mg/g}$  vs.  $4,03 \pm 0,59 \text{ mg/g}$ ), proteínas ( $11,13 \pm 0,32 \text{ mg/g}$  vs.  $9,48 \pm 0,88 \text{ mg/g}$ ), amonio ( $0,25 \pm 0,02 \text{ mg/g}$  vs.  $0,07 \pm 0,01 \text{ mg/g}$ ) y polifenoles ( $8,30 \pm 0,26 \text{ mg/g}$  vs.  $4,77 \pm 0,31 \text{ mg/g}$ ). Los cambios químicos en las características de la hojarasca durante la SSF se presentan en la Figura 40. En los cultivos de *L. lucidum* se detectó una fuerte alcalinización del sustrato, especialmente con *M. candidus* que incrementó su pH marcadamente en los primeros 30 días del experimento. A su vez, un aumento moderado en los valores de pH también se observó para *C. tala* cuando se incubó con *L. ceres*. El contenido inicial de azúcares reductores en *L. lucidum* fue unas 10 veces mayor que en *C. tala* y los mismos fueron consumidos rápidamente y casi agotados en los primeros 60 días de cultivo, tiempo luego del cual no se detectaron cambios cuantitativos. En *C. tala*, los niveles de azúcares disminuyeron

de una forma menos drástica e incluso, un significativo aumento se detectó para *M. haematocephalus* a partir del día 60.

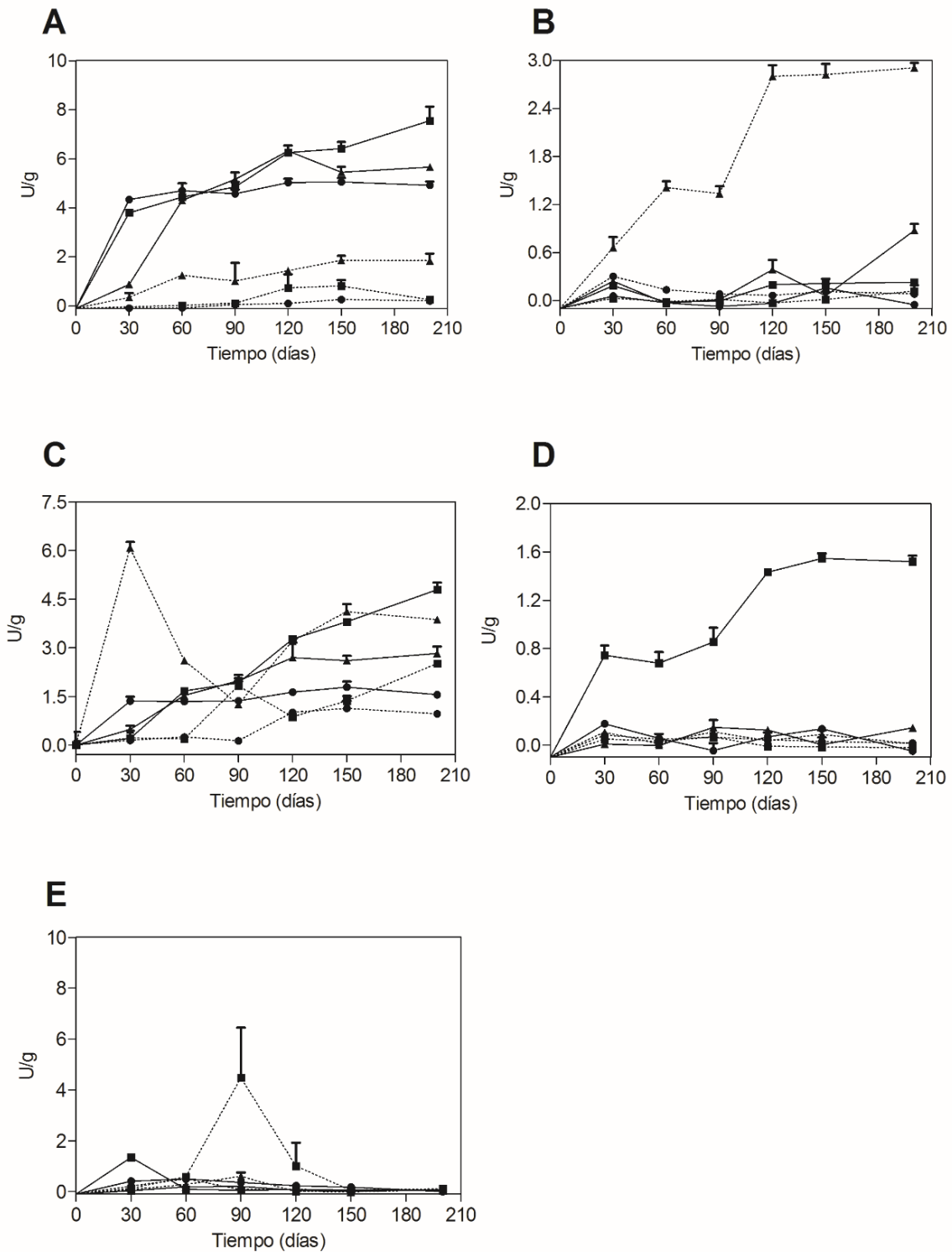
Los niveles de amonio detectados en la WSF mostraron una tendencia a aumentar con el tiempo. Para los tratamientos con *L. lucidum*, se observó una disminución inicial en los niveles de amonio, pero luego de los 120 días, las concentraciones comenzaron a incrementarse en los cultivos con *M. haematocephalus* y *L. cerea*. En el caso de *C. tala* inoculado con *M. haematocephalus* y *M. candidus*, el aumento ocurrió en la fase inicial del SSF, manteniéndose luego constantes estos valores máximos. En *L. cerea*, se detectó un pico al día 90 y luego de los 120 días los niveles también comenzaron a aumentar de forma exponencial. Las concentraciones de proteínas registraron un máximo al día 30 para los cultivos en *L. lucidum* y para *M. candidus* incubado en *C. tala*, aunque éste no resultó estadísticamente significativo. El mayor aumento en los niveles de proteínas se registró en *M. haematocephalus* creciendo sobre *C. tala* durante los estadios iniciales de la fermentación, manteniéndose constantes a partir del día 60 de incubación. Los polifenoles detectados en la WSF disminuyeron bruscamente en *L. lucidum* y, en menor medida, en *M. haematocephalus* incubado en *C. tala*. Contrariamente, la concentración de polifenoles no mostró cambios significativos durante la incubación de *L. cerea* en *C. tala*., y exhibió un aumento al día 200 cuando *M. candidus* creció en este sustrato.

#### 3.3.4. Actividades enzimáticas extracelulares

Con el objetivo de comprender el rol de las enzimas lignocelulolíticas durante el curso de la fermentación de los distintos tipos de hojarasca, se evaluó la actividad de las enzimas extracelulares  $\beta$ -1,4-endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -1,4-endoxilanasas, lacasa y Mn peroxidasa, enzimas relacionadas con la degradación de los componentes estructurales mayoritarios de la hojarasca: celulosa, hemicelulosa y lignina (**Figura 41**). La actividad endoglucanasa resultó significativamente diferente entre los sustratos para cada uno de los tiempos de muestreo ( $P < 0,05$ ), con mayores actividades detectadas en las fermentaciones con *L. lucidum*, siendo *L. cerea* el mayor productor de esta enzima ( $7,55 \pm 0,99$  U/g). En la hojarasca de *C. tala*, *M. haematocephalus* registró las mayores actividades de esta enzima. Este tratamiento presentó además, una particular actividad  $\beta$ -glucosidasa que resaltó frente al resto de las combinaciones hongo-hojasca, con valores máximos de 2,8 U/g aproximadamente, detectados al día 120. A su vez, *M. haematocephalus* y *L. cerea* creciendo en la hojarasca de *L. lucidum*, resultaron segundo y tercer productores de  $\beta$ -glucosidasa en orden de importancia.

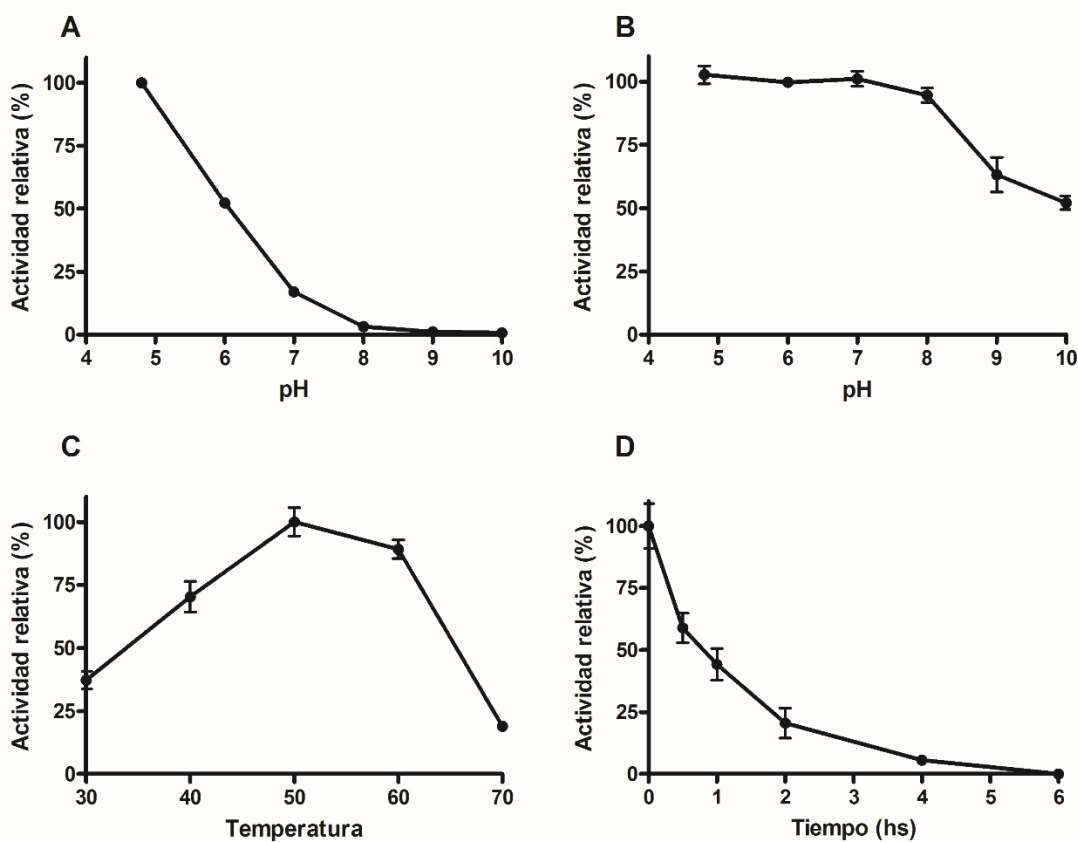


**Figura 40.** Caracterización de la fracción soluble acuosa (WSF) obtenida de la SSF de *M. candidus* (círculos), *L. ceres* (cuadrados) o *M. haematocephalus* (triángulos), con *L. lucidum* (líneas sólidas) o *C. tala* (líneas discontinuas) como sustrato: (A) pH (B) Glucosa (C) Amonio (D) Proteínas (E) Polifenoles. Los datos representan la media de tres réplicas y un error estándar.



**Figura 41.** Producción de enzimas lignocelulolíticas durante la SSF de *M. candidus* (círculos), *L. cereis* (cuadrados) o *M. haematocephalus* (triángulos) en *L. lucidum* (líneas continuas) o *C. tala* (líneas discontinuas) como sustrato: (A) Endoglucanasa (B)  $\beta$ -glucosidasa (C) Endoxilanas (D) MnP (E) Lacasa. Los datos representan la media de tres réplicas y un error estándar.

La actividad  $\beta$ -1,4-endoxilanasas mostró un pico al día 30 cuando se cultivó a *M. haematocephalus* en *C. tala* ( $6,09 \pm 0,31$  U/g), mientras que un continuo aumento se detectó para los otros tratamientos con una actividad máxima al día 200 registrada cuando *L. ceres* creció sobre *L. lucidum*. *L. ceres* se destacó con respecto a la producción de ligninasas. Cuando se lo incubó en *L. lucidum*, la producción de MnP fue notoriamente más alta que en el resto de los tratamientos. La producción de lacasa por *L. ceres* registró su máximo al día 30 en *L. lucidum* y disminuyó posteriormente. En *C. tala*, este pico de producción enzimática se detectó más tardíamente (alrededor del día 90 de cultivo) aunque los títulos enzimáticos valorados fueron mayores.



**Figura 42.** Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad (A, C) y sobre la estabilidad (B, D) de la  $\beta$ -glucosidasa de *M. haematocephalus* creciendo en *C. tala* durante 120 días en SSF. La actividad se ensayó a 50°C durante 30 min en el rango de pHs 4,8-10 (A) o a pH 4,8 en el rango de temperaturas 30-70°C (C). Para el ensayo de estabilidad se incubó el extracto enzimático durante 12hs a 30°C en el rango de pHs 4,8-10 (B) o a 50°C y pH 4,8 a distintos intervalos de tiempo (D) y luego se midió la actividad a 50°C durante 30 min a pH 4,8. Los datos representan la media de tres réplicas  $\pm$  desvío estándar.

Debido a la importante producción de  $\beta$ -glucosidasa detectada a los 120 días del SSF de *M. haematocephalus* sobre *C. tala* a los 120 días del SSF y dada la alcalinidad del cultivo a los 120 días, este extracto enzimático fue caracterizado bioquímicamente con miras a la detección de una actividad  $\beta$ -

glucosidasa alcalino resistente con potencial para su aplicación industrial. Aunque la actividad registró su óptimo a pH 4,8 y 50°C, resultó estable en un amplio rango de pHs a 30°C, detectándose más de 50% de actividad luego de 12 hs de incubación a pH 10. A temperatura y pH óptimos de actividad (50°C y pH 4,8) sin embargo, la actividad decreció bruscamente, y no se registró actividad luego de 6 hs, detectándose sólo 20% de la misma a las 2 hs de incubación. (Figura 42).

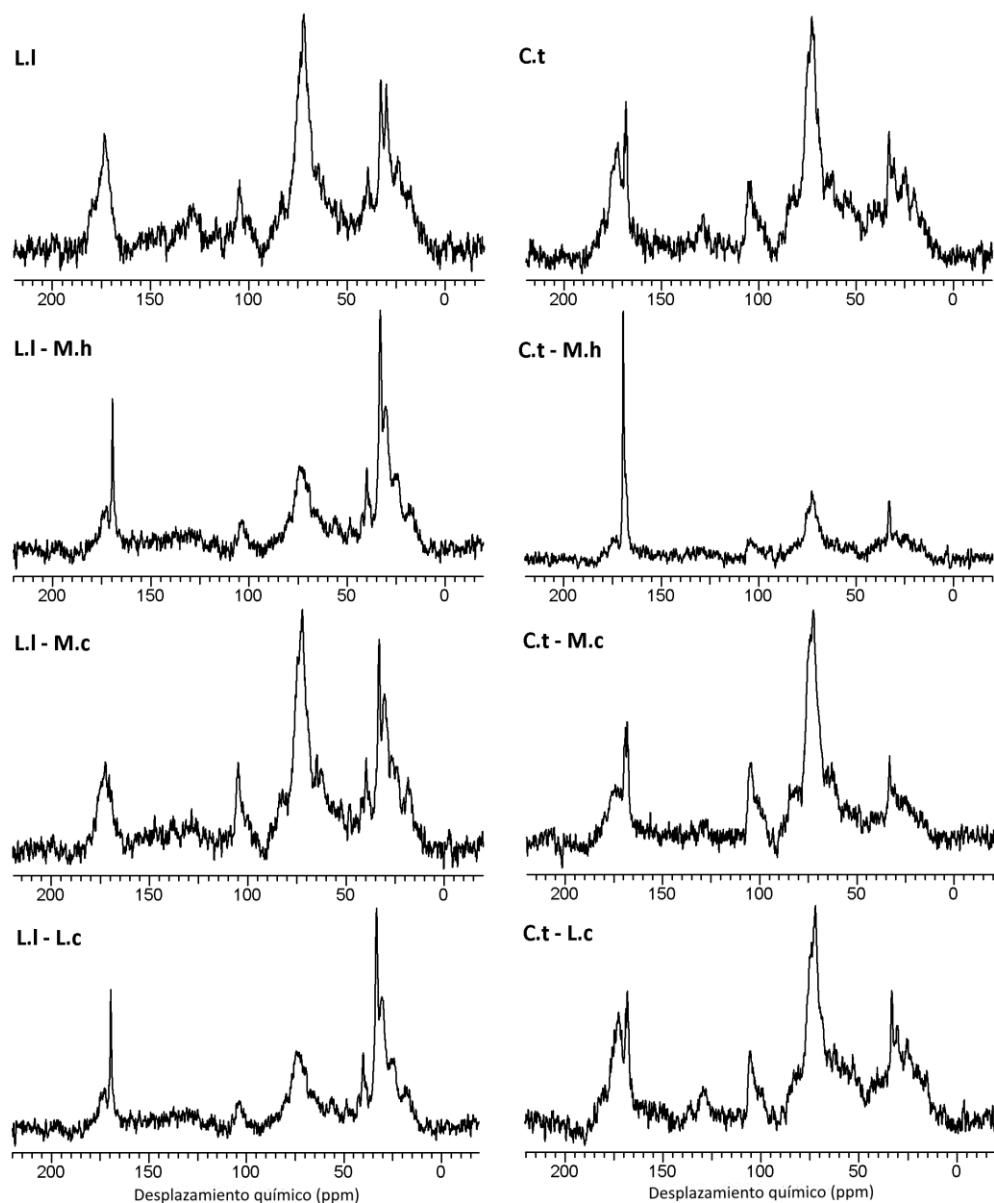
### 3.3.5. Composición química de la fracción sólida (SF)

Los espectros de RMN  $C^{13}$  CPMAS de la hojarasca fresca de *L. lucidum* y *C. tala* y luego del periodo de incubación durante 200 días en condiciones SSF con cada uno de los tres hongos saprótrofos evaluados se muestran en la **Figura 43**. Todos los espectros exhibieron el mismo patrón, difiriendo en las intensidades relativas de las regiones químicas para carbono. Se encontraron diferencias significativas entre los dos tipos de hojarasca sin inocular en todas las señales de las regiones del espectro consideradas para la integración y en todas las relaciones e índices, excepto para la región de C O-alquilo ( $P = 0,15$ , Tabla 2, Tabla 3). Una mayor proporción de C alquílicos se encontró en la hojarasca inicial de *L. lucidum* (33,67%) respecto de la de *C. tala* (24,22%). La intensidad de esta región puede atribuirse a componentes alifáticos, mayormente a estructuras metileno de lípidos, cutinas y ceras (Dignac *et al.*, 2002; Quideau *et al.*, 2000), así como a cadenas cortas de ácidos o aminoácidos (Dick *et al.*, 2005). Para el final de la SSF, un aumento en su contenido relativo se observó con *L. lucidum* inoculado con *M. haematocephalus* y *L. cereis*.

Los carbonos metoxílicos, principalmente de la lignina, se encuentran en los 45-60 ppm, aunque aproximadamente el 10% corresponden a grupos metoxilo de las unidades menos comunes presentes en los monómeros de la hemicelulosa, específicamente del ácido glucurónico y xilano (Haw *et al.*, 1984). El contenido de carbonos metoxílicos en la hojarasca fresca de *C. tala* fue cuatro veces mayor que en la de *L. lucidum*. En *L. lucidum*, un aumento significativo de los mismos se detectó para el final del SSF, sólo cuando la hojarasca fue inoculada con *L. cereis*. La señal de la región de los C O-alquilo constituyó la proporción más grande de las hojarascas al tiempo inicial (sin inocular) lo que se debió principalmente a la presencia de polisacáridos. Comprendió el 48,27% en *L. lucidum* y el 55,60% en *C. tala*. Se encontraron dos picos dominantes, uno más amplio a los 70-80 ppm, atribuido a un doblete aparente que se ha reportado que corresponde a los C-2, C-3 y C-5 de la celulosa (I), y un pico a los 105 ppm, que se asigna generalmente al C-1 de las unidades repetitivas de la anhidroglucosa de la celulosa (I) (Haw *et al.*, 1984). El contenido relativo de los carbonos O-alquilo disminuyó hacia el final del SSF, principalmente en *L.*



*lucidum* inoculado con *L. cerea* (Figura 43, Tabla 8). A medida que la descomposición prosiguió, la relación C-alquilo/C O- alquilo, también conocida como grado de humificación, aumentó en *M. haematocephalus*, mayormente cuando creció en *L. lucidum* pero también en *C. tala*, y también en *L. cerea* creciendo en *L. lucidum*. No se registraron diferencias significativas en el índice C-alquilo/C O-alquilo con el resto de las combinaciones hongo-hojarasca (Tabla 9).



**Figura 43.** Espectros RMN  $C^{13}$  CPMAS de las muestras de hojarasca a tiempo inicial (L.l y C.t) y luego de 200 días en SSF con las especies de basidiomicetes seleccionadas (L.l-M.c, C.t-M.c, L.l-L.c, C.t-L.c, L.l-M.h y C.t-M.h): L.l, *Ligustrum lucidum*; C.t, *Celtis tala*; M.c, *M. candidus*; L.c, *L. cerea*; M.h, *M. haematocephalus*. Los desplazamientos químicos de la hojarasca se caracterizaron según los siguientes picos dominantes: C alquilo (0-45 ppm), C O-alquilo (45-110 ppm), C metoxilo (50-60 ppm), C aromático (110-140 ppm), C fenólico (140-160 ppm) y C carboxilo (160-190 ppm).

**Tabla 8.** Intensidades relativas (%) derivadas de los espectros RMN C<sup>13</sup> CPMAS de las muestras de hojarasca a tiempo inicial (0 días) y final (200 días) de los cultivos en SSF. Los datos representan la media de dos réplicas  $\pm$  error estándar

Tiempo	Hongo	Hojarasca	Región del espectro (ppm)*				
			C Alquilo	C Metoxilo	C O-alquilo	C Aromático	C Carboxilo
			0–45	45–60	45–110	110–140	160–190
0 días			33,67 $\pm$ 1,81	1,65 $\pm$ 0,42	48,27 $\pm$ 2,51	4,75 $\pm$ 0,11	14,30 $\pm$ 0,81
	<i>M. haematocephalus</i>	<i>L. lucidum</i>	49,95 $\pm$ 4,57	2,38 $\pm$ 0,13	38,66 $\pm$ 4,23	0,00 $\pm$ 0,01	11,38 $\pm$ 0,34
200 días	<i>M. candidus</i>		32,41 $\pm$ 3,00	2,60 $\pm$ 1,70	56,28 $\pm$ 1,50	2,15 $\pm$ 0,03	9,16 $\pm$ 1,49
	<i>L. ceres</i>		45,87 $\pm$ 1,18	6,48 $\pm$ 1,19	37,44 $\pm$ 1,21	3,61 $\pm$ 0,09	13,06 $\pm$ 0,12
0 días			24,22 $\pm$ 0,07	7,74 $\pm$ 0,18	55,60 $\pm$ 0,01	2,45 $\pm$ 0,06	17,71 $\pm$ 0,03
	<i>M. haematocephalus</i>	<i>C. tala</i>	26,18 $\pm$ 1,00	4,21 $\pm$ 2,27	41,24 $\pm$ 4,81	2,09 $\pm$ 0,71	30,47 $\pm$ 3,12
200 días	<i>M. candidus</i>		20,73 $\pm$ 6,33	5,77 $\pm$ 1,94	59,95 $\pm$ 10,28	1,78 $\pm$ 1,67	17,52 $\pm$ 2,26
	<i>L. ceres</i>		23,38 $\pm$ 5,08	5,33 $\pm$ 2,56	57,55 $\pm$ 6,96	1,77 $\pm$ 0,85	17,29 $\pm$ 1,00

**Tabla 9.** Varias relaciones, contenido de lignina (%) y de aromaticidad (%) derivados del espectro de RMN C<sup>13</sup> CPMAS en el tiempo inicial (0 días) y tiempo final (200 días) de cultivo en SSF. Los datos representan la media de dos réplicas  $\pm$  error estándar.

Tiempo	Hongo	Hojarasca	Relaciones			%	
			C Alquilo/ C O-Alquilo	C Alquilo/ C Carboxilo	C O-alquilo/ C Aromático	Lignina	Aromaticidad
			0 días			0,68 $\pm$ 0,07	2,28 $\pm$ 0,01
	<i>M. haematocephalus</i>	<i>L. lucidum</i>	1,31 $\pm$ 0,26	4,40 $\pm$ 0,53	ND*	0,00 $\pm$ 0,01	0,00 $\pm$ 0,01
200 días	<i>M. candidus</i>		0,58 $\pm$ 0,07	3,61 $\pm$ 0,92	26,17 $\pm$ 0,35	3,81 $\pm$ 0,18	2,30 $\pm$ 0,11
	<i>L. ceres</i>		1,23 $\pm$ 0,07	3,51 $\pm$ 0,06	10,36 $\pm$ 0,07	6,40 $\pm$ 0,17	3,87 $\pm$ 0,10
0 días		<i>C. tala</i>	0,43 $\pm$ 0,01	1,37 $\pm$ 0,01	22,65 $\pm$ 0,59	4,51 $\pm$ 0,13	2,73 $\pm$ 0,08
200 días	<i>M. haematocephalus</i>		0,64 $\pm$ 0,10	0,86 $\pm$ 0,06	21,32 $\pm$ 9,57	4,71 $\pm$ 1,65	2,85 $\pm$ 1,00
	<i>M. candidus</i>		0,36 $\pm$ 0,17	1,17 $\pm$ 0,21	64,89 $\pm$ 66,68	3,35 $\pm$ 3,15	2,03 $\pm$ 1,91
	<i>L. ceres</i>		0,41 $\pm$ 0,14	1,35 $\pm$ 0,22	37,76 $\pm$ 22,12	3,32 $\pm$ 1,55	2,01 $\pm$ 0,94

\* Relación tendiendo a infinito dado que los C aromáticos estuvieron ausentes en este tratamiento.

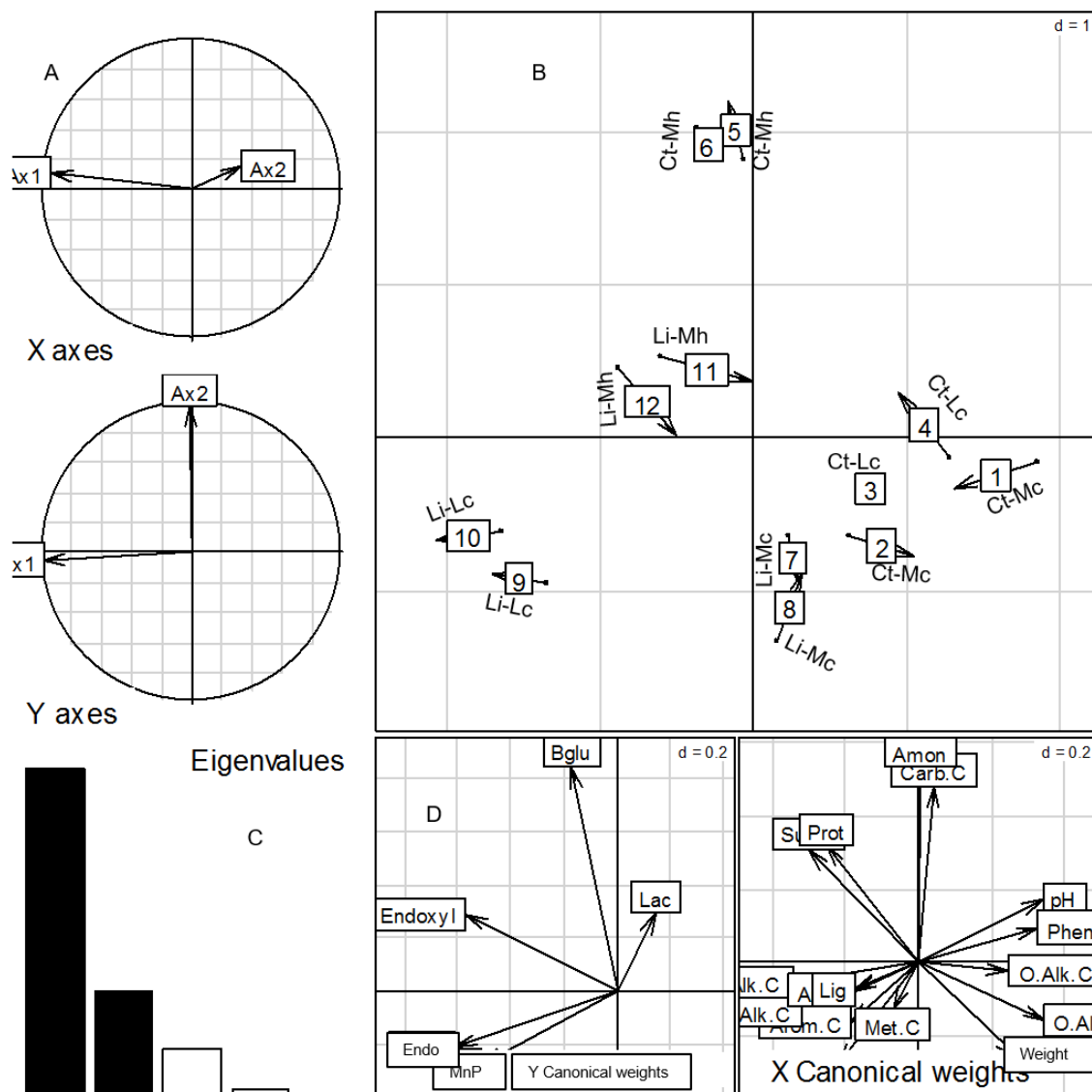
La intensidad en la región del espectro entre 110 ppm y hasta los 160 ppm se debe a los carbonos de los anillos aromáticos de la lignina. La señal de la región fenólica, entre los 140 y 160 ppm, es característica de los carbonos aromáticos sustituidos con oxígeno, y fue insignificante en los espectros de la hojarasca. Aproximadamente el doble del contenido de carbonos aromáticos se encontró en la hojarasca fresca de *L. lucidum* (4,75%) en comparación con la de *C. tala* (2,45%), lo cual es consistente con valores más grandes en los índices de aromaticidad y lignina. El contenido de C aromáticos disminuyó hacia el final del periodo de descomposición como consecuencia de la actividad ligninolítica de los hongos

ensayados y los valores máximos para los cambios químicos se registraron con *M. haematocephalus*, que delignificó por completo el sustrato *L. lucidum*. Por último, las señales a 160-190 ppm se debieron a grupos acetato, conocidos por su presencia en la hemicelulosa o a especies carbonílicas presentes también en la hemicelulosa (por ej. grupos CO<sub>2</sub>H de los ácidos urónicos). En *C. tala* inoculada con *M. haematocephalus* se observó un incremento, mientras que el contenido de carbonos carboxílicos disminuyó cuando se inoculó con *M. candidus*.

### 3.3.6. Análisis de Co-inercia (CoiA)

Debido a que la pérdida de masa fue significativa durante el curso de la descomposición entre los dos tipos de hojarasca y entre las especies fúngicas, con diferencias en la producción de enzimas lignocelulolíticas y en la composición química del sustrato hacia el final del experimento, se realizó un análisis de co-inercia utilizando un ACP-ACP para testear las relaciones entre las variables mencionadas (**Figura 44**). El CoiA entre los dos grupos de variables (químicas y enzimáticas) fue significativo ( $P < 0,01$ ), lo que indica que la co-estructura descrita por los ejes del CoiA fue próxima a las estructuras descritas en los análisis individuales de los dos grupos de variables. La inercia proyectada con los dos primeros ejes (Ax1 y Ax2) representó el 90,86% de la covarianza total.

Los tratamientos inoculados con *M. haematocephalus* correlacionaron bien con la actividad  $\beta$ -glucosidasa, los azúcares y las proteínas, mostrando la mayor pérdida de masa, mientras que *L. lucidum* inoculado con *L. cereis* correlacionó con la producción de MnP, bajos niveles de amonio y condiciones acídicas. Los tratamientos que fueron inoculados con *M. candidus* en general estuvieron correlacionados con bajas actividades enzimáticas y altos scores químicos.



**Figura 44.** Análisis de Co-inercia utilizando un ACP-ACP con los parámetros químicos (determinaciones analíticas de la WSF y resultados de RMN de la fracción sólida) y las actividades lignocelulolíticas luego de 200 días en SSF. El análisis representa los tratamientos individuales (de 1 a 12) del sustrato (L.l, *Ligustrum lucidum*; C.t, *Celtis talá*) inoculado con las especies fúngicas (M.c, *Marasmiellus candidus*; L.c, *Leratiomyces ceres*; M.h, *Marasmius haematocephalus*). (A) Proyección de la inercia de los parámetros evaluados (B) Biplot mostrando la optimización de la covarianza por la co-inercia (C) Eigenvalores mostrando la varianza total y eigenvalores considerados en el análisis (D) Cargas de los ejes X e Y (pesos canónicos) para el PC1 (parámetros químicos) y PC2 (parámetros enzimáticos).

### 3.4. DISCUSIÓN

La descomposición de hojarasca en los suelos es controlada jerárquicamente por el clima, la composición química del sustrato y la biota del suelo (Aerts, 1997; Hättenschwiler y Gasser, 2005; Seastedt, 1984; Swift *et al.*, 1979). En este estudio, las respuestas específicas sobre la descomposición de hojarasca dadas por las especies de microorganismos, como función de la química del sustrato, pudieron ser detectadas debido a que las mismas se analizaron separadamente en condiciones ambientales controladas. Las constantes de descomposición ( $k$ ) obtenidas para la hojarasca de *L. lucidum* y *C. tala* se encontraron en el siguiente orden: *M. haematocephalus* > *L. cerea* creciendo en *L. lucidum* > *M. candidus* > *L. cerea* creciendo en *C. tala* (**Tabla 7**). Por lo tanto, las tasas para la descomposición de hojarasca fueron diferentes según el hongo empleado en los cultivos SSF y sólo para *L. cerea* se encontraron diferencias significativas dependiendo de la especie de hojarasca, con una tasa de degradación mayor para la hojarasca exótica proveniente de *L. lucidum*. Este patrón de preferencia por un tipo de sustrato hallado con *L. cerea* se condice con las diferencias detectadas en el crecimiento en placa únicamente con esta cepa. La mayor degradación de la hojarasca de *L. lucidum* podría estar relacionada al mayor crecimiento promovido por este sustrato (**Figura 38**).

Existen algunos estudios previos que registraron la descomposición de *L. lucidum* y *C. tala*, por ejemplo Marano *et al.* (2013) indicaron un valor  $k$  de 4.094 año<sup>-1</sup> para *L. lucidum* descomponiéndose en la Reserva Natural ‘Selva Marginal Punta Lara’ que superó el valor  $k$  de la hojarasca nativa de *Pouteria salicifolia*, lo cual relacionaron con una mejor calidad del sustrato (menos lignina y compuestos fenólicos, mayor relación C:N y C:L). Fernández y Aragón (2014), no encontraron diferencias en el valor medio de  $k$  entre especies exóticas (incluyendo a *L. lucidum*) y especies nativas luego de un año de incubación en una reserva natural ubicada en Tucumán, Argentina. Muchos estudios sugieren que las especies exóticas poseen características comunes que les permiten una descomposición más rápida respecto a las especies nativas con las que co-ocurren, contribuyendo con la invasión y el ciclado de nutrientes (Allison y Vitousek, 2004; Ehrenfeld, 2003; Liao *et al.*, 2008). Sin embargo, no hay una regla general acerca de la descomposición comparativa entre especies exóticas y nativas, y al igual que con *L. lucidum*, otros estudios muestran resultados opuestos (Boon y Johnstone, 1997; Godoy *et al.*, 2010; Knight *et al.*, 2007). Hasta el presente, no hay trabajos que reporten constantes de descomposición para *C. tala* aunque Saparrat *et al.* (2008) reportaron el porcentaje de degradación de esta hojarasca por hongos anamorfos del phylum Ascomycota, revelando valores menores al 40 % de reducción de la masa foliar en ensayos *in-vitro* después de 30 días de incubación.

En este trabajo, las pérdidas de masa obtenidas al día 200 en los cultivos SSF se encontraron en el rango de 7,5-31,5% (**Figura 39**), porcentajes comparables a resultados previos con otros hongos saprotróficos: Osono *et al.* (2006) reportaron 27,6% de pérdida de peso para la hojarasca de *Chamaecyparis obtusa* luego de 18 semanas de incubación con *Marasmius sp* y un 16,6% de pérdida de masa promedio para diferentes basidiomicetes evaluados. Voříšková *et al.* (2011) encontraron entre 16 y 34% de pérdida de masa con *Hypholoma fasciculare* creciendo en diferentes tipos de hojarasca durante 12 semanas.

Se asume que en los estadios tempranos de descomposición, la pérdida de masa resulta mayoritariamente de la degradación de sustancias solubles y de la holocelulosa que no está protegida por la lignina. Una proporción considerable de las sustancias solubles se pierden también por el lixiviado hacia los suelos. Al mismo tiempo, las tasas de degradación iniciales resultan afectadas positivamente por un aumento en los niveles de nutrientes claves como el azufre, fósforo y nitrógeno (Aber y Melillo, 1982; Berg, 2014; Kang *et al.*, 2010), el último considerado un factor crítico para los basidiomicetes descomponedores de hojarasca (Ekblad y Nordgren, 2002). Simultáneamente, valores bajos de relación C:N (menores a 20), se asociaron a una rápida descomposición (Lambers *et al.*, 2008). El contenido de azúcares en la fracción soluble acuosa (producto de la degradación de compuestos carbonados fácilmente accesibles) resultó 10 veces mayor en *L. lucidum* con respecto a *C. tala* (**Figura 40**). Sin embargo, el contenido de N en *C. tala* se estimó en valores cercanos al 1% y la relación C:N igual a 27 (Saparrat *et al.*, 2008), mientras que Aragón *et al.* (2014) informaron un 0,82% en el contenido de N para *L. lucidum* y una relación C:N de 53,72. Además, durante el cultivo fúngico sobre *L. lucidum*, no se detectó amonio en la WSF (excepto cuando se incubó con *M. haematocaphalus*, hacia el final de la SSF; **Figura 40**), sugiriendo que no hubo una mineralización neta del N inicialmente presente en la hojarasca (en forma de aminoácidos y proteínas) o que existió una inmovilización neta del N en la biomasa fúngica. Se reportó que cuando la relación C: nutriente es alta (como la de C:N), una fracción sustancial de los nutrientes presentes en la materia orgánica puede ser inmovilizada en las hifas y utilizada para el crecimiento (Swift *et al.*, 1979). Estas variaciones en los niveles de amonio detectados pueden indicar una disponibilidad de N diferencial para los hongos dependiendo del tipo de sustrato y por lo tanto, el N puede ser considerado limitante en *L. lucidum*. Esto coincide con una mayor pérdida de masa en *C. tala* durante los estadios iniciales de la SSF, mientras que los azúcares iniciales en *L. lucidum* podrían estar involucrados en el crecimiento inicial (con una disminución rápida de más del 70% durante los primeros 60 días de la SSF y una mayor actividad endoglucanasa) a expensas de la degradación.

En estadios avanzados de la descomposición, la pérdida de masa es más limitada y abarca la degradación de lignina y compuestos lignificados (Berg, 2014). *L. lucidum* mostró mayores valores en el

área relativa de los compuestos aromáticos y alifáticos que *C. tala* (**Tabla 8**), así como un mayor contenido de polifenoles en la WSF (**Figura 40**), compuestos que son recalcitrantes y son conocidos por retardar el proceso de decaimiento (De Marco *et al.*, 2012; Kuiters, 1990). Los índices de lignina y aromaticidad (**Tabla 9**) y el contenido de polifenoles de la WSF (**Figura 40**) disminuyeron hacia el final del periodo de cultivo revelando la actividad de los hongos ligninolíticos. Por ende, la pérdida de masa fue mayor en *L. lucidum* durante los estadios finales del SSF. Además, el N pudo haber interferido con la degradación de lignina mediante la inhibición en la producción de enzimas ligninolíticas o debido a una posible reactividad frente a ciertos grupos químicos presentes en la fuente orgánica (como la lignina parcialmente degradada), generando compuestos que son menos susceptibles al ataque microbiano (Berg, 2014). El amonio detectado en *C. tala* al final de la SSF, derivado de la degradación de compuestos orgánicos nitrogenados, pudo estar involucrado en un retraso de la descomposición de la hojarasca.

La relación C alquilo/ C O-alquilo se ha propuesto que aumenta durante el transcurso del proceso de descomposición de la materia orgánica del suelo, a medida que los C O-alquilo se convierten en C alquilo (Baldock *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 2003). En este trabajo, el índice funcionó como un predictor fidedigno ya que un aumento significativo se observó al final de los cultivos SSF que registraron los mayores porcentajes de degradación, específicamente *M. haematocephalus* en *L. lucidum* y *C. tala* y *L. ceres* en *L. lucidum* (**Tabla 9**). En el resto de los tratamientos, no se encontraron cambios significativos en el ratio C alquilo/ C O-alquilo respecto de la hojarasca sin inocular.

Debido a que la pérdida de C O-alquilos se asocia principalmente a la degradación de celulosa y/o hemicelulosa, estos resultados sugieren que al menos *M. haematocephalus* y *L. ceres* son activos degradadores de holocelulosa, siendo el primero menos selectivo en el tipo de sustrato. Por lo tanto, estos hongos pueden tener algún rol en la humificación debido a un aumento en el dominio de los C alquílicos el cual se asocia principalmente, a la acumulación de componentes estructurales recalcitrantes presentes en la hojarasca vegetal como ser ceras, cutinas, suberinas, lípidos y aminoácidos (**Figura 43**) (Kögel-Knabner *et al.*, 1992).

La actividad de enzimas extracelulares también resulta un indicador sensible de las tasas de descomposición y de los requerimientos nutricionales de los microorganismos en el crecimiento. La evaluación de los cambios producidos en dichas actividades se utiliza en el modelado de patrones de descomposición y de la dinámica de la materia orgánica (Sinsabaugh *et al.*, 2008; Veres *et al.*, 2015). En este trabajo, entre los cambios más notables en las actividades enzimáticas se encontró la gran producción de  $\beta$ -glucosidasa por *M. haematocephalus* creciendo en *C. tala* pero no en *L. lucidum* (**Figura 41**). La presencia de azúcares reductores en la WSF de *L. lucidum* en estadios iniciales de la SSF puede sugerir un

mecanismo de inhibición por producto de la actividad  $\beta$ -glucosidasa en este sustrato (Xiao *et al.*, 2004) ya que cuando los niveles de azúcares disminuyeron, hacia el final del cultivo, la actividad  $\beta$ -glucosidasa comenzó a aumentar. Las bajas concentraciones de azúcares detectadas en la hojarasca de *C. tala*, permitirían que *M. haematocephalus* produzca una cantidad apreciable de  $\beta$ -glucosidasa (concordante con los altos niveles de proteínas presentes en la WSF) con un aumento consecuente en los niveles de glucosa luego de 60 días de cultivo. Saparrat *et al.* (2008) encontraron que la actividad  $\beta$ -glucosidasa se correlacionó con la descomposición de *C. tala*. Por otro lado, la actividad ligninolítica de *M. haematocephalus* creciendo en *L. lucidum* resultó muy potente, alcanzando una completa delignificación del sustrato, lo que pudo haber compensado los valores de  $k$  y de pérdida de masa entre los dos tipos de hojarasca. Debido a que no se detectó actividad lacasa ni MnP, en la degradación de lignina pudieron estar implicadas otras enzimas peroxidadas encontradas en LDF saprótrofos, como las peroxidadas decolorantes de tintes (DyP, EC 1.11.1.19) o la peroxigenasa inespecífica (UPO, EC 1.11.2.1) (Kellner *et al.*, 2014). En cambio, la actividad lignina peroxidasa no se ha encontrado hasta el momento en estos hongos. La degradación pudo haber implicado otros mecanismos como la reacción de Fenton, en la cual se generan especies moleculares de bajo peso molecular fuertemente oxidativas (Regalado *et al.*, 1999). En los cultivos con *M. haematocephalus* la delignificación de *C. tala* no fue significativa.

En *L. cereis*, la producción de MnP se incrementó notoriamente sólo cuando el hongo creció sobre la hojarasca de *L. lucidum* (**Figura 41**). Como la MnP es una enzima oxidativa clave en la degradación de hojarasca (Purahong *et al.*, 2014) y dado que el contenido de lignina es el componente generalmente identificado como factor limitante (Berg, 1986; Meentemeyer, 1978; Preston *et al.*, 1997; Rutigliano *et al.*, 1996), la actividad MnP registrada en este tratamiento podría explicar los altos valores de pérdida de peso, como se muestra en el análisis de coinerencia. La actividad lacasa también pudo ser detectada. Aunque una mayor actividad lacasa se registró con *C. tala* que con *L. lucidum*, la mencionada actividad puede estar asociada a otras funciones fisiológicas que se adjudican a las lacasas, diferentes de la ligninólisis, como la patogenicidad, pigmentación y formación de basidiomas (Mayer y Staples, 2002), por lo que no se observó en este estudio un patrón específico relacionado a la degradación.

Las variables ambientales como el pH condicionan el crecimiento de los hongos. En la mayoría de los casos, el pH óptimo ronda los valores ácidos (Dix y Webster, 1995), pero algunas especies prefieren pHs neutros o ligeramente alcalinos, por ejemplo Fries (1956) comprobó que algunas especies de *Coprinus* crecían bien a pHs por encima de 8, esta característica asociada al pH de su hábitat natural. El pH inicial de *C. tala* fue 8,32 y los valores se mantuvieron alcalinos o algo más bajos durante todo la SSF. En cambio, el pH inicial de *L. lucidum* fue de 5,08 con una tendencia general hacia la alcalinización en el tiempo,



principalmente cuando se incubó con *M. haematocephalus* y *M. candidus*, este último aumentó el pH a 8,27 en los primeros 30 días de cultivo (**Figura 40**). Estos resultados sugieren que el sistema enzimático de estos hongos es muy activo a pHs alcalinos. En este sentido, la actividad y estabilidad de la  $\beta$ -glucosidasa de *M. haematocephalus* creciendo en *C. tala* se ensayó en el rango de pHs 4,8-10,0 encontrándose una actividad muy poderosa y estable, con más del 50% de actividad relativa luego de 12 hs de incubación incluso a pH 10 (**Figura 42A y B**). Contrariamente, *L. ceres* podría ser sensible al pH básico y favorecido por la introducción de *L. lucidum* que proporciona un sustrato con valores de pH más ácidos. Las enzimas resistentes adaptadas a pHs alcalinos, como la hallada en *M. haematocephalus*, poseen un gran potencial para aplicaciones industriales tal como reportan Restuccia *et al.* (2011).

A partir de los resultados anteriormente expuestos, se concluye que la introducción de *L. lucidum* a ambientes prístinos podría alterar la composición química del aporte de la hojarasca a los suelos de bosques. Datos preliminares del estudio de degradación *in-vitro* sugieren que un impacto en las tasas de descomposición de hojarasca debe esperarse, ya que algunos hongos saprótrofos basidiomicetes frecuentes, como *L. ceres* están presentes, conduciendo a un aumento en la descomposición de hojarasca. A pesar de que *M. haematocephalus* y *M. candidus* fueron menos sensibles a las alteraciones en la calidad de la hojarasca, los tres hongos ensayados mostraron cambios significativos en el patrón de producción de enzimas extracelulares lignocelulolíticas, con una concomitante modificación en la dinámica de nutrientes. Más investigaciones sobre este tema son necesarias con el fin de entender el rol que juegan los hongos basidiomicetes y sus sistemas enzimáticos en la degradación de la materia orgánica de los suelos así como para poder predecir el efecto potencial que tienen las invasiones de plantas en los procesos ecosistémicos.

La degradación de hojarasca es el resultado de una sucesión funcional dinámica entre distintos grupos de organismos. Estudios recientes indican que las bacterias pueden contribuir significativamente a la descomposición. Con frecuencia se detecta habilidad celulolítica en bacterias habitantes de hojarasca. Se han encontrado enzimas involucradas en el catabolismo de celulosa, hemicelulosa, quitina y almidón en los proteomas bacterianos cuando se utiliza celulosa cristalina como única fuente de C para el crecimiento (López-Mondéjar *et al.*, 2016). La capacidad ligninolítica bacteriana en cambio es limitada en comparación con la habilidad que presentan para degradar este sustrato los hongos saprótrofos, sin embargo las *Actinobacteria* podrían solubilizar compuestos fenólicos, particularmente los compuestos de bajo peso molecular (Větrovský *et al.*, 2014). Por lo tanto, los co-cultivos entre bacterias y hongos podrían mejorar la hidrólisis de residuos lignocelulósicos y contribuir a definir su contribución a la descomposición de biomasa vegetal en los ecosistemas. Existe un creciente interés biotecnológico en el

estudio de las enzimas extracelulares de un amplio espectro de basidiomicetes, con el objetivo de encontrar sistemas de degradación más eficientes en la transformación de residuos lignocelulósicos para generar productos con valor agregado como el bioetanol. El presente trabajo explora la capacidad lignocelulolítica de especies fúngicas raramente investigadas hasta la fecha.

## **CAPÍTULO 4**

### **“Degradación fúngica de nonilfenol polietoxilado”**

## 4.1. INTRODUCCIÓN

Los polietoxilatos de nonilfenol (NP $n$ EOs) se encuentran entre los agentes tensioactivos no iónicos más ampliamente empleados (Thiele *et al.*, 1997; Ying *et al.*, 2002). Entre sus principales aplicaciones se incluye la fabricación de detergentes y productos de limpieza, cosméticos, pinturas, espermicidas y su uso como agentes dispersantes o emulsionantes en pesticidas y herbicidas (Berryman *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2001; Vitali *et al.*, 2004). La mayor parte de los NP $n$ EOs se introducen en el medio ambiente en forma de soluciones acuosas a través de efluentes industriales y domésticos y se descargan a las aguas superficiales, ya sea directamente o después de su paso por plantas de tratamiento de aguas residuales (Planas *et al.*, 2002; Thiele *et al.*, 1997). Se ha demostrado que los NP $n$ EOs sufren transformaciones biológicas tanto en ecosistemas naturales como en plantas de tratamiento de aguas residuales, donde su eliminación no es completa. Los productos de degradación como son el alquilfenol dietoxilato (NP2EO), alquilfenol monoetoxilato (NP1EO) y el nonilfenol (NP) son más recalcitrantes al ataque microbiano y, debido a su fuerte carácter hidrofóbico, se acumulan en los sedimentos, las aguas subterráneas, los barros activados y los tejidos de organismos acuáticos (Giger *et al.*, 1984; Maguire, 1999; Stephanou y Giger, 1982; Uguz *et al.*, 2003). Por lo tanto, el xenobiótico se transfiere del sistema acuático a una matriz ambiental diferente, sin llevarse a cabo su destrucción.

Estos compuestos están recibiendo cada vez más atención debido a su demostrada toxicidad y a sus efectos perjudiciales sobre la biota, principalmente la perturbación del sistema endócrino en varias especies (Jonkers *et al.*, 2010; Ying *et al.*, 2002), incluso a bajas concentraciones, lo que plantea graves riesgos potenciales para el medio ambiente y la salud pública. Debido a sus efectos estrogénicos, su naturaleza ubicua, toxicidad y persistencia, el uso de los NP $n$ EOs ha sido prohibido en Europa (European Parliament and the Council, 2003) y Canadá (Gazette, 2003). Sin embargo se mantiene su utilización debido al bajo costo y buen rendimiento que tienen los NP $n$ EOs para numerosas aplicaciones, y la ausencia de regulación en la mayoría de los países. De esta manera, resulta de suma relevancia la búsqueda de organismos capaces de reducir su concentración en el medio ambiente (Babay *et al.*, 2014; Sumpter y Johnson, 2008).

Las tecnologías basadas en diferentes tipos de tratamiento biológico son las más utilizadas en la remoción de los disruptores endócrinos químicos (EDCs), incluyendo los barros activados, lagunas de tratamiento, distintos tipos de biorreactores (incluyendo biorreactor de membrana o MBR, aerobio, anaerobio, de microalga y fúngico), lechos o filtros de contacto, biodiscos o contactores biológicos rotativos, nitrificación, tratamiento enzimático y biosorción (Ahmed *et al.*, 2016).

Existen grupos taxonómicos que, a pesar de no ser utilizados en tratamientos biológicos tradicionales, podrían ser útiles por sus capacidades catabólicas. Los hongos causantes de pudrición blanca de madera (WRF) o sus enzimas ligninolíticas han comenzado a aplicarse para eliminar un amplio rango de compuestos xenobióticos (Torres *et al.*, 2003). La capacidad de remoción de NP por hongos ligninolíticos ha sido estudiada en basidiomicetes como *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*, *T. versicolor*, *Bjerkandera* sp. (Soares *et al.*, 2005), *Phanerochaete sordida* (Tsutsumi *et al.*, 2001) y *Corioloopsis polyzona* (Cabana *et al.*, 2007a), en dos ascomicetes acuáticos (Junghanns *et al.*, 2005) y otro aislado de suelo (Saito *et al.*, 2004). Se evaluó la habilidad de degradación de NP utilizando extractos crudos (Cabana *et al.*, 2007a) o las enzimas lacasa (Saito *et al.*, 2004; Tsutsumi *et al.*, 2001) y MnP (Tsutsumi *et al.*, 2001) parcial o totalmente purificadas. La utilización de mediadores de actividad lacasa como ABTS (Cabana *et al.*, 2007a) y HBT (Tsutsumi *et al.*, 2001) incrementó significativamente la remoción de NP.

Los LDF, al igual que los WRF, son capaces de producir enzimas extracelulares con baja especificidad que intervienen en la degradación de la lignina y compuestos relacionados, tales como MnP y lacasa. Se ha reportado que los LDF pueden atacar numerosos compuestos xenobióticos aromáticos y alifáticos, incluidos distintos contaminantes ambientales, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas y herbicidas (Aranda *et al.*, 2010a; Nemergut *et al.*, 2000; Steffen *et al.*, 2003; 2007b). Sin embargo, no existen reportes en la literatura hasta el momento, que traten sobre la degradación de NP $\pi$ EOs u otros detergentes por hongos LDF. La presente investigación sobre el rol de LDF en la remoción de este xenobiótico contribuiría a establecer nuevas estrategias potenciales para remediación ambiental, así como a esclarecer los mecanismos asociados a la degradación de este tipo de compuestos en un grupo de organismos poco estudiado.

En el presente estudio, se realizó una prospección de hongos LDF con capacidad para crecer y degradar NP10EO -la forma más ampliamente utilizada de NP $\pi$ EOs- en condiciones de cultivo. Además, se investigó si existe una posible relación entre la remoción de NP10EO por hongos seleccionados y la producción de enzimas ligninolíticas lacasa y MnP.

## 4.2. HIPÓTESIS y OBJETIVOS

### 4.2.1. Hipótesis

Existen hongos saprótrofos de hojarasca (LDF) con capacidad de degradar el surfactante NP10EO bajo diferentes condiciones de cultivo *in-vitro*.

La degradación del detergente NP10EO por LDF seleccionados involucra la participación de enzimas ligninolíticas.

### 4.2.2. Objetivos

- Realizar una bioprospección de aislamientos de LDF con capacidad para tolerar el NP10EO presente en cultivos agarizados y seleccionar los que presenten las mayores velocidades de crecimiento.

- Evaluar el potencial de degradación de NP10EO por los aislamientos LDF seleccionados, en distintas condiciones de cultivo, e investigar si guarda relación con la producción de enzimas ligninolíticas lacasa y MnP por dichos aislamientos.

- Analizar el efecto del NP10EO sobre la degradación *in-vitro* de hojas senescentes de *L. lucidum* y *C. tala* por hongos seleccionados y sobre variables fisicoquímicas y enzimáticas indicadoras de la extensión de la transformación fúngica de las hojarasca bajo estudio.

## 4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.3.1. Crecimiento en GA-NP10EO

Los aislamientos fúngicos (**Tabla 4**, 4.4.1.) se inocularon en condiciones estériles en el centro de una placa de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo 20 mL de medio agarizado GA-NP10EO 1 g/L. Los cultivos se incubaron a 25°C en oscuridad durante 20 días. Se midió el diámetro de la colonia diariamente con un calibre y se calcularon las velocidades de crecimiento a partir del intervalo de fase lineal (mm/día). Cultivos en medio GA sin surfactante se utilizaron como control para evaluar el efecto del NP10EO sobre el crecimiento fúngico. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

### 4.3.2. Ensayos de toxicidad

Los aislamientos seleccionados a partir del relevamiento con GA-NP10EO al 0,1% se inocularon en placas de Petri de 90 mm conteniendo 20 mL de GA suplementado con las siguientes concentraciones finales del detergente NP10EO (g/L): 0, 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10. Las cajas fueron incubadas a 25°C en oscuridad durante 15 días. Las tasas de crecimiento se calcularon de manera semejante a la descrita anteriormente. Para cada aislamiento, se determinó la concentración efectiva 50 (CE50) es decir, la concentración a la cual el surfactante causa un 50% de inhibición en el crecimiento.

### 4.3.3. Cultivos fúngicos sobre hojarasca con NP10EO bajo SSF

Los cultivos bajo SSF se realizaron según el procedimiento detallado en el apartado 3.3.2. Se inoculó hojarasca de *C. tala* y *L. lucidum* con *G. luxurians* y *H. fasciculare*. Además, se sumó un tratamiento correspondiente al agregado de NP10EO 1 g/L a ambos tipos de hojarasca. Los cultivos SSF se siguieron a lo largo de tres meses con intervalos de muestreo cada 30 días. Se realizaron tres réplicas por tratamiento (2 hongos y 1 control x 2 hojarasca x 3 réplicas x 3 tiempos de muestreo x 2 NP10EO +/-). Para cada tiempo de muestreo, se obtuvo la fracción soluble acuosa (WSF) y la fracción sólida (SF), según lo detallado en 3.3.3. En la WSF se realizaron las determinaciones analíticas de pH, proteínas, amonio, azúcares reductores y polifenoles así como la medición de las actividades enzimáticas endoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, lacasa y MnP. En la SF se midió el peso seco (80°C) para la estimación de la pérdida de masa. Por último, se analizó la cantidad de NP10EO residual en cada una de las fracciones y se calculó el porcentaje de degradación de NP10EO por comparación con las muestras control sin inocular (100% de NP10EO) mediante cromatografía en cada delgada (CCD).

#### 4.3.4. Extracción de NP10EO

La extracción de los distintos etoxímeros que componen el NP10EO presente en las muestras fue realizada como paso previo a la cuantificación de la degradación del surfactante. La extracción se realizó en:

- Los discos de agar de 9 mm de diámetro conteniendo micelio fúngico que fueron tomados del borde de una colonia proveniente de los ensayos de toxicidad al día 15 de cultivo (concentraciones 0, 1, 5 y 10 g/L).
- La fracción sólida (SF) obtenida a partir de los cultivos bajo SSF.
- La fracción soluble acuosa (WSF) obtenida a partir de los cultivos bajo SSF

Para cada uno de los métodos de extracción utilizados, se calcularon los porcentajes de recuperación del NP10EO, como parámetro de evaluación de la eficiencia de extracción de los compuestos estudiados. Para ello, se utilizaron muestras de las mismas características que las mencionadas más arriba pero que no fueron inoculadas con hongo ni incubadas. En el momento previo a la extracción, se agregó la concentración de NP10EO ensayada y se siguieron todos los pasos mencionados en el proceso de extracción. La recuperación fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Masa de NP10EO en la muestra}}{\text{Masa de NP10EO teórica}} * 100$$

Además, se comprobó que el porcentaje de recuperación no varió según el etoxímero que compone la mezcla NP10EO. Por lo tanto, para cada método de extracción utilizado, se comprobó que la composición de oligómeros extraídos fue uniforme.

Existen distintas técnicas para la extracción del NP y sus compuestos parentales a partir de muestras sólidas (suelos, sedimentos, barros, etc.) incluyendo la extracción por Soxhlet, extracción asistida por microondas y la extracción asistida por ultrasonido (sonicación), las cuales a su vez pueden combinar uno o más solventes extractantes tanto polares como no polares (revisado por Croce *et al.*, 2003). Debido a la considerable reducción en el tiempo de extracción, consumo de solvente y energía, la extracción por sonicación resulta un método atractivo, que además ha sido idóneo en la extracción del NP y NP $n$ EOs



(Núñez *et al.*, 2007; Romero-Ale *et al.*, 2009). Por lo tanto, esta técnica fue la elegida para la extracción del NP10EO a partir de las muestras provenientes de los tacos de agar y la SF.

Para la extracción del detergente a partir de los tacos de agar, los mismos se dispusieron en un vial de vidrio de 2 mL y el NP10EO residual se extrajo mediante la adición de 0,5 mL de acetato de etilo (AcEt) y sonicación durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados del taco de agar con 0,5 mL de AcEt, volumen que fue agrupado en un mismo tubo colector. Los extractos se evaporaron a sequedad con una corriente suave de N<sub>2</sub> y se guardaron en freezer a -20°C para su posterior análisis. El porcentaje de recuperación de NP10EO fue de  $4,7 \pm 0,8\%$ .

En el caso de la hojarasca seca proveniente de la SF de los cultivos bajo SSF, inicialmente la hojarasca se molió y, para la extracción del surfactante, se tomaron 0,5 g de muestra molida. Luego del agregado de 5 mL de AcEt, la mezcla se sonicó durante 20 min, se centrifugó por 10 min a máxima velocidad y el sobrenadante fue colectado en un tubo de vidrio. Se realizaron tres ciclos sucesivos en los que se combinaron los sobrenadantes y llevaron a sequedad (Petrović y Barceló, 2000). Debido a que el tubo colector era de un volumen muy grande, se realizaron dos resuspensiones con 0,75 mL del solvente de extracción y los mismos se colectaron en viales de vidrio de 2 mL. Las muestras se volvieron a evaporar y se reservaron a -20°C. El porcentaje de recuperación de NP10EO fue de  $50,3 \pm 2,2\%$ .

Para la extracción de analitos a partir de muestras acuosas (aguas, aguas superficiales, efluentes, etc), la técnica de extracción en fase sólida (SPE) es la que se utiliza con mayor frecuencia debido a su gran poder de concentración y recuperación, así como por su sencillez y menor consumo de solventes en comparación al método tradicional de extracción líquido-líquido. Por este motivo ha sido ampliamente utilizada en la extracción de NP y NP<sub>n</sub>EOs a partir de fases líquidas (Di Corcia *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Stasinakis *et al.*, 2008).

El procedimiento empleado para la extracción de las muestras provenientes de la WSF consistió en pasar 2,5 mL de la WSF a través de columnas empacadas con 0,5 g de sílica RP C18 (octadecil sílica) fase reversa de 18 a 32 μm, 60 Å (ICN, Bélgica). Las mismas fueron previamente activadas con 7,5 mL de metanol (solvente activo) y 7,5 mL de agua bidestilada (equilibrante) (**Figura 44**). Luego del pasaje de las muestras con vacío (8-10 mL/min) a través de las columnas, las mismas se enjuagaron con 7,5 mL de metanol: agua bidestilada (10:90, v/v) para eliminar restos solubles en agua. La humedad se eliminó por aplicación de vacío durante 15 min. La elución de los analitos se realizó con 7,5 mL de AcEt. El solvente fue evaporado a temperatura ambiente con una corriente suave de N<sub>2</sub>. Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su posterior análisis (Babay *et al.*, 2008). La recuperación de NP10EO a partir de una

solución 1 g/L fue de  $92,6 \pm 5,8\%$ , mientras que la recuperación de NP10EO a partir de los extractos acuosos (WSF) provenientes de la hojarasca con NP10EO 1 g/L fue de  $83,3 \pm 2,7\%$ .



**Figura 44.** Muestras de la fracción soluble acuosa proveniente de los cultivos SSF pasando por las columnas C18.

#### 4.3.5. Biodegradación de NP10EO

La degradación de NP10EO fue estimada en:

- Los discos de agar (ensayos de toxicidad), mediante cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- La fracción soluble acuosa y fracción sólida de los cultivos bajo SSF, mediante CCD.

##### 4.3.5.1. *Cromatografía en capa delgada (CCD)*

La técnica de cromatografía en capa delgada (CCD) resulta útil para evaluar de manera rápida y semi-cuantitativa el patrón de etoxímeros que componen una mezcla comercial de NP $n$ EOs así como para el seguimiento de la degradación primaria de dichos compuestos. Los cambios operados en las moléculas afectan la migración en la placa cromatográfica y los distintos metabolitos pueden ser visualizados con tinciones específicas.

Se sembraron 10  $\mu$ L de muestra en placas de sílica en soporte de aluminio (TLC Silicagel 60G F<sub>254</sub>; Merck Millipore) y se desarrollaron en una mezcla de acetato de etilo: ácido acético glacial: agua en una

proporción 70:16:15, para separar los distintos etoxímeros producidos por la degradación del NP10EO. Una vez evaporado el solvente de corrida, se revelaron las placas mediante spray con reactivo de Burger modificado (John y White, 1998), el cual es específico para homólogos con cinco o más unidades etoxílicas. Este reactivo se une a moléculas que contienen grupos etoxilados, formando complejos naranja-amarronados. Inmediatamente después del revelado, se capturaron electrónicamente las imágenes mediante escáner de escritorio. Las imágenes se procesaron con el programa de análisis ImageJ 1.45s (NHI, Institutos Nacionales de Salud, EE.UU.) y se obtuvieron las curvas densitométricas para cada calle de la corrida cromatográfica. A partir de las mismas, se calcularon las relaciones de frente (Rf) correspondientes a cada banda (cada una definiendo un etoxímero diferente). Los porcentajes de degradación de NP10EO se calcularon mediante la integración y suma de las áreas correspondientes a los distintos etoxímeros y comparación con las muestras control sin inocular (100% NP10EO).

En primer lugar se realizaron diluciones seriadas a partir de una concentración de NP10EO patrón de manera de poder calcular la masa límite de detección es decir, la masa mínima de una sustancia que puede ser detectada en una muestra. El límite de detección para el NP10EO en las placas de CCD fue hallado en 2 µg. Por otro lado, se realizó una curva de calibración con el NP10EO patrón dentro de un rango de masa que permitió una buena visualización en las placas de CCD (0-30 µg), con el objetivo de poder realizar una cuantificación del NP10EO en las muestras. Se graficó el área total de los distintos etoxímeros en función de la masa de NP10EO patrón sembrada y la curva se aproximó a una regresión lineal la cual arrojó un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9996.

En el caso de las muestras provenientes de los ensayos de toxicidad (día 15), los extractos evaporados a partir de los tacos de agar se redisolviéron con AcEt en un volumen final que varió en función de la masa de NP10EO teórica calculada según el volumen del taco ( $\pi * \text{radio}^2 * \text{altura}$ ) en las muestras sin inocular (100%).

#### 4.3.5.2. *Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)*

Con esta técnica además de mejorar la resolución de la CCD, pueden revelarse los productos de degradación más cortos como el NP, NP1EO y NP2EO.

El sistema de HPLC empleado consistió en una bomba binaria Spectra SERIES P200 (Thermo Separation Products, California, EE.UU). La detección se realizó con un detector de fluorescencia Linear LC-305 (Linear Instruments, Nebraska, EE.UU.). Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 230 y 300 nm, respectivamente. Los datos fueron adquiridos y analizados con el software Konikrom

5.2 (Konik Instruments, Barcelona, España). La temperatura de las columnas se controló dentro de los 0.1°C utilizando un calefactor de columnas Eppendorf CH-30 y un controlador Eppendorf TC-50 (Alltech, Illinois, EE.UU.). Las soluciones estándar de t-NP, Igepal y NP10EO para el HPLC fueron preparadas por dilución de las soluciones stock de los compuestos individuales a 1 g/L con hexano: 2-PrOH (96:4) para t-NP, aprox. 2 g/L para Igepal y 10 g/L para el NP10EO.

Todas las soluciones se almacenaron a 4°C. Las separaciones se realizaron en una columna de aminopropil sílica (250 x 4,6 mm) con partículas de 5 µm y una columna guarda de 10 mm x 4,0 (Pinnacle II, Restek, EE.UU.). La temperatura de la columna se fijó en 35°C y los volúmenes de inyección fueron de 50 µL. La columna se dejó equilibrar hasta alcanzar una línea de base estable (aprox. por 30 min), al comienzo de la operación del equipo. La medición simultánea de ambos tipos de oligómeros, los cortos y largos, se realizó mediante la elución en un gradiente binario. Las fases móviles fueron A: hexanos (95% de n-hexano/5% hexanos ramificados) y B: 2-propanol. El programa comenzó isocráticamente con 96% A - 4% B por 15 min, con un gradiente lineal a través de 50% A- 50% B durante 27 min; finalmente hubo 6 min de espera isocrática con 100% B. La velocidad del flujo fue de 1 mL/min. La identificación de compuestos con menos de 3 unidades de óxido de etileno se realizó con los picos estándar de t-NP, 4-NP1EO y 4-NP2EO, mientras que los etoxímeros más grandes fueron asignados según su secuencia de elución en NP10EO.

Los extractos evaporados proveniente de los tacos de agar se redisolviéron en la mezcla de elución de HPLC. Los provenientes de los tacos de agar control, que no fueron inoculados con hongo, se redisolviéron con diferentes volúmenes de AcEt para lograr una concentración final única de 30 mg/L. El NP10EO residual se calculó como el porcentaje de área correspondiente a los picos cromatográficos para el surfactante en las muestras inoculadas con el hongo con respecto al control sin inocular (100% NP10EO). Se realizó una curva de calibración de t-NP, Igepal y NP10EO en las mismas condiciones del ensayo.

#### **4.3.6. Actividades enzimáticas en placa**

##### *4.3.6.1. Actividad lacasa*

La actividad lacasa se midió mediante la oxidación de DMP a 469 nm ( $\epsilon = 27.5/\text{mM cm}$ ), según Paszczyński y Crawford (1991). La mezcla de reacción consistió en 1,5 mL de DMP 5 mM en buffer acetato de sodio 100 mM (pH 3,6) y la reacción se inició mediante la adición de un taco de agar de 9 mm de diámetro tomado del borde de una colonia. Se monitoreó la absorbancia durante 2 min bajo agitación

vigorosa continua. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en 1 min.

#### 4.3.6.2. *Actividad MnP*

Para la medición de actividad MnP, 2,5 mL de sustrato (sulfato de manganeso 1 mM y rojo fenol 0,28 mM en 0,2 M de buffer succinato de sodio; pH 4,5), se mezclaron con un taco de agar de 9 mm de diámetro tomado del borde de una colonia y la solución se incubó a 30°C. La reacción se inició por el agregado de 25  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno (0,003%). Luego de 10 min de agitación continua, la reacción se frenó con 80  $\mu\text{L}$  de NaOH 5N. Inmediatamente se pasó a hielo y centrifugó durante 10 min. Se determinó la absorbancia a 610 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en las condiciones estándar del ensayo.

#### 4.3.7. **Análisis estadístico**

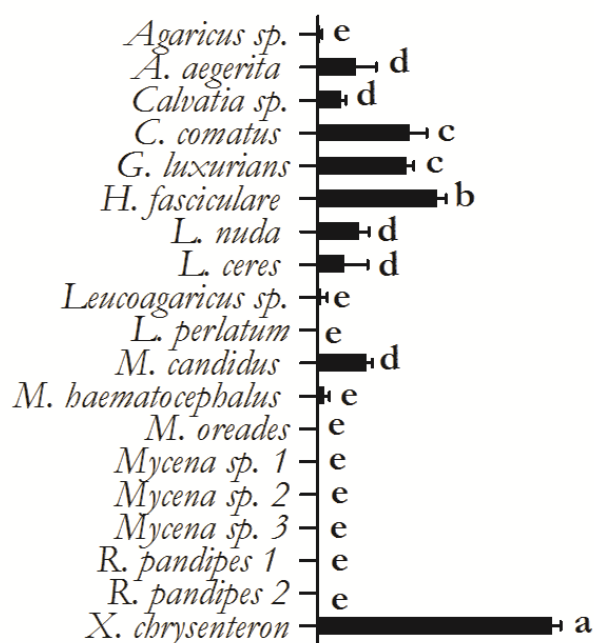
Se realizó un ANOVA de una sola vía para evaluar si existieron diferencias en las velocidades de crecimiento en el medio GA-NP10EO entre los aislamientos LDF. Las medias fueron comparadas mediante una prueba DGC con un nivel de significancia del 5%. Para poner a prueba las relaciones lineales entre el crecimiento de los distintos aislamientos en GA-NP10EO 1 g/L y la velocidad de crecimiento en MEA (apartado 2.3.7), se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ). Para el análisis, se utilizaron los software estadísticos STATISTICA 7.0 e INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013).

Las curvas de dosis-respuesta de los ensayos de toxicidad, se construyeron mediante el trazado de las velocidades de crecimiento frente a la concentración logarítmica de NP10EO. Los valores de CE50, se calcularon mediante una regresión no lineal utilizando el modelo “log (inhibidor) vs. respuesta normalizada – pendiente variable” incluido en el programa GraphPad Prism versión 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU). Se realizó un ANOVA para comparar las CE50 de los aislamientos ensayados en el test de toxicidad y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia del 5%. La degradación del NP10EO se analizó con un ANOVA de dos vías en el que la especie fúngica y la concentración de NP10EO fueron los factores principales.

## 4.4. RESULTADOS

### 4.4.1. Crecimiento en GA-NP10EO

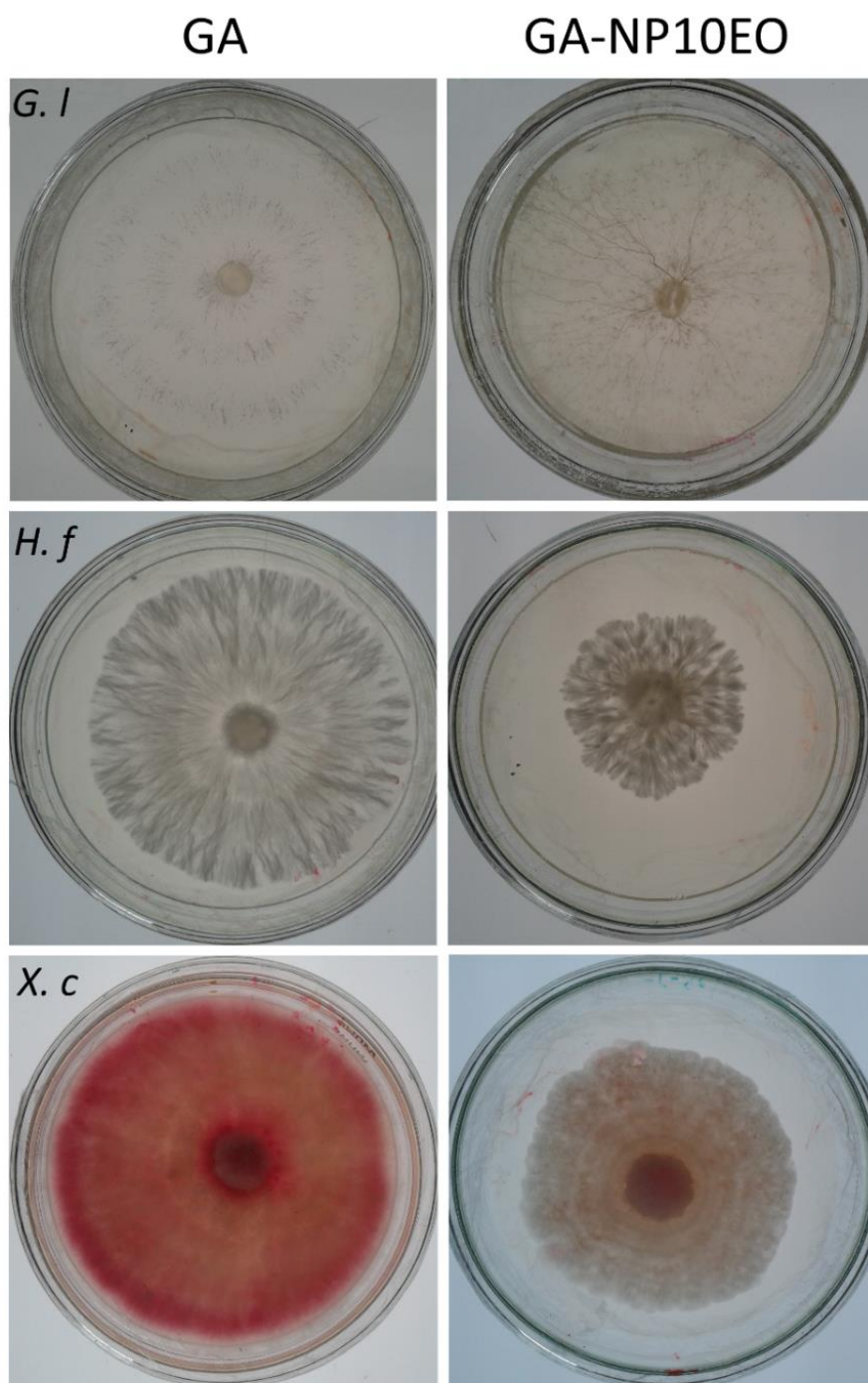
El total de basidiomicetes descomponedores de hojarasca se evaluó en función de su capacidad de crecer en un medio adicionado con NP10EO 1 g/L (GA-NP10EO) (**Figura 45**). En la mayoría de los aislamientos (55% aprox.), el surfactante resultó fuertemente tóxico, inhibiendo completamente o casi por completo el crecimiento micelial. *X. chrysenteron* presentó la tasa más alta de crecimiento radial ( $2,99 \pm 0,10$  mm/día), seguido de *H. fasciculare*, *C. comatus*, *G. luxurians* y *M. candidus*, y por lo tanto fueron seleccionados para los subsiguientes experimentos.



**Figura 45.** Velocidades de crecimiento (mm/día) en medio GA-NP10EO 1 g/L de los aislamientos LDF del Bajo Delta del Río Paraná y Ribera Platense. Las diferentes letras indican diferencias significativas a partir de comparaciones post hoc DGC ( $P < 0,05$ ). Los valores representan la media de dos réplicas  $\pm$  el desvío estándar.

La velocidad de crecimiento de los hongos en GA-NP10EO se correlacionó significativamente con la velocidad de crecimiento en un medio nutritivo común como MEA ( $r = 0,55$ ;  $P = 0,0004$ ). La inhibición en el crecimiento por el agregado del alquilfenol polietoxilato estuvo acompañada por cambios macroscópicos en la morfología de las colonias, como se puede observar en la **Figura 46** con los aislamientos que presentaron las mayores velocidades de crecimiento. Entre ellos podemos mencionar una tendencia a la formación de cordones miceliales (hifas agregadas que corren en sentido paralelo) en

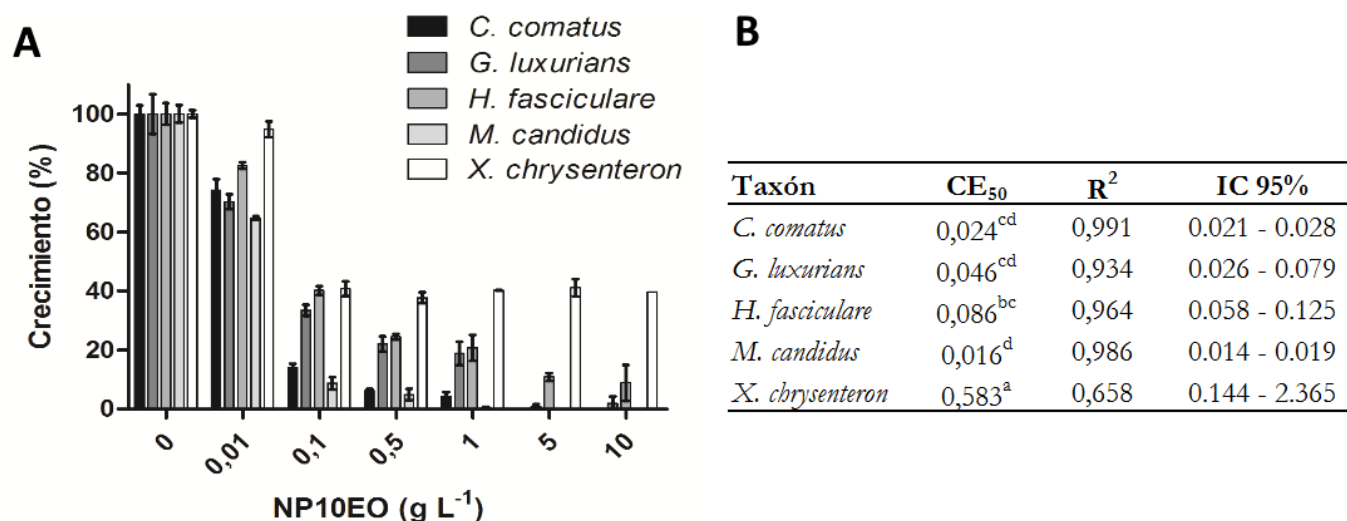
los LDF *G. luxurians* y *H. fasciculare*. En *X. chrysenteron* se produjo un cambio de coloración, de violáceo intenso a un crema con tintes violetas, y el micelio se volvió más denso y plano.



**Figura 46.** Cambios morfológicos observados en las colonias de *G.l* (*G. luxurians*), *H.f* (*H. fasciculare*) y *X.c* (*X. chrysenteron*) debido al agregado de NP10EO sobre el medio GA.

#### 4.4.2. Ensayos de toxicidad

Con el fin de evaluar el efecto del surfactante sobre el crecimiento fúngico de forma más detallada, los aislamientos seleccionados fueron sometidos a diferentes concentraciones de NP10EO en el rango de concentración 0 - 10 g/L. Los valores de CE50 calculados a partir de las curvas de toxicidad se muestran en la **Figura 47**.



**Figura 47. A.** Inhibición en el crecimiento (%) al día 7 de cultivo de los LDF seleccionados por el agregado de distintas concentraciones de NP10EO al medio GA. **B.** Valores de CE<sub>50</sub>. Las diferentes letras indican diferencias significativas a partir de las comparaciones realizadas con el test de Tukey ( $P < 0,0001$ ). Los valores representan la media de tres réplicas.

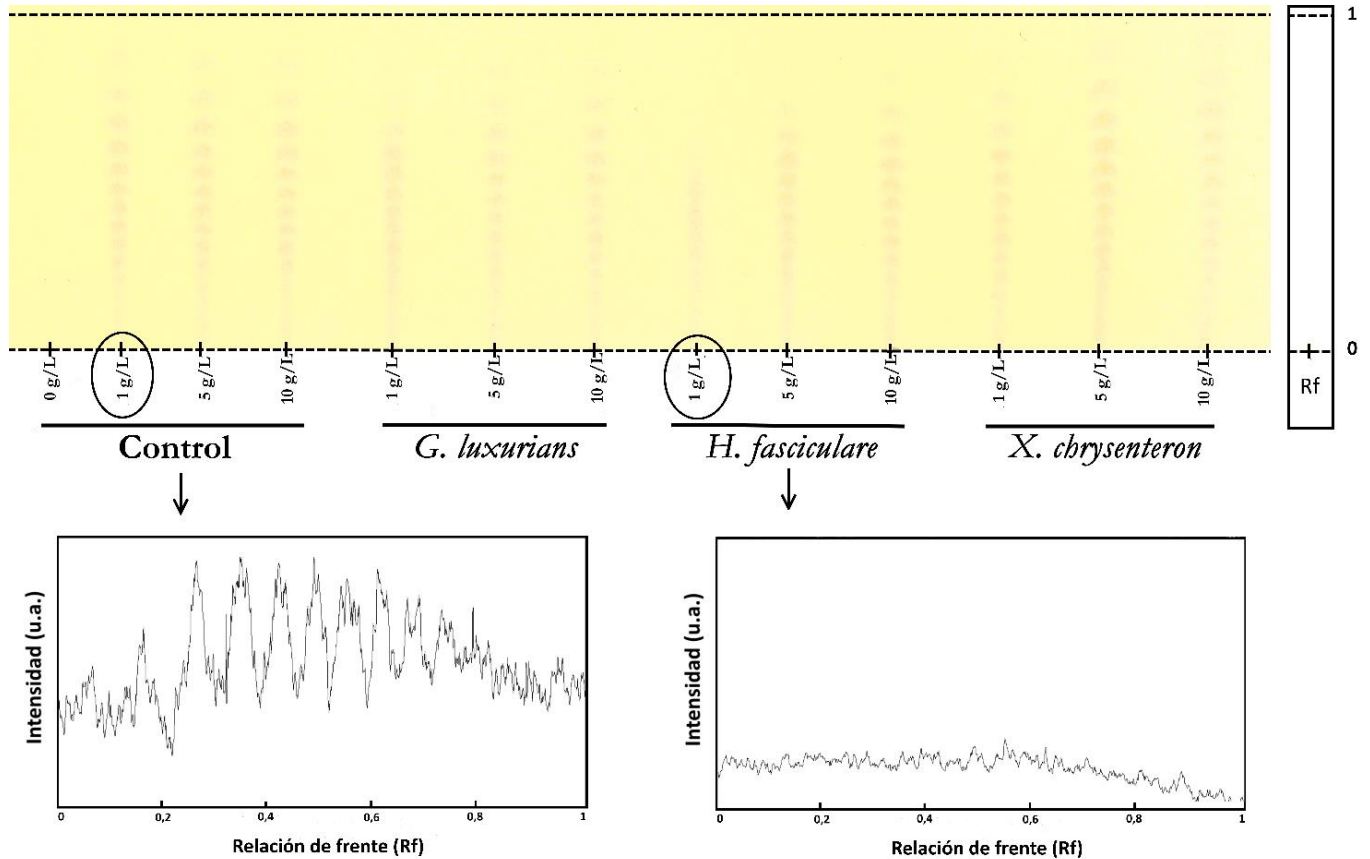
Los aislamientos más sensibles al agregado de NP10EO resultaron *C. comatus* y *M. candidus*, con CE<sub>50</sub> de 0,024 y 0,016 respectivamente, y una inhibición total del crecimiento en presencia de una concentración  $\geq$  a 5 g/L de surfactante. *H. fasciculare*, *G. luxurians* y *X. chrysenteron*, resultaron los aislamientos más resistentes a la presencia de NP10EO, siendo capaces de crecer en todo el rango de concentraciones evaluado. Sin embargo, mientras que *H. fasciculare* y *G. luxurians* presentaron una inhibición gradual en el crecimiento, en presencia de concentraciones crecientes del xenobiótico, el crecimiento de *X. chrysenteron* se redujo marcadamente en presencia de una concentración de 0,1 g/L y luego se mantuvo constante, con valores cercanos al 60% de inhibición respecto del control ( $P < 0,05$ ) (**Figura 47A**). Los valores de CE<sub>50</sub> máximos se obtuvieron con *X. chrysenteron*, aunque el R<sup>2</sup> fue muy bajo, probablemente debido al patrón de inhibición anteriormente señalado (**Figura 47B**). Con el fin de



reducir el número de aislamientos seleccionados para los estudios de degradación, tanto *C. comatus* y *M. candidus* fueron descartados debido a su mayor sensibilidad al surfactante.

#### 4.4.3. Biodegradación de NP10EO de los cultivos en placa

Para comprobar si los hongos seleccionados a partir de los ensayos de toxicidad, además de tolerar el surfactante pudieron eliminarlo, se tomaron discos de agar de 9 mm de diámetro del borde de la colonia al día 15 de cultivo (GA-NP10EO a las concentraciones de 1, 5 y 10 g/L) y, luego de la extracción, se calculó el porcentaje del surfactante remanente. La biodegradación fue evaluada mediante cromatografía en capa delgada (CCD) por comparación entre el área correspondiente al patrón de bandas de las muestras inoculadas con los hongos seleccionados y las muestras control sin inocular (**Figura 48**).



**Figura 48.** Cromatografía en capa delgada de las muestras a los 15 días de cultivo en cajas de Petri conteniendo GA-NP10EO 1 g/L, 5 g/L y 10 g/L con los LDF seleccionados. Se señala el espectro de corrida obtenido con el programa Image J para las muestras control y el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de degradación. La migración diferencial de las bandas observadas en la placa cromatográfica (o los distintos picos del espectro) corresponden a los diferentes etoxímeros del NP10EO. A medida que el etoxímero es más corto se produce una migración más cercana al frente de corrida (Rf mayores).

En los tratamientos control, pudieron visualizarse nítidamente 10 bandas correspondientes a la separación de los homólogos del tensioactivo en la corrida cromatográfica, con valores de Rf que fueron desde  $0,17 \pm 0,01$  hasta  $0,82 \pm 0,03$ .

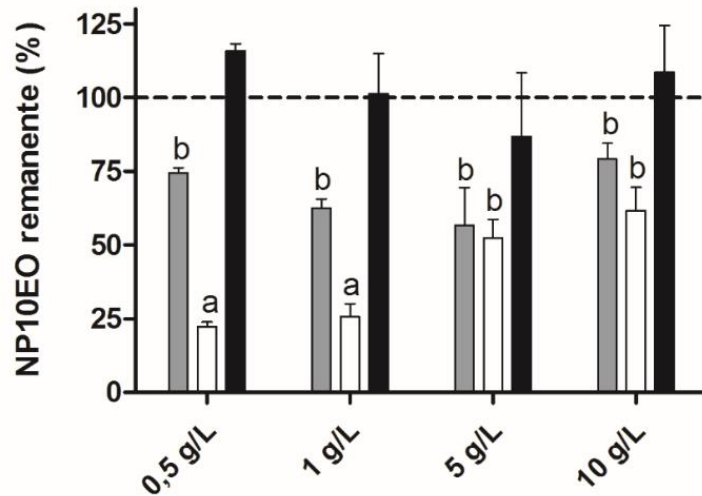
La mayor degradación fue observada con *H. fasciculare* a la concentración de surfactante de 1 g/L, con un valor cercano al 80% (**Tabla 10**). A 5 y 10 g/L, los porcentajes de eliminación fueron similares con valores próximos al 65%. *G. luxurians* también demostró eficiencia en la degradación presentando valores similares en todo el rango de surfactante evaluado (60-65%). En contraste, no se encontraron diferencias entre los controles y *X. chrysenteron*, por lo que este aislamiento no sería capaz de eliminar el surfactante en las condiciones ensayadas.

**Tabla 10.** Porcentajes de degradación de NP10EO en placa por hongos seleccionados

[NP10EO] g/L	NP10EO remanente (%)		
	<i>G. luxurians</i>	<i>H. fasciculare</i>	<i>X. chrysenteron</i>
1	42,02	20,2	94,5
5	37,41	35,5	124
10	36,11	35,9	107,5

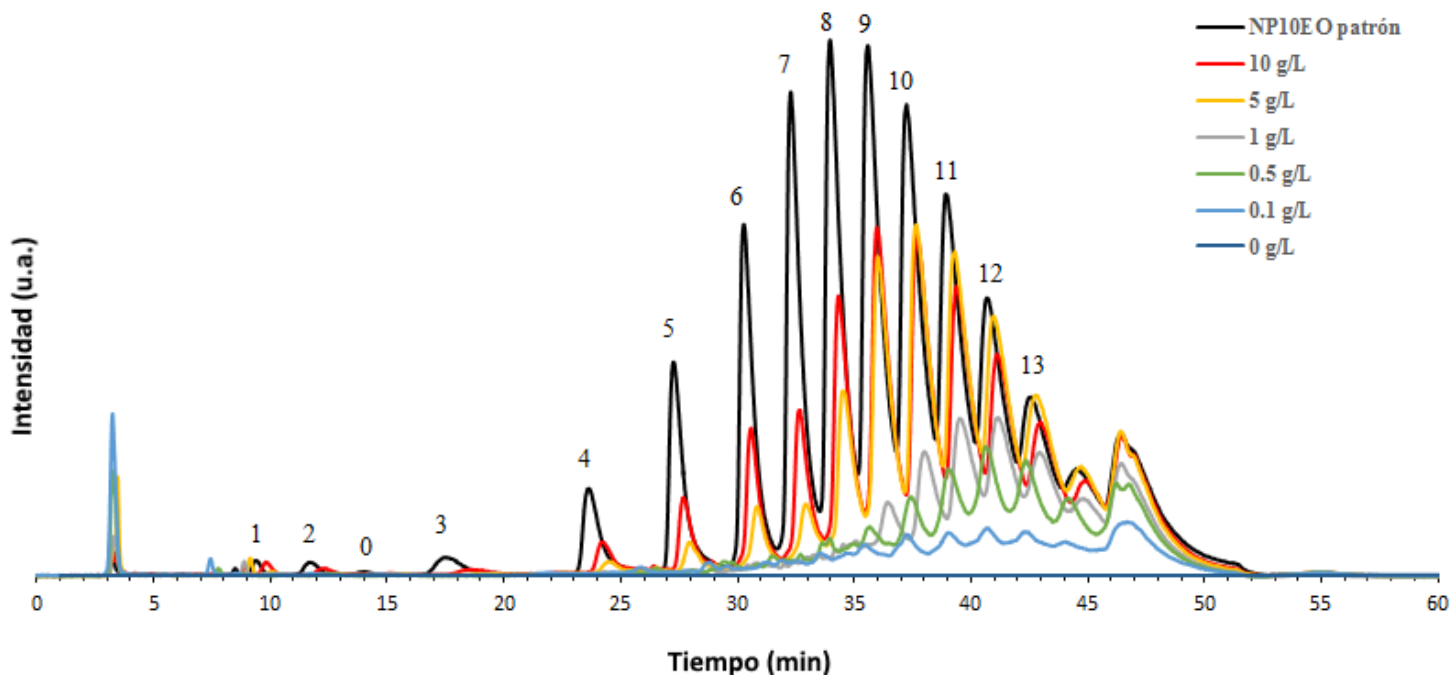
Con el objetivo de obtener una cuantificación más precisa de la degradación y determinar si hubo formación de productos de degradación de cadena corta (que no se pueden visualizar nítidamente por CCD), los mismos tratamientos fueron evaluados por HPLC (**Figura 49**). Al igual que para la CCD, se encontró que *H. fasciculare* fue el aislamiento más eficiente en la eliminación del surfactante, con una remoción del  $77,7 \pm 1,67\%$  a 0,5 g/L y  $74,4 \pm 4,43\%$  a 1 g/L. A 0,1 g/L la degradación fue casi completa ( $88,8 \pm 1,76\%$ ) (**Figura 49**).

A medida que la concentración de NP10EO aumentó, *H. fasciculare* fue menos activo en la degradación del surfactante y por encima de los 5 g/L, ésta resultó comparable a la obtenida con *G. luxurians*. *G. luxurians* exhibió una eliminación promedio del xenobiótico de 31,8% sin encontrar diferencias significativas en la degradación en todo el intervalo de concentración evaluado. Finalmente, *X. chrysenteron* fue incapaz de degradar el NP10EO y no se detectaron diferencias en los porcentajes de NP10EO residual con respecto al control abiótico.



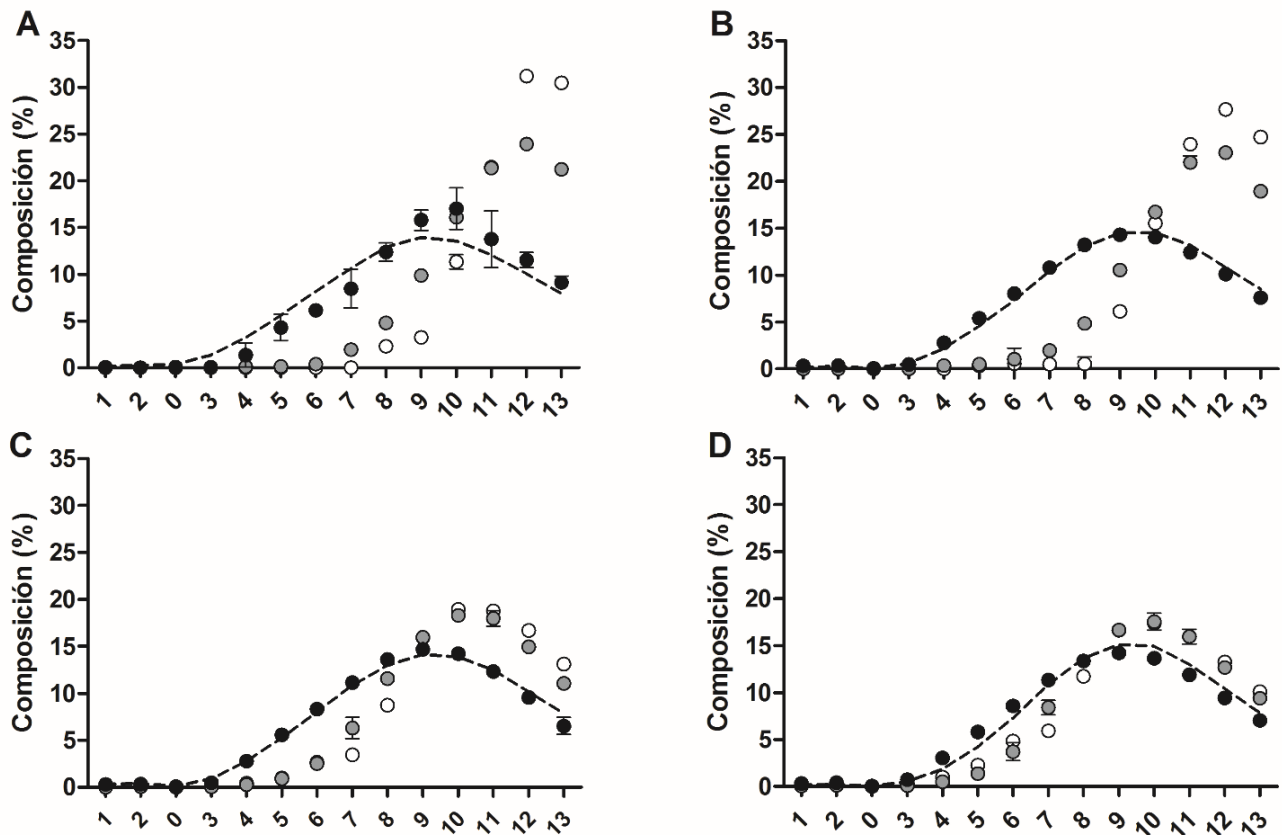
**Figura 49.** Biodegradación de NP10EO por LDF seleccionados: *G. luxurians* (■), *H. fasciculare* (□) y *X. chrysenteron* (■). Los valores representan la media de dos réplicas  $\pm$  desvío estándar.

En la **Figura 50** se observa el perfil de distribución de los distintos homólogos presentes en la mezcla NP10EO (curva control) analizados por HPLC. Este perfil presenta una distribución de Poisson con una intensidad máxima para los homólogos NP8EO y NP9EO y una disminución bilateral en la intensidad para el resto de homólogos. Se señala hasta el polietxilato NP13EO ya que a mayores tiempos de retención la resolución se volvió difusa y por lo tanto sus respectivas áreas no fueron tenidas en cuenta en los análisis de degradación. A modo de ejemplo, se muestra en la misma figura los cromatogramas obtenidos para *H. fasciculare* creciendo en un medio conteniendo distintas concentraciones del surfactante (0-10 g/L). Se puede apreciar que todos los etoxilatos presentes en el surfactante fueron biológicamente degradables.



**Figura 50.** Cromatogramas de NP10EO 30 mg/L para *H. fasciculare* luego de 15 días en cultivo en GA-NP10EO a las concentraciones indicadas. Las marcas encima de los picos indican el número ( $n$ ) de grupos etoxi en el correspondiente oligómero NP $n$ EO.

Además, se observó una eliminación diferencial de oligómeros como una función de la concentración de NP10EO y el aislamiento fúngico empleado (**Figura 51**). A concentraciones más bajas de NP10EO, especialmente con *H. fasciculare* y *G. luxurians* quienes mostraron los más altos porcentajes de degradación, los etoxímeros con  $n \leq 6$  fueron completamente degradados, los etoxímeros con un largo intermedio  $7 < n \leq 9$  fueron agotados con respecto al NP10EO patrón, y la proporción de los etoxímeros con  $n > 9$  se incrementó. A concentraciones más altas de NP10EO, la composición de etoxímeros relativa fue similar a la del NP10EO patrón. Por lo tanto, en el presente estudio no se encontró una acumulación de metabolitos de alquilfenol de cadena corta (NP1EO-NP3EO) ni de nonilfenol (NP), como consecuencia de la transformación fúngica del NP10EO en ninguna de las concentraciones ensayadas.

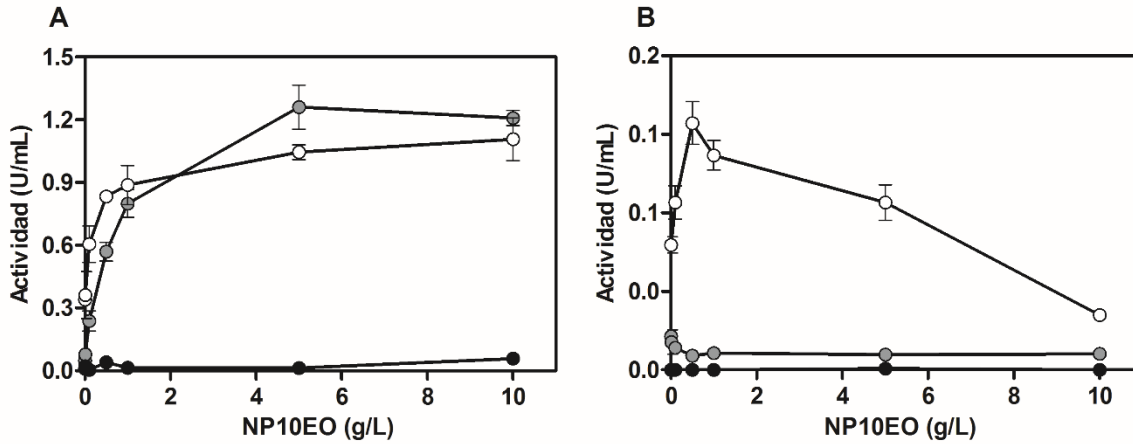


**Figura 51.** Composición relativa de etoximeros (%) a los 15 días de cultivo en placa en GA-NP10EO a las concentraciones: **A.** 0,5 g/L **B.** 1 g/L **C.** 5 g/L y **D.** 10 g/L con los hongos seleccionados *G. luxurians* (●), *H. fasciculare* (○) y *X. chrysenteron* (●). La composición de etoximeros del control sin inocular se muestra en (---). Los valores representan la media de dos réplicas  $\pm$  el desvío estándar.

#### 4.4.4. Actividades enzimáticas en placa

Las actividades enzimáticas extracelulares lacasa y MnP producidas por los hongos LDF seleccionados se analizaron al día 15 del periodo de cultivo (**Figura 52**). Tanto *H. fasciculare* como *G. luxurians* fueron capaces de producir lacasa, con títulos enzimáticos que resultaron dependientes de la concentración de NP10EO empleada. Para ambos aislamientos, la producción enzimática resultó significativamente mayor a la obtenida en el control sin surfactante a partir de los 0,5 g/L de NP10EO ( $P < 0,05$ ), con títulos de actividad crecientes hasta la concentración de 1 g/L, manteniéndose luego en valores constantes cercanos a 1,1 U/mL en *H. fasciculare*, correspondientes a un aumento de 3 veces en la actividad registrada en el control; y a 1,2 U/mL en *G. luxurians*, con un incremento de 25 veces en la actividad. La actividad MnP fue muy baja en *G. luxurians* con un valor promedio de  $0,013 \pm 0,001$  U/mL, sin encontrarse diferencias significativas entre los cultivos con y sin el agregado del surfactante ( $P < 0,05$ ).

Por el contrario, la producción de MnP por *H. fasciculare* fue máxima a los 0,5-1 g/L ( $P < 0,05$ ) y presentó un pico de actividad con un valor correspondiente a  $0,157 \pm 0,019$  U/mL, equivalente a un aumento cercano a 20 veces en la actividad. En *X. chrysenteron* no se detectó actividad lacasa ni MnP.

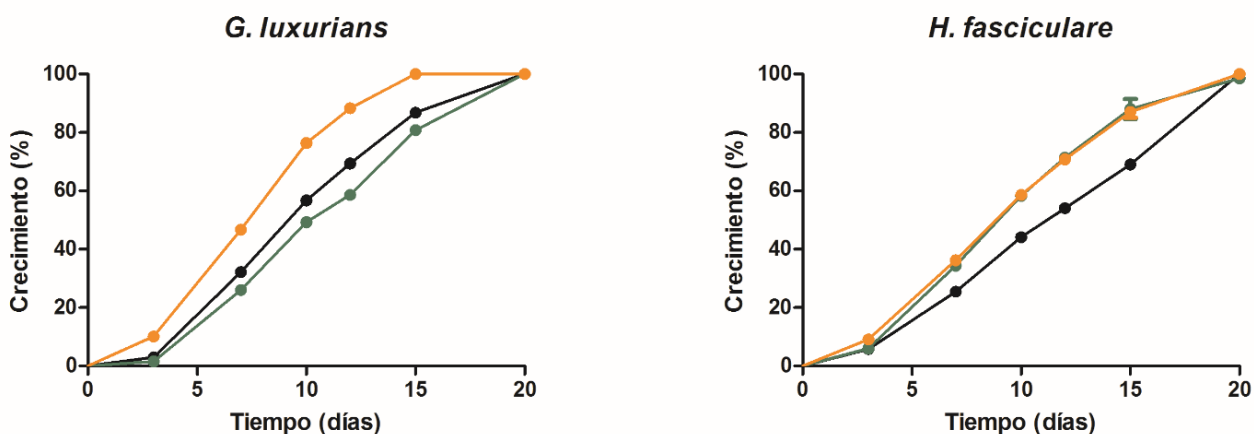


**Figura 52.** Actividad lacasa (A) y MnP (B) a los 15 días de cultivo en placa en medio GA suplementado con diferentes concentraciones NP10EO con los hongos seleccionados: *G. luxurians* (-●-), *H. fasciculare* (-○-) y *X. chrysenteron* (-◆-). Los valores representan la media de dos réplicas  $\pm$  el desvío estándar.

#### 4.4.5. Crecimiento en placa con extractos de hojarasca

Con el objetivo de pasar al sistema de fermentación en estado sólido (SSF), se estudió inicialmente el efecto del agregado de extractos de hojarasca de *C. tala* (GAT) y *L. lucidum* (GAL) sobre el crecimiento de los LDF seleccionados, *G. luxurians* y *H. fasciculare*, en el medio nutritivo GA agarizado. Dado que *X. chrysenteron* no es un LDF saprótrofo y que no fue capaz de degradar el NP10EO ni de producir las enzimas ligninolíticas lacasa o MnP en las condiciones testeadas, este aislamiento no se incorporó a los ensayos posteriores.

Los dos hongos evaluados mostraron una respuesta diferencial al agregado de los dos tipos de extractos. El extracto de *L. lucidum* estimuló tanto el crecimiento de *G. luxurians* como el de *H. fasciculare*, con un aumento en el desarrollo micelial respecto al control GA de  $34,8 \pm 1,8\%$  en *G. luxurians* y de  $32,7 \pm 4,9\%$  en *H. fasciculare* a los 10 días de cultivo. Por el contrario, el extracto de *C. tala* causó una inhibición del  $13,06 \pm 0,6\%$  en el crecimiento de *G. luxurians* pero estimuló el crecimiento de *H. fasciculare* en un  $32,0 \pm 0,2\%$  (Figura 53).



**Figura 53.** Efecto del extracto de hojas de *L. lucidum* (GAL —●—) y *C. tala* (GAT —●—) sobre el crecimiento de los hongos LDF *G. luxurians* y *H. fasciculare* en medio GA agarizado —●—.

#### 4.4.6. Cultivos fúngicos sobre hojarasca bajo SSF

Al pasar al sistema de fermentación en estado sólido con hojarasca de *L. lucidum* o *C. tala* como únicas fuentes metabólicas, se encontró que los cultivos con hojarasca de *C. tala* no permitieron el crecimiento fúngico ni de *G. luxurians* ni de *H. fasciculare*. Por lo tanto sólo los cultivos con extracto de *L. lucidum* fueron analizados.

En cuanto a las determinaciones analíticas evaluadas en la WSF proveniente de los cultivos con ligustro, no se encontraron diferencias entre los tratamientos que tuvieron el agregado del surfactante respecto de los que no lo tuvieron (**Tabla 11**). Las diferencias pudieron detectarse en todos los casos entre el tiempo inicial y final. El pH se acidificó ligeramente, pasando de 4,99 a cerca de 4,20. Tanto los azúcares reductores, como las proteínas y los polifenoles disminuyeron hacia el final del periodo de cultivo. Los azúcares fueron consumidos en mayor medida por *H. fasciculare* que por *G. luxurians*, con una reducción del  $82,3 \pm 4,3\%$  y  $62,1 \pm 11,2\%$  respectivamente. Las proteínas solubles disminuyeron un  $21,8 \pm 1,4\%$ , sin detectarse diferencias significativas entre los aislamientos estudiados, mientras que los polifenoles fueron transformados casi en su totalidad, en mayor medida por *G. luxurians* ( $97,4 \pm 1,3\%$ ) que por *H. fasciculare* ( $93,2 \pm 2,4\%$ ).

Algo similar ocurrió con las actividades enzimáticas determinadas en la WSF (**Tabla 12**). En ningún caso se observó un efecto significativo sobre la producción enzimática de estos hongos debido al agregado del surfactante. Las diferencias se registraron a nivel de especie fúngica empleada para la actividad endoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. Los niveles de ligninasas fueron muy bajos en general.

**Tabla 11.** Determinaciones analíticas en la WSF de los cultivos fúngicos bajo SSF

Tiempo	Hongo	NP10EO 1 g/L	pH	Azúcares mg/g	Proteínas mg/g	Polifenoles mg/g
inicial			4,99 ± 0,02	34,90 ± 3,17	11,25 ± 0,48	8,40 ± 0,65
final	<i>G.luxurians</i>	-	4,23 ± 0,08	15,10 ± 4,47	8,65 ± 0,03	0,19 ± 0,08
		+	4,35 ± 0,20	11,38 ± 2,65	8,48 ± 0,17	0,25 ± 0,14
	<i>H.fasciculare</i>	-	4,12 ± 0,05	7,23 ± 1,07	8,76 ± 0,10	0,65 ± 0,17
		+	4,15 ± 0,26	5,14 ± 1,25	8,62 ± 0,21	0,49 ± 0,23

**Tabla 12.** Actividades enzimáticas en la WSF de los cultivos fúngicos bajo SSF

Hongo	NP10EO 1 g/L	Endoglucanasa U/g	$\beta$ -glucosidasa U/g	Mn-P U/g	Lacasa U/g
<i>G.luxurians</i>	-	1,64 ± 0,24 (2)*	0,44 ± 0,09 (1)	0,03 ± 0,01 (1)	0,49 ± 0,29 (1)
	+	1,97 ± 0,44 (2)	0,54 ± 0,05 (1)	0,05 ± 0,02 (1)	0,49 ± 0,28 (1)
<i>H.fasciculare</i>	-	4,54 ± 0,10 (3)	0,11 ± 0,03 (1)	0,07 ± 0,01 (1)	0,15 ± 0,18 (1)
	+	5,15 ± 0,57 (3)	0,10 ± 0,01 (1)	0,05 ± 0,01 (1)	0,10 ± 0,21 (1)

\*Entre paréntesis se indica el tiempo (mes) en el que se obtuvieron los mayores títulos de actividad

#### 4.4.7. Biodegradación de NP10EO de los cultivos bajo SSF

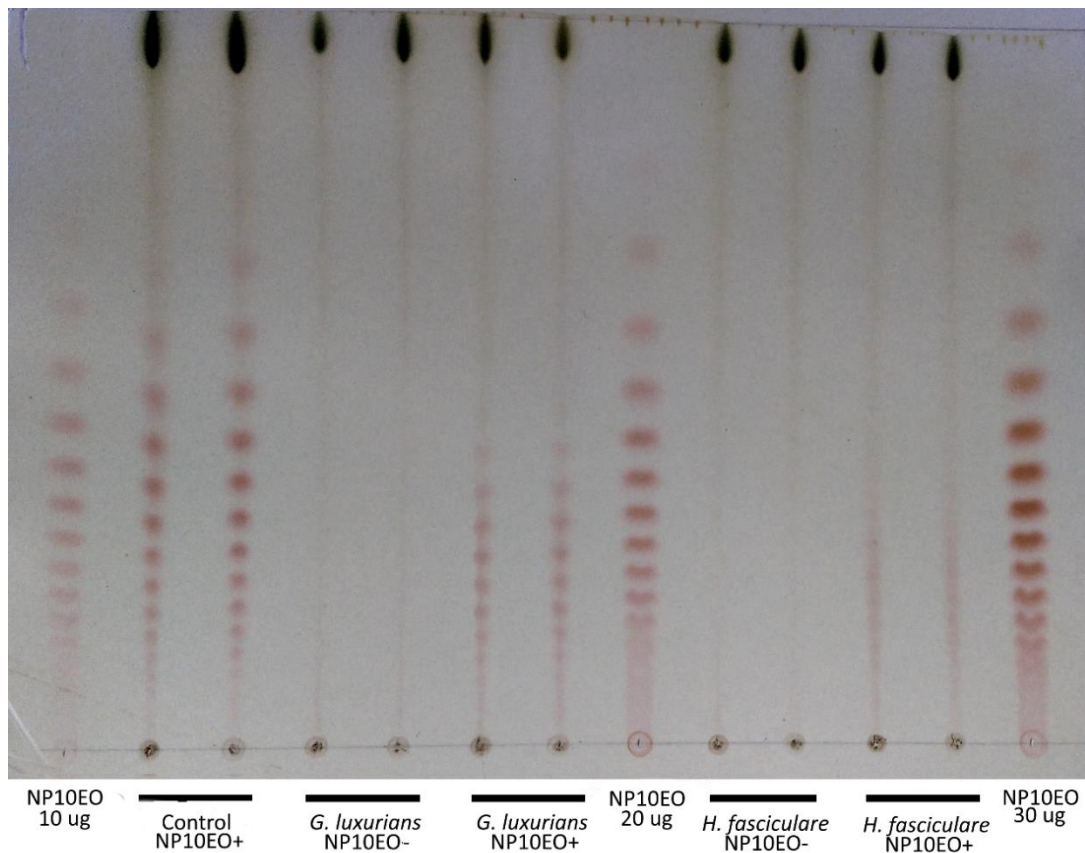
Si bien los títulos de las ligninasas testeadas: de lacasa y en particular de MnP, fueron muy reducidos en todas las condiciones ensayadas durante la SSF, se evaluó la capacidad de ambos hongos de degradar el NP10EO en estas condiciones de cultivo. El contenido de NP10EO en las fracciones líquidas (WSF) y sólidas (SSF) de los cultivos fúngicos bajo SSF fue evaluado mediante CCD y comparados con los tratamientos sin inocular (**Figura 54**). La técnica de CCD, a pesar de ser semi-cuantitativa, arrojó resultados muy similares a los valores obtenidos por HPLC (sección 4.3.5.2.), por lo que resultaría una técnica confiable en la estimación de los porcentajes de degradación.

Al analizar la presencia del surfactante en la SF de los tratamientos control, se encontró un  $52,1 \pm 8,2\%$  de la masa del NP10EO que fue adherida en los cultivos SSF al inicio del experimento. Teniendo en cuenta que la eficiencia de extracción de los polietoxilatos de nonilfenol en el sistema de SSF con hojarasca de *L. lucidum* fue de  $50,3 \pm 2,2\%$  y que no se encontraron rastros de ningún etoxímero del surfactante en ninguna de las WSF analizadas (tampoco en los controles), es probable que el detergente haya sido adsorbido casi completamente a la hojarasca utilizada.

Al comparar el NP10EO remanente en la fracción sólida de los cultivos SSF inoculados con *H. fasciculare* respecto de los cultivos sin inocular, se encontró que este aislamiento fue capaz de remover el



51,7 ± 22,1% al mes de incubación y el 96,3 ± 1,4% al tercer mes de incubación. Por su lado, *G.luxurians* degradó un 60,0 ± 0,1% del tensioactivo al mes de cultivo bajo SSF y un 71,3 ± 3,8% al tercer mes de cultivo (**Figura 54**).



**Figura 54.** CCD de las muestras derivadas de la extracción del NP10EO a partir de la fracción sólida al tercer mes de cultivo bajo SSF conteniendo hojarasca de *L. lucidum* con y sin el agregado del surfactante al 0,1% y que fueron inoculados con los LDF seleccionados. Las corridas cromatográficas se realizaron por duplicado.

## 4.5. DISCUSIÓN

El crecimiento de los hongos de hojarasca que fueron aislados en la región del Delta del Río Paraná y Ribera Platense fue afectado considerablemente por el agregado del surfactante NP10EO 1 g/L al medio de cultivo agarizado. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los aislamientos presentó un crecimiento considerable con una fuerte correlación positiva para el crecimiento en este medio de cultivo y el medio MEA, por lo que los aislamientos seleccionados según su velocidad de crecimiento fueron aquellos que presentaron un vigoroso crecimiento en general (**Figura 45**). De un total de 19 aislamientos, los LDF *H. fasciculare* y *G. luxurians* y el ECM *X. chrysenteron* fueron los de mayor velocidad de crecimiento así como los que tuvieron una mayor tolerancia al surfactante en un amplio rango de concentraciones (entre 0 y 10 g/L) (**Figura 45; Figura 47**). La morfología de sus colonias presentó cambios apreciables debido al agregado del surfactante, tal como la formación de cordones miceliales (**Figura 46**), lo cual se relacionaría con la capacidad que tienen estos hongos para adaptarse a diversos ambientes. Esta agregación permite una mayor interconexión del micelio y, aunque resulta costosa en términos energéticos, proporciona rutas de transporte alternativo y por ende una mayor resiliencia frente al daño (Bebber *et al.*, 2007; Fricker *et al.*, 2007). Por otro lado, al igual que sucedió con *X. chrysenteron*, se han reportado cambios en la producción de metabolitos pigmentados cuando algunas especies fúngicas son sometidas a un estrés químico, como el generado por un xenobiótico, tal es el caso de *Stereum hirsutum* creciendo en presencia de cadmio que presentó una coloración anaranjada (Baldrian y Gabriel, 1997). En general, la melanización de las colonias o de diferentes estructuras como clamidosporas o rizomorfos, están asociadas a una mayor tolerancia al estrés y es de relevancia ecológica en diferentes situaciones, como puede ser la supervivencia en suelos contaminados (Gadd, 1993).

La CE50 es una medida del efecto tóxico provocado por una sustancia sobre un organismo vivo. La toxicidad del NP10EO sobre los hongos seleccionados fue ensayada mediante la medición de la inhibición del crecimiento micelial, hallándose una CE50 de 583 mg/L para *X. chrysenteron*, 86 mg/L para *H. fasciculare* y 46 mg/L para *G. luxurians* (**Figura 47**). Lamentablemente no existen datos disponibles en la literatura de CE50 del NP10EO en hongos u otros organismos, sino que la mayoría de datos existentes reportan CE50 para el nonilfenol, metabolito más tóxico, que resulta de la degradación biológica natural del NP10EO. Por ejemplo, Karley *et al.* (1997) reportaron que el NP tiene efectos negativos sobre hongos filamentosos a concentraciones de 1,3 - 6,2 mg/L vía el desacople de la respiración y la inducción de múltiples efectos fisiológicos, mientras que Kollmann *et al.* (2003) reportaron que el NP no tiene efectos negativos sobre los hongos a concentraciones ambientales (0,08 – 1,45 mg/L), al ensayar la aplicación de barros activados sobre suelos para la agricultura. El crustáceo modelo utilizado en ensayos de

ecotoxicología *Daphnia magna* presentó una CE50 de 1,5 mg/L para el NP10EO y 0,18 mg/L para el NP a las 48 hs de exposición. En cultivos celulares *in-vitro* de 14 especies diferentes de plantas se encontraron CE50 para el NP entre 11 y 220 mg/L (Bokern y Harms, 1997). Para tener una idea comparativa estimada, Canadá desarrolló un factor tóxico de equivalencia (TEF) entre el NP y los NP $n$ EOS, y asumen en 0,005 el factor para los polietoxilatos con  $n \geq 9$ , es decir que estos últimos serían unas 200 veces menos tóxicos que el NP (Canada, 2002). Datos en los que se utilizan polietoxilatos de nonilfenol fueron reportados en los peces killi, con una toxicidad de 12 mg/L para el NP9EO (Canada, 2002), y en *Pimephales promelas* una letalidad del 50% (LC50) con 6,6 mg/L también de NP9EO a las 96 hs.

Tanto *G. luxurians* como *H. fasciculare* resultaron eficientes degradadores del surfactante luego de 15 días de ser cultivados en placa de Petri. Por el contrario, *X. chrysenteron* fue el aislamiento que resultó más tolerante al surfactante pero no fue capaz de eliminarlo (**Tabla 10; Figura 49**). Los mayores porcentajes de remoción se encontraron con *H. fasciculare* a 0,1 g/L ( $88,8 \pm 1,76\%$ ) y, si bien la eficiencia de degradación disminuyó a concentraciones crecientes del surfactante, a 10 g/L la remoción fue de  $38,3 \pm 7,9\%$  (**Figura 50**). Se encuentra bien establecido que los compuestos parentales alquilfenol etoxilatos (APEs) presentan una rápida biodegradación primaria, tanto aerobia como anaerobia, pudiendo ser llevado a cabo por diferentes grupos filogenéticos, como se demuestra en diferentes ensayos en los que se utilizan aguas de ríos, sedimentos, efluentes y suelos (Jonkers *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 1999; Staples *et al.*, 2001). En plantas de tratamiento de efluentes se reporta entre 90 y 99% de eficiencia de remoción para estos compuestos, aunque también se han reportado valores entre 50 y 90% en plantas de funcionamiento más ineficientes (Maguire, 1999). Sin embargo, que los aislamientos ensayados hayan presentado una alta remoción de NP10EO, incluso a elevadas concentraciones como las empleadas (10 g/L), da una idea del potencial degradativo que presentan estos hongos. La capacidad de degradación de NP por hongos ha sido demostrada en *T. versicolor* y *Bjerkandera* sp., quienes luego de 25 días de incubación en presencia de NP 0,1 g/L, lo eliminaron casi por completo ( $\geq 97\%$ ) (Soares *et al.* 2005). Por su parte, Cabana *et al.* (2007) registraron una remoción de NP 0,005 g/L mayor al 95% luego de 4 hs. de incubación con una preparación enzimática del hongo *Corioloropsis polizona*.

En el presente estudio, no se encontró una acumulación de metabolitos de alquilfenol (NP y NP1EO-NP2EO) como consecuencia de la transformación fúngica del NP10EO en ninguna de las concentraciones ensayadas y en ninguno de los tiempos de exposición al surfactante evaluadas, sino que se observó una tendencia a la eliminación de los homólogos con menor número de grupos etoxi (**Figura 51**). Aunque no pueda descartarse la presencia de etoxicarboxilatos de nonilfenol (NP1EC, NP2EC, etc.), ya que los mismos no pueden visualizarse por HPLC o TLC en las condiciones ensayadas, estos compuestos son en general menos tóxicos que los correspondientes homólogos etoxilados (NP1EO y

NP2EO), mostrando grados de toxicidad aguda similares a los NP $n$ EOs con  $n \geq 9$  (TEF = 0,005)(Canada, 2002).

Si bien no existen reportes sobre el mecanismo de degradación fúngica de polietoxilatos de nonilfenol que sustenten los resultados obtenidos en el presente trabajo, éstos son de relevancia ya que usualmente los compuestos intermedios producto de la degradación primaria, son más tóxicos y persistentes que los compuestos que los originan y suelen acumularse principalmente en las fracciones sedimentables de las plantas de tratamiento pero también en los efluentes tratados (Giger *et al.*, 1984; Jonkers *et al.*, 2001; Potter *et al.*, 1999; Thiele *et al.*, 1997). En contraposición con los resultados obtenidos en la presente investigación, en trabajos previos en los que se estudió la degradación aeróbica de los polietoxilatos de nonilfenol por cultivos microbianos mixtos y puros, se evidenció la formación de etoxímeros cortos (con  $n \leq 4$ ), etoxicarboxilatos de nonilfenol (NP $n$ EC) y otras moléculas más solubles en agua como los etoxicarboxilatos con la cadena alquílica también oxidada a su forma ácida (CAPECs) (Di Corcia *et al.*, 2000; John y White, 1998). Por ejemplo, Lozada *et al.* (2004) encontraron una acumulación del metabolito mayoritario NP2EO y de los metabolitos minoritarios NP1EO y NP3EO al ensayar la biodegradación de NP10EO 60 mg/L en sistemas aerobios de barros activados, mientras que Hayashi *et al.* (2005) encontraron, luego de 25 días de cultivo con un inóculo proveniente de un efluente, una formación cercana al 48% de NP2EO y 18% de NP3EO respecto del NP10EO inicial que fue adherido como único oligómero al sistema (purificado a partir de la mezcla comercial).

En el presente trabajo, la composición de etoxímeros degradados varió en función de la concentración de NP10EO empleada (**Figura 51**). A menores concentraciones del surfactante, los etoxímeros cortos ( $n \leq 6$ ) fueron más fácilmente eliminados, a pesar de no ser los compuestos mayoritarios en la mezcla inicial de NP10EO mientras que hubo un enriquecimiento en los homólogos con mayor número de grupos etoxi ( $n > 9$ ). Esta selectividad en la degradación de homólogos más cortos se vió reducida a medida que la concentración del surfactante aumentó, hasta encontrar muy pocas diferencias en los perfiles de distribución inicial de los distintos homólogos y luego de la degradación fúngica. Este comportamiento podría deberse a la hidrofobicidad diferencial que presentan los homólogos, siendo menor la lipoficidad a medida que aumenta el número de grupos etoxi (Kunieda *et al.*, 2000, 1997).

La superficie de la pared celular externa de las células fúngicas presenta un alto número de sitios de unión potenciales exhibidos por grupos libres carboxilos, amino, hidroxilos, fosfato y mercapto (Strandberg *et al.*, 1981), y por lo tanto ofrece una matriz para la interacción, principalmente con los etoxímeros más cortos, mediante la formación de complejos hidrofóbicos, en un mecanismo denominado biosorción, que no depende de la actividad metabólica del hongo. En un trabajo en el que se ensayó la

bioacumulación y biodegradación de una mezcla de NP $n$ EOs ( $n = 1-12$ ) por la microalga *Chlorella vulgaris*, se encontró que el NP1EO fue el oligómero que presentó la mayor retención intracelular y que la concentración intracelular de los distintos compuestos disminuyó gradualmente con el aumento en el número de grupos etoxi, hecho asociado principalmente a la diferente lipoficidad de los homólogos (Sun *et al.*, 2014). La mayor biosorción de los homólogos cortos, podría favorecer la interacción de las enzimas ligninolíticas con estos sustratos, ya que las ligninasas, aunque son secretadas extracelularmente por los hongos, tienen una difusibilidad limitada en el medio agarizado, además de existir enzimas ligninolíticas que se encuentran unidas a la pared celular (Evans, 1991) y que podrían tener una participación en la degradación del surfactante. Por otro lado, se ha reportado que especialmente para los detergentes no iónicos, la solubilidad en agua tiene una influencia dominante en el grado de adsorción (Kuhnt, 1993), por lo que los homólogos con etoxímeros largos, al ser más polares, tendrían una mayor tendencia a permanecer disueltos en el medio acuoso agarizado. Sin embargo en presencia de una alta concentración del surfactante, gran cantidad de polietoxilatos largos quedarían espacialmente próximos a las hifas fúngicas, impidiendo estéricamente la acción degradativa de las enzimas y por ende, disminuyendo la probabilidad de que las mismas reaccionen con los etoxímeros más cortos.

El agregado de NP10EO al medio de cultivo estimuló la producción de lacasa en los LDF evaluados con capacidad de remoción del surfactante, *G. luxurians* y *H. fasciculare*; e incrementó también la producción de MnP en *H. fasciculare*, mientras que no se detectó producción de ninguna de las ligninasas testeadas con *X. chrysenteron*, aislamiento que resultó incapaz de eliminarlo, aunque sí fue capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de este xenobiótico (**Figura 52**). En *G. luxurians* y *H. fasciculare*, los títulos de lacasa valorados se incrementaron en presencia de concentraciones crecientes del surfactante. En *G. luxurians*, el aumento fue de 25 veces cuando se agregó NP10EO 10 g/L al medio de cultivo (1,2 U/mL). En *H. fasciculare* los títulos de lacasa aumentaron al triple (1,1 U/mL) en presencia de NP10EO 10 g/L y los de MnP al doble (0,16 U/mL) con 0,5 g/L del surfactante. Por lo tanto en este hongo, a 0,5-1 g/L se encontró el máximo de actividad lacasa y MnP. Por su parte, los resultados obtenidos con *X. chrysenteron* sugieren que este hongo utiliza otros mecanismos que le permitieron tolerar la toxicidad causada por el surfactante y que no implicaron su transformación. Por ejemplo, un aumento en la defensa antioxidante, es una respuesta fisiológica que presentan los organismos al encontrarse con un xenobiótico, y es la encargada de neutralizar especies reactivas del oxígeno, previniendo a las células del daño oxidativo que éstas especies producen. Se ha reportado la inducción de estrés oxidativo debido a compuestos nonilfenólicos principalmente en células animales (Chitra y Mathur, 2004; Gong y Han, 2006) pero también en plantas, incluyendo a las algas (Gao *et al.*, 2017) y en la levadura *S. cerevisiae* (Okai *et al.*, 2000). En general, la tolerancia al xenobiótico se correlacionó con cambios en la respuesta

antioxidante, tanto de sistemas enzimáticos como no enzimáticos, de manera especie-específica. Por otro lado, la respuesta generalmente es dependiente del tipo y magnitud del estrés. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2016) encontraron que plántulas de trigo expuestas a NP aumentaron la actividad de superóxido dismutasa, peroxidasa y glutatión transferasa, con efectos menores frente al NP4EO, y sin efectos apreciables en las concentraciones ensayadas para el NP10EO (0 – 5 mg/L).

La inducción de la actividad ligninolítica en hongos de pudrición y en hongos de hojarasca como respuesta a la presencia de xenobióticos ha sido reportada ampliamente en la literatura y es un atributo que sustenta la utilización de estos hongos o de sus sistemas enzimáticos para la remediación de estos compuestos (Asgher *et al.*, 2008; Baldrian y Šnajdr, 2006; Steffen *et al.*, 2003). En algunos trabajos esta inducción ha sido reportada frente al nonilfenol. Por ejemplo, Mougin *et al.* (2002) y Kollmann *et al.* (2003) reportaron un aumento de 14 veces en la actividad lacasa de *T. versicolor* luego de 3 días de incubación en un medio líquido conteniendo NP 0,5 mM ( $\equiv$  0,11 g/L), con títulos de hasta 2,2 U/mL, y también en *T. versicolor*, Soares *et al.* (2006, 2005) registraron una inducción de 3,6 veces en la actividad lacasa al agregar NP 0,1 g/L, con un máximo de actividad de 0,21 U/mL a los 10 días de cultivo, en coincidencia con el pico de remoción del alquilfenol y un máximo de actividad MnP de 4 mU/mL al día 12 de incubación. Aunque Cabana *et al.* (2007) encontraron que la eliminación del NP era promovida por el agregado de ABTS al preparado enzimático, sugiriendo la participación del sistema lacasa/mediador en el proceso, Saito *et al.* (2004) lograron la total remoción de NP (1,1 g/L) a las 24 hs de tratamiento con lacasa purificada (50 U/mL) proveniente de un hongo aislado de suelo.

Las lacasas producen radicales libres que pueden llevar a reacciones de polimerización (Gianfreda *et al.*, 1999). En trabajos previos se ha reportado la formación de dímeros de NP debido a la transformación por lacasas fúngicas (Cabana *et al.*, 2007b; Torres-Duarte *et al.*, 2012). En nuestro trabajo no podemos descartar entonces, que a partir de la degradación de los homólogos con más unidades etoxi, se forme como producto de degradación NP, el cual pudo haber sido polimerizado por acción de la lacasa. Sin embargo, a medida que desaparecieron los NPEOs, no se observó la aparición de nuevos picos debidos a compuestos no identificados, esperables de observar si este fuese el caso.

El análisis del potencial de los hongos seleccionados para remover el surfactante en matrices complejas como las hojas senescentes de *L. ligustrum* bajo SSF reveló que el NP10EO se recuperó principalmente desde estas matrices inertes (controles no inoculados), no resultando disponible en la fracción soluble acuosa asociada. Esto concuerda con los altos coeficientes de partición octanol/agua (log Kow) calculados para el NP (4,48) y, en menor medida para los NP $n$ EOs ( $1 \leq n \leq 9$ ), con valores entre 4,3 y 3,59 (Ahel y Giger, 1993; Düring *et al.*, 2002) y expresa que los mencionados compuestos se asocian fácilmente a la materia orgánica presente en suelos o sedimentos, proceso en el que intervienen

uniones tipo hidrógeno y de van der Waals y que son responsables de la fuerza de adsorción/desorción (Hower, 1970). Se ha reportado que la adsorción natural que tiene el NP en los sedimentos es el principal mecanismo de remoción de este tipo de xenobióticos (Ahel *et al.*, 1994). Por lo tanto, aunque el sistema de hojarasca por sí solo sería útil en el tratamiento del surfactante NP10EO, al poder adsorberlo y concentrarlo en una matriz sólida, existen hongos degradadores de hojarasca que lo degradan, incluso cuando están inmovilizados en la hojarasca. La utilización de hongos con capacidad ligninolítica, como los LDF *H. fasciculare* y *G. luxurians*, resultó efectiva en la degradación del surfactante adsorbido en la hojarasca. Por lo tanto, el xenobiótico puede concentrarse en la hojarasca, un sustrato que se encuentra fácilmente disponible en el ambiente y además, existen organismos que crecen de forma natural y activamente sobre estos materiales, y que son capaces de degradarlo. Aunque no registramos en los cultivos SSF, un incremento en la producción de ligninasas asociada a la presencia del surfactante como sucedió en los cultivos en placa y los títulos de actividad ligninolítica fueron bajos (**Tabla 12**), la remoción del NP10EO a la concentración de 1 g/L ( $\equiv$  3,8 g/Kg de hojarasca seca) por estos hongos utilizando cultivos SSF fue mayor al 50% al mes de experimentación, mientras que a los 3 meses de cultivo fue cercana al 70% con *G. luxurians* y mayor al 95% con *H. fasciculare* (**Figura 54**).

Hay que tener presente que algunas especies vegetales pueden no soportar el crecimiento de hongos degradadores como es el caso de la hojarasca de *C. tala* con los LDF *G. luxurians* y *H. fasciculare*. El extracto de hojarasca de *C. tala* adicionado al medio de cultivo GA (GAT), fue útil para predecir la inhibición en el crecimiento de *G. luxurians*, sin embargo, esto no sucedió con *H. fasciculare* (**Figura 53**), quien tuvo un mayor crecimiento en placa debido al agregado de la hojarasca respecto de GA sin extracto.

# CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios sobre la descomposición de hojarasca han sido orientados mayormente hacia una cuantificación a escala ecosistémica (Berg y McClaugherty, 2003). Sin embargo, a partir de los mismos, han surgido interesantes interrogantes y descubrimientos que cambiaron los puntos de vista establecidos. En cuanto a los procesos implicados en la descomposición de lignocelulosa, se han descrito mecanismos no enzimáticos que ejercen su acción sobre los polisacáridos y también sobre la lignina (Baldrian y Valášková, 2008; Suzuki *et al.*, 2006), y se descubrieron nuevas enzimas oxidativas que participan de la descomposición de lignina y celulosa (Dimarogona *et al.*, 2012; Hofrichter *et al.*, 2010). A su vez, el enfoque en el cual sólo los organismos saprótrofos basidiomicetes resultaban capaces de descomponer la lignina fue modificado cuando se encontró que muchos hongos Xylariales también presentaban esta habilidad (Liers *et al.*, 2006; Osono, 2007), e incluso, que la lignina podía ser mineralizada hasta cierto punto en ausencia de enzimas ligninolíticas (Šnajdr *et al.*, 2010). Asimismo, se comenzó a cuestionar el hecho de que no sólo los hongos saprótrofos tienen la habilidad de descomponer sustratos lignocelulósicos, ya que existe evidencia de actividad extracelular lignocelulolítica debida a hongos ectomicorrícicos (Baldrian, 2009; Talbot *et al.*, 2008) avalada por el reciente descubrimiento de la presencia de genes para peroxidasas ligninolíticas en este grupo funcional (Bödeker *et al.*, 2009). Por lo tanto, los nuevos hallazgos aportados a este área del conocimiento, no sólo contribuyen a una mayor información sobre la biología de los hongos de hojarasca y su contribución a los procesos ecosistémicos de descomposición de hojarasca sino que es de suma relevancia para sentar las bases sobre el rol que estos organismos cumplen en el ambiente y su contribución al reciclado de materia orgánica, aportando herramientas y criterios en la formulación de planes de manejo y/o conservación de bosques nativos y otras áreas forestales que requieren protección. Por otro lado, las investigaciones realizadas en este campo de estudio, son útiles también en la búsqueda de nuevos organismos o de sus sistemas enzimáticos, con interesantes capacidades lignocelulolíticas y que puedan ser de utilidad en el desarrollo de tecnologías para la biorremediación de suelos.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo es posible concluir que:

- El crecimiento *in-vitro* de aislamientos seleccionados y obtenidos a partir de basidiomas asociados al mantillo forestal del Delta del Rio Paraná y Ribera Platense es diferencial y está condicionado por factores como la temperatura de incubación y la química del medio de cultivo.



- Los LDF seleccionados son capaces de sintetizar enzimas extracelulares consideradas claves en la degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina. Excepto por la actividad MnP, la velocidad de producción de endoglucanasas, xilanasas y lacasas por estos hongos se relaciona con su velocidad de crecimiento.
- En base al análisis comparativo de los niveles de diferentes actividades enzimáticas extracelulares relacionadas a la degradación de lignocelulosa de cultivos agarizados de los hongos bajo estudio, el aislamiento *Xerocomellus chrysenteron* BAFC 1760 demuestra una habilidad superior para producir endo- $\beta$ -1,4-glucanasas y xilanasas, mientras que una alta producción de enzimas ligninolíticas lacasa y MnP, se registró principalmente con *Gymnopus luxurians* BAFC 2013 y *Leratyomices cerea* BAFC 4533, y en forma apreciable con *Hypholoma fasciculare* BAFC 4546 y *Leucoagaricus sp.* BAFC 2977.
- *L. cerea* BAFC 4533, *Marasmiellus candidus* BAFC 4532 y *Marasmius haematocephalus* BAFC 4531 son activos en la degradación y humificación de hojas senescentes de *Celtis tala* y *Ligustrum lucidum*.
- El grado de descomposición *in-vitro* de hojas senescentes de *C. tala* y *L. lucidum* varía según el hongo inoculado mientras que, sólo para *L. cerea* se encuentran diferencias en el grado de descomposición entre ambos tipos de hojarasca, siendo éste más activo al crecer sobre hojarasca de la especie exótica *L. lucidum*, lo que estaría principalmente asociado a una mayor actividad MnP.
- El cultivo de *M. haematocephalus* BAFC 4531 bajo condiciones en estado sólido (SSF) sobre hojas senescentes de *C. tala* es un sistema prometedor para la producción de  $\beta$ -glucosidasas.
- La relación C alquilo/C O-alquilo es un predictor fidedigno de la extensión de la degradación de hojas senescentes de *C. tala* y *L. lucidum* por los LDF ensayados.
- El reemplazo de comunidades vegetales nativas presentes en áreas forestales de la región del Delta del Río Paraná y la Ribera Platense por plantas invasoras como *L. lucidum* puede condicionar la composición química del mantillo de los suelos y alterar la actividad de la microbiota de estos ambientes asociada al proceso de degradación y humificación.

- Los LDF saprótrofos *G. luxurians* BAFC 2013 y *H. fasciculare* BAFC 4546, y el LDF ectomicorrícico *X. chrysesteron* BAFC 1760 toleran el surfactante NP10EO a concentraciones de hasta 10 g/L.
- Mientras que *G. luxurians* BAFC 2013 y *H. fasciculare* BAFC 4546 resultaron eficientes en la remoción del surfactante luego de 15 días de ser cultivados en placa de Petri, *X. chrysesteron* BAFC 1760 no fue capaz de eliminarlo.
- Los mayores porcentajes de remoción se encontraron con *H. fasciculare* BAFC 4546 a 0,1 g/L de surfactante ( $88,8 \pm 1,76\%$ ) con una eficiencia de degradación que disminuyó a concentraciones crecientes de NP10EO. Sin embargo, este aislamiento presentó una considerable remoción incluso a altas concentraciones del mismo (10 g/L; % de remoción:  $38,3 \pm 7,9$ ).
- El NP10EO estimuló la producción de lacasa en LDF seleccionados que demostraron capacidad de degradar este surfactante es decir, *G. luxurians* BAFC 2013 y *H. fasciculare* BAFC 4546, así como también incrementó la producción de MnP en *H. fasciculare* BAFC 4546.
- Los polietoxilatos de nonilfenol son degradados por LDF seleccionados a través de mecanismos que involucran la eliminación de los homólogos con menor número de grupos etoxi.
- Aunque la hojarasca de *L. lucidum* es un soporte de inmovilización del surfactante NP10EO, los LDF *G. luxurians* BAFC 2013 y *H. fasciculare* BAFC 4546 son capaces de removerlo de esta matriz, incluso después de un periodo de 30 días de incubación.

# PERSPECTIVAS FUTURAS

En base a los resultados y conclusiones obtenidos en esta Tesis, se sugieren algunas ideas para futuros estudios:

- Ensayar el crecimiento de los aislamientos LDF y la producción de enzimas extracelulares lignocelulolíticas en otras especies vegetales, tanto nativas como exóticas, en cultivos puros y en co-cultivo con otros organismos que participan del proceso de degradación y humificación de hojarasca (por ej. bacterias).
- Con el fin de dilucidar los mecanismos involucrados en la remoción de NP10EOs por los LDF seleccionados, sería aconsejable la identificación de los productos de degradación por técnicas analíticas complementarias, como GC-MS.
- Debido a la remarcable capacidad de remoción del NP10EO evidenciada por estos hongos, incluso en presencia de altas concentraciones del surfactante, sería importante evaluar el efecto que tiene el agregado de diferentes agentes químicos en el proceso, como pueden ser mediadores de la actividad lacasa (ABTS, HBT, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, vainillina, entre otros).
- Evaluar la toxicidad de los metabolitos generados durante la transformación de NP10EO por los LDF estudiados utilizando diferentes sistemas biológicos como bioindicadores (por ejemplo peces, lombriz de tierra, semillas de plantas hortícolas y hongos).
- Por último, evaluar la capacidad de los aislamientos LDF seleccionados de crecer en condiciones de no esterilidad con miras de acompañar el sistema de hojarasca inoculada con hongo en otros sistemas de tratamiento tradicionalmente empleados, como son los barros activados.

# ANEXO

## Medios de cultivo

En todos los casos los medios fueron esterilizados con autoclave a 121°C durante 15 min.

### *Agar extracto de malta (MEA)*

Extracto de malta 12 g/L; Glucosa 10 g/L; Agar 20 g/L; Agua destilada 1 L.

### *Medio Basal*

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,6 g/L; Tiamina 0,1 mg/L; Biotina 0,05 mg/L; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,4 mg/L; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0,09 mg/L; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,07 mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,02 mg/L; FeCl<sub>3</sub> 1 mg/L; ZnCl<sub>2</sub> 3,5 mg/L; Agua destilada 1 L.

### *Glucosa-Asparagina (GA)*

Glucosa 10 g/L; Asparagina monohidrato 4 g/L; Medio Basal 1 L (composición detallada en el Capítulo 1). Para la preparación del medio GA agarizado, se agrega Agar 20 g/L.

### *Medio Glucosa Asparagina suplementado con NP10EO (GA-NP10EO)*

Al medio GA (5.3.9.1.), se le adicionó NP10EO a una concentración final de 1 g/L y posteriormente, se esterilizó con autoclave a 121°C durante 15 min. Para la preparación del medio GA-NP10EO agarizado, se agregó Agar 20 g/L.

## Buffers

### *TAE (Tris-Ácido acético-EDTA)*

Agarosa 1,8 g; TAE 1X 120 mL; Bromuro de Etidio 6 µL.

### *Acetato de sodio*

Ácido acético 0,2 M 20 mL; Acetato de sodio 0,2 M 30 mL; Agua destilada 100 mL; pH 4,8.

Ácido acético 0,2 M 46,3 mL; Acetato de sodio 0,2 M 3,7 mL; Agua destilada 100 mL; pH 3,6.

### *Buffer Universal*

20 mL de solución stock (8,9 g de fosfato disodio dihidrato; 7 g de ácido cítrico monohidrato; 3,54 g de ácido bórico, 243 mL de hidróxido de sodio 1N; 1 L agua destilada) se le agrega un volumen de ácido clorhídrico 0,1 N según el pH deseado (**Tabla 13**), y se completa a 100 mL con agua destilada.

**Tabla 13.** Preparación del Buffer Universal

pH→ ↓	·00	·10	·20	·30	·40	·50	·60	·70	·80	·90
2		72.10	69.25	66.87	64.90	63.25	61.77	60.48	59.29	58.29
3	57.49	56.76	56.05	55.42	54.88	54.28	53.72	53.17	52.61	52.07
4	51.52	51.00	50.46	49.92	49.40	48.88	48.35	47.81	47.28	46.72
5	46.18	45.64	45.10	44.54	43.99	43.40	42.77	42.15	41.51	40.89
6	40.28	39.66	39.02	38.81	37.54	36.78	36.02	35.36	34.72	34.13
7	33.51	32.97	32.46	31.90	31.36	30.82	30.33	29.88	29.45	29.06
8	28.70	28.44	28.20	27.91	27.56	27.20	26.83	26.34	25.77	25.12
9	24.48	23.82	23.21	22.60	21.95	21.32	20.71	20.13	19.60	19.10
10	18.65	18.24	17.84	17.51	17.20	16.92	16.68	16.35	15.98	15.56
11	15.09	14.59	13.92	13.08	12.09	10.75				

### *Clark y Lubs*

Ácido bórico 0,1 M y Cloruro de potasio 0,1 M 50 mL; Hidróxido de sodio 0,1 M 40,8 mL; Agua destilada 100 mL; pH 9,8.

### *Succinato de sodio*

Ácido succínico 0,2 M 25 mL; Hidróxido de sodio 0,2 M 18,3 mL; Agua destilada 100 mL; pH 4,5.

### *Tartrato de sodio*

Ácido tartárico 0,2 M 25 mL; Hidróxido de sodio 0,2 M; Agua destilada 100 mL; pH 3.

### *Carbonato-Tartrato*

Carbonato de sodio 200 g, Tartrato de sodio (dihidrato) 12 g, Agua destilada 1 L.

### **Reactivos**

El NP grado técnico (85% 4-NP, Fluka, Suiza), una mezcla de 4-NP1EO y 4-NP2EO (Igepal CO-210, Aldrich, EE.UU.) y el NP10EO (NP $n$ EO con 10 unidades de óxido de etileno en promedio), fueron usados como analitos standard. El ciclohexano, hexanos (95% n-hexano/5% isómeros ramificados) y 2-propanol fueron de calidad HPLC (J.T.Baker, NJ, USA). Metanol (MeOH), y acetato de etilo (AcEt) grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania). Ácido acético glacial, (J. T. Baker, Estados Unidos). Ácido clorhídrico (36,5%), (Mallinckrodt-Baker, México).

### *Reactivo de Burger*

El reactivo de Burger fue preparado con 1,7 g de oxinitrato de bismuto ( $\text{Bi}_5\text{O}(\text{OH})_9(\text{NO}_3)_4$ ) disuelto en 220 mL de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ), 40 g de ioduro de potasio (KI) y posteriormente llevado a un volumen final de 1 litro con agua destilada. A 10 mL de esta solución madre se le agregaron 1 mL de ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 10 mL de etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) y 5 mL de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ) 20% (p/v).

# REFERENCIAS

- Abdel-Hamid, A.M., Solbiati, J.O., Cann, I.K.O., 2013. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 82, 1–28.
- Aber, J.D., Melillo, J.M., 1982. Nitrogen immobilization in decaying hardwood leaf litter as a function of initial nitrogen and lignin content. *Can. J. Bot.* 60, 2263–2269.
- Aber, J.D., Melillo, J.M., McClaugherty, C.A., 1990. Predicting long-term patterns of mass loss, nitrogen dynamics, and soil organic matter formation from initial fine litter chemistry in temperate forest ecosystems. *Botany* 68, 2201–2208.
- Adav, S.S., Ravindran, A., Sze, S.K., 2012. Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. *J. Proteomics* 75, 1493–1504.
- Adler, E., 1977. Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Sci. Technol.* 11, 169–218.
- Aerts, R., 1997. Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos* 79, 439–449.
- Ahel, M., Giger, W., 1993. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26, 1471–1478.
- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of alkylphenol surfactants in the aquatic environment – I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28, 1131–1142.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W., 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollut.* 79, 243–248.
- Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., Thomaidis, N.S., Xu, J., 2016. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. *J. Hazard. Mater.* 323, 274–298.
- Ajjolakewu, K.A., Leh, C.P., Wan Nadiah, W., Lee, C.K., 2015. Screening for xylosyl hydrolase (xylanase) enzymes in soil fungal species; comparative efficacy of solid state fermentation technique and plate-screening methods. *Int. Conf. Environ. Res. Technol. (ICERT 2015)* 423–428.
- Alarcón-Gutiérrez, E., Floch, C., Augur, C., Petit, J. Le, Ziarelli, F., Criquet, S., 2009. Spatial variations of chemical composition, microbial functional diversity, and enzyme activities in a Mediterranean litter (*Quercus ilex L.*) profile. *Pedobiologia (Jena)*. 52, 387–399.
- Albenne, C., Canut, H., Boudart, G., Zhang, Y., San Clemente, H., Pont-Lezica, R., Jamet, E., 2009. Plant cell wall proteomics: Mass spectrometry data, a trove for research on protein structure/function relationships. *Mol. Plant* 2, 977–989.
- Alcalde, M., 2007. Laccases: Biological functions, molecular structure and industrial applications. *Ind. Enzym. Struct. Funct. Appl.* 461–476.

- Allison, S.D., Vitousek, P.M., 2004. Rapid nutrient cycling in leaf litter from invasive plants in Hawai'i. *Oecologia* 141, 612–619.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Stand. Methods 541.
- Anastasi, A., Tigini, V., Varese, G.C., 2013. The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi, en: Goltapeh, E.M., Danesh, Y.R., Varma, A. (Eds.), *Fungi as bioremediators*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg, pp. 203–226.
- Ander, P., Marzullo, L., 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53, 115–131.
- 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. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1238–1243.
- Aragón, R., Montti, L., Ayup, M.M., Fernández, R., 2014. Exotic species as modifiers of ecosystem processes: litter decomposition in native and invaded secondary forests of NW Argentina. *Acta Oecologica* 54, 21–28.
- Aranda, E., Ullrich, R.R., Hofrichter, M., 2010. Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation* 21, 267–281.
- Araújo, R.P.A., Botta-Paschoal, C.M.R., Silvério, P.F., Almeida, F. V, Rodrigues, P.F., Umbuzeiro, G.A., Jardim, W.E., Mozeto, A.A., 2006. Application of toxicity identification evaluation to sediment in a highly contaminated water reservoir in southeastern Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 581–588.
- Archibald, F., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M., Reid, I., 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* 53, 215–236.
- Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., Legge, R.L., 2008. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19, 771–783.
- Ayup, M.M., Montti, L., Aragón, R., Grau, H.R., 2014. Invasion of *Ligustrum lucidum* (Oleaceae) in the southern Yungas: Changes in habitat properties and decline in bird diversity. *Acta Oecologica* 54, 72–81.
- Babay, P.A., Itria, R.F., Romero Ale, E.E., Becquart, E.T., Gautier, E.A., 2014. Ubiquity of endocrine disruptors nonylphenol and its mono- and di-ethoxylates in freshwater, sediments, and biosolids associated with high and low density populations of Buenos Aires, Argentina. *Clean - Soil, Air, Water* 42, 731–737.
- Babay, P.A., Romero Ale, E.E., Itria, R.F., Becquart, E.T., Thiele, B., Batistoni, D.A., 2008. Simplified determination of lipophilic metabolites of nonylphenol ethoxylates: method development and application in aqueous samples from Buenos Aires, Argentina. *J. Environ. Monit.* 10, 443–452.
- Bailey, M.J., Biely, P., Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257–270.



- Baldock, J.A., Oades, J.M., Nelson, P.N., Skene, T.M., Golchin, A., Clarke, P., 1997. Assessing the extent of decomposition of natural organic materials using solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Aust. J. Soil Res.* 35, 1061–1083.
- Baldock, J.A., Preston, C.M., 1995. Chemistry of carbon decomposition processes in forests as revealed by solid state carbon  $^{13}$  nuclear magnetic resonance, en: McFee, W.W., Kelly, J.M. (Eds.), *Carbon Forms and Functions in Forest Soils*. Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison, WI., pp. 89–117.
- Baldrian, P., 2009. Ectomycorrhizal fungi and their enzymes in soils: is there enough evidence for their role as facultative soil saprotrophs? *Oecologia* 161, 657–660.
- Baldrian, P., 2008a. Ecology of saprotrophic basidiomycetes, en: Boddy, L., Frankland, J.C., van West, P. (Eds.), pp 372.
- Baldrian, P., 2008b. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecol.* 1, 4–12.
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 215–242.
- Baldrian, P., Gabriel, J., 1997. Effect of heavy metals on the growth of selected wood-rotting basidiomycetes. *Folia Microbiol. (Praha)*. 42, 521–523.
- Baldrian, P., Šnajdr, J., 2006. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 1023–1029.
- Baldrian, P., Valášková, V., 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 501–521.
- Ball, B.A., Carrillo, Y., Molina, M., 2014. The influence of litter composition across the litter-soil interface on mass loss, nitrogen dynamics and the decomposer community. *Soil Biol. Biochem.* 69, 71–82.
- Barrasa, J.M., González, A.E., Martínez, A.T., 1992. Ultrastructural aspects of fungal delignification of chilean woods by *Ganoderma australe* and *Phlebia chrysocrea*: A study of natural and in vitro degradation. *Holzforschung* 46, 1–8.
- Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E., 2015. The cell biology of lignification in higher plants. *Ann. Bot.* 115, 1053–1074.
- Bebber, D.P., Hynes, J., Darrah, P.R., Boddy, L., Fricker, M.D., 2007. Biological solutions to transport network design. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2307–2315.
- Beecher, G.R., Whitten, B.K., 1970. Ammonia determination: reagent modification and interfering compounds. *Anal. Biochem.* 36, 243–246.
- Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 326–338.
- Belmont, M.A., Ikonomou, M., Metcalfe, C.D., 2006. Presence of nonylphenol ethoxylate surfactants in a watershed in central Mexico and removal from domestic sewage in a treatment wetland. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 29–35.
- Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E., Maguire, R.J., 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Sci. Total*

- Environ. 193, 263–275.
- Berg, B., 2014. Decomposition patterns for foliar litter - a theory for influencing factors. *Soil Biol. Biochem.* 78, 222–232.
- Berg, B., 1986. Nutrient release from litter and humus in coniferous forest soils: a mini review. *Scand. J. For. Res.* 1, 359–369.
- Berg, B., De Marco, A., Davey, M., Emmett, B., Hobbie, S., Liu, C., McClaugherty, C., Norell, L., Johansson, M.B., Rutigliano, F., Vesterdal, L., Virzo De Santo, A., 2010. Factors influencing limit values for pine needle litter decomposition: a synthesis for boreal and temperate pine forest systems. *Biogeochemistry* 100, 57–73.
- Berg, B., Ekbohm, G., 1991. Litter mass-loss rates and decomposition patterns in some needle and leaf litter types. Long-term decomposition in a Scots pine forest. VII. *Can. J. Bot.* 69, 1449–1456.
- Berg, B., Laskowski, R., 2006. Litter fall. *Adv. Ecol. Res.* 38, 19–71.
- Berg, B., Laskowski, R., 2005. Litter decomposition: a guide to carbon and nutrient turnover. *Adv. Ecol. Res.* 38, 291–331.
- Berg, B., Matzner, E., 1997. Effect of N deposition on decomposition of plant litter and soil organic matter in forest systems. *Environ. Rev.* 5, 1–25.
- Berg, B., McClaugherty, C., 2003. Plant litter: decomposition, humus formation, carbon sequestration, en: *Carbon*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 340.
- Berg, B., Steffen, K.T., McClaugherty, C., 2007. Litter decomposition rate is dependent on litter Mn concentrations. *Biogeochemistry* 82, 29–39.
- Berovic, M., Cimerman, A., Steiner, W., Koloini, T., 1991. Submerged citric acid fermentation rheological properties of *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 579–581.
- Berryman, D., Houde, F., DeBlois, C., O'Shea, M., 2004. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere* 56, 247–255.
- Bhattacharjee B, Roy A, M. AL, 1993. Carboxymethylcellulase from *Lenzites saepiaria*, a brownrotter. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* 30, 1143–1152.
- Bilay, V.T., Solomko, E.F., Buchalo, A.S., 2000. Growth of edible mushrooms on commercial agar media, en: *Science and cultivation of edible fungi*. Balkema, Rotterdam., pp. 779–782.
- Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* 29, 1623–1629.
- Blackwell, M., 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* 98, 426–438.
- Blanchette, R.A., 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Can. J. Bot.* 73, 999–1010.
- Blodig, W., Doyle, W.A., Smith, A.T., Winterhalter, K., Choinowski, T., Piontek, K., 1998. Autocatalytic formation of a hydroxy group at C $\beta$  of trp171 in lignin peroxidase. *Biochemistry* 37, 8832–8838.

- Bo, R.F., 2005. Situación ambiental en la ecorregion Delta e Islas del Paraná, en: La situación ambiental argentina 2005. pp. 130–143.
- Bödeker, I.T.M., Nygren, C.M.R., Taylor, A.F.S., Olson, A., Lindahl, B.D., 2009. ClassII peroxidase-encoding genes are present in a phylogenetically wide range of ectomycorrhizal fungi. *ISME J.* 3, 1387–1395.
- Bokern, M., Harms, H.H., 1997. Toxicity and metabolism of 4-n-nonylphenol in cell suspension cultures of different plant species. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1849–1854.
- Bokern, M., Raid, P., Harms, H., 1998. Toxicity, uptake and metabolism of 4-n-nonylphenol in root cultures and intact plants under septic and aseptic conditions. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 5, 21–27.
- Bonnen, A.M., Anton, L.H., Orth, A.B., 1994. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 960–965.
- Boon, P.I., Johnstone, L., 1997. Organic matter decay in coastal wetlands - an inhibitory role for essential oil from *Melaleuca alternifolia* leaves. *Arch. fur Hydrobiol.* 138, 433–449.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267, 99–102.
- Box, J.D., 1983. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* 17, 511–525.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brown, R.M., 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century?, en: *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. pp. 487–495.
- Brunow, G., 2001. Methods to reveal the structure of lignin, en: Hofrichter, M., Steinbüchel, A. (Eds.), *Lignin, humic Substances and coal*, Vol 1. Wiley-VHC, Weinheim, pp. 89–116.
- Bumpus, J.A., Tien, M., Wright, D., Aust, S.D., 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228, 1434–1436.
- Bunnell, F.L., Tait, D.E.N., Flanagan, P.W., Van Clever, K., 1977. Microbial respiration and substrate weight loss-I. A general model of the influences of abiotic variables. *Soil Biol. Biochem.* 9, 33–40.
- Burkart, A., 1957. Ojeada sinóptica sobre la vegetación del Delta del Río Paraná. *Darwiniana* 11, 457–561.
- Burkart, R., Bárbaro, N.O., Sánchez, R.O., Gómez, D.A., 1999. Eco-rregiones de la Argentina. *Adm. Parques Nac.*
- Burke, R.M., Cairney, J.W.G., 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12, 105–116.
- Cabana, H., Jiwan, J.L.H., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S.N., Jones, J.P., 2007a. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using

- enzyme preparation from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona*. *Chemosphere* 67, 770–778.
- Cabana, H., Jones, J.P., Agathos, S.N., 2007b. Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *J. Biotechnol.* 132, 23–31.
- Cabello, M., Arambarri, A., 2002. Diversity in soil fungi from undisturbed and disturbed *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* forests in the eastern Buenos Aires Province (Argentina) 157, 115–125.
- Cairney, J.W.G., Burke, R.M., 1994. Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycol. Res.* 98, 1345–1356.
- Calvo-Flores, F.G., Dobado, J.A., 2010. Lignin as renewable raw material. *ChemSusChem* 3, 1227–1235.
- 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. *J. Biol. Chem.* 274, 10324–10330.
- Canada, 2002. Environment Canada. Canadian Environmental Quality Guidelines for Nonylphenol and its Ethoxylates (Water, Sediment, and Soil). Scientific supporting document. Ecosystem health: science-based solutions report No. 1-3. National Guidelines and Standards Office.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 2002. Canadian soil quality guidelines for the protection of environment and human health: nonylphenol and its ethoxylates. *Can. Counc. Minist. Ottawa*.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. *The Fungi*, 2nd ed., San Diego, Calif.; London.
- Casieri, L., Anastasi, A., Prigione, V., Varese, G.C., 2010. Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 98, 483–504.
- Cepáková, Š., Frouz, J., 2015. Changes in chemical composition of litter during decomposition: a review of published <sup>13</sup>C NMR spectra. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 805–815.
- Chanzy, H., 1990. Aspects of cellulose structure, en: Cellulose sources and exploitation. Industrial utilization, biotechnology and physico-chemical properties, Ellis Hord. (Ed).
- Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., Lopes Ferreira, N., 2010. Comparative kinetic analysis of two fungal beta-glucosidases. *Biotechnol. Biofuels* 3, 3. doi:10.1186/1754-6834-3-3
- Chen, D.M., Taylor, A.F.S., Burke, R.M., Cairney, J.W.G., 2001. Identification of genes for lignin peroxidases and manganese peroxidases in ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 152, 151–158.
- Chen, F., Ying, G.G., Kong, L.X., Wang, L., Zhao, J.L., Zhou, L.J., Zhang, L.J., 2011. Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environ. Pollut.* 159, 1490–1498.
- Chen, J.C., Lin, Z.H., Ma, X.X., 2003. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma* sp.3.2883 with silver nitrate. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 105–108.

- Chitra, K.C., Mathur, P.P., 2004. Vitamin E prevents nonylphenol-induced oxidative stress in testis of rats. *Indian J. Exp. Biol.* 42, 220–223.
- Chukeatirote, E., Maharachchikumbura, S.S.N., Wongkham, S., Sysouphanthong, P., Phookamsak, R., Hyde, K.D., 2012. Cloning and sequence analysis of the cellobiohydrolase i genes from some basidiomycetes. *Mycobiology* 40, 107–110.
- Clark, W.M., Lubs, H.A., 1916. Hydrogen electrode potentials of phthalate, phosphate, and borate buffer mixtures. *J. Biol. Chem.* 25, 479–510.
- Cohen, R., Suzuki, M.R., Hammel, K.E., 2005. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2412–2417.
- Collins, P.J., Dobson, A.D.W., 1997. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3444–3450.
- Colpaert, J. V., Van Laere, A., 1996. A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and a leaf-saprotrophic basidiomycete colonizing beech leaf litter. *New Phytol.* 133, 133–141.
- Conejo Saucedo, U., Cano Camacho, H., López Romero, E., Lara Márquez, A., Zavala Páramo, M.G., 2011. Hemicellulases of fungi: A vision of their function in the coordinated degradation of polysaccharides of plant cell walls. *Curr. Trends Microbiol.* 7, 1–13.
- Cornelissen, J.H.C., 1996. An experimental comparison of leaf decomposition rates in a wide range of temperate plant species and types. *J. Ecol.* 84, 573–582.
- 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. *J. Hazard. Mater.* 183, 669–676.
- Criquet, S., Tagger, S., Vogt, G., Le Petit, J., 2002. Endoglucanase and  $\beta$ -glycosidase activities in an evergreen oak litter: Annual variation and regulating factors. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1111–1120.
- Croce, V., Valsecchi, L., Patrolecco, S., Polesello, S., 2003. Extraction of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates from river sediments: Comparison of different extraction techniques. *Chromatographia* 58, 145–149.
- Cronk, Q.C.B., Fuller, J.L., 1995. Plant invaders: The threat to natural ecosystems. *Biol. Conserv.* 10, 508–509.
- Dachs, J., Van Ry, D.A., Eisenreich, S.J., 1999. Occurrence of estrogenic nonylphenols in the urban and coastal atmosphere of the lower Hudson River estuary. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2676–2679.
- Dance, A., 2008. Soil ecology: What lies beneath. *Nature* 455, 724–725.
- Dashtban, M., Schraft, H., Qin, W., 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578–595.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., Qin, W., 2010. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 1, 36–50.

- Dau, H.A., Ullrich, R., Benndorf, D., Svatoš, A., Muck, A., Hofrichter, M., 2007. The coprophilous mushroom *Coprinus radians* secretes a haloperoxidase that catalyzes aromatic peroxygenation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5477–5485.
- Davies, G., Henrissat, B., 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3, 853–859.
- Davin, L.B., Lewis, N.G., 2005. Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 407–415.
- De Marco, A., Spaccini, R., Vittozzi, P., Esposito, F., Berg, B., De Santo, A. V., 2012. Decomposition of black locust and black pine leaf litter in two coeval forest standson Mount Vesuvius and dynamics of organic components assessed through proximate analysis and NMR spectroscopy. *Soil Biol Biochem* 51, 1–15.
- De Voogt, P., Kwast, O., Hendriks, R., Jonkers, C., 2000. Alkylphenol ethoxylates and their degradation products in abiotic and biological samples from the environment. *Analisis* 28, 776–782.
- De Vries, R.P., Visser, J., 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 497–522.
- Desmet, T., Cantaert, T., Gualfetti, P., Nerinckx, W., Gross, L., Mitchinson, C., Piens, K., 2007. An investigation of the substrate specificity of the xyloglucanase Cel74A from *Hypocrea jecorina*. *FEBS J.* 274, 356–363.
- Dhawan, S., Kuhad, R.C., 2002. Effect of amino acids and vitamins on laccase production by the bird's nest fungus *Cyathus bulleri*. *Bioresour. Technol.* 84, 35–38.
- Dhillon, G.S., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., 2011. Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food Bioprocess Technol.* 4, 505–529.
- Dhouib, A., Hamza, M., Zouari, H., Mechichi, T., Hmidi, R., Labat, M., Martinez, M.J., Sayadi, S., 2005. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 1415–1423.
- Di Corcia, A., Cavallo, R., Crescenzi, C., Nazzari, M., 2000. Occurrence and abundance of dicarboxylated metabolites of nonylphenol polyethoxylate surfactants in treated sewages. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3914–3919.
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., Silvana, G., 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 380–391.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C., 2013. Infostat - Software estadístico. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Univ. Nac. Córdoba, Argentina.
- Di Rienzo, J.A., Guzman, A.W., Casanoves, F., 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 7, 129–142.
- Dick, D.P., Gonçalves, C.N., Dalmolin, R.S.D., Knicker, H., Klamt, E., Kögel-Knabner, I., Simões, M.L., Martin-Neto, L., 2005. Characteristics of soil organic matter of different Brazilian Ferralsols under native vegetation as a function of soil depth. *Geoderma* 124, 319–333.
- Dignac, M.F., Kögel-Knabner, I., Michel, K., Matzner, E., Knicker, H., 2002. Chemistry of soil organic matter as related to C : N in Norway spruce forest (*Picea abies*(L.) Karst.) floors and mineral soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 281–289.

- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2013. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8455–8465.
- Dimarogona, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2012. Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* doi: 10.5936/csbj.201209015.
- Ding, S.J., Ge, W., Buswell, J.A., 2001. Endoglucanase I from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*: Purification, characterization, cloning and expression. *Eur. J. Biochem.* 268, 5687–5695.
- Dix, N.J., Webster, J., 1995. *Fungal Ecology*, Chapman & Hall (Eds.). London.
- Dolédec, S., Chessel, D., Gimaret-Carpentier, C., 2000. Niche separation in community analysis: A new method. *Ecology* 81, 2914–2927.
- Ducros, V., Brzozowski, A.M., Wilson, K.S., Brown, S.H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D.S., Pedersen, A.H., Davies, G.J., 1998. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 5, 310–6.
- Düring, R.A., Krahe, S., Gäth, S., 2002. Sorption behavior of nonylphenol in terrestrial soils. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4052–4057.
- Durrens, P., 1981. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*: The three forms of the major laccase activity. *Arch. Microbiol.* 130, 121–124.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., Kumar, A., 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 68, 117–128.
- Eastwood, D.C., Floudas, D., Binder, M., Majcherczyk, A., Schneider, P., Aerts, A., Asiegbu, F.O., Baker, S.E., Barry, K., Bendiksby, M., Blumentritt, M., Coutinho, P.M., Cullen, D., de Vries, R.P., Gathman, A., Goodell, B., Henrissat, B., Ihrmark, K., Kauserud, H., Kohler, A., LaButti, K., Lapidus, A., Lavin, J.L., Lee, Y.-H., Lindquist, E., Lilly, W., Lucas, S., Morin, E., Murat, C., Oguiza, J. a, Park, J., Pisabarro, A.G., Riley, R., Rosling, A., Salamov, A., Schmidt, O., Schmutz, J., Skrede, I., Stenlid, J., Wiebenga, A., Xie, X., Kües, U., Hibbett, D.S., Hoffmeister, D., Högberg, N., Martin, F., Grigoriev, I. V, Watkinson, S.C., 2011. The plant cell wall-decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. *Science.* 333, 762–765.
- Eggert, C., Temp, U., Eriksson, K.E.L., 1996. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151–1158.
- Ehrenfeld, J.G., 2003. Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes. *Ecosystems* 6, 503–523.
- Ek, M., Gierer, J., Jansbo, K., 1989. Study on the selectivity of bleaching with oxygen-containing species. *Holzforschung* 43, 391–396.
- Ekblad, A., Nordgren, A., 2002. Is growth of soil microorganisms in boreal forests limited by carbon or nitrogen availability? *Plant Soil* 242, 115–122.
- Ekelund, R., Granmo, Å., Magnusson, K., Berggren, M., Bergman, Å., 1993. Biodegradation of 4-nonylphenol in seawater

- and sediment. *Environ. Pollut.* 79, 59–61.
- Enoki, M., Watanabe, T., Nakagame, S., Koller, K., Messner, K., Honda, Y., Kuwahara, M., 1999. Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 180, 205–211.
- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P., 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, en: Springer Series in Wood Science. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 407.
- European Commission. Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th Time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparati, 2003., En: Off. J. Eur. Union. Publications Office of the European Union, Luxembourg City, Luxembourg., pp. 24–178.
- Evans, C.S., 1991. Enzymes of lignin degradation, en: Betts, W.B. (Ed.), Biodegradation: natural and synthetic materials. Berlin, Springer-Verlag, pp. 175-184.
- Faituri, M.Y., 2002. Soil organic matter in Mediterranean and Scandinavian forest ecosystems and dynamics of nutrients and monomeric phenolic compounds. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Silvestria* 236. p. 136.
- Faix, O., 1991. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung* 45, 21–28.
- Faraco, V., Piscitelli, A., Sannia, G., Giardina, P., 2007. Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 889–893.
- Farnet, A.M., Gil, G., Ruaudel, F., Chevremont, A.C., Ferre, E., 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon transformation with laccases of a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Geoderma* 149, 267–271.
- Fenn, P., Kirk, T., 1981. Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol.* 130, 59–65.
- Fernandes, E.G., Valério, H.M., Feltrin, T., Sand, S.T. Van Der, Van Der Sand, S.T., 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. *Brazilian J. Microbiol.* 43, 827–833.
- Fernández, R.D., Aragón, R., 2014. Descomposición de hojarasca de las especies leñosas nativas y exóticas más abundantes del pedemonte de las yungas, Tucumán, Argentina. *Ecol. Austral* 24, 286–293.
- Ferrara, F., Fabietti, F., Delise, M., Funari, E., 2005. Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates contamination of crustaceans and fishes from the Adriatic Sea (Italy). *Chemosphere* 59, 1145–1150.
- Fiedler, S., Foerster, M., Glaser, B., Zech, W., 2007. Alkylphenols in sediments of the Atlantic Rainforest south-west of São Paulo, Brazil. *Chemosphere* 66, 212–218.
- Fields, M.W., Russell, J.B., Wilson, D.B., 1998. The role of ruminal carboxymethylcellulases in the degradation of  $\beta$ -glucans from cereal grain. *FEMS Microbiol. Ecol* 27, 261–268.
- Fogel, R., Cromack Jr., K., 1977. Effect of habitat and substrate quality on Douglas fir litter decomposition in western Oregon. *Can. J. Bot.* 55, 1632–1640.



- Fonseca, M.I., Shimizu, E., Zapata, P.D., Villalba, L.L., 2010. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme Microb. Technol.* 46, 534–539.
- Fonseca, M.I., Zapata, P.D., Villalba, L.L., Fariña, J.I., 2014. Characterization of the oxidative enzyme potential in wild white rot fungi from Misiones (Argentina). *Acta Biológica Colomb.* 20, 47–56.
- Frankland, J.C., 1998. Fungal succession - unravelling the unpredictable. *Mycol. Res.* 102, 1–15.
- Frassinetti, S., Barberio, C., Caltavuturo, L., Fava, F., Di Gioia, D., 2011. Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this text to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 253–258.
- Fricke, M.D., Boddy, L., Bebbler, D.P., 2007. Network organisation of mycelial fungi, en: Howard, R.J., Gow, N.A.R. (Eds.), *The Mycota VIII. Biology of the fungal cell.* p. 341.
- Fries, L., 1956. Studies in the physiology of *Coprinus*. II. Influence of pH, metal factors and temperature. *Sven. Bot. Tidskr.* 50, 47–96.
- Gabriel, F.L.P., Heidlberger, A., Rentsch, D., Giger, W., Guenther, K., Kohler, H.P.E., 2005. A novel metabolic pathway for degradation of 4-nonylphenol environmental contaminants by *Sphingomonas xenophaga* Bayram: *ipso*-hydroxylation and intramolecular rearrangement. *J. Biol. Chem.* 280, 15526–15533.
- Gadd, G.M., 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol.* 124, 25–60.
- Gallardo, A., Merino, J., 1993. Leaf decomposition in two Mediterranean ecosystems of southwest Spain: influence of substrate quality. *Ecology* 74, 152–161.
- Gao, Q.T., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2017. Antioxidant responses of different microalgal species to nonylphenol-induced oxidative stress. *J. Appl. Phycol.* 1-13.
- Garavaglia, S., Cambria, M.T., Miglio, M., Ragusa, S., Iacobazzi, V., Palmieri, F., D'Ambrosio, C., Scaloni, A., Rizzi, M., 2004. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J. Mol. Biol.* 342, 1519–1531.
- Garcia-Sandoval, R., Wang, Z., Binder, M., Hibbett, D.S., 2011. Molecular phylogenetics of the Gloeophyllales and relative ages of clades of Agaricomycotina producing a brown rot. *Mycologia* 103, 510–524.
- Gavier-Pizarro, G.I., Kuemmerle, T., Hoyos, L.E., Stewart, S.I., Huebner, C.D., Keuler, N.S., Radeloff, V.C., 2012. Monitoring the invasion of an exotic tree (*Ligustrum lucidum*) from 1983 to 2006 with Landsat TM/ETM+ satellite data and Support Vector Machines in Córdoba, Argentina. *Remote Sens. Environ.* 122, 134–145.
- Gazette, 2003. (CEPA) Canadian Environmental Protection Act, Proposed Notice Requiring the Preparation and Implementation of Pollution Prevention Plans in Respect of Nonylphenol and Its Ethoxylates Contained in Products, Minister of Public Works and Government Services.
- Ghorai, S., Chowdhury, S., Pal, S., Banik, S.P., Mukherjee, S., Khowala, S., 2010. Enhanced activity and stability of cellobiase ( $\beta$ -glucosidase: EC 3.2.1.21) produced in the presence of 2-deoxy-d-glucose from the fungus *Termitomyces chypeatus*.

- Carbohydr. Res. 345, 1015–1022.
- Ghosh, A., Frankland, J.C., Thurston, C.F., Robinson, C.H., 2003. Enzyme production by *Mycena galopus* mycelium in artificial media and in *Picea sitchensis* F-1 horizon needle litter. Mycol. Res. 107, 996–1008.
- Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.-M., 1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. Bioremediat. J. 3, 1–26.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sanna, G., 2010. Laccases: a never-ending story. Cell. Mol. Life Sci. 67, 369–385.
- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V., Jiménez, B., 2007. Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1169, 31–39.
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J.C., Estrada, K.L., Chávez, A., Jiménez Cisneros, B., 2010. Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. Chemosphere 81, 1437–1445.
- Giger, W., Brunner, P.H., Schaffner, C., 1984. 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. Science 225, 623–625.
- Gilbertson, R.L., 1980. Wood-rotting fungi of North America. Mycologia 72, 1–49.
- Givaudan, A., Effosse, A., Faure, D., Potier, P., Bouillant, M.-L., Bally, R., 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum*. FEMS Microbiol. Lett. 108, 205–210.
- Glenn, J.K., Gold, M.H., 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys. 242, 329–341.
- Godoy, O., Castro-Díez, P., Van Logtestijn, R.S.P., Cornelissen, J.H.C., Valladares, F., 2010. Leaf litter traits of invasive species slow down decomposition compared to Spanish natives: A broad phylogenetic comparison. Oecologia 162, 781–790.
- Gong, Y., Han, X.D., 2006. Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. Reprod. Toxicol. 22, 623–630.
- Goodell, B., 2003. Brown-Rot Fungal Degradation of Wood: Our Evolving View. ACS Symp. Ser. 845, 97–118.
- Gramss, G., 1997. Activity of oxidative enzymes in fungal mycelia from grassland and forest soils. J. Basic Microbiol. 37, 407–423.
- Gramss, G., Günther, T., Fritsche, W., 1998. Spot tests for oxidative enzymes in ectomycorrhizal, wood-, and litter decaying fungi. Mycol Res 102, 67–72.
- Gramss, G., Voigt, K.D., Bergmann, H., 2005. Factors influencing water solubility and plant availability of mineral compounds in the tripartite fairy rings of *Marasmius oreades* (BOLT: FR.) FR. J. Basic Microbiol. 45, 41–54.

- Grassi, E., Scodeller, P., Filiel, N., Carballo, R., Levin, L., 2011. Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65, 635–643.
- Green, F., Larsen, M.J., Winandy, J.E., Highley, T.L., 1991. Role of oxalic acid in incipient brown rot decay. *Mater. Organ.* 26, 191–213.
- Griffin, D.H., 1994. *Fungal Physiology*, second edition. Wiley Science Paperback, New York.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T., 2002. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1676–1680.
- Guillén, F., Martínez, A., Martínez, M., 1990. Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 465–469.
- Hakulinen, N., Kiiskinen, L.-L., Kruus, K., Saloheimo, M., Paananen, A., Koivula, A., Rouvinen, J., 2002. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat. Struct. Biol.* 9, 601–605.
- Hall, T., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 449–450.
- Hamada, N., Ishikawa, K., Fuse, N., Kodaira, R., Shimosaka, M., Amano, Y., Kanda, T., Okazaki, M., 1999. Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase, II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 442–451.
- Hammel, K.E., Cullen, D., 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 349–355.
- Hammel, K.E., Kapich, A.N., Jensen, K.A., Ryan, Z.C., 2002. Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 445–453.
- Hankin, L., Anagnostakis, S.L., 1977. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulase activity of microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 98, 109–115.
- Harris, P. V., Welner, D., McFarland, K.C., Re, E., Navarro Poulsen, J.C., Brown, K., Salbo, R., Ding, H., Vlasenko, E., Merino, S., Xu, F., Cherry, J., Larsen, S., Lo Leggio, L., 2010. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: Structure and function of a large, enigmatic family. *Biochemistry* 49, 3305–3316.
- Harvey, P.J., Gilardi, G.F., Goble, M.L., Palmer, J.M., 1993. Charge transfer reactions and feedback control of lignin peroxidase by phenolic compounds: significance in lignin degradation. *J. Biotechnol.* 30, 57–69.
- Harvey, P.J., Palmer, J.M., 1990. Oxidation of phenolic compounds by ligninase. *J. Biotechnol.* 13, 169–179.
- Hatakka, A., 2001. Biodegradation of lignin, en: *Lignin, Humic Substances and Coal.*, Hofrichter, M., Steinbüchel, A. (Eds.), *Biopolymers*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 129–179.

- Hatakka, A., Hammel, K., 2010. Fungal biodegradation of lignocelluloses, en: *The Mycota*. Berlin, Heidelberg, Springer. pp. 319–340.
- Hättenschwiler, S., Gasser, P., 2005. Soil animals alter plant litter diversity effects on decomposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1519–1524.
- Hättenschwiler, S., Tiunov, A. V., Scheu, S., 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36, 191–218.
- Haw, J.F., Maciel, G.E., Schroeder, H.A., 1984. Carbon - 13 nuclear magnetic resonance spectrometric study of wood and wood pulping with cross polarization and magic-angle spinning. *Anal. Chem.* 1329, 1323–1329.
- Hayashi, S., Saito, S., Kim, J.H., Nishimura, O., Sudo, R., 2005. Aerobic biodegradation behavior of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in the presence of organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5626–5633.
- Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., 1998a. Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 165, 43–50.
- Heinfling, A., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Bergbauer, M., Szewzyk, U., 1998. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2788–2793.
- Heinfling, A., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, M.J., Bergbauer, M., Szewzyk, U., Martínez, A.T., 1998b. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. *FEBS Lett.* 428, 141–146.
- Henriksson, G., Johansson, G., Pettersson, G., 2000. A critical review of cellobiose dehydrogenases. *J. Biotechnol.* 78, 93–113.
- Henriksson, G., Nutt, A., Henriksson, H., Pettersson, B., Ståhlberg, J., Johansson, G., Pettersson, G., 1999. Endoglucanase 28 (Cel12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. *Eur. J. Biochem.* 259, 88–95.
- Henrissat, B., Vegetales, M., Grenoble, F., 1991. A classification of glycosyl hydrolases based sequence similarities amino acid. *Biochem. J.* 280, 309–316.
- Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W., 1999. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 447–471.
- Hibbett, D.S., Pine, E.M., Langer, E., Langer, G., Donoghue, M.J., 1997. Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 12002–12006.
- Higuchi, T., 2004. Microbial degradation of lignin: role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proc. Jpn. Acad.* 80, 204–214.
- Hildén, L., Johansson, G., 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol. Lett.* 26, 1683–1693.
- Himmel, M.E., Ding, S.-Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W., Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315, 804–807.

- Hintikka, V., 1970. Studies on white-rot humus formed by higher fungi in forest soils. *Commun. Inst. Fenn.* 69, 1–68.
- Hofrichter, M., 2002. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb. Technol.* 30, 454–466.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., 2010. New trends in fungal biooxidation, en: Hofrichter, M. (Ed.), *The Mycota: X Industrial Applications*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 425–437.
- Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Liers, C., Lundell, T., 2010. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 871–897.
- Hon, D.N.S., 1994. Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose* 1, 1–25.
- Horn, S.J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V.G., 2012. Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnol. Biofuels* 5, 45. doi:10.1186/1754-6834-5-45
- Howard, P.J.A., Howard, D.M., 1974. Microbial decomposition of tree and shrub leaf litter. 1. Weight loss and chemical composition of decomposing litter. *Oikos* 25, 341–352.
- Hower, W.F., 1970. Adsorption of surfactants on montmorillonite. *Clays Clay Miner.* 18, 97–105.
- Hudson, H., 1986. *Fungal Biology*. Edward Arnold, London, p. 306.
- Isroi, Millati, R., Syamsiah, S., Niklasson, C., Cahyanto, M.N., Lundquist, K., Taherzadeh, M.J., 2011. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: A review. *BioResources* 6, 5224–5259.
- Ito, T., Yokoyama, E., Sato, H., Ujita, M., Funaguma, T., Furukawa, K., A., H., 2003. Xylosidases associated with the cell surface of *Penicillium berquei* IFO 4674. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 354–359.
- Ja'afaru, M.I., 2013. Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production. *ISRN Microbiol.* 2013. doi:10.1155/2013/283423
- Jäger, S., Brumbauer, A., Fehe, E., Re, K., 2001. Production and characterization of  $\beta$ -glucosidases from different *Aspergillus* strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 455–461.
- Jarosz-Wilkolazka, A., Kochmańska-Rdest, J., Malarczyk, E., Wardas, W., Leonowicz, A., 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 566–572.
- Jenny, H., Gessel, S.P., Bingham, F.T., 1949. Comparative study of decomposition rates of organic matter in temperate and tropical regions. *Soil Sci.* 68, 419–432.
- Jiménez-González, A., Siles-Alvarado, S., Monroy, O., 2003. Biodegradation of octylphenol polyethoxylates by denitrification. *Water Sci. Technol.* 48, 165–170.
- John, D.M., White, G.F., 1998. Mechanism for biotransformation of nonylphenol polyethoxylates to xenoestrogens in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 180, 4332–4338.
- Jonkers, N., Knepper, T.P., de Voogt, P., 2001. Aerobic biodegradation studies of nonylphenol ethoxylates in river water using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 35, 335–340.

- Jonkers, N., Sousa, A., Galante-Oliveira, S., Barroso, C.M., Kohler, H.P.E., Giger, W., 2010. Occurrence and sources of selected phenolic endocrine disruptors in Ria de Aveiro, Portugal. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 834–843.
- Junghanns, C., Moeder, M., Krauss, G., Martin, C., Schlosser, D., 2005. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151, 45–57.
- Kalesnik, F., Sirolli, H., Collantes, M., 2013. Seed bank composition in a secondary forest in the Lower Delta of the Parana River (Argentina). *Acta Bot. Brasilica* 27, 40–49.
- Kanda, T., Nakakubo, S., Wakabayashi, K., Nisizawa, K., 1978. Purification and properties of an exo-cellulase of Avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.* 84, 1217–1226.
- Kandus, P., Quintana, R.D., Bó, R.F., 2006. Patrones de Paisaje y Biodiversidad del Bajo Delta del Río Paraná. Mapa de Ambientes. Buenos Aires.
- Kang, H.Z., Xin, Z., Berg, B., Burgess, P.J., Liu, Q., Liu, Z., Li, Z., Liu, C., Hongzhang, K., Zaijun, X., Björn, B., Paul, J.B., Qunlu, L., Zhicheng, L., Zhaohua, L., Chunjiang, L., 2010. Global pattern of leaf litter nitrogen and phosphorus in woody plants. *Ann. For. Sci.* 67, 1–8.
- Kapich, A.N., Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A., 2005. Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 371–377.
- Karam, J., Nicell, J.A., 1997. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69, 141–153.
- Karley, A.J., Powell, S.I., Davies, J.M., 1997. Effect of nonylphenol on growth of *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1312–1317.
- Karnchanat, A., Petsom, A., Sangvanich, P., Piaphukiew, J., Whalley, A.J.S., Reynolds, C.D., Sihanonth, P., 2007. Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzi* (Ehrenb.:Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 162–170.
- Kästner, M., Hofrichter, M., 2001. Biodegradation of humic substances, en: Lignin, humic substances and coal, en: Hofrichter, M., Steinbüchel, A. (Eds.), *Biopolymers*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 349–378.
- Keith, T.L., Snyder, S.A., Naylor, C.G., Staples, C.A., Summer, C., Kannan, K., Giesy, J.P., 2001. Identification and quantitation of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol in fish tissues from Michigan. *Environ. Sci. Technol.* 35, 10–13.
- Kellner, H., Luis, P., Pecyna, M.J., Barbi, F., Kapturska, D., Krüger, D., Zak, D.R., Marmeisse, R., Vandenberg, M., Hofrichter, M., 2014. Widespread occurrence of expressed fungal secretory peroxidases in forest soils. *PLoS One* 9, e95557. doi:10.1371/journal.pone.0095557
- Kim, S.J., Ishikawa, K., Hirai, M., Shoda, M., 1995. Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec 1, which decolorizes various dyes. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 601–607.

- Kinne, M., Poraj-Kobielska, M., Ralph, S.A., Ullrich, R., Hofrichter, M., Hammel, K.E., 2009. Oxidative cleavage of diverse ethers by an extracellular fungal peroxygenase. *J. Biol. Chem.* 284, 29343–29349.
- Kirk, K., Ibach, R., Mozuch, M.D., Conner, A.H., Highley, T.L., 1991. Characteristics of cotton cellulose depolymerized by a brown-rot fungus, by acid, or by chemical oxidants. *Holzforschung* 45, 239–244.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A. (Eds.), 2008. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*, 10th Ed., CABI Europe - UK.
- Kirk, T., Farrell, R., 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annu Rev Microbiol* 41, 465–505.
- Kleinert, M., Barth, T., 2008. Phenols from lignin. *Chem. Eng. Technol.* 31, 736–745.
- Knicker, H., Schmidt, M.W.I., Kögel-Knabner, I., 2000. Nature of organic nitrogen in fine particle size separates of sandy soils of highly industrialized areas as revealed by NMR spectroscopy. *Soil Biol. Biochem.* 32, 241–252.
- Knight, K.S., Kurylo, J.S., Endress, A.G., Stewart, J.R., Reich, P.B., 2007. Ecology and ecosystem impacts of common buckthorn (*Rhamnus cathartica*): a review. *Biol. Invasions* 9, 925–937.
- Kögel-Knabner, I., de Leeuw, J.W., Hatcher, P.G., 1992. Nature and distribution of alkyl carbon in forest soil profiles: implications for the origin and humification of aliphatic biomacromolecules. *Sci. Total Environ.* 117–118, 175–185.
- Kollmann, A., Brault, A., Touton, I., Dubroca, J., Chaplain, V., Mougin, C., 2003. Effect of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. *J. Environ. Qual.* 32, 1269–1276.
- Kovalenko, V.I., 2010. Crystalline cellulose: structure and hydrogen bonds. *Russ. Chem. Rev.* 79, 231–241.
- Kremer, S.M., Wood, P.M., 1992. Evidence that cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* is primarily an Fe(III) reductase. Kinetic comparison with neutrophil NADPH oxidase and yeast flavocytochrome b2. *Eur J Biochem.* 205, 133–138.
- Kubicek, C.P., 2012. *Fungi and lignocellulosic biomass*, en: John Wiley & Sons. p. 304.
- Kuch, H.M., Ballschmiter, K., 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCl)-MS in the picogram per liter range. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3201–3206.
- Kuhnt, G., 1993. Behavior and fate of surfactants in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1813–1820.
- Kuiters, A.T., 1990. Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. *Acta Bot. Neerl.* 39, 329–348.
- Kulkarni, N., Lakshmikumar, M., Rao, M., 1999. Xylanase II from an alkaliphilic thermophilic *Bacillus* with a distinctly different structure from other xylanases: evolutionary relationship to alkaliphilic xylanases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 640–5.
- Kunamneni, A., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., 2007. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications, en: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badajoz, Spain, pp. 233–245.

- Kunieda, H., Shigeta, K., Ozawa, K., Suzuki, M., 1997. Self-organizing structures in poly(oxyethylene) oleyl ether-water system. *J. Phys. Chem. B* 101, 7952–7957.
- Kunieda, H., Umizu, G., Aramaki, K., 2000. Effect of mixing oils on the hexagonal liquid crystalline structures. *J. Phys. Chem. B* 104, 2005–2011.
- Lambers, H., Stuart Chapin III, F., Pons, T.L., 2008. *Plant Physiological Ecology*, Springer.
- Langford, K.H., Scrimshaw, M.D., Birkett, J.W., Lester, J.N., 2005. The partitioning of alkylphenolic surfactants and polybrominated diphenyl ether flame retardants in activated sludge batch tests. *Chemosphere* 61, 1221–1230.
- Langston, J.A., Shaghasi, T., Abbate, E., Xu, F., Vlasenko, E., Sweeney, M.D., 2011. Oxidoreductive cellulose depolymerization by the enzymes cellobiose dehydrogenase and glycoside hydrolase 61. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 7007–7015.
- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., Bras, J., 2012. Microfibrillated cellulose - its barrier properties and applications in cellulosic materials: a review. *Carbohydr. Polym.* 90, 735–764.
- Lee, H.B., Peart, T.E., Svoboda, M.L., 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1094, 122–129.
- Lee, K.M., Moon, H.J., Kalyani, D., Kim, H., Kim, I.W., Jeya, M., Lee, J.K., 2011. Characterization of cellobiohydrolase from a newly isolated strain of *Agaricus arvensis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 711–718.
- Lee Ferguson, P., Bopp, R.F., Chillrud, S.N., Aller, R.C., Brownawell, B.J., 2003. Biogeochemistry of nonylphenol ethoxylates in urban estuarine sediments. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3499–3506.
- Levin, L., Papinutti, L., Forchiassin, F., 2004. Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin-modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresour. Technol.* 94, 169–176.
- Liao, C., Peng, R., Luo, Y., Zhou, X., Wu, X., Fang, C., Chen, J., Li, B., 2008. Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: A meta-analysis. *New Phytol.* 177, 706–714.
- Lichstein, J.W., Grau, H.R., Aragón, R., 2004. Recruitment limitation in secondary forests dominated by an exotic tree. *J. Veg. Sci.* 15, 721–728.
- Liers, C., Arnstadt, T., Ullrich, R.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 Microbiol. Ecol.* 78, 91–102.
- Liers, C., Bobeth, C., Pecyna, M., Ullrich, R., Hofrichter, M., 2010. DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1869–1879.
- Liers, C., Ullrich, R., Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M., 2006. Mineralization of <sup>14</sup>C-labelled synthetic lignin and extracellular enzyme activities of the wood-colonizing ascomycetes *Xylaria hypoxylon* and *Xylaria polymorpha*. *Appl.*



- Microbiol. Biotechnol. 69, 573–579.
- Liu, Q.P., Sulzenbacher, G., Yuan, H., Bennett, E.P., Pietz, G., Saunders, K., Spence, J., Nudelman, E., Levery, S.B., White, T., Neveu, J.M., Lane, W.S., Bourne, Y., Olsson, M.L., Henrissat, B., Clausen, H., 2007. Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells. *Nat. Biotechnol.* 25, 454–464.
- Lomascolo, A., Record, E., Herpoël-Gimbert, I., Delattre, M., Robert, J.L., Georis, J., Dauvrin, T., Sigoillot, J.C., Asther, M., 2003. Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer. *J. Appl. Microbiol.* 94, 618–624.
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K., Baldrian, P., 2016. Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Sci. Rep.* 6, 25279.
- Lorenz, K., Preston, C.M., Kandeler, E., 2006. Soil organic matter in urban soils: Estimation of elemental carbon by thermal oxidation and characterization of organic matter by solid-state <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Geoderma* 130, 312–323.
- Lousier, J.D., Parkinson, D., 1976. Litter decomposition in a cool temperate deciduous forest. *Can. J. Bot.* 54, 419–436.
- Lozada, M., Itria, R.F., Figuerola, E.L.M., Babay, P.A., Gettar, R.T., De Tullio, L.A., Erijman, L., 2004. Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates-enriched activated sludge. *Water Res.* 38, 2077–2086.
- Luis, P., Walther, G., Kellner, H., Martin, F., Buscot, F., 2004. Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1025–1036.
- Lundell, T.K., Mäkelä, M.R., Hildén, K., 2010. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes - ecological, functional and phylogenetic review. *J. Basic Microbiol.* 50, 5–20.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., Cooper, D.W., Jones, D.M., 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1009–1014.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., Gerngross, T.U., 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnol. Prog.* 15, 777–793.
- Lyr, H., 1963. Enzymatische detoxification chlorierter phenole. *Phytopathol Z.* 47, 73–83.
- Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Fedorova, N.D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P.R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J.R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A., Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N., Kikuchi, H., 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438, 1157–1161.

- Maehara, T., Ichinose, H., Furukawa, T., Ogasawara, W., Takabatake, K., Kaneko, S., 2013. Ethanol production from high cellulose concentration by the basidiomycete fungus *Flammulina velutipes*. *Fungal Biol.* 117, 220–226.
- Magnelli, P., Forchiassin, F., 1999. Regulation of the cellulase complex production by *Saccobolus saccoboloides*: induction and repression by carbohydrates. *Mycologia* 91, 359–364.
- Maguire, R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Qual. Res. J. Can.* 34, 37–78.
- Makropoulou, M., Christakopoulos, P., Tsitsimpikou, C., Kekos, D., Kolisis, F.N., Macris, B.J., 1998. Factors affecting the specificity of beta-glucosidase from *Fusarium oxysporum* in enzymatic synthesis of alkyl-beta-D-glucosides. *Int. J. Biol. Macromol.* 22, 97–101.
- Mallerman, J., Papinutti, L., Levin, L., 2015. Characterization of  $\beta$ -glucosidase produced by the white rot fungus *Flammulina velutipes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 57–65.
- Malvárez, A.I., 1999. El Delta Del Rio Parana como mosaico de humedales, en: Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica. Oficina Regional de Ciencia y Técnica para América Latina y el Caribe, MAB/UNESCO, Montevideo, pp. 35–53.
- Manavalan, T., Manavalan, A., Heese, K., 2015. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Curr. Microbiol.* 70, 485–498.
- Mao, Z., Zheng, X.F., Zhang, Y.Q., Tao, X.X., Li, Y., Wang, W., 2012. Occurrence and biodegradation of nonylphenol in the environment. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 491–505.
- Marano, A.V., Saparrat, M.C.N., Steciow, M.M., Cabello, M.N., Gleason, F.H., Pires-Zottarelli, C.L.A., de Souza, J.I., Barrera, M.D., 2013. Comparative analysis of leaf-litter decomposition from the native *Pouteria salicifolia* and the exotic invasive *Ligustrum lucidum* in a lowland stream (Buenos Aires, Argentina). *Fundam. Appl. Limnol. / Arch. für Hydrobiol.* 183, 297–307.
- Marcomini, A., Pavoni, B., Sfriso, A., Orío, A.A., 1990. Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. *Mar. Chem.* 29, 307–323.
- Martínez-Anaya, C., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Folch-Mallol, J.L., 2008. Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50, 119–131.
- Martínez, A.T., 2002. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 425–444.
- Martínez, A.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 lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Internat. Microbiol.* 8, 195–204.
- Martínez, D., Challacombe, J., Morgenstern, I., Hibbett, D., Schmoll, M., Kubicek, C.P., Ferreira, P., Ruiz-Dueñas, F.J., Martínez, A.T., Kersten, P., Hammel, K.E., Vanden Wymelenberg, A. Gaskell, J., Lindquist, E., Sabat, G., Bondurant, S.S., Larrondo, L.F., Canessa, P., Vicuna, R., Yadav, J., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Pisabarro, A.G., Lavín,

- J.L., Oguiza, J.A., Master, E., Henrissat, B., Coutinho, P.M., Harris, P., Magnuson, J.K., Baker, S.E., Bruno, K., Kenealy, W., Hoegger, P.J., Kües, U., Ramaiya, P., Lucas, S., Salamov, A., Shapiro, H., Tu, H., Chee, C.L., Misra, M., Xie, G., Teter, S., Yaver, D., James, T., Mokrejs, M., Pospisek, M., Grigoriev, I. V., Brettin, T., Rokhsar, D., Berka R, C.D., 2009. Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 1954–1959.
- Martínez, M.J., Muñoz, C., Guillen, F., Martínez, A.T., 1994. Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 500–504.
- 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.
- Massiot, D., Fayon, F., Capron, M., King, I., Le Calvé, S., Alonso, B., Durand, J.O., Bujoli, B., Gan, Z., Hoatson, G., 2002. Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* 40, 70–76.
- Master, E.R., Zheng, Y., Storms, R., Tsang, A., Powlowski, J., 2008. A xyloglucan-specific family 12 glycosyl hydrolase from *Aspergillus niger*: recombinant expression, purification and characterization. *Biochem. J.* 411, 161–170.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., 2002. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60, 551–565.
- McCleary, B. V., 1991. Comparison of endolytic hydrolases that depolymerize 1,4- $\beta$ -D-mannan, 1,5- $\alpha$ -L-arabinan, and 1,4- $\beta$ -D-galactan, en: Leatham, G. F. Himmel, M. E. (Ed.), *Enzym. biomass conversion*. ACS Symp. Ser. vol 460. Am. Chem. Soc., Washington, D.C. pp. 437–449.
- Meentemeyer, V., 1978. Macroclimate and lignin control of litter decomposition rates. *Late Spring Ecol.* 59, 465–472.
- Mester, T., Field, J.A., 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by Bjerkandera species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* 273, 15412–15417.
- Miki, Y., Ichinose, H., Wariishi, H., 2010. Molecular characterization of lignin peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes cervina*: a novel fungal peroxidase. *FEMS Microbiol. Lett.* 304, 39–46.
- Mikola, P., 1956. Studies on the decomposition of forest litter by basidiomycetes. *Commun Inst Fenn* 48, 4–48.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- Minussi, R.C., Pastore, G.M., Durán, N., 2007. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent. *Bioresour. Technol.* 98, 158–164.
- Miyamoto, T., 2000. Lignin-degrading ability of litter-decomposing basidiomycetes from Picea forests of Hokkaido. *Mycoscience* 41, 105–110.
- Montoya, S., Sanchez, O., Levin, L., 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroind.* 12, 115–124.
- Moreira, D.S., Aquino, S.F., Afonso, R.J.C.F., Santos, E.P.P.C., de Pádua, V.L., 2009. Occurrence of endocrine disrupting compounds in water sources of Belo Horizonte Metropolitan Area, Brazil. *Environ. Technol.* 30, 1041–1049.

- Moreira, P.R., Almeida-Vara, E., Malcata, F.X., Duarte, J.C., 2007. Lignin transformation by a versatile peroxidase from a novel *Bjerkandera* sp. strain. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 59, 234–238.
- Morello, J., Matteucci, S.D., Rodriguez, A.F., Silva, M.E., 2012. Ecorregiones y complejos ecosistémicos argentinos. GEPAMA, FADU.
- Morgenstern, I., Klopman, S., Hibbett, D.S., 2008. Molecular evolution and diversity of lignin degrading heme peroxidases in the agaricomycetes. *J. Mol. Evol.* 66, 243–257.
- Mougin, C., Kollmann, A., Jolival, C., 2002. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. *Biotechnol. Lett.* 24, 139–142.
- Mozolowski, G.A., Connerton, I.F., 2009. Characterization of a highly efficient heterodimeric xylosidase from *Humicola insolens*. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 436–442.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 1997. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2166–2174.
- Myasoedova, N.M., Chernykh, A.M., Psurtseva, N. V., Belova, N. V., Golovleva, L.A., 2008. New efficient producers of fungal laccases. *Appl. Biochem. Microbiol.* 44, 73–77.
- Nemergut, D.R., Wunch, K.G., Johnson, R.M., Bennett, J.W., 2000. Benzo[a]pyrene removal by *Marasmiellus trojanus* in soil microcosms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25, 116–119.
- Nicell, J.A., Bewtra, J.K., Biswas, N., Taylor, E., 1993. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater. *Water Res.* 27, 1629–1639.
- Nilsson, T., Ginns, J., 1979. Cellulolytic activity and the taxonomic position of selected brown-rot fungi. *Mycologia* 71, 170–177.
- Núñez, L., Turiel, E., Tadeo, J.L., 2007. Determination of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1146, 157–163.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J., Vilgalys, R., 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5544–5550.
- Okai, Y., Higashi-Okai, K., Machida, K., Nakamura, H., Nakayama, K., Fujita, K., Tanaka, T., Otani, S., Taniguchi, M., 2000. Protective effect of antioxidants against para-nonylphenol-induced inhibition of cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 185, 65–70.
- Olson, J.S., 1963. Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems. *Ecology* 44, 322–331.
- Olson J.S., 2008. Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems. *Ecol. Soc. Am. Stable* 44, 322–331.
- Osono, T., 2007. Ecology of ligninolytic fungi associated with leaf litter decomposition. *Ecol. Res.* 22, 955–974.

- Osono, T., Hobara, S., Koba, K., Kameda, K., 2006. Reduction of fungal growth and lignin decomposition in needle litter by avian excreta. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1623–1630.
- Osono, T., Takeda, H., 2006. Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia* 98, 172–179.
- Osono, T., Takeda, H., 2002. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia* 94, 421–427.
- Ostling, S., Virtama, P., 1946. A modified preparation of the universal buffer described by Teorell and Stenhagen. *Acta Physiol.* 11, 289–293.
- Pandey, M.P., Kim, C.S., 2011. Lignin depolymerization and conversion: a review of thermochemical methods. *Chem. Eng. Technol.* 34, 29–41.
- Paszczynski, A., Crawford, R.L., 1991. Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of veratryl alcohol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178, 1056–1063.
- Paul, E.A., 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, Third ed., p. 552.
- Pecyna, M.J., Ullrich, R., Bittner, B., Clemens, A., Scheibner, K., Schubert, R., Hofrichter, M., 2009. Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 885–897.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz, S., Cornelissen, J.H.C., Vendramini, F., Cabido, M., Castellanos, A., 2000. Chemistry and toughness predict leaf litter decomposition rates over a wide spectrum of functional types and taxa in central Argentina. *Plant Soil* 218, 21–30.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., De La Rubia, T., Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int. Microbiol.* 5, 53–63.
- Peterbauer, C.K., Volc, J., 2010. Pyranose dehydrogenases: Biochemical features and perspectives of technological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 837–848.
- Petersen, R.C., Cummins, K.W., 1974. Leaf processing in a woodland stream. *Freshw. Biol.* 4, 343–368.
- Petrović, M., Barceló, D., 2000. Determination of anionic and nonionic surfactants, their degradation products, and endocrine-disrupting compounds in sewage sludge by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 4560–4567.
- Phillips, C.M., Beeson, W.T., Cate, J.H., Marletta, M.A., 2011. Cellobiose dehydrogenase and a copper-dependent polysaccharide monooxygenase potentiate cellulose degradation by *Neurospora crassa*. *ACS Chem. Biol.* 6, 1399–1406.
- Pinedo-Rivilla, C., Aleu, J., Collado, I.G., 2009. Pollutants biodegradation by fungi. *Curr. Org. Chem.* 13, 1194–1214.
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T., 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277, 37663–37669.
- Planas, C., Guadayol, J.M., Droguet, M., Escalas, A., Rivera, J., Caixach, J., 2002. Degradation of polyethoxylated nonylphenols in a sewage treatment plant. Quantitative analysis by isotopic dilution-HRGC/MS. *Water Res.* 36, 982–

- Pointing, S.B., 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 20–33.
- Pointing, S.B., 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Divers.* 2, 17–33.
- 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.
- Pointing, S.B., Pelling, A.L., Smith, G.J.D., Hyde, K.D., Reddy, C.A., 2005. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. *Mycol. Res.* 109, 115–124.
- Pollet, A., Delcour, J. a, Courtin, C.M., 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30, 176–191.
- Popper, Z.A., 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Curr Opin Plant Biol* 11, 286–292.
- Potin, O., Veignie, E., Rafin, C., 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51, 71–78.
- Potter, T.L., Simmons, K., Wu, J., Sanchez-Olvera, M., KostECKI, P., Calabrese, E., 1999. Static die-away of a nonylphenol ethoxylate surfactant in estuarine water samples. *Environ. Sci. Technol.* 33, 113–118.
- Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., Gold, M.H., 1993. Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* 268, 4429–4440.
- Powlowski, J., Mahajan, S., Schapira, M., Master, E.R., 2009. Substrate recognition and hydrolysis by a fungal xyloglucan-specific family 12 hydrolase. *Carbohydr. Res.* 344, 1175–1179.
- Pozdniakova, N.N., Turkovskaia, O. V, Iudina, E.N., Rodakiewicz-Nowak, Y., 2006. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 42, 63–69.
- Preston, C.M., Trofymow, J.A., Sayer, B.G., Niu, J.N., 1997. C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy with cross-polarization and magic-angle spinning investigation of the proximate-analysis fractions used to assess litter quality in decomposition studies. *Can. J. Bot. Can. Bot.* 75, 1601–1613.
- Purahong, W., Kapturska, D., Pecyna, M.J., Schulz, E., Schloter, M., Buscot, F., Hofrichter, M., Krüger, D., 2014. Influence of different forest system management practices on leaf litter decomposition rates, nutrient dynamics and the activity of ligninolytic enzymes: a case study from central European forests. *PLoS One* 9, e93700.  
doi:10.1371/journal.pone.0093700
- Quarantino, D., Ciaffi, M., Federici, E., D'annibale, A., 2008. Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid cultures. *Biochem. Eng. J.* 39, 236–245.
- Quideau S. A, Anderson M. A, Graham R.C, Chadwick O.A, Trumbore S.E, 2000. Soil organic matter processes: characterization by <sup>13</sup>C NMR and <sup>14</sup>C measurements. *For. Ecol. Manage.* 138, 19–27.

- Quintana, R.D., BÓ, R.F., Kalesnik, F., 2002. Flora y fauna silvestres de la porción terminal de la Cuenca del Plata. Consideraciones ecológicas y biogeográficas., en: Borthagaray, J.M. (Ed.), El Río de la Plata como territorio. FADU, FURBAN e Infinito, Buenos Aires, pp. 99–124.
- Quintana, R.D., Malzof, Silvina, L., Villar, M.V., Saccone, P.L., Astrada, E., Prado, W., Rosenfeldt, S., Brancolini, F., 2012. Plantas, animales y hongos de las islas: una introducción a la biodiversidad del Bajo Delta del Río Paraná. Aprelenda, Buenos Aires.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A. V., Vasil'chenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40, 1–17.
- R Development Core Team, R.F.F.S.C., 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput.
- Rajan, S.S., Yang, X., Collart, F., Yip, V.L.Y., Withers, S.G., Varrot, A., Thompson, J., Davies, G.J., Anderson, W.F., 2004. Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD<sup>+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent phospho- $\alpha$ -glucosidase from *Bacillus subtilis*. *Structure* 12, 1619–1629.
- Rayner, A.D., Boddy, L., 1988. Fungal Decomposition of Wood. Wiley, New York.
- Reading, N.S., Welch, K.D., Aust, S.D., 2003. Free radical reactions of wood-degrading fungi. *Wood Deterior. Preserv.* 845, 16–31.
- Reale, S., Di Tullio, A., Spreti, N., De Angelis, F., 2004. Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins. *Mass Spectrom. Rev.* 23, 87–126.
- Reddy, C.A., Mathew, Z., 2001. Bioremediation potential of white rot fungi, en: Gadd, G.M. (Ed.), Fungi in bioremediation. Cambridge, pp. 52–78.
- Reese, E.T., Maguire, A.H., Parrish, F.W., 1968. Glucosidases and exo-glucanases. *Can. J. Biochem.* 46, 25–34.
- Regalado, V., Perestelo, F., Rodríguez, A., Carnicero, A., Sosa, F.J., De La Fuente, G., Falcón, M.A., 1999. Activated oxygen species and two extracellular enzymes: Laccase and aryl-alcohol oxidase, novel for the lignin-degrading fungus *Fusarium proliferatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 388–390.
- Regina, I.S., Salazar, S., Leonardi, S., Rapp, M., 2005. Nutrient pools to the soil through organic matter in several *Castanea sativa* Mill. coppices of mountainous mediterranean climate areas. *Acta Hort.* 693, 341–348.
- Renganathan, V., Gold, M.H., 1986. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* 25, 1626–1631.
- Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C.L., Caggia, C., Spagna, G., 2011. An alkaline  $\beta$ -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Res.* 11, 487–493.
- Revankar, M.S., Lele, S.S., 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochem.* 41, 581–588.
- Riley, R., Salamov, A.A., Brown, W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., Levasseur, A., Lombard, V., Morin, E., Lindquist,

- E.A., Sun, H., Labutti, K.M., Jabbour, D., Luo, H., Baker, S.E., Antonio, G., Walton, J.D., Blanchette, R.A., Martin, F., Cullen, D., Hibbett, D.S., Riley, R., Salamov, A.A., Brown, D.W., Nagy, L.G., Floudas, D., Held, B.W., 2014. Correction for Riley et al., Extensive sampling of basidiomycete genomes demonstrates inadequacy of the white-rot/brown-rot paradigm for wood decay fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 14959–14959.
- Rivero, C.L.G., Barbosa, A.C., Ferreira, M.F.N., Dorea, J.G., Grisolia, C.K., 2008. Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicology* 17, 732–737.
- Rodríguez-Couto, S., 2013. Treatment of textile wastewater by white-rot fungi: still a far away reality?. *Text. Light Ind. Sci. Technol.* 2, 113–119.
- Romano, G.M., Calcagno, J., Lechner, B., 2013. Influencia de las condiciones climáticas sobre la biodiversidad de hongos Macromycetes en una plantación de álamos y sauces del Delta del Paraná, en: Libro del Simposio Científico Académico Delta del Paraná. pp. 72–76.
- Romero-Ale, E.E., Babay, P.A., Magallanes, J., Becquart, E., Polla, G., Gautier, E., 2009. Performance of different extraction media for the ultrasonic-assisted extraction of nonylphenol and nonylphenol mono- and diethoxylates from sediments. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 89, 1005–1021.
- Ronchi-Virgolini, A.L., Lorenzón, R.E., Beltzer, A.H., Alonso, J.M., 2010. Ensamblajes de aves del Parque Nacional Pre-Delta (Entre Ríos, Argentina): Análisis de la importancia ornitológica de distintas unidades ambientales. *Hornero* 25, 27–40.
- Rose, J.K.C., Saladié, M., Catalá, C., 2004. The plot thickens: new perspectives of primary cell wall modification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 296–301.
- Rosenberg, W., Nierop, K.G.J., Knicker, H., de Jager, P.A., Kreutzer, K., Weiß, T., 2003. Liming effects on the chemical composition of the organic surface layer of a mature Norway spruce stand (*Picea abies* [L.] Karst.). *Soil Biol. Biochem.* 35, 155–165.
- Rudel, R.A., Melly, S.J., Geno, P.W., Sun, G., Brody, J.G., 1998. Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol.* 32, 861–869.
- Ruegger, M.J., Tauk-Tornisielo, S.M., 2004. Cellulase activity of fungi isolated from soil of the Ecological Station of Juréia-Itatins, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 27, 205–211.
- 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.
- Rutigliano, F.A., Virzo De Santo, A., Berg, B., Alfani, A., Fioretto, A., 1996. Lignin decomposition in decaying leaves of *Fagus sylvatica* L. and needles of *Abies alba* Mill. *Soil Biol. Biochem.* 28, 101–106.
- Ryan, M.G., Melillo, J.M., Ricca, A., 1990. A comparison of methods for determining proximate carbon fractions of forest litter. *Can. J. For. Res.* 20, 166–171.
- Sadana, J.C., Lachke, a H., Patil, R. V., 1984. Endo-(1,4)- $\beta$ -D-glucanases from *Sclerotium rolfsii*. Purification, substrate specificity, and mode of action. *Carbohydr. Res.* 133, 297–312.



- Saito, T., Kato, K., Yokogawa, Y., Nishida, M., Yamashita, N., 2004. Detoxification of bisphenol A and nonylphenol by purified extracellular laccase from a fungus isolated from soil. *J. Biosci. Bioeng.* 98, 64–66.
- Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttilä, M., 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *Eur. J. Biochem.* 269, 4202–4211.
- Saparrat, M.C.N., Bucsinzky, A.M.M., Alfio Tournier, H., Cabello, M.N., Arambarri, A.M., 2000. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Rev. Iberoam. Micol.* 17, 64–68.
- Saparrat, M.C.N., Guillén, F., 2005. Ligninolytic ability and potential biotechnology applications of the South American fungus *Pleurotus laciniatocrenatus*. *Folia Microbiol.* 50, 155–160.
- Saparrat, M.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, 72–76.
- Saparrat, M.C.N., Martínez, M.J., Cabello, M.N., Arambarri, A.M., 2002. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev. Iberoam. Micol.* 19, 181–185.
- Saparrat, M.C.N., Rocca, M., Aulicino, M., Arambarri, A.M., Balatti, P.A., 2008. *Celtis tala* and *Scutia buxifolia* leaf litter decomposition by selected fungi in relation to their physical and chemical properties and lignocellulolytic enzyme activity. *Eur. J. Soil Biol.* 44, 400–407.
- Šásek, V., 2003. Why mycoremediations have not yet come to practice, en: Sasek, V. *et al.* (Ed.), Kluwer Academic Publishers, pp. 247–276.
- Sayed, D.H.A.E., Hakeem, S.S.A., Mahmoud, U.M., Mekkawy, I.A., 2012. 4 nonylphenol induced morphological and histopathological malformation in *Bufo regularis* tadpoles. *Glob. Adv. Res. J. Environ. Sci. Toxicol.* 1, 143–151.
- Schauer, F., Borriss, R., 2004. Biocatalysis and biotransformation, en: Tkacz, J.S., Lane, L. (Eds.), *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. Kluwer/Plenum, New York, pp. 237–306.
- Scheibner, M., Hülsdau, B., Zelena, K., Nimtz, M., De Boer, L., Berger, R.G., Zorn, H., 2008. Novel peroxidases of *Marasmius scorodoni* degrade  $\beta$ -carotene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 1241–1250.
- Scheller, H. V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annu Rev Plant Biol* 61, 263–289.
- Schlosser, D., Höfer, C., 2002. Laccase-catalyzed oxidation of  $Mn^{2+}$  in the presence of natural  $Mn^{3+}$  chelators as a novel source of extracellular  $H_2O_2$  production and its impact on manganese peroxidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3514–3521.
- Schmidhalter, D.R., Canevascini, G., 1992. Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 431–436.
- 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, 13–19.
- Scott, M.J., Jones, M.N., 2000. The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1508, 235–251.
- Seastedt, T., 1984. The role of microarthropods in decomposition and mineralization processes. *Annu. Rev. Entomol.* 29, 25–46.
- Sekela, M., Brewer, R., Moyle, G., Tuominen, T., 1999. Occurrence of an environmental estrogen (4-nonylphenol) in sewage treatment plant effluent and the aquatic receiving environment. *Water Sci. Technol.* 39, 217–220.
- Shallom, D., Shoham, Y., 2003. Microbial hemicellulases. *Curr. Opin. Microbiol.* 6, 219–228.
- Shimada, M., Akamtsu, Y., Tokimatsu, T., Mii, K., Hattori, T., 1997. Possible biochemical roles of oxalic acid as a low molecular weight compound involved in brown-rot and white-rot wood decays. *J. Biotechnol.* 53, 103–113.
- Sigoillot, C., Record, E., Belle, V., Robert, J.L., Levasseur, A., Punt, P.J., Van Den Hondel, C.A.M.J.J., Fournel, A., Sigoillot, J.C., Asther, M., 2004. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 346–352.
- Sigoillot, J.C., Berrin, J.G., Bey, M., Lesage-Meessen, L., Levasseur, A., Lomascolo, A., Record, E., Uzan-Boukhris, E., 2012. *Fungal Strategies for Lignin Degradation*, 1<sup>st</sup> ed, *Advances in Botanical Research*. Elsevier Ltd., pp. 263–308.
- Singh, H., 2006. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, en: *Mycoremediation, fungal bioremediation*. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 283–356.
- Sinsabaugh, R.L., Lauber, C.L., Weintraub, M.N., Ahmed, B., Allison, S.D., Crenshaw, C., Contosta, A.R., Cusack, D., Frey, S., Gallo, M.E., Gartner, T.B., Hobbie, S.E., Holland, K., Keeler, B.L., Powers, J.S., Stursova, M., Takacs-Vesbach, C., Waldrop, M.P., Wallenstein, M.D., Zak, D.R., Zeglin, L.H., 2008. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. *Ecol. Lett.* 11, 1252–1264.
- Slomczynski, D., Nakas, J.P., Tanenbaum, S.W., 1995. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 907–912.
- Smith, E., Ridgway, I., Coffey, M., 2001. The determination of alkylphenols in aqueous samples from the Forth Estuary by SPE-HPLC-fluorescence. *J. Environ. Monit.* 3, 616–20.
- Šnajdr, J., Steffen, K.T., Hofrichter, M., Baldrian, P., 2010. Transformation of <sup>14</sup>C-labelled lignin and humic substances in forest soil by the saprobic basidiomycetes *Gymnopus erythropus* and *Hypboloma fasciculare*. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1541–1548.
- Šnajdr, J., Valášková, V., Merhautová, V., Cajthaml, T., Baldrian, P., 2008. Activity and spatial distribution of lignocellulose-degrading enzymes during forest soil colonization by saprotrophic basidiomycetes. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 186–192.
- Snyder, S.A., Keith, T.L., Verbrugge, D.A., Snyder, E.M., Gross, T.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 1999. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2814–2820.

- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* 34, 1033–1049.
- Soares, A., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2006. Influence of agitation on the removal of nonylphenol by the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera* sp. *BOL 13. Biotechnol. Lett.* 28, 139–143.
- Soares, A., Jonasson, K., Terrazas, E., Guieysse, B., Mattiasson, B., 2005. The ability of white-rot fungi to degrade the endocrine-disrupting compound nonylphenol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 719–725.
- Soponsathien, S., 1998. Some characteristics of ammonia fungi 1. In relation to their ligninolytic enzyme activities. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 337–345.
- Sørensen, A., Lübeck, P.S., Lübeck, M., Teller, P.J., Ahring, B.K., 2011.  $\beta$ -glucosidases from a new *Aspergillus* species can substitute commercial  $\beta$ -glucosidases for saccharification of lignocellulosic biomass. *Can. J. Microbiol.* 57, 638–650.
- Staples, C.A., Naylor, C.G., Williams, J.B., Gledhill, W.E., 2001. Ultimate biodegradation of alkylphenol ethoxylate surfactants and their biodegradation intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2450–2455.
- Stasinakis, A.S., Gatidou, G., Mamais, D., Thomaidis, N.S., Lekkas, T.D., 2008. Occurrence and fate of endocrine disrupters in Greek sewage treatment plants. *Water Res.* 42, 1796–1804.
- Steffen, K.T., Cajthaml, T., Šnajdr, J., Baldrian, P., 2007a. Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litter-decomposing basidiomycetes. *Res. Microbiol.* 158, 447–455.
- Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M., 2003. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 212–217.
- Steffen, K.T., Hatakka, A., Hofrichter, M., 2002a. Degradation of humic acids by the litter-decomposing basidiomycete *Collybia dryophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3442–3448.
- Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A., 2002b. Purification and characterization of manganese peroxidases from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*. *Enzyme Microb. Technol.* 30, 550–555.
- Steffen, K.T., Hofrichter, M., Hatakka, A., 2000. Mineralisation of <sup>14</sup>C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 819–825.
- Steffen, K.T., Schubert, S., Tuomela, M., Hatakka, A., Hofrichter, M., 2007b. Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation* 18, 359–369.
- Stephanou, E., Giger, W., 1982. Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinations of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 16, 800–805.
- Strandberg, G.W., Shumate, S.E., Parrott, J.R., 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 237–245.
- Subramanian, S., Prema, P., 2002. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 33–64.

- Sugano, Y., 2009. DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1387–1403.
- Sumpster, J.P., Johnson, A.C., 2008. 10th anniversary perspective: reflections on endocrine disruption in the aquatic environment: from known knowns to unknown unknowns (and many things in between). *J. Environ. Monit.* 10, 1476–1485.
- Sun, H.W., Hu, H.W., Wang, L., Yang, Y., Huang, G.L., 2014. The bioconcentration and degradation of nonylphenol and nonylphenol polyethoxylates by *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 1255–1270.
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M.H., Poulos, T.L., 1994. Preliminary crystallographic analysis of manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Mol. Biol.* 238, 845–848.
- Sutherland, J.B., Crawford, D.L., 1981. Lignin and glucan degradation by species of the Xylariaceae. *T. Brit. Mycol. Soc.* 76, 1–37.
- Suto, M., Tomita, F., 2001. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 305–311.
- Suzuki, M.R., Hunt, C.G., Houtman, C.J., Dalebroux, Z.D., Hammel, K.E., 2006. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. *Environ. Microbiol.* 8, 2214–2223.
- Sweetman, A.J., 1994. Development and application of a multi-residue analytical method for the determination of n-alkanes, linear alkylbenzenes, polynuclear aromatic hydrocarbons and 4-nonylphenol in digested sewage sludges. *Water Res.* 28, 343–353.
- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979. Decomposition in terrestrial ecosystems. *Rev. Lit. Arts Am.* 5, 12–24.
- Tadros, T.F., 2005. *Applied surfactants: principles and applications*, Wiley-VCH, p. 654.
- Takano, M., Nishida, A., Nakamura, M., 2001. Screening of wood-rotting fungi for kraft pulp bleaching by the Poly R decolorization test and biobleaching of hardwood kraft pulp by *Phanerochaete crassa* WD1694. *J. Wood Sci.* 47, 63–68.
- Talbot, J.M., Allison, S.D., Treseder, K.K., 2008. Decomposers in disguise: Mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Funct. Ecol.* 22, 955–963.
- Tanghe, T., Devriese, G., Verstraete, W., 1998. Nonylphenol degradation in lab scale activated sludge units is temperature dependent. *Water Res.* 32, 2889–2896.
- Tanghe, T., Dhooge, W., Verstraete, W., 1999. Isolation of a bacterial strain able to degrade branched nonylphenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 746–751.
- Teeri, T.T., Koivula, A., Linder, M.B., Wohlfahrt, G., Divne, C., Jones, T.A., 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases : Why so efficient on crystalline cellulose ? *Biochem. Soc. Trans.* 26, 173–178.
- Tekere, M., Mswaka, A.Y., Zvauya, R., Read, J.S., 2001. Growth, dye degradation and ligninolytic activity studies on Zimbabwean white rot fungi. *Enzym. Microb Technol.* 28, 420–426.
- Ten, L.N., Im, W.T., Kim, M.K., Kang, M.S., Lee, S.T., 2004. Development of a plate technique for screening of

- polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *J. Microbiol. Methods* 56, 375–382.
- Tenney, F.G., Waksman, S.A., 1929. Composition of natural organic materials and their decomposition in the soil. *Soil Sci.* 28, 55–84.
- Terwisscha van Scheltinga, a C., Armand, S., Kalk, K.H., Isogai, A., Henrissat, B., Dijkstra, B.W., 1995. Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and x-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis. *Biochemistry* 34, 15619–15623.
- Thiele, B., Günther, K., Schwuger, M.J., 1997. Alkylphenol ethoxylates: trace analysis and environmental behavior. *Chem. Rev.* 97, 3247–3272.
- Thiele, B., Heinke, V., Kleist, E., Guenther, K., 2004. Contribution to the structural elucidation of 110 isomers of technical p-nonylphenol. *Environ. Sci. Technol.* 38, 3405–3411.
- Thurston, C.F., 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19–26.
- Timofeevski, S.L., Reading, N.S., Aust, S.D., 1998. Mechanisms for protection against inactivation of manganese peroxidase by hydrogen peroxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 356, 287–295.
- Torres-Duarte, C., Viana, M.T., Vazquez-Duhalt, R., 2012. Laccase-mediated transformations of endocrine disrupting chemicals abolish binding affinities to estrogen receptors and their estrogenic activity in zebrafish. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 864–876.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S., 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B Environ.* 46, 1–15.
- Toyooka, T., Kubota, T., Ibuki, Y., 2012. Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 741, 57–64.
- Tsukada, T., Igarashi, K., Yoshida, M., Samejima, M., 2006. Molecular cloning and characterization of two intracellular beta-glucosidases belonging to glycoside hydrolase family 1 from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 807–814.
- Tsutsumi, Y., Haneda, T., Nishida, T., 2001. Removal of estrogenic activities of bisphenol A and nonylphenol by oxidative enzymes from lignin-degrading basidiomycetes. *Chemosphere* 42, 271–276.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2010. Nonylphenol (NP) and nonylphenol ethoxylates (NPEs) action plan 1–13.
- Uguz, C., Iscan, M., Ergüven, A., Isgor, B., Togan, I., 2003. The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effect on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Res.* 92, 262–270.
- Ullrich, R., Nüske, J., Scheibner, K., Spantzel, J., Hofrichter, M., 2004. Novel haloperoxidase from the agaric basidiomycete *Agrocybe aegerita* oxidizes aryl alcohols and aldehydes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4575–4581.
- Uzan, E., Nousiainen, P., Balland, V., Sipila, J., Piumi, F., Navarro, D., Asther, M., Record, E., Lomascolo, A., 2010. High redox potential laccases from the ligninolytic fungi *Pycnoporus coccineus* and *Pycnoporus sanguineus* suitable for white

- biotechnology: From gene cloning to enzyme characterization and applications. *J. Appl. Microbiol.* 108, 2199–2213.
- Valášková, V., Baldrian, P., 2006. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus* - Production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. *Microbiology* 152, 3613–3622.
- Valášková, V., Šnajdr, J., Bittner, B., Cajthaml, T., Merhautová, V., Hofrichter, M., Baldrian, P., 2007. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2651–2660.
- Valli, K., Wariishi, H., Gold, M.H., 1990. Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase: role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry* 29, 8535–8539.
- Van Den Brink, J., De Vries, R.P., 2011. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 1477–1492.
- Van Ry, D.A., Dachs, J., Gigliotti, C.L., Brunciak, P.A., Nelson, E.D., Eisenreich, S.I., 2000. Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the lower Hudson River Estuary. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2410–2417.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W., 2008. Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 278–285.
- Vardakou, M., Katapodis, P., Samiotaki, M., Kekos, D., Panayotou, G., Christakopoulos, P., 2003. Mode of action of family 10 and 11 endoxylanases on water-unextractable arabinoxylan. *Int. J. Biol. Macromol.* 33, 129–134.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A.F., Viana, M.T., 2006. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. Scientific review. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 4, 1–25.
- Veres, Z., Kotroczó, Z., Fekete, I., Tóth, J., Lajtha, K., Townsend, K., Tóthmérész, B., 2015. Soil extracellular enzyme activities are sensitive indicators of detrital inputs and carbon availability. *Appl. Soil Ecol.* 92, 18–23.
- Větrovský, T., Steffen, K.T., Baldrian, P., 2014. Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil Actinobacteria. *PLoS One* 9, e89108. doi:10.1371/journal.pone.0089108
- Vidal-Liñán, L., Bellas, J., Salgueiro-González, N., Muniategui, S., Beiras, R., 2015. Bioaccumulation of 4-nonylphenol and effects on biomarkers, acetylcholinesterase, glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase, in *Mytilus galloprovincialis* mussel gilla. *Environ. Pollut.* 200, 133–139.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J., Linko, M., 1986. Bleaching with enzymes, en: *Biotechnology in the pulp and paper industry. Proc.3rd Int. Con. Stockholm.* p. 67.
- Vitali, M., Ensabella, F., Stella, D., Guidotti, M., 2004. Nonylphenols in freshwaters of the hydrologic system of an Italian district: association with human activities and evaluation of human exposure. *Chemosphere* 57, 1637–47.
- Voříšková, J., Baldrian, P., 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME J.* 7, 477–486.
- Voříšková, J., Dobiášová, P., Šnajdr, J., Vaněk, D., Cajthaml, T., Šantrůčková, H., Baldrian, P., 2011. Chemical composition of litter affects the growth and enzyme production by the saprotrophic basidiomycete *Hypoholoma fasciculare*. *Fungal Ecol.* 4, 417–426.

- Waksman, S.A., Tenney, F.G., Stevens, K.R., 1928. The role of microorganisms in the transformation of organic matter in forest soils. *Ecology* 9, 126–144.
- Walling, C., El-Taliawi, G.M., Amarnath, K., 1984. Oxidation of styrene derivatives by peroxydisulfate(2-) ion-copper(II) in acetic acid and acetonitrile. Reaction paths in oxidations via radical cations. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 7573–7578.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., Van der Putten, W.H., Wall, D.H., 2004. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304, 1629–1633.
- Wardle, D.A., Bonner, K.I., Nicholson, K.S., 1997. Biodiversity and plant litter: experimental evidence which does not support the view that enhanced species richness improves ecosystem function. *Oikos* 79, 247–258.
- Wariishi, H., Gold, M.H., 1990. Lignin peroxidase compound III: Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.* 265, 2070–2077.
- Wariishi, H., Valli, K., Gold, M.H., 1991. In vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 269–275.
- Watanabe, K., 2001. Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12, 237–241.
- Watanabe, T., Shirai, N., Okada, H., Honda, Y., Kuwahara, M., 2001. Production and chemiluminescent free radical reactions of glyoxal in lipid peroxidation of linoleic acid by the ligninolytic enzyme, manganese peroxidase. *Eur. J. Biochem.* 268, 6114–6122.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22, 161–187.
- Wheeler, T.F., Heim, J.R., LaTorre, M.R., Janes, A B., 1997. Mass spectral characterization of p-nonylphenol isomers using high-resolution capillary GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* 35, 19–30.
- White, T.J., Bruns, S., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, en: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. San Diego: Academic Press. pp. 315-322.
- Wieder, R.K., Lang, G.E., 1982. A critique of the analytical methods used in a examined decomposition data obtained from litter bags. *Ecology* 63, 1636–1642.
- Wilson, J.R., Hatfield, R.D., 1997. Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Aust. J. Agric. Res.* 48, 165–180.
- Wilson, M.A., Heng, S., Goh, K.H., Pugmire, R.J., Grant, D.M., 1983. Studies of litter and acid insoluble soil organic matter fractions using <sup>13</sup>C cross polarization nuclear magnetic resonance spectroscopy with magic angle spinning. *J. Soil Sci.* 34, 83–97.
- Wong, D.W.S., 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157, 174–209.

- Wood, D., 1980. Production, purification and properties of extracellular laccase of *Agaricus bisporus*. J. Gen. Microbiol. 117, 327–338.
- Wood, T.M., Bhat, K.M., 1988. Methods for measuring cellulase activities. Methods Enzymol. 160, 87–112.
- Wood, T.M., McCrae, S.I., 1972. The purification and properties of the C 1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. Biochem. J. 128, 1183–92.
- Woodward, J., Wiseman, A., 1982. Fungal and other  $\beta$ -d-glucosidases - Their properties and applications. Enzyme Microb. Technol. 4, 73–79.
- Wunch, K.G., Alworth, W.L., Bennett, J.W., 1999. Mineralization of benzo[a]pyrene by *Marasmiellus trojanus*, a mushroom isolated from a toxic waste site. Microbiol. Res. 154, 75–9.
- Xiao, Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. Appl. Biochem. Biotechnol. 115, 1115–1126.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram, U.M., Solomon, E.I., 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1292, 303–311.
- Yamamoto, H., Horii, F., Hirai, A., 1996. In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I $\alpha$  and I $\beta$  at the early stage of incubation. Cellulose 3, 229–242.
- Yaropolov, A.I., Skorobogat'ko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D., 1994. Laccase - Properties, catalytic mechanism, and applicability. Appl. Biochem. Biotechnol. 49, 257–280.
- Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalbøge, H., 1996. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 834–841.
- Ying, G.-G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates- a review. Environ. Int. 28, 215–226.
- Yoder, O.C., Valent, B., Chumley, F., 1986. Genetic nomenclature and practice for plant pathogenic fungi. Phytopathology 76, 383–385.
- Yoon, J.J., Kim, Y.K., 2005. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. J. Microbiol. 43, 487–492.
- Zaldívar M, Velásquez JC, Contreras I, P.L., 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electron. J. Biotechnol 4, 1–7.
- Zamocky, M., Ludwig, R., Peterbauer, C., Hallberg, B.M., Divne, C., Nicholls, P., Haltrich, D., 2006. Cellobiose dehydrogenase - a flavocytochrome from wood-degrading, phytopathogenic and saprotrophic fungi. Curr. Protein Pept. Sci. 7, 255–280.
- Zavarzina, A.G., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Trofimov, S.Y., 2004. Biotransformation of soil humic acids by blue



laccase of *Panus tigrinus* 8/18: an in vitro study. *Soil Biol. Biochem.* 36, 359–369.

Zhang, Q., Wang, F., Xue, C., Wang, C., Chi, S., Zhang, J., 2016. Comparative toxicity of nonylphenol, nonylphenol-4-ethoxylate and nonylphenol-10-ethoxylate to wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 131, 7–13.