

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctorando
Lic. Aníbal Sebastián CHELALICHE

Caracterización de los perfiles transcriptómicos y proteómicos de *pleurotus pulmonarius* LBM 105 durante la degradación de bifenilos policlorados y su implicancia para la biorremediación

Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctora en Ciencias Aplicadas”

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto, queda sujeto al cumplimiento de la Ley N° 26.899”.

Directora
Dra. María Isabel FONSECA
Co-Directora
Dra. Adriana Elizabet ALVARENGA

Posadas, 2022



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales



**CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES
TRANSCRIPTÓMICOS Y PROTEÓMICOS DE *Pleurotus
pulmonarius* LBM 105 DURANTE LA DEGRADACIÓN DE
BIFENILOS POLICLORADOS Y SU IMPLICANCIA PARA LA
BIORREMEDIACIÓN**

Por Lic. Anibal Sebastian CHELALICHE

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la
Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2022

Directora

Dr. María Isabel Fonseca

Co-directora

Dra. Adriana Elizabet Alvarenga

TRIBUNAL EXAMINADOR (Resolución Consejo Directivo N° 657/22)

Dr. José Sebastián DÁVILA COSTA

PROIMI-CONICET

Dr. Marcos Mateo MIRETTI

Universidad Nacional de Misiones

Dra. Beatriz del Valle ARGÜELLO

Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Disposición N° 400/23)

Posadas

**CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES TRANSCRIPTÓMICOS Y
PROTEÓMICOS DE *PLEUROTUS PULMONARIUS* LBM 105 DURANTE LA
DEGRADACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y SU IMPLICANCIA PARA LA
BIORREMEDIACIÓN**

Por Lic. Anibal Sebastian CHELALICHE

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología Misiones “Dra. María Ebe Recca” Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Misiones.

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N° 175/18)

Dra. Marta Alejandra POLTI	Universidad Nacional de Tucumán
Dra. Patricia Mabel AGUILERA	Universidad Nacional de Misiones
Dra. Beatriz del Valle ARGÜELLO	Universidad Nacional de Misiones

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Carrera Acreditada con Categoría “A”, por Resolución de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU) N° RESFC-2021-503-APN-CONEAU#ME.

En memoria de Miriam Chelaliche, que esta obra sirva de recuerdo de la Fe que siempre me tuviste para poder avanzar en la vida.

Agradecimientos

La construcción de un trabajo como este no es posible de forma individual; a lo largo de todo este trayecto infinidad de personas me supieron aconsejar, acompañar y guiar por los trémulos caminos de la investigación científica.

Mi primer agradecimiento va dirigido a mi familia, a mi madre Susana, a mi padre Anibal y a mi hermano Juan Andres, que supieron ser pilares emocionales durante mis años como estudiante y ahora como profesional. Que sepan que de todo logro que alcance, ninguno hubiese sido posible sin su incondicional amor y apoyo. Les debo una y mil tesis más.

A mis directoras María Isabel Fonseca y Adriana Elizabet Alvarenga, cuyo consejo, criterio y guía fue determinante para este trabajo de tesis más allá de lo académico. Supieron ser pacientes mentoras a lo largo de estos años sorteando mil vicisitudes con total profesionalismo, siempre acompañándome desde una posición de par para poder lograr que alcancemos las metas propuestas en este trabajo.

Al Dr. Pedro Darío Zapata, por creer en mí y seguir haciéndolo, invitándome a formar parte del grupo de trabajo del Instituto de Biotecnología Misiones, permitiéndome llegar hasta este punto culminante.

A Florencia, cuyo acompañamiento a lo largo de estos últimos años me permitió crecer como persona. No solo supiste ser una excelente compañera de vida, sino una invaluable consejera, amiga y profesional. Siempre todo camino que se recorre se hace más fácil si uno va acompañado, y en vos supe encontrar esa persona con la que no me cansaría de caminar.

A Gabriela Acosta, por su infinita paciencia y por enseñarme el significado de la persistencia. A Maria de los Angeles Kolman, por siempre estar dispuesta a compartir su sabiduría. A mis compañeros de trabajo, por siempre estar dispuestos a ofrecer una mano en ayuda.

Finalmente, pero no menos importante, a Milán y Dobby, por aportar alegría y compañía a todos los días que volvía cansado o que me la pasaba hasta tarde escribiendo. Son una de las mejores cosas que me paso en la vida.

Índice

Índice de Figuras.....	I
Índice de Tablas.....	IV
Lista de abreviaturas.....	V
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
Capítulo 1: Introducción y objetivos.....	1
1.1 Bifenilos policlorados.....	2
1.2 Mecanismos de toxicidad de los PCBs.....	4
1.3 Métodos de remoción de PCBs.....	7
1.3.1 Métodos de remoción <i>in situ</i>	7
1.3.2 Métodos de remoción <i>ex situ</i>	8
1.3.2 Métodos de remoción duales.....	9
1.4 Biorremediación de PCBs.....	11
1.4.1 Biorremediación anaeróbica de los PCBs.....	11
1.4.2 Biorremediación aeróbica de los PCBs.....	11
1.5 Metabolismo de los xenobióticos.....	13
1.5.1 Fase 1 del metabolismo de los xenobióticos.....	13
1.5.2 Fase 2 del metabolismo de los xenobióticos.....	13
1.6 Micorremediación de los PCBs.....	14
1.6.1 Hongos de pudrición blanca y su uso como agentes de micorremediación.....	15
1.6.2 Características del sistema enzimático extracelular de los hongos de pudrición blanca.....	16
1.6.3 Ejemplos del uso de hongos de pudrición blanca en la biorremediación.....	19

1.6.4 Hongos de pudrición blanca y los PCBs.....	22
Hipótesis del trabajo.....	24
Objetivos.....	25
Capítulo 2: Identificación Taxonómica.....	26
2.1 Introducción.....	27
2.2 Materiales y Métodos.....	29
2.2.1 Cepa utilizada y mantenimiento.....	29
2.2.1.1 Cepa.....	29
2.2.1.2 Mantenimiento de la cepa.....	29
2.2.2 Identificación morfológica.....	29
2.2.2.1 Obtención y estudio del basidiocarpo.....	29
2.2.2.2 Desarrollo de la colonia fúngica en medio agarizado.....	30
2.2.3 Identificación molecular.....	30
2.2.3.1 Obtención del ADN de la cepa LBM 105.....	30
2.2.3.2 Análisis de calidad del ADN.....	31
2.2.3.3 Marcador molecular para la identificación.....	31
2.2.3.4 Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2.....	32
2.2.3.5 Estudio filogenético del amplicón ITS1-ITS4.....	32
2.3 Resultados.....	33
2.3.1 Identificación morfológica.....	33
2.3.2 Identificación molecular.....	35
2.4 Discusión.....	38
2.5 Conclusión.....	40

Capítulo 3: Remoción de PCBs y análisis de intermediarios de degradación.....	42
3.1 Introducción.....	43
3.2 Materiales y Métodos.....	45
3.2.1 Cepa utilizada y mantenimiento.....	45
3.2.1.1 Condiciones de cultivo.....	45
3.2.1.2 Tratamientos y controles utilizados.....	46
3.2.1.3 Cuantificación de la remoción de PCBs.....	46
3.2.2 Ensayo de toxicidad.....	47
3.2.2.1 Tratamientos y controles.....	47
3.2.2.2 Condiciones del ensayo.....	48
3.2.2.3 Cálculo de índices de germinación y elongación.....	50
3.2.2.4 Análisis estadístico.....	50
3.2.3 Análisis Metabolómico.....	51
3.2.3.1 Acondicionamiento de las muestras.....	51
3.2.3.2 Determinación por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas.....	51
3.3 Resultados.....	52
3.3.1 Remoción de PCBs por la cepa LBM 105.....	52
3.3.2 Ensayos de toxicidad.....	53
3.3.3 Análisis metabolómico.....	55
3.4 Discusión.....	59
3.5 Conclusión.....	62
Capítulo 4: Análisis Transcriptómico.....	63
4.1 Introducción.....	64

4.2 Materiales y Métodos	65
4.2.1 Obtención del ARN	65
4.2.1.1 Condiciones de cultivo.....	65
4.2.1.2 Extracción y purificación del ARN.....	66
4.2.2 Secuenciación del transcriptoma	67
4.2.2.1 Construcción de las bibliotecas y secuenciación.....	67
4.2.2.2 Análisis de calidad y ensamblado del transcriptoma.....	68
4.2.2.3 Análisis de expresión diferencial.....	68
4.2.3 Análisis de dominios y ubicación	69
4.3 Resultados	69
4.3.1 Metabolismo oxidativo	70
4.3.2 Metabolismo de los xenobióticos	72
4.3.3 Metabolismo de los lípidos	74
4.3.4 Metabolismo de los carbohidratos	75
4.4 Discusión	77
4.4.1 Expresión del sistema oxidativo fúngico	77
4.4.2 Expresión del metabolismo de xenobióticos	79
4.4.3 Peroxidación de los lípidos y modificación del metabolismo lipídico	81
4.4.4 Represión del metabolismo de los carbohidratos	82
4.5 Conclusión	82
Capítulo 5: Análisis Proteómico	84
5.1 Introducción	85
5.2 Materiales y Métodos	86

5.2.1 Preparación de las muestras para el análisis proteómico intracelular.....	86
5.2.2 Preparación de las muestras para el análisis secretómico.....	87
5.2.3 Análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas.....	89
5.2.3.1 Digestión trípica de las proteínas.....	89
5.2.3.2 Separación de las muestras por nanoHPLC.....	89
5.2.3.3 Identificación de los péptidos.....	89
5.2.3.4 Análisis de expresión diferencial.....	90
5.3 Resultados.....	91
5.3.1 Proteoma de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 durante la degradación de bifenilos policlorados.....	91
5.3.1.1 Identificación de las proteínas.....	91
5.3.1.2 Análisis funcional de dominios proteicos.....	91
5.3.1.3 Análisis de localización subcelular.....	93
5.3.1.4 Proteínas únicas en cada condición de cultivo.....	95
5.3.1.5 Análisis secretómico.....	95
5.3.1.6 Comparación de los sets de datos proteicos.....	96
5.4 Discusión.....	97
5.4.1 Acción de las enzimas fúngicas sobre los PCBs.....	97
5.4.2 Los PCBs como inductores del estrés oxidativo.....	100
5.5 Conclusión.....	103
Capítulo 6: Remediación <i>in vitro</i>	104
6.1 Introducción.....	105
6.2 Materiales y Métodos.....	106
6.2.1 Condiciones de cultivo para la obtención de las enzimas.....	106

6.2.2 Remediación <i>in vitro</i> con enzimas extracelulares.....	108
6.2.3 Remediación <i>in vitro</i> con enzimas intracelulares.....	109
6.2.4 Remediación <i>in vitro</i> con la combinación de enzimas extracelulares e intracelulares.....	110
6.2.5 Evaluación de la toxicidad del tratamiento <i>In vitro</i> de PCBs.....	111
6.3 Resultados.....	112
6.3.1 Efecto de los tratamientos sobre la longitud de la radícula.....	112
6.3.2 Índice de crecimiento relativo.....	113
6.3.3 Índice de germinación.....	114
6.3.4 Reducción de la toxicidad.....	115
6.4 Discusión.....	116
6.5 Conclusión.....	119
Capítulo 7: Discusión y conclusiones finales.....	121
7.1 Discusión y Conclusiones.....	122
Recomendación para trabajos futuros.....	130
Producción científica.....	132
Proyectos de Investigación y Becas.....	135
Bibliografía.....	137
Anexos.....	161

Índice de Figuras

<u>Figura:</u>	<u>Pág.</u>
Figura 1.1. Estructura química general de los bifenilos policlorados.	2
Figura 1.2. Configuraciones posibles en relación a la presencia de átomos de cloro en las posiciones <i>orto</i> de la molécula de bifenilo.	5
Figura 1.3. Modelo general de señalización del receptor de hidrocarburos de arilo ante la presencia de un xenobiótico.	6
Figura 1.4. Clasificación de los métodos de remediación de sedimentos y suelos contaminados con PCBs.	10
Figura 1.5. Metabolismo Bacteriano Aeróbico.	12
Figura 1.6. Síntesis gráfica de la degradación de contaminantes orgánicos realizado por hongos de pudrición blanca y de su sistema oxidativo enzimático extracelular.	16
Figura 2.1. Mapa del gen nuclear de ARN ribosomal y las regiones del espaciador interno transcripto (ITS).	28
Figura 2.2. Caracterización morfológica de <i>Pleurotus pulmonarius</i> LBM 105.	34
Figura 2.3. Árbol filogenético de las secuencias de ITS de <i>Pleurotus pulmonarius</i> LBM 105 (*) y de especies relacionadas presentes en las bases de datos.	37
Figura 3.1. Vía metabólica de degradación de PCBs propuesta para los hongos ligninolíticos.	44
Figura 3.2. Esquema representativo de tratamientos y controles utilizados para los ensayos de toxicidad utilizando a <i>Lactuca sativa</i> .	49
Figura 3.3. Remoción enzimática de PCBs luego del tratamiento con <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 en medio líquido GA, expresado como porcentaje de recuperación.	52

Figura 3.4. Efecto de tratamientos y controles en la elongación de la radícula de <i>L. sativa</i> .	54
Figura 3.5. A) Índice de crecimiento relativo calculado a partir de los valores de radícula del ensayo de toxicidad de <i>L. sativa</i> llevado a cabo con los medios tratados con la cepa LBM 105 de <i>P. pulmonarius</i> . B) Índice de germinación calculado a partir de los valores de radícula y de cantidad de semillas germinadas del ensayo de toxicidad de <i>L. sativa</i> llevado a cabo con los medios tratados con la cepa LBM 105 de <i>P. pulmonarius</i> .	55
Figura 3.6. Estructura química de algunos de los compuestos con mayor abundancia relativa obtenidos del análisis de intermediarios de degradación del tratamiento de los Arocloros 1242, 1254 y 1260 con la cepa LBM 105.	57
Figura 3.7. Estructura química del 1,2,3-triclorobenceno.	58
Figura 3.8. Abundancia relativa de las especies de PCBs y los intermediarios de degradación producidos en el tratamiento de los Arocloros 1242, 1254 y 1260 utilizando la cepa <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 luego de 21 días en medio líquido GA.	59
Figura 4.1. Flujo de trabajo para el análisis de expresión diferencial de los transcriptomas de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 en presencia y ausencia de los PCBs.	66
Figura 4.2. <i>Heatmap</i> del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo oxidativo de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105.	71
Figura 4.3. <i>Heatmap</i> del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo de los xenobióticos de la cepa LBM 105 de <i>P. pulmonarius</i> .	73
Figura 4.4. <i>Heatmap</i> del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105.	75
Figura 4.5. <i>Heatmap</i> del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105.	76
Figura 5.1. Flujo de trabajo para el análisis proteómico de la cepa LBM 105 durante la degradación de bifenilos policlorados.	80

Figura 5.2 Distribución de los procesos biológicos afectados de la cepa <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 en presencia de los PCBs.	93
Figura 5.3. Localización subcelular predicha de las proteínas con abundancia diferencial en el tratamiento del medio con PCBs.	94
Figura 5.4. Diagrama de Venn mostrando las proteínas identificadas, tanto únicas de cada condición como las compartidas del análisis proteómico integral (Prot.) y del estudio secretómico (Secret), tanto en condiciones de exposición a los PCBs como en condiciones control.	97
Figura 6.1. Esquema representativo de las condiciones de ensayo y el flujo de trabajo utilizado para la obtención de los extractos enzimáticos tanto intracelulares como extracelulares de la cepa LBM 105 <i>P. pulmonarius</i> .	107
Figura 6.2. Esquema representativo de los ensayos de remoción <i>In vitro</i> para las enzimas extracelulares de la cepa LBM 105.	108
Figura 6.3. Esquema representativo de los ensayos de remoción <i>In vitro</i> para las enzimas intracelulares de la cepa LBM 105.	110
Figura 6.4. Esquema representativo de los ensayos de remoción <i>In vitro</i> para las enzimas intracelulares y extracelulares de la cepa LBM 105.	111
Figura 6.5. Efecto de tratamientos y controles en la elongación de la radícula de <i>L. sativa</i> en los ensayos de remoción <i>In vitro</i> con las proteínas de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105.	113
Figura 6.6. Índice de crecimiento relativo calculado a partir de los valores de radícula del ensayo de toxicidad de <i>L. sativa</i> llevado a cabo con los medios tratados con las enzimas de de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 en buffer fosfato (pH = 6).	114
Figura 6.7. Índice de germinación calculado a partir de los valores de radícula y de cantidad de semillas germinadas del ensayo de toxicidad de <i>L. sativa</i> llevado a cabo con los medios tratados con las enzimas de <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 en buffer fosfato (pH = 6).	115
Figura 7.1. Vía propuesta para la transformación de los PCBs y sus metabolitos por la cepa LBM 105 <i>P. pulmonarius</i> .	128

Índice de Tablas

<u>Tabla:</u>	Pág.
Tabla 1.1. Enzimas involucradas en cada fase del metabolismo de los xenobióticos y su localización celular.	15
Tabla 1.2. Ejemplos de contaminantes orgánicos remediados por diferentes especies de hongos de pudrición blanca.	20
Tabla 2.1. <i>Primers</i> utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2	32
Tabla 2.2. Primeros 10 resultados del blast de la secuencia de ITS de la cepa LBM 105 en la base de datos no redundante del NCBI.	35
Tabla 3.1. Intermediarios de degradación identificados durante la remoción de una mezcla compleja de PCBs por <i>P. pulmonarius</i> LBM 105 a los 21 días de cultivo.	56
Tabla 4.1. Reducción de toxicidad de cada una de las condiciones ensayadas para el análisis de remoción <i>In vitro</i> .	116

Listado de abreviaturas

AAO: Aril Alcohol Oxidasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AhR: Receptor de hidrocarburos de arilo, del inglés *Aryl Hydrocarbon Receptor*

ARN: Ácido ribonucleico

Arnt: translocador nuclear del receptor aril-hidrocarburo, del inglés del inglés *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*

ATSDR: Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, del inglés *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BCL: Benzoato-CoA ligasa

Ben ABCD: benzoato 1,2-dioxigenasa y benzoato dihidrodiol deshidrogenasa

BPA: Bisfenol A, del inglés *Bisphenol A*

BphA: Bifenil 2,3-dioxigenasa

BphB: *cis*-2,3-dihidro-2,3-dihidroxibifenil deshidrogenasa

BphC: 2,3-dihidroxibifenil-1,2-dioxigenasa

BphD: 2-hidroxi-6-fenil-oxohexa-2,4-dienoato hidrolasa

BphH(E): 2-hidroxipenta-2,4-dieonato hidratasa

BphI(F): 4-hidroxi-2-oxoalderato aldolasa

BphJ(G): Acetaldehído deshidrogenasa

BTF3b: Factor de transcripción basal 3

BTPRB: Butilparabeno

CAS: Servicio de Química Abstracta, del inglés *Chemistry Abstract Services*

CBA: Ácido Clorobenzoico

CBZ: Carbamazepina

CLP: Clorpirifos

Con: Control

CPM: Cipermetrina

CYP450: Citocromo P450

DBQ: 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona

DCF: Diclofenac

DCL: Dicofol

DMPTL: Dimetilftalato

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato

DTT: Ditioneitol

DyP: Peroxidasas Decolorantes

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

emPAI: Índice exponencialmente modificado de abundancia proteica, del inglés *Exponentially modified protein abundance index*

FDR: Tasa de descubrimiento falso, del inglés *False discovery rate*

FEP: Fenoprofeno

GA: Medio de Glucosa-Asparagina

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GI: Índice de Crecimiento, del inglés *Growth Index*

GLXO: Glioxal Oxidasa

GO: Número de *Gene Ontology*

GST: Glutación-S- Transferasa

HA: Ácidos húmicos, del inglés *Humic acids*

HI: Homogenato Interno

HOPDA: Ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoico

HPD: 2-hidroxipenta-2,4-dieonato

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*

IBP: Ibuprofeno

IDM: Indometacina

ITS: Espaciador Interno Transcripto, del inglés *Internal Transcribed Spacer*

Lac: Lacasa

LiP: Lignino Peroxidasa

LRC: Largo de radícula del control

LRM: Largo de radícula de la muestra

LSD: Menor diferencia significativa, del inglés *Least Significant Difference*

LSU: Subunidad mayor del ribosoma, del inglés *Large Subunit*

MCL: Máxima verosimilitud compuesta

MEA: Agar Extracto de Malta, del inglés *Malt Extract Agar*

MnP: Manganeso Peroxidasa

MS: Espectro de Masa, del inglés *Mass Spectra*

MTPRB: Metilparabeno

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica, del inglés *National Center for Biotechnology Information*

NPX: Naproxen

PAI: Índice de abundancia proteica, del inglés *Protein abundance index*

PBDE: Éteres de difenilos Polibromurados, del inglés *Polybrominated diphenyl ethers*

PCB: Bifenilos Policlorados, del inglés *Polychlorinated biphenyls*

PHE: Fenantreno, del inglés *Phenathrene*

PYR: Pireno, del inglés *Pyrene*

RB5: Negro Reactivo 5, del inglés *Reactive Black 5*

RES: Especies electrofílicas reactivas, del inglés *Reactive electrophile species*

RGI: Índice de Crecimiento Relativo, del inglés *Relative Growth Index*

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno, del inglés *Reactive Oxygen Species*

S: Sobrenadante

SDS: dodecilsulfato sódico, del inglés *Sodium dodecyl sulfate*

SFGH: S-formilglutación hidrolasa

SGC: Semillas Germinadas del Control

SGM: Semillas Germinadas de la Muestra

SSU: Subunidad Menor del ribosoma, del inglés *Small Subunit*

TCDD: Dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina

TEF: Factor de equivalencia tóxica, del inglés *Toxicity equivalency factor*

Tr: Tratamiento

VP: Peroxidasa Versátil, del inglés *Versatile Peroxidase*

XRE: Elemento de Respuesta a xenobióticos, del inglés *Xenobiotic response element*

Resumen

Los bifenilos policlorados (PCBs) son compuestos organoclorados, recalcitrantes, tóxicos y cancerígenos. Entre los años 1920 y 1970 su producción como aislantes y refrigerantes en transformadores eléctricos hizo que éstos fueran distribuidos globalmente.

Se conoce que los hongos de pudrición blanca tienen potencial de remover estos compuestos. Si bien la capacidad de estos hongos está ampliamente estudiada, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares utilizados en este proceso. Es por ello, que el objetivo general de este trabajo fue el de evaluar el vínculo existente entre los cambios transcriptómicos y proteómicos en la degradación de los PCBs por parte de *Pleurotus pulmonarius* LBM 105, con el fin de comprender los mecanismos de respuesta metabólica, así como analizar la habilidad de sus enzimas para la biorremediación.

En una primera instancia se caracterizó taxonómicamente a la cepa LBM 105 mediante métodos morfológicos y moleculares, ubicando a esta cepa dentro de la especie *P. pulmonarius*.

P. pulmonarius LBM 105 fue capaz de remover un 80,40 % de los PCBs en un medio sintético líquido de glucosa-asparagina (GA) contaminado con 4000 µg de PCBs, reduciendo su toxicidad en un 46,47 %, siendo el día 21 el día de mayor tasa de remoción.

En el día de mayor remoción se realizaron estudios de evaluación de intermediarios de degradación, transcriptómicos y proteómicos. Los estudios de los intermediarios de degradación determinaron una prevalencia de especies de PCBs con un grado de cloración alto (de 5 a 7 sustituciones), aunque todas ellas con sustituciones en posiciones *orto* dentro de la molécula, siendo estas las de menor toxicidad. Así mismo, se identificaron compuestos derivados de la ruptura de la molécula de bifenilo, como ácidos clorobenzoicos.

Los estudios transcriptómicos y proteómicos de esta cepa al día 21 determinaron un aumento de las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo, entre ellas enzimas lacasas, peroxidasas versátiles, citocromo P450s, aril alcohol oxidasas, reductasas de cadena corta y aldo/ceto reductasas, enzimas con capacidad de modificar a los PCBs y a sus derivados, como también factores de transcripción asociados a la respuesta del estrés oxidativo. Así también proteínas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos como glutatión-S-transferasas y dienolactona hidrolasas mostraron un aumento en sus síntesis. Enzimas pertenecientes al metabolismo de los carbohidratos sufrieron una fuerte disminución en su expresión y abundancia en presencia de los PCBs, evidenciándose además un cambio en el perfil de enzimas involucradas en la transcripción y traducción proteica.

Finalmente, se realizó un análisis de remediación *in vitro* con las enzimas obtenidas de cultivos de *P. pulmonarius* LBM 105 expuestos al contaminante, comparándose con controles sin exposición al mismo. Se observó que las enzimas de esta cepa mantienen la capacidad de reducir la toxicidad del medio, siendo la combinación de enzimas extracelulares e intracelulares de la cepa previamente expuestas a los PCBs los que mejor resultados arrojaron, con una reducción de la toxicidad del 39,45 %. Esto demuestra la capacidad de uso de las enzimas de *P. pulmonarius* LBM 105 para poder remediar estos xenobióticos, presentándose como una alternativa atractiva para su aplicación en estrategias de biorremediación.

Palabras Clave: Biorremediación, *Pleurotus pulmonarius*, Intermediarios de degradación de PCBs, Transcriptoma, Proteoma

Abstract

Polychlorinated Biphenyls (PCBs) are organochlorinated, persistent, toxic, and carcinogenic compounds. Between the 20's and the 70's their production as insulators and coolants in electrical transformers caused a global distribution of the PCBs.

It is known that white rot fungi are capable of removing these compounds. Although the removal capacity of these fungi is widely studied, little is known about the molecular mechanisms involved in these processes. Therefore, the general objective of this work was to evaluate the existent relation between transcriptomic and proteomic changes and the PCBs degradation by *Pleurotus pulmonarius* LBM 105, looking forward to comprehending the metabolic response as well as analyze the ability of its enzymes for bioremediation.

First, the strain LBM 105 was taxonomically classified via morphologic and molecular methods, identifying this strain as *P. pulmonarius*.


P. pulmonarius LMB 105 removed 80,40 % of the PCBs in a glucose-asparagine synthetic liquid media (GA) contaminated with 4000 µg of PCBs, reducing the toxicity by 46,47 %, being the 21st day the one with the best remotion rate.

Hence, the intermediate degradation products analysis, proteomic, and transcriptomics studies were made on this day. The intermediate degradation products study was able to determine a prevalence of highly chlorinated PCB species (5 to 7 substitutions), all of them with *ortho* substitutions in the molecule, being the less toxic species. Degradation products of the biphenyl molecule, like chlorobenzoic acids, were identify as well.

The transcriptomic and proteomic studies of this strain on day 21 showed an increase of abundance of enzymes involved in the oxidative metabolism, like laccases, versatile peroxidases, cytochrome P450s, aryl alcohol oxidases, short chain reductases, and aldo/keto reductases, all enzymes capable of modifying PCBs and their derivatives as well as transcriptional factors involved in the response to oxidative stress. Proteins involved in the xenobiotic metabolism, like glutathione-s-transferases and dienelactone hydrolases were also increased. The carbohydrate metabolism enzymes suffered a strong decrease in their synthesis in presence of PCBs and a shift in the profile of protein transcription and translation was also evidenced.

Finally, an *In vitro* remediation analysis with enzymes of *P. pulmonarius* LBM 105 PCBs exposed to PCBs was made and compared with controls without exposure to the contaminant. The combination of extracellular and intracellular enzymes of the PCBs exposed culture showed the best results with a reduction of 39,45 % of the toxicity. This demonstrates the capacity of using the enzymes of *P. pulmonarius* LBM 105 for the remediation of these xenobiotics, being an attractive alternative for their application in bioremediation strategies.

Keywords: Bioremediation, *Pleurotus pulmonarius*, PCBs Intermediate degradation products, Transcriptome, Proteome



Capítulo 1 Introducción y Objetivos

1.1 Bifenilos policlorados

Los bifenilos policlorados, también conocidos como PCBs (del inglés *Polychlorinated biphenyls*), son compuestos químicos sintéticos formados por una molécula de bifenilo conteniendo de 1 a 10 sustituciones de los átomos de hidrógeno por átomos de cloro (Figura 1.1). El número y posición de los átomos de cloro en el anillo fenilo hace posible la existencia de 209 congéneres diferentes (Reddy *et al.*, 2019) de los cuales 60 de éstos pueden ser encontrados en productos comerciales (Ohtsubo *et al.*, 2004; Borja *et al.*, 2005; Passatore *et al.*, 2014).

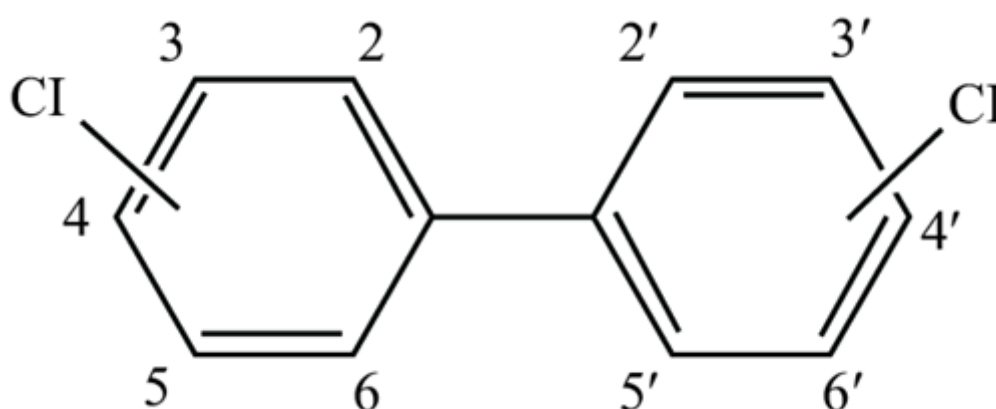


Figura 1.1. Estructura química general de los bifenilos policlorados (tomado de Faroon & Ruiz, 2016).

Desde los años 1920 hasta 1970 los PCBs fueron altamente distribuidos en la industria debido a su uso en equipamientos eléctricos como fluidos hidráulicos, lubricantes o refrigerantes por su baja combustibilidad, estabilidad química y sus propiedades aislantes (Pieper & Seeger, 2008; Xing *et al.*, 2010). Asimismo, estos compuestos han sido utilizados en varias aplicaciones industriales, en transferencias de calor, como plastificantes, en máquinas hidráulicas, tintes, pigmentos e impresiones (Zhu *et al.*, 2012; Zhu & Zhang, 2011). Se estima que aproximadamente 1,5 millones de toneladas de bifenilos policlorados fueron producidos durante este período (Liu *et al.*, 2020) y se estima que un 10 % de esta producción se encuentra distribuida en el ambiente (Wolska *et al.*, 2012). En el pasado, un amplio número de productos basados en PCBs fueron producidos bajo nombres comerciales como *Aroclor* (USA), *Chlophen* (Alemania), *Kanechlor* (Japón) y *Fenclor* (Italia) (Hu *et al.*, 2011). Si bien su producción fue centrada en estos

países, la facilidad de transporte de estos compuestos por largas distancias resultaría en la distribución a lo largo de continentes incluso en regiones donde no se había certificado su uso (Reddy *et al.*, 2019), lo que significó que los PCBs fueran encontrados en todos los compartimentos del ecosistema global.

Los PCBs son reconocidos mundialmente por pertenecer a los 12 contaminantes persistentes orgánicos de mayor importancia, determinada por la Convención de contaminantes persistentes orgánicos de Estocolmo en 2001¹. Hoy en día encabezan en 5to lugar la lista de prioridad de compuestos peligrosos propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (ATSDR, 2019)².

El uso común y generalizado de estos compuestos ha hecho que grandes cantidades de los mismos fueran introducidas al medio ambiente, acumulándose en el sedimento y en suelo, representando una amenaza para el balance del ecosistema y la salud humana. Debido a su baja biodegradabilidad y alta lipofilia, estos compuestos son propensos a bioacumularse en los tejidos, derivando en una biomagnificación a lo largo de la cadena alimenticia (Bedard *et al.*, 2007; Loganathan & Lam, 2011). Es por ello que la principal fuente de la exposición humana hacia los PCBs proviene de la ingesta a través de la dieta, especialmente de la carne de ganado y peces, aunque se han reportado casos de exposición por contacto dermal de suelos cotaminados o inhalación de productos volátiles en matrices contaminadas (Wu *et al.*, 2018).

A partir del reconocimiento de los efectos detrimentales de los PCBs en el ambiente debido a su toxicidad persistente y bioacumulación, a mediados de los años 70 su producción y distribución fue prohibida por la mayoría de los gobiernos, pero la contaminación ambiental, como consecuencia de derrames, transporte, almacenaje y depósito inadecuado, todavía persiste (Sadañoski *et al.*, 2019).

Una serie de estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a los PCBs está altamente correlacionada con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hepáticas, desórdenes hormonales, inmunológicos, neurológicos y genotoxicidad (Carpenter 2006; Yum *et al.*, 2010; Robertson & Ludewig 2011;

1 El Convenio de Estocolmo sobre los contaminantes orgánicos persistentes es un acuerdo internacional que regula el tratamiento de las sustancias tóxicas. Fue firmado el 23 de mayo de 2001 en Estocolmo y entró en vigor en Argentina el 2004 bajo la ley 26.011.

² Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, del inglés *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

Crinnion 2011; Recio-Vega *et al.*, 2013; Perkins *et al.*, 2016). Además, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) clasificó a los PCBS como agentes carcinogénicos de tipo I para humanos (2016) a través de varios estudios epidemiológicos en grupos ocupacionales con exposición a estos contaminantes.

1.2 Mecanismos de toxicidad de los PCBs

La capacidad citotóxica de estos compuestos está dada mayoritariamente por la posición y número de átomos de cloro presentes en la molécula de bifenilo policlorado (Figura 1.2).

En este sentido, se puede diferenciar a los PCBs en dos categorías. Una categoría denominada “similar a dioxina” o “*dioxin-like*” por su similitud en estructura y toxicidad a las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas. La propiedad más destacable de este grupo es la ausencia de átomos de cloro en posiciones *orto* dentro de la molécula, lo que deriva en una configuración coplanar de la molécula de PCB. La otra categoría es denominada como “no similar a dioxina” o “*non-dioxin-like*” que agrupa congéneres que tienen uno o más átomos de cloro presentes en estas posiciones *orto* dentro de la molécula, reduciendo así la coplanaridad de la misma (Liu *et al.*, 2020). Una modificación de la molécula de PCB que introduzca un grupo funcional dentro de la posición *orto* produce cambios en el ángulo diedro del metabolito de PCB resultante, que se relaciona directamente al impacto en la toxicidad y acción sobre la célula (Song *et al.*, 2011).

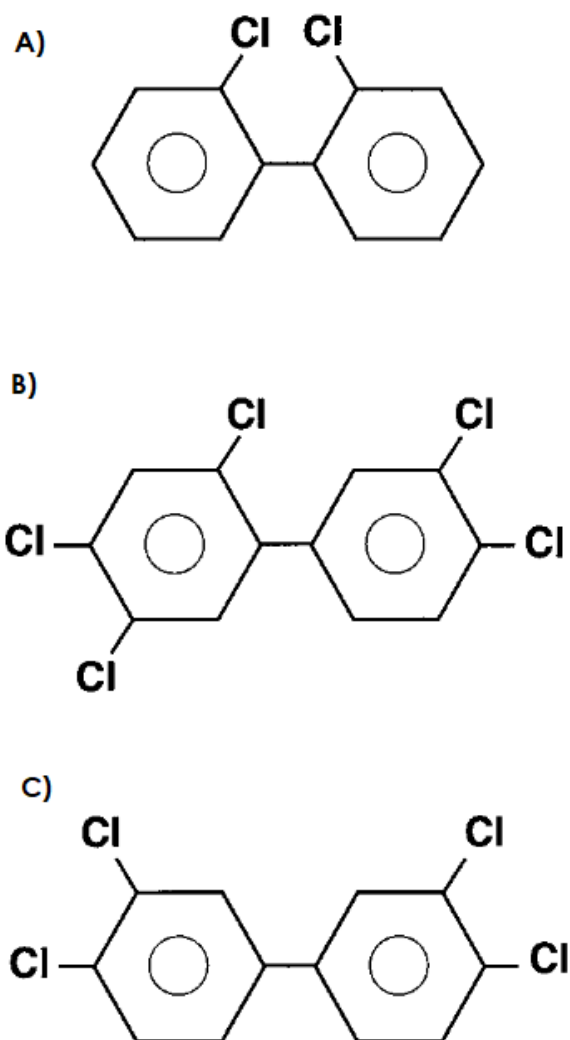


Figura 1.2. Configuraciones posibles en relación a la presencia de átomos de cloro en las posiciones *orto* de la molécula de bifenilo. **A)** di-*orto* PCBs. **B)** mono-*orto* PCB. **C)** PCB coplanar (tomado de Gore, 2001).

Los PCBs similares a dioxinas tienen una mayor afinidad hacia el receptor de hidrocarburos de arilos (AhR del inglés *Aryl hydrocarbon receptor*), ubicado en el citoplasma de la célula, considerado un factor de transcripción que está íntimamente ligado al metabolismo de los xenobióticos (Perkins *et al.*, 2016). Una vez que la molécula del xenobiótico entra a la célula, esta se une al receptor de hidrocarburos de arilo, que se encuentra complejizado dentro de un complejo receptor de dioxinas (Figura 1.3). Una vez unido, el receptor se transloca hacia el núcleo donde forma un heterodímero con el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilos (Arnt del inglés *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*).

Este complejo luego se une al elemento de respuesta de xenobióticos (XRE del inglés *Xenobiotic response element*) en la región promotora de los genes diana (Korashy & El-Kadi, 2006), aunque también se han visto casos de genes activados en presencia de xenobióticos activadores del AhR sin tener una región XRE presente (Huang & Elferink, 2012). La región XRE es una región nucleotídica de secuencia “TNGCGTG” específicamente reconocida por el AhR y se encuentra aguas arriba de los genes diana que participan en el metabolismo de los xenobióticos unidos al AhR (Saatcioglu *et al.*, 1990). Se encontró que una amplia gama de enzimas con capacidad de metabolizar xenobióticos contiene una región promotora con el XRE presente, como por ejemplo la citocromo P450 subtipo 1A1 (CYP1A1) y la glutatión-S-transferasa, entre otros (Ye *et al.*, 2019; Martínez-Guzman *et al.*, 2020).

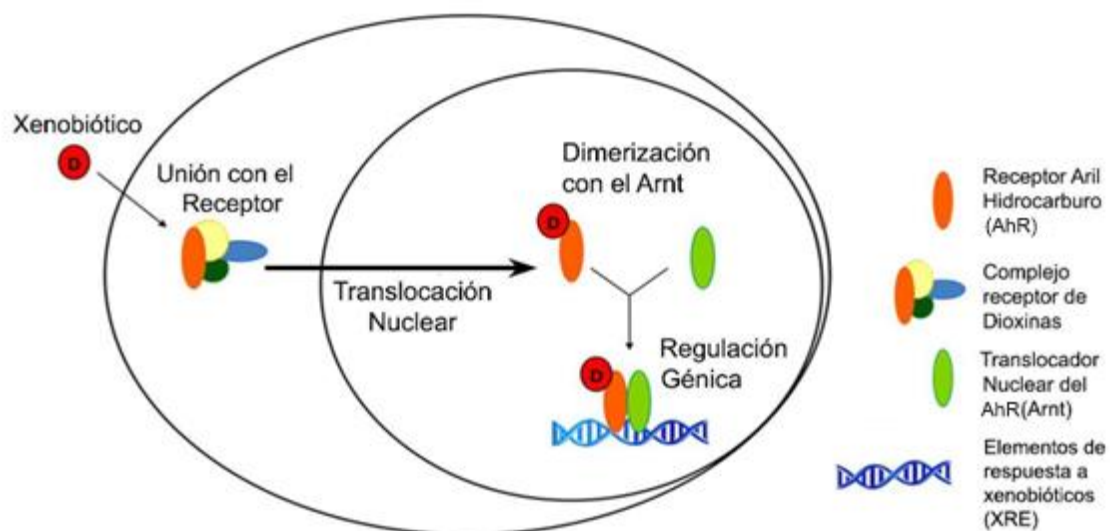


Figura 1.3. Modelo general de señalización del receptor de hidrocarburos de arilos ante la presencia de un xenobiótico. Se puede observar el camino de la molécula de xenobiótico (D) dentro de la célula, donde es reconocido por el receptor de hidrocarburos de arilos (AhR), hasta su translocación al núcleo por el translocador nuclear del AhR (Arnt) donde se activarán los elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) del genoma del individuo (adaptado de Céspedes *et al.*, 2010).

La presencia de los PCBs y la consecuente activación de los XRE mediados por el receptor Aril-hidrocarburo juegan un importante rol en la inducción de estrés oxidativo que produce daño celular. La activación de enzimas con capacidad oxidativa, como la CYP1A1, son generadoras de un desbalance oxidativo dentro de la célula, acompañado de la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del

inglés *Reactive oxygen species*), durante los pasos del metabolismo de los PCBs (Liu *et al.*, 2020). Se ha demostrado que el PCB 153 y la mezcla de los Arocloros 1254 y 1242 son capaces de elevar los niveles celulares de las especies reactivas de oxígeno hasta 1,5 a 1,8 veces más que en condiciones fisiológicamente normales (Mariussen *et al.*, 2002). Adicionalmente, se sabe que los PCBs son capaces de alterar la acción de enzimas antioxidantes relacionados con el sistema de defensa frente al estrés oxidativo (Pessah *et al.*, 2019; Perkins *et al.*, 2016) e incluso alterar la homeostasis del ion Ca^{2+} y de neurotransmisores derivando en un efecto neurotóxico (Westerink, 2014).

1.3 Métodos de remoción de PCBs

La presencia y permanencia de estos compuestos en el ambiente representan un serio riesgo ecotoxicológico. Para poder enfrentarse a la problemática que presentan estos sitios contaminados se emplean tecnologías de remediación de suelos. El principal objetivo de estas es reducir la concentración y movilidad de los contaminantes presentes en la matriz del suelo o sedimento, teniendo en cuenta las características fisicoquímicas y biológicas del suelo (Alvarenga *et al.*, 2018). En el caso de los PCBs, los métodos comúnmente utilizados para la remediación se dividen en métodos *in situ*, *ex situ* y métodos que pueden ser usados en ambas condiciones.

1.3.1 Métodos de remoción *in situ*

Los métodos de remediación *in situ* incluyen estrategias realizadas sobre el lugar a remediar sin remover el suelo o sedimento (Sayqal & Ahmed, 2021).

- **Tratamientos biológicos:** estos tratamientos utilizan organismos vivos o partes de ellos para la remediación de sitios contaminados. Tausz & Donath (1930) introducen este concepto y lo definen como un proceso que se basa en mecanismos biológicos para reducir (degradar, desintoxicar, mineralizar o transformar) la concentración de contaminantes a un estado inocuo. En la biorremediación pueden intervenir bacterias, hongos (micorremediación), plantas (fitorremediación) o enzimas derivadas de estos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. Existen estrategias como la bioestimulación que aceleran la degradación de los

contaminantes por los microorganismos que naturalmente habitan las matrices contaminadas mediante la optimización de factores como ser nutrientes, oxigenación, temperatura, pH, entre otros. O bien, estrategias que enriquecen el suelo con un consorcio microbiano con capacidad de remediar el suelo, lo que se conoce como bioaumentación (Guarino *et al.*, 2017). En este tipo de estrategias se pueden utilizar organismos tanto aeróbicos como anaeróbicos.

- Atenuación natural: es un tratamiento en el que se deja que el mismo microcosmo presente en la matriz contaminada remedie de forma natural a la matriz, sin intervención alguna (Guarino *et al.*, 2017).
- Calentamiento por ondas de Microondas: este método de remediación térmica es eficiente para la remoción de contaminantes orgánicos de suelo y sedimento en el cual mediante ondas de microonda se calienta la superficie de la matriz a remediar, descomponiendo los xenobióticos (Krouzek *et al.*, 2018).
- Tapado o *Capping*: involucra el depósito de una capa de material sin contaminación (sedimento o una combinación de materiales) sobre los sedimentos contaminados. Esto impide generalmente la movilización o resuspensión de los contaminantes en el sedimento y a los cuerpos de agua adyacentes (Labianca *et al.*, 2022).
- Descomposición por catálisis básica: en este método, mediante el uso de una base fuerte y temperatura alta se produce una hidrogenación catalítica que, en el caso particular de los PCBs, remueve los átomos de cloro y los reemplaza por átomos de hidrógeno (Liu *et al.*, 2015).

1.3.2 Métodos de remoción *ex situ*

Las metodologías denominadas *ex situ* involucran excavar y tratar el suelo o sedimentos antes de devolver al mismo a su lugar original (Sayqal & Ahmed, 2021). Dentro de estas estrategias, las más utilizadas para la remediación de PCBs son las siguientes:

- Desorción térmica: es un proceso en el cual contaminantes volátiles o semivolátiles en el suelo son calentados a una temperatura apropiada por medios directos o indirectos en el vacío o mediante un gas para separar el

contaminante de la matriz del suelo (Zhao *et al.*, 2019).

- *Land Farming*: es un proceso simple que implica la excavación del suelo contaminado y traslado a un sitio preparado, donde se labra la tierra periódicamente hasta que los contaminantes son degradados por los microorganismos presentes en la misma matriz. Por lo general se limita a pequeñas porciones de suelo.

1.3.3 Métodos de remoción duales

Existen métodos que pueden ser tanto aplicados a estrategias *in situ* o *ex situ* dependiendo de las necesidades y de las características del ambiente a remediar. Dentro de estos se encuentran los siguientes métodos:

- Hidrodecloración catalítica: esta estrategia de remediación se realiza mediante el uso de metales de transición como catalizadores y el H₂ como agente reductor en solventes acuosos u orgánicos. En el caso de los PCBs, es un proceso irreversible en el cual los átomos de cloro se remueven de la molécula resultando una molécula de bifenilo (Wu *et al.*, 2012).
- Reducción ferrosa: en este método de decloración, las sucesivas remociones de los átomos de cloro son llevadas a cabo por un agente reductor, que en este caso se trata del hierro con valencia de 0 (Fe⁰) produciendo la remoción de los átomos de cloro de la molécula de PCBs (Hashmi *et al.*, 2022).
- Dispersión con sodio: en este método de decloración se dispersa sodio en amoníaco líquido seco en agitación, a temperatura ambiente y en presencia de nitrógeno. Bajo estas condiciones se producen radicales que son capaces de remover los átomos de cloro de los PCBs formando bifenilos como productos finales (Wu *et al.*, 2012).
- Decloración fotocatalítica: en este método, una sustancia fotocatalítica capaz de absorber luz dentro del espectro ultravioleta, visible o infrarrojo cataliza la degradación de los PCBs (como los sistemas fotocatalíticos de óxido de titanio), previa extracción de los contaminantes mediante el uso de surfactantes (Hashmi *et al.*, 2022).
- Ozonización: en esta estrategia de remediación oxidativa se utiliza el ozono como agente oxidante de forma directa (atacando las posiciones nucleofílicas de las sustancias orgánicas y sustituyendo grupos funcionales de los

contaminantes) o de forma indirecta formando radicales oxidrilos en presencia de agua que van a descomponer las moléculas del contaminante (Joseph *et al.*, 2021).

- Reacción de Fenton: durante esta estrategia se produce la activación del peróxido de hidrógeno por sales de hierro para producir radicales hidroxilo, cuya reactividad es tal que es capaz de degradar contaminantes altamente recalcitrantes (Hashmi *et al.*, 2022).

Un resumen de las metodologías descritas anteriormente puede observarse en la Figura 1.4.

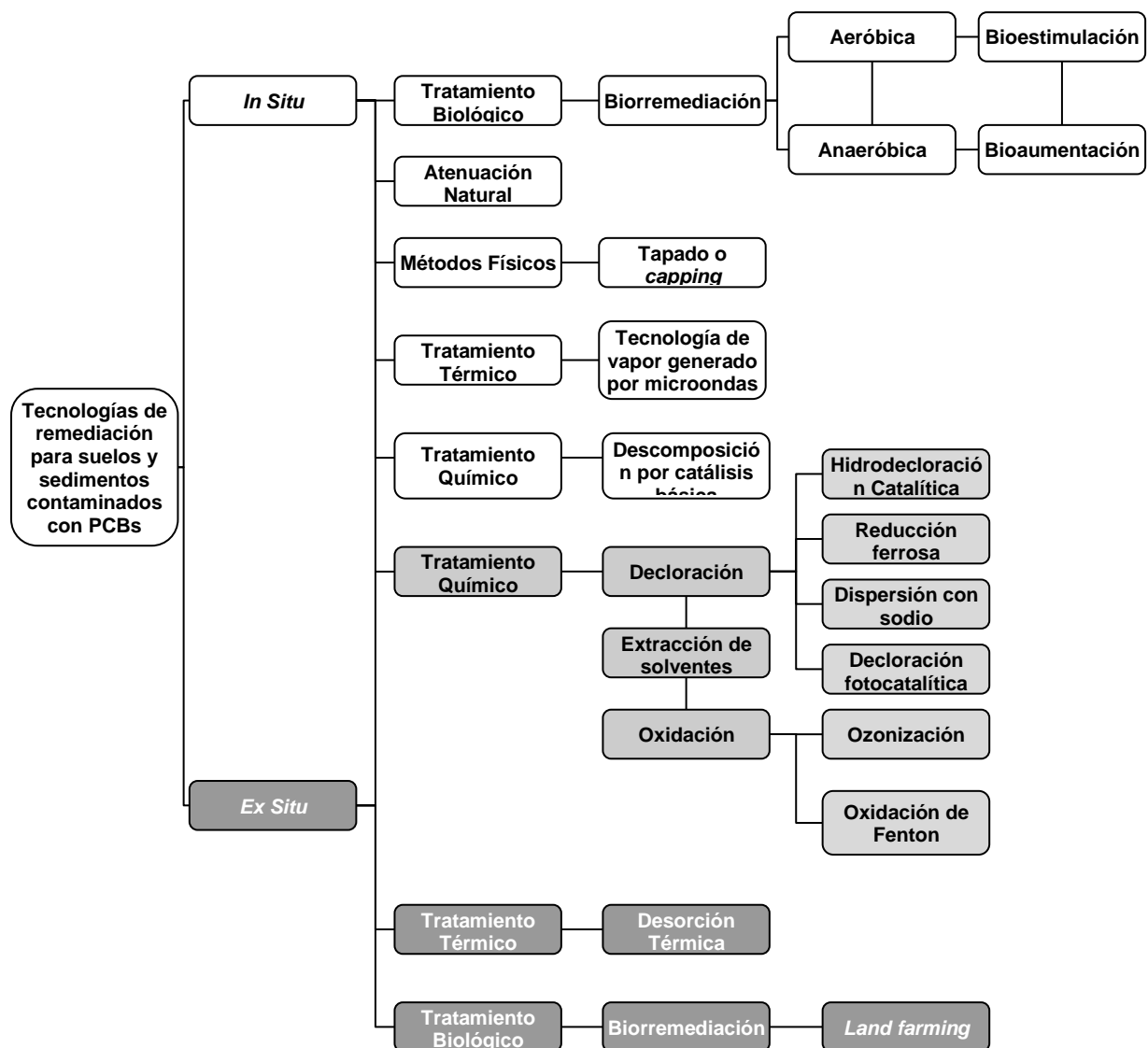


Figura 1.4. Clasificación de los métodos de remediación de sedimentos y suelos contaminados con PCBs. En blanco se mencionan los métodos de remediación *in situ*, en gris oscuro los métodos de remediación *ex situ* y en gris claro los métodos de remoción duales (adaptado de Gomes *et al.*, 2013).

1.4 Biorremediación de PCBs

Las tecnologías mencionadas anteriormente suelen ser demandantes desde el punto de vista energético y económico, sin contar que son altamente invasivas y disruptivas al ambiente que se planea remediar.

En este contexto, la biorremediación ha sido usada para promover la degradación de estos xenobióticos recalcitrantes, con la ventaja adicional de tener un menor impacto ambiental (Sadañoski *et al.*, 2019). Esta estrategia ha recibido un alto grado de atención debido a que representa una eficiente herramienta biotecnológica para la descontaminación ambiental (Kour *et al.*, 2021).

La biorremediación dada por microorganismos comprende dos grandes rutas principales de degradación: la ruta anaeróbica y la ruta aeróbica.

1.4.1 Biorremediación anaeróbica de los PCBs

La degradación anaeróbica suele ocurrir en sedimentos contaminados con PCBs (lagos de agua dulce, ríos y estuarios) y mayoritariamente involucra la reducción de los PCBs y el reemplazo de los átomos de cloro por un átomo de hidrógeno (Gomes *et al.*, 2013). En sus investigaciones, Bedard & Quensen (1995), y Wiegel & Wu (2000) identificaron una serie de vías de dechloración en bacterias anaeróbicas.

Mediante este tipo de dechloración microbiana, se remueven generalmente cloros posicionados en regiones *para* y *meta* dentro de la molécula halogenada, generando primariamente congéneres *orto*-sustituidos (Wiegel & Wu, 2000). Se han observado combinaciones de estas vías para generar congéneres exclusivamente *orto*-sustituidos con una gran reducción de la planaridad de la molécula (Zwiernik *et al.*, 1998). Sin embargo, esta vía de degradación tiene la desventaja de que se vuelve menos eficaz conforme disminuye la biodisponibilidad y bioactividad de los PCBs, lo que ocurre con PCBs de alto grado de cloración (Liu *et al.*, 2007).

1.4.2 Biorremediación aeróbica de los PCBs

Por otro lado, la biodegradación aeróbica de los PCBs involucra una degradación oxidativa que implica la ruptura de la molécula de bifenilo, produciendo ácido clorobenzoico, y su posterior degradación.

En bacterias, este proceso se lleva a cabo por los productos de dos *clusters*

de genes: uno responsable de la transformación de los PCBs a ácido clorobenzoico y el otro responsable de la posterior degradación de este (Borja *et al.*, 2005). Se ha documentado que bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Acinetobacter* y *Rhodococcus* son capaces de degradar los PCBs mediante una vía metabólica aeróbica (Figura 1.5).

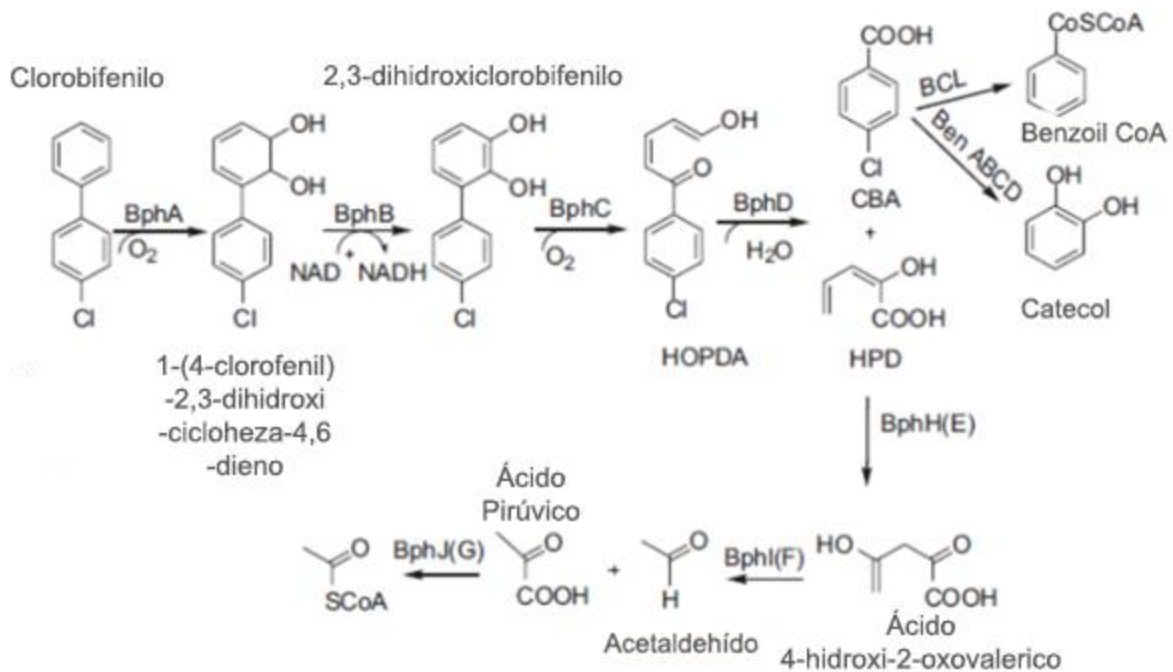


Figura 1.5. Metabolismo Bacteriano Aeróbico. **Ben ABCD**; benzoato 1,2-dioxigenasa y benzoato dihidrodiol deshidrogenasa **BCL**: Benzoato-CoA ligasa. **Bpha**: Bifenil 2,3-dioxigenasa. **BphB**: *cis*-2,3-dihidro-2,3-dihidroxiclorobifenil deshidrogenasa. **BphC**: 2,3-dihidroxiclorobifenil-1,2-dioxigenasa. **BphD**: 2-hidroxi-6-fenil-oxohepta-2,4-dienoato hidrolasa. **BphH(E)**: 2-hidroxipenta-2,4-dienoato hidratasa. **BphI(F)**: 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa. **BphJ(G)**: Acetaldehído deshidrogenasa. **CBA**: Ácido 4-Clorobenzoico. **HOPDA**: 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienoato. **HPD**: Ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienoico (adaptado de Elangovan *et al.*, 2019).

Las diferencias observadas entre la capacidad de metabolizar los PCBs en bacterias son atribuidas al número y posición de átomos de cloro dentro de la molécula.

La capacidad de degradación de las bacterias está dada por una proporción inversa a la cloración de la molécula, mientras más átomos de cloro presente la molécula, más difícil de degradar será la molécula de PCB por el metabolismo bacteriano (Wang *et al.*, 2018). Sin embargo, la mayoría de las bacterias con capacidad de degradar PCBs no son capaces de mineralizar completamente estos compuestos, es decir su completa metabolización hasta la obtención de dióxido de

carbono. Esto resulta en una acumulación de intermediarios tóxicos como ser el ácido benzoico y algunas variedades de ácidos clorobenzoicos, lo que causa efectos inhibitorios significativos en el crecimiento bacteriano y consecuentemente en la continuidad de la degradación de los PCBs por parte de estas bacterias (Wójcik *et al.*, 2020; Xing *et al.*, 2020). Un caso particular se produce con la cepa *Sphingobium fuliginis* HC3 que es capaz de degradar el ácido benzoico y el ácido 3-clorobenzoico simultáneamente (Hu *et al.*, 2015).

1.5 Metabolismo de los xenobióticos

La capacidad de estos organismos de poder modificar a los contaminantes está dada por un mecanismo celular conocido como el metabolismo de los xenobióticos, siendo éste el principal mecanismo para mantener la homeostasis celular durante la exposición de compuestos extraños. En general, este metabolismo está llevado a cabo por un número de enzimas con especificidad amplia, algunas de ellas inducidas por la presencia del mismo contaminante. Incluso, la estructura en relación a la secuencia de aminoácidos de una enzima involucrada en la biotransformación de los contaminantes puede variar entre individuos, generando diferencias en las tasas de metabolización de estos compuestos (Parkinson & Ogilvie, 2008).

Este llamado metabolismo de los xenobióticos puede dividirse en dos fases según las reacciones catalizadas por las enzimas involucradas en la biotransformación de estos mismos compuestos (Williams, 1971).

1.5.1 Fase 1 del metabolismo de los xenobióticos

La fase 1 del metabolismo de los xenobióticos involucra reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación. Este tipo de reacciones exponen o introducen grupos funcionales (-OH, -NH₂, -SH o -COOH) lo que resulta en un ligero aumento de la hidrofilia y posibilita la acción de las enzimas involucradas en la siguiente fase del metabolismo de los xenobióticos (Parkinson & Ogilvie, 2008).

1.5.2 Fase 2 del metabolismo de los xenobióticos

La fase 2 del metabolismo de los xenobióticos incluye reacciones como la glucuronización, sulfonación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión y con

otros aminoácidos. Las enzimas de esta fase reaccionan con los grupos funcionales presentes en los xenobióticos o los que fueron introducidos durante la fase 1 del metabolismo, aunque en muchos casos esta etapa puede no ser precedida por la fase 1. Estas reacciones resultan en un incremento sustancial de la hidrofilia de los compuestos y su ulterior eliminación (Parkinson & Ogilvie, 2008). La tabla 1.1 muestra un resumen de las reacciones que pueden ocurrir en ambas fases del metabolismo de los xenobióticos, así como su ubicación subcelular más común.

1.6 Micorremediación de los PCBs

Entre los organismos capaces de llevar a cabo la degradación aeróbica oxidativa de los PCBs y de otros contaminantes es necesario destacar a los hongos. Este método de remediación mediante su utilización es denominado micorremediación. La micorremediación es una estrategia económica, eco amigable y efectiva, que aprovecha el robusto crecimiento de esta taxa, su forma de crecimiento hifal, la producción de enzimas ligninolíticas extracelulares, su importante área superficial y adaptabilidad para la remediación de sedimentos y suelos contaminados (Akhtar *et al.*, 2020).

Una ventaja es el ya mencionado crecimiento hifal que presentan los hongos filamentosos. A diferencia de las bacterias, el movimiento de los hongos a través de la matriz contaminada no se encuentra afectado por la heterogeneidad y la complejidad de los poros de dicha matriz, así como tampoco por las dinámicas de las condiciones hidrológicas (Espinosa-Ortiz *et al.*, 2022). La producción de hidrofobinas permite que las hifas rompan la interfase aire-líquido, favoreciendo el crecimiento fúngico dentro de poros insaturados en la matriz (Bayry *et al.*, 2012; Kulkarni *et al.*, 2017) lo que permitiría un mejor acceso a los contaminantes, condición limitante en caso de degradación microbiana, para organismos sin estas características (Espinosa-Ortiz *et al.*, 2022). En este sentido, la presencia de hongos filamentosos puede permitir la dispersión, tanto de bacterias con capacidad degradadora de contaminantes (Kohlmeier *et al.*, 2005; Worrich *et al.*, 2016) como de los contaminantes (Moeder, 2005), funcionando entonces como “carreteras hifales”.

Tabla 1.1. Enzimas involucradas en cada fase del metabolismo de los xenobióticos y su localización celular. Adaptado de Parkinson & Ogilvie (2008).

Reacción	Enzima o sus funciones	Localización
Fase 1		
Hidrólisis	Esterasa	Citosol, lisosoma, Microsoma
	Peptidasa	Lisosomas
	Epóxido hidrolasa	Citosol, Microsomas
Reducción	Azoreductasas y nitroreductasas	Citosol, Microsomas
	Reductoras de grupos carbonilos	Citosol, Microsomas
	Reductoras de grupos disulfuro	Citosol
	Reductoras de grupos sulfóxidos	Citosol
	Reductoras de quinonas	Citosol, microsomas
	Deshalogenasas	Microsomas
Oxidación	Alcohol deshidrogenasa	Citosol
	Aldehído deshidrogenasa	Mitocondria, citosol
	Aldehído oxidasa	Citosol
	Xantino oxidasa	Citosol
	Monoamina oxidasa	Mitocondria
	Diamina oxidasa	Citosol
	Prostaglandina H sintasa	Microsomas
	Flavin Monooxigenasa	Microsomas
	Citocromo P450	Microsomas, citosol, mitocondria
Fase 2		
Conjugación del ácido glucurónico	UDP-glucoronosiltrasnferasa	Microsomas
Conjugación del sulfato	Sulfotrasnferasas	Citosol
Conjugación del glutatión	Glutatión-s-transferasa	Citosol, microsomas
Conjugación de aminoácidos	Aminoacil-tRNA-sintetasas y Acil-CoA sintetasas	Mitocondria, microsomas
Acilación	N-acetiltransferasas	Mitocondria, citosol
Metilación	Metiltransferasas	Citosol, microsomas

1.6.1 Hongos de pudrición blanca y su uso como agentes de micorremediación

Un subgrupo dentro de los hongos filamentosos, los denominados “hongos

de pudrición blanca”, presentan una característica ventajosa adicional para la degradación de contaminantes. Estos hongos, mayoritariamente de la división Basidiomycota, son considerados un grupo fisiológico capaz de degradar la lignina y compuestos similares, produciendo una coloración blanquecina sobre la madera que degradan (Bilal *et al.*, 2017a). Este grupo de hongos es capaz de degradar biopolímeros de lignina y celulosa mediante la producción de una batería de enzimas de acción sinérgica (Sanchez, 2009). Son estas mismas enzimas oxidativas extracelulares que participan en el sistema ligninolítico las que, debido a su baja especificidad de sustrato, le permiten transformar y degradar contaminantes ambientales, como puede ejemplificarse en la Figura 1.6.

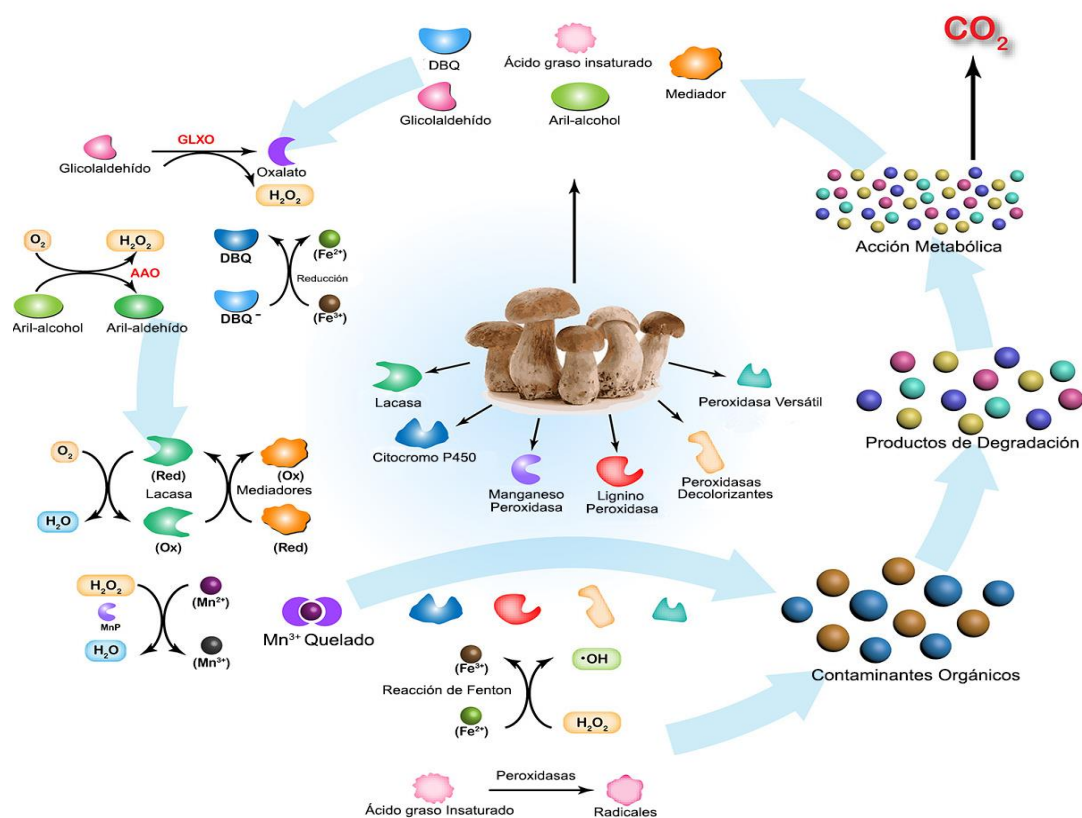


Figura 1.6. Síntesis gráfica de la degradación de contaminantes orgánicos realizado por hongos de pudrición blanca y de su sistema oxidativo enzimático extracelular. **GLXO:** Glicoxal oxidasa. **AAO:** Aril-alcohol oxidasa. **DBQ:** 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona. **MnP:** Manganese Peroxidase (adaptado de Zhuo & Fan, 2021).

1.6.2 Características del sistema enzimático extracelular de los hongos de pudrición blanca

En la figura 1.6 se muestra el sistema ligninolítico extracelular y oxidativo

único que presentan los hongos de pudrición blanca. El sistema ligninolítico de los hongos de pudrición blanca está compuesto en su mayoría por enzimas extracelulares como ser peroxidasas decolorantes (EC 1.11.1.19, DyP), lignino peroxidasas (EC 1.11.1.14, LiP), manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13, MnP), peroxidasas versátiles (EC 1.11.1.16, VP) y lacasas (EC 1.10.3.2, Lac) (Zhuo y Fan, 2021). Este sistema extracelular es usado como un poderoso sistema de defensa frente a compuestos xenobióticos, estando distribuido diferencialmente dentro de los hongos de pudrición blanca. Es por ello, que dentro de este subgrupo se puede hacer la distinción en base a su capacidad de producción de este tipo de enzimas. Por lo que se pueden agrupar según Bilal *et al.* (2017a) en:

- Cepas capaces de producir lignino peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas
- Cepas capaces de producir manganeso peroxidasas y lacasas.
- Cepas capaces de producir lignino peroxidasas y manganeso peroxidasas
- Cepas capaces de producir lignino peroxidasas y lacasas.

La amplia gama de diferentes enzimas que los hongos de pudrición blanca pueden producir, y el extenso espectro de especificidad de las mismas, hace que estos hongos sean utilizados dentro de estrategias de biorremediación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, compuestos farmacéuticos activos, disruptores endocrinos, pesticidas, tintes y otros contaminantes ambientales (Zhuo y Fan, 2021). Las enzimas previamente mencionadas tienen la capacidad de atacar a estos compuestos orgánicos mediante una amplia gama de reacciones redox (Figura 1.6), en las que suelen estar involucrada especies reactivas del oxígeno capaces de degradar los xenobióticos en subproductos que pueden ser utilizados por el mismo metabolismo del hongo, llegándose incluso a obtener la mineralización de los contaminantes (Korcan *et al.*, 2013).

Dentro del sistema enzimático de los hongos de pudrición blanca involucrado en la degradación de contaminantes se pueden destacar algunas enzimas en particular que han demostrado un potencial de degradación que las hace candidatas excelentes para su aplicación en la biorremediación. Entre estas enzimas se pueden nombrar a:

- Manganeso Peroxidasa: es una enzima que contiene un grupo hemo, descubierta por primera vez en el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, y es descrita como la peroxidasa modificadora de lignina más común de los

hongos de pudrición blanca (Zhuo y Fan, 2021). La actividad catalítica de las manganeso peroxidasas depende del ión manganeso, prefiriendo el Mn^{+2} que puede ser oxidado a Mn^{+3} . El Mn^{+3} quelado puede servir de mediador para la transferencia de carga permitiendo la oxidación de sustratos fenólicos, como fenoles simples y tintes (Manavalan *et al.*, 2015). Esta enzima puede oxidar y degradar estructuras no fenólicas con la asistencia de radicales lipídicos (Falade *et al.*, 2017).

- Lignino Peroxidasa: esta enzima también fue reportada por primera vez en *P. chrysosporium* y es clasificada dentro de las peróxido oxidorreductasas. Esta enzima posee un alto potencial redox lo que le da una ventaja frente a la oxidación de estructuras no fenólicas (Martinez *et al.*, 2005). Además, puede oxidar compuestos aromáticos y contaminantes orgánicos (Lothe *et al.*, 2020). Esta enzima está relacionada a un metabolito secundario común en los hongos de pudrición blanca, el alcohol veratrílico, que es capaz de moderar la inactivación de la lignino peroxidasa por la presencia de peróxido de hidrógeno. Este metabolito puede usarse en estrategias que incluyan a esta enzima para acelerar la transformación de compuestos contaminantes (Mao *et al.*, 2010).
- Peroxidasa Versátil: esta enzima es una peroxidasa ligninolítica que contiene un grupo hemo que combina las propiedades de las manganeso peroxidasa y la lignino peroxidasa (Manavalan *et al.*, 2015). Pueden oxidar sustratos fenólicos mediante la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} y oxidar compuestos aromáticos no fenólicos al igual que las lignino peroxidasas (Falade *et al.*, 2017). Esta versatilidad le permite la aplicación en reacciones que involucren potenciales de reacciones redox tanto altos como bajos, siendo útil para la catálisis de una gama más amplia de contaminantes orgánicos.
- Peroxidasas decolorantes: estas peroxidasas fueron nombradas por su capacidad de decolorar compuestos como tintes. Se encuentran ampliamente distribuidas entre los Agaromycetes y otros hongos, y en bacterias (Colpa *et al.*, 2014). Estas enzimas comparten una estructura proteica y una secuencia aminoacídica particular, y muestran preferencia por tintes de antraquinona, y una actividad peroxidasa alta contra una variedad de compuestos orgánicos. Se ha observado que pueden llegar a presentar actividad oxidasa en ausencia de peróxido de hidrógeno (Lauber *et al.*, 2017).

- **Lacasas:** las lacasas son oxidasas que contienen varios iones de cobre que catalizan reacciones de un único electrón con la reducción de oxígeno molecular a agua. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas entre los hongos de pudrición blanca. Su oxidación no específica y la utilización de oxígeno como aceptor de electrones las convierten en candidatas para diversas aplicaciones industriales y ambientales (Zhuo *et al.*, 2019). Las lacasas producidas por los hongos de pudrición blanca son unas de las enzimas más ampliamente estudiadas para la biorremediación utilizando este tipo de hongos, siendo combinadas con estrategias como la inmovilización en diversos sustratos y combinación con tratamientos de procesos avanzados de oxidación (Zhuo y Fan, 2021).
- **Citocromo P450:** de todas las enzimas antes descritas, el citocromo P450 es la única enzima de expresión intracelular. Estas enzimas portadoras de grupo hemo son una de las familias de proteínas más grandes y están presentes en todos los seres vivos (Shin *et al.*, 2018) y son conocidas por su capacidad detoxificante en varios organismos. Estas enzimas actúan como monooxigenasas terminales que catalizan reacciones como hidroxilaciones, heteroatomoxigenaciones, dealquilaciones, epoxidaciones, reducciones y dehalogenaciones (Bernhardt, 2006). Por lo general los sistemas eucarióticos de citocromo P450 tienen una P450 monooxigenasa y una P450 oxidorreductasa, ambas asociadas a la membrana (Syed *et al.*, 2010). Las P450 monooxigenasas de los hongos de pudrición blanca han sido aplicadas para la eliminación y detoxificación de una amplia gama de xenobióticos (Zhuo y Fan, 2021).

1.6.3 Ejemplos del uso de hongos de pudrición blanca en la biorremediación

Debido a las características de este grupo de hongos y de la multiplicidad de usos de sus enzimas, se han utilizado a los hongos de pudrición blanca en numerosos estudios de degradación y remediación de contaminantes (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Ejemplos de contaminantes orgánicos remediados por diferentes especies de hongos de pudrición blanca (apadtado de Zhuo y Fang, 2021).

Cepa Fúngica	Contaminante	Concentración Inicial	Porcentaje de Remoción	Referencia
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Naproxen (NPX) y Carbamazepina (CBZ)	0,096 mg g ⁻¹	100 % para NPX y 48% para CBZ a las 72 hs	Rodriguez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2010
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Diclofenac (DCF), Naproxen (NPX), Indometacina (IDM), Ibuprofeno (IBP), Fenoprofeno (FEP)	10 µg L ⁻¹	100 % para DCF, NPX, IDM, IBP y FEP	Tran <i>et al.</i> , 2010
<i>Trametes versicolor</i> 167/93	Ácidos Clorobenzoicos (CBAs)	10 µg mL ⁻¹	100 % para 3-CBA, 4-CBA, 2,3-CBA, 2,4-CBA, 2,5-CBA, 3,4-CBA, 3,5-CBA, 2,3,5-CBA a los 21 días	Muzikáĭ <i>et al.</i> , 2011
<i>Trametes versicolor</i> 20148	Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Fenantreno (PHE) y Pireno (PYR)	100 mM	80 % para PHE y 70 % para PYR luego de 11 días	Rosales <i>et al.</i> 2013
<i>Trametes versicolor</i> BAFC 4272	Verde de Malaquita	50 µM	50 % de remoción a las 0,78 hs	Kuhar <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes versicolor</i> CDBB-H1051	Negro Reactivo 5 (RB5)	200 ppm	84 % de remoción en 24 hs	Martínez-Sanches <i>et al.</i> , 2018
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Clorpirifos (CLP), Dicofol (DCL) y Cipermetrina (CPM)	5 µg L ⁻¹	94,7 % para CLP, 87,9 % para DCL y 93,1% para CPM	Hu <i>et al.</i> , 2020
<i>Trametes versicolor</i> ATCC 42530	Mezcla comercial de Éteres de difenilos Polibromurados (PBDE)	5 mg L ⁻¹	87 % para Deca-PBDE, 67 % para octa-PBDE y 85 % para penta-PBDE	Vilaplana <i>et al.</i> , 2015
<i>Trametes versicolor</i> NBRC4937	Bisfenol A (BPA), butilparabeno (BTPRB), metilparabeno (MTPRB), Nonilfenol (NP) y dimetilftalato (DMPTL)	100 µM	100 % para BPA y BTPRB a los 2 días, 100 % para MTPRB a los 4 días, 100 % para NP a los 8 días y 60 % para DMPTL a los 8 días	Pezzella <i>et al.</i> , 2017
<i>Trametes versicolor</i> DSMZ 3086	Ácidos Húmicos (HA) sintéticos y de efluentes reales	1 mg L ⁻¹	80 % de remoción en ambos efluentes	Zahmatkesh <i>et al.</i> , 2018
<i>Trametes versicolor</i> 167/93	Delor 103	0.2 mg mL ⁻¹	60 % de remoción luego de 42 días	Čvančarová <i>et al.</i> , 2012
<i>Trametes sanguinea</i> LBM 203	Arocloros 1242, 1254 and 1260	217 mg L ⁻¹	59,86 % de remoción luego de 24 días	Benitez <i>et al.</i> , 2021
<i>Irpex Lacteus</i>	Delor 103	0.2 mg mL ⁻¹	70 % de remoción luego de 42 días	Čvančarová <i>et al.</i> , 2012
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fluoreno	30 mg L ⁻¹	89,16 % de remoción para la mezcla de Arocloros	Akdogan y Pazarlioglu, 2011

Tabla 1.2. Ejemplos de contaminantes orgánicos remediados por diferentes especies de hongos de pudrición blanca. (Cont.)

<i>Pleurotus ostreatus</i> CECT 20600	Fenantreno (PHE) y Pireno (PYR)	100 mM	91 % de remoción para PHE y 95 % para PYR luego de 11 días	Rosales <i>et al.</i> , 2013
<i>Pleurotus ostreatus</i> BWPB	Verde brillante, Azul Evans y su mezcla (1:1 p/p)	0,06 g L ⁻¹ para verde brillante 0,15 g L ⁻¹ para el Azul Evans, 0,08 g L ⁻¹ para la mezcla	95,4 % de remoción para el verde brillante, 53 % de remoción para el Azul Evans y 83,6 % para la mezcla a las 96 Hs	Przystas <i>et al.</i> , 2013
<i>Pleurotus ostreatus</i> PO-3	Benzo-a-pireno	10 µg mL ⁻¹	64,3 % de remoción luego de 15 días	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2017
<i>Pleurotus ostreatus</i> 3004 CCBAS 278	Ácidos Clorobenzoicos	10 µg mL ⁻¹	100 % para 3-CBA, 4-CBA, 2,4-CBA, 3,4-CBA, 3,5-CBA luego de 21 días	Muzikář <i>et al.</i> , 2011
<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC MYA-2306	Bisfenol A (BPA), butilparabeno (BTPRB), metilparabeno (MTPRB), Nonilfenol (NP) y dimetilftalato (DMPTL)	100 µM	70 % de remoción para el NP, aproximadamente 60% para BPA, BTPRB, MTPRB, DMPTL a los 8 días	Pezzella <i>et al.</i> , 2017
<i>Pleurotus ostreatus</i> 3004 CCBAS 278	Delor 103	0,2 mg L ⁻¹	99,6 % de remoción luego de 42 días	Čvančarová <i>et al.</i> , 2012
<i>Pleurotus pulmonarius</i> LBM 105	Arocloros 1242, 1254 y 1260	217 mg L ⁻¹	97,7 % de remoción para la mezcla de Arocloros	Sadaňoski <i>et al.</i> , 2019
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME 446	Delor 103	0,2 mg mL ⁻¹	60 % de remoción luego de 42 días	Čvančarová <i>et al.</i> , 2012
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	Violeta ácido 7 y Fucsina básica	40 mg L ⁻¹	93,4 % para Violeta ácido en 3 días y 67.9 % para Fucsina básica en 5 días	Li <i>et al.</i> , 2015
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> CGMCC 5.0766	Fenantreno y Pireno	0,33 mg L ⁻¹ para el Fenantreno y 0,033 mg L ⁻¹ para el Pireno	99,55 % de Fenantreno y 99,47 % de Pireno luego de 60 días	Ding <i>et al.</i> , 2013
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aceite crudo	600 ppm	58,1 % de remoción luego de 12 días	Behnood <i>et al.</i> , 2014
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	2,4-Diclorofenol	50 mg L ⁻¹	100 % de remoción en 24 hs	Chen <i>et al.</i> , 2014
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	Bisfenol A	250 mg kg ⁻¹	58,23 % de remoción luego de 24 días	Hu <i>et al.</i> , 2018
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ME 446	Ácidos Clorobenzoicos	10 µg mL ⁻¹	100 % para 3-CBA, 4-CBA, 2,3-CBA, 2,4-CBA, 2,5-CBA, 3,4-CBA, 3,5-CBA, 2,3,5-CBA luego de 21 días	Muzikář <i>et al.</i> , 2011

Tabla 1.2. Ejemplos de contaminantes orgánicos remediados por diferentes especies de hongos de pudrición blanca. (Cont.)

<i>Phanerochaete chrysosporium</i> DSM 13583	Bisfenol A (BPA), butilparabeno (BTPRB), metilparabeno (MTPRB), Nonilfenol (NP) y dimetilftalato (DMPTL)	100 µM	100 % para BTPRB, 100 % para MTPRB, 80 % para NP, 60% y 45 % para BPA y DMPTL	Pezzella <i>et al.</i> , 2017
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725	Herbicida Diuron	7 µg mL ⁻¹	94 % de remoción luego de 10 días	Coelho-Moreira <i>et al.</i> , 2013
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> BKM-F-1767	2,4,2,4-Tetrabromuro bifenil éter	2 µg mL ⁻¹	99 % de remoción en 3 días	Liu <i>et al.</i> , 2018
<i>Pycnoporus sanguineus</i> 2126	Verde Malaquita, Azul de Bromofenol	50 µM	90 % de remoción para Azul de Bromofenol y 30 % para Verde malaquita en 14 días	Shimizu <i>et al.</i> , 2009

1.6.4 Hongos de pudrición blanca y los PCBs

En relación con la acción de los hongos de pudrición blanca sobre la remoción y modificación de congéneres de PCBs, se demostró que existe una gran variedad de cepas pertenecientes a diversos géneros fúngicos con capacidad de acción sobre estos compuestos. Entre estos se puede mencionar a cepas pertenecientes a *P. chrysosporium* (Kamei *et al.*, 2006a), *T. versicolor* (Cloete *et al.*, 1999), *T. sanguinea* (Benitez *et al.*, 2021), *Lentinus edodes* (Ruiz-Aguilar *et al.*, 2002), *Phlebia brevispora* (Kamei *et al.*, 2006a), *I. lacteus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Phanerochaete magnoliae* (Čvančarová *et al.*, 2012) y *P. ostreatus* (Moeder *et al.*, 2005; Čvančarová *et al.*, 2012) que mostraron resultados promisorios en la degradación de una amplia gama de PCBs. Dentro de este grupo de hongos, se destaca la cepa *P. pulmonarius* LBM 105 (previamente identificado como *Pleurotus sajor-caju*) que ha demostrado una capacidad singular para remover la mezcla de Arocloros 1242, 1254 y 12660 en medio líquido (Benítez *et al.*, 2021; Sadañoski *et al.*, 2019). Este hongo es capaz de alcanzar porcentajes de degradación por encima del 90 % en medio líquido luego de los 35 días (Sadañoski *et al.*, 2019).

La tolerancia y capacidad de acción de esta cepa es bien conocida, sin embargo, poco se sabe del proceso metabólico que involucra la remoción y modificación de estos compuestos por parte del hongo. El uso de microorganismos para remediar ambientes contaminados es un área de la biotecnología ambiental

que está en continuo desarrollo, y las comunidades microbianas implicadas en este tipo de procesos no deben ser tratadas como “cajas negras”, sino que deben ser estudiadas profundamente, a fin de lograr una tecnología confiable y segura (Iwamoto & Nasu, 2001).

El presente trabajo de tesis se centra en el estudio de la respuesta tanto transcripcional como proteómica de la cepa LBM 105 durante la degradación de bifenilos policlorados, buscando dilucidar los mecanismos moleculares utilizados por dicha cepa para su potencial aplicación en estrategias de biorremediación.

Hipótesis del trabajo


La degradación de PCBs por la cepa LBM 105 implica cambios transcriptómicos, proteómicos y secretómicos que involucran genes claves, determinando la biorremediación de estos compuestos tóxicos. La dilucidación de estos cambios podrá aportar herramientas para el desarrollo de futuras estrategias para su mejor aplicación en procesos de biorremediación.

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es evaluar el vínculo existente entre los cambios transcriptómicos y proteómicos con la degradación de los PCBs por parte de la cepa LBM 105 con el fin de comprender los mecanismos de respuesta metabólica, así como analizar la habilidad de sus enzimas para la biorremediación.

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar taxonómicamente la cepa LBM 105 mediante métodos de caracterización morfológica y molecular.
2. Evaluar la degradación de los PCBs por la cepa 105 e identificar los intermediarios de degradación producidos.
3. Analizar el transcriptoma de la cepa LBM 105 en condiciones de degradación y de ausencia de PCBs.
4. Identificar las proteínas con abundancia significativa durante la degradación de los PCBs, comparando este perfil con su perfil en ausencia del contaminante.
5. Evaluar la capacidad de biorremediación *in vitro* de las enzimas intra y extracelulares de la cepa LMB 105 en condiciones controladas.



Capítulo 2 Identificación Taxonómica

2.1. Introducción

Los hongos representan el segundo grupo más numeroso de organismos eucariotas en la Tierra, con un estimado actual de 1,5 a 5,1 millones de especies. Debido a la amplia variedad de especies fúngicas existentes, la identificación de las especies es fundamental para estudios básicos (ecología, taxonomía) y aplicados (bioprospección, biotecnología), así como también para el área industrial, agroquímica y farmacéutica, ya que estas suelen utilizar productos derivados de cepas fúngicas (Raja *et al.*, 2017).

La identificación precisa y acertada de los hongos generalmente es mucho más compleja comparada con otros eucariotas multicelulares. Al tener una estructura micelar simple, la identificación morfológica suele limitarse a las estructuras productoras de esporas sexuales y asexuales (Nagy *et al.*, 2017; Lücking 2020). En algunos casos, ciertos hongos son conocidos solamente por sus estructuras vegetativas, por lo que las aproximaciones tradicionales de clasificación resultan imposibles (Koch *et al.*, 2017, 2018). Aún más, eventos de especiación críptica pueden llevar a casos de identificación fenotípica errónea (Lücking *et al.*, 2020).

Debido a la complejidad inherente del taxón en estudio, la taxonomía fúngica moderna se enfatiza en una aproximación genealógica, que incluyen estudios filogenéticos de un gen o una concatenación de los mismos, concordancias genealógicas y filogenómica (Lücking *et al.*, 2020). Aunque también existe un esfuerzo por realizar una taxonomía integrativa, optando por una estrategia más abarcativa a fin de utilizar la mayor cantidad de evidencia posible (sea genealógica, biológica y fenotípica) para la delimitación de las especies (Haelewaters *et al.* 2018; Kruse *et al.* 2018).

En el caso particular de la identificación filogenética fúngica, la región del espaciador interno transcrito del gen ribosomal nuclear (ITS, del inglés *Internal transcribed spacer*) es uno de los marcadores moleculares más utilizados debido a la cantidad de secuencias disponibles para su uso y comparación. La región de los espaciadores internos transcritos se ubica entre la subunidad menor (18S) y la subunidad mayor (28S) del gen de ARN ribosomal (Figura 2.1).

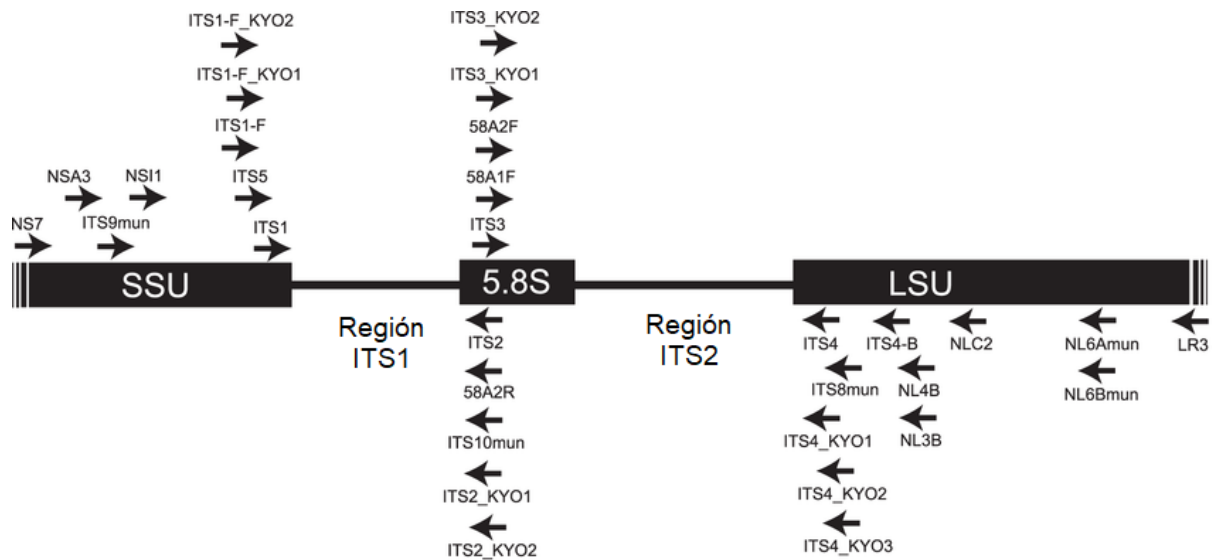


Figura 2.1. Mapa del gen nuclear de ARN ribosomal y las regiones del espaciador interno transcrito (ITS). Se muestra la posición de los cebadores *forward* (flechas apuntando a la derecha) y *reverse* (flechas apuntando a la izquierda) más comúnmente utilizados para la amplificación de las regiones de ITS. **SSU**: Gen de la subunidad menor del ribosoma (18S). **5.8S**: Gen del componente 5.8s no codificante de la subunidad mayor del ribosoma **LSU**: Gen de la subunidad mayor del ribosoma (28S) (adaptado de Toju *et al.*, 2012).

La base de datos para la identificación molecular fúngica UNITE (Nilsson *et al.*, 2019) contiene aproximadamente 2,5 millones de secuencias de ITS, correspondientes a más de 100 mil especies hipotéticas utilizando una línea de corte del 98,5 % de identidad (Lücking 2020), junto a otros repositorios de secuencias como *ISHAM DNA barcoding* y *NCBI Refseq* (Irinnyi *et al.*, 2015; O'Leary *et al.*, 2016). Las secuencias de ITS fueron propuestas como marcadores moleculares universales para la identificación fúngica, debido a su fácil amplificación y su resolución aceptable en un amplio rango de taxas (Nagy *et al.* 2012; Schoch *et al.* 2012; Xu 2016).

En este capítulo se muestra el proceso de identificación taxonómica de la cepa LBM 105, identificada previamente como *P. sajor-caju*, mediante una aproximación que combina métodos de identificación morfológica convencionales con métodos de análisis moleculares, buscando alcanzar una identificación certera a nivel de especie de la cepa en estudio.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1 Cepa utilizada y mantenimiento

2.2.1.1 Cepa

La identificación taxonómica se realizó sobre una cepa de un hongo de pudrición blanca aislada de la selva subtropical de Misiones (Argentina). Esta cepa fue provista por la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional de Misiones (Argentina) y está depositada en el cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular (LBM), del Instituto de Biotecnología Misiones bajo el nombre LBM 105.

2.2.1.2 Mantenimiento de la cepa

El mantenimiento de la cepa fúngica utilizada en este trabajo se realizó mediante siembras periódicas en placas de Petri en medio agar-extracto de malta (MEA, del inglés *Malt Extract Agar*).

Composición del medio:

Extracto de malta.....12,7 g L⁻¹

Agar.....17 g L⁻¹

El mantenimiento de la cepa en este medio sólido fue de 4 ± 1 °C durante 5-7 días.

2.2.2 Identificación morfológica

Para la identificación morfológica se observaron las características distintivas del basidiocarpo de la cepa LBM 105 y se las comparó con el trabajo de Lechner *et al.* (2004) que realizó una descripción morfológica de especies del género *Pleurotus* distribuidas en Argentina.

2.2.2.1 Obtención y estudio del basidiocarpo

La obtención del basidiocarpo de la cepa LBM 105 se llevó a cabo en bolsas de polipropileno con un sustrato orgánico FungiMix® ubicados dentro de cajas de cartón de 35 cm de largo x 20 cm de ancho x 11,5 cm de alto. El sustrato se esterilizó a 120 °C por 2 horas. Se inoculó la cepa en el sustrato mediante el

agregado de cinco tacos de 5 mm de diámetro proveniente de un cultivo de 5 días y se incubó en oscuridad a 25 ± 1 °C. Luego de 15 días, las bolsas con el sustrato inoculado se mantuvieron a 18 - 20 °C con un fotoperiodo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad para inducir la formación del basidiocarpo, manteniendo una temperatura uniforme durante todo el fotoperiodo. Una vez obtenido, se evaluaron sus características macro-morfológicas y se realizaron cortes en el píleo del basidiocarpo para su observación al microscopio.

Las observaciones de las hifas se realizaron en microscopio óptico a 400x, utilizando una tinción simple con azul de lactofenol (Fenol 0,1 g; Ácido láctico 8 mL; Agua destilada 10 mL; Glicerina 20 mL; Azul de Anilina 0,5 g). Las mediciones de hifas y estructuras reproductivas se realizaron con un micrómetro ocular (escala de 22 μm).

2.2.2.2 Desarrollo de la colonia fúngica en medio agarizado.

Así mismo, la cepa LBM 105 se desarrolló en placas de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo el medio de cultivo MEA por 5 días a 25 ± 1 °C en oscuridad, con el fin de observar la forma y las características de la colonia formada.

2.2.3 Identificación molecular

2.2.3.1 Obtención del ADN de la cepa LBM 105

Para el análisis molecular, se inoculó un taco de 5 mm de diámetro de la cepa LBM 105 de 5 días en 20 mL de medio líquido de extracto de malta (extracto de malta $12,7 \text{ g L}^{-1}$) y se cultivó por 5 días a 25 ± 1 °C en oscuridad sin agitación. Luego el micelio se obtuvo por centrifugación a $4.695 \times \text{g}$ por 10 min. Para la obtención del ADN, se siguió el protocolo descrito por Fonseca *et al.* (2015). Para ello el micelio obtenido se lavó dos veces con 1 mL de solución de lavado (Tris_HCl 0,1 M pH 8; EDTA 0,02 M) a 4 °C, centrifugando a $10625 \times \text{g}$ por 3 min y recuperando el *pellet* en cada caso. Luego, el micelio se maceró utilizando una varilla de vidrio en presencia de 600 μL de una solución de extracción (Tris_HCl 0,1 M pH 8; EDTA 0,05 M; NaCl 1,5 M; Proteinasa K 0,1 mg/mL; β -Mercaptoetanol 10 mM; SDS 2 % p/v). El homogenato obtenido se dejó incubar a 37 °C por 1 h en agitación a 300 rpm. Luego de incubar, se centrifugó a $10625 \times \text{g}$ por 5 min para

recuperar el sobrenadante. Se adicionó igual volumen de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se agitó en vórtex por 15 segundos. Se centrifugó nuevamente a 10625 x g por 3 min, se recuperó el sobrenadante y se le adicionaron 200 µL de Acetato de potasio (3 M). Para la precipitación del ADN se centrifugó a 10625 x g por 5 min, se recuperó el sobrenadante, se le agregó 1 mL de Isopropanol, se lo dejó precipitar en frío a -20 °C durante 24 h. A continuación, se centrifugó a 10625 x g por 5 min a 4 °C, se descartó el isopropanol y se lavó el *pellet* obtenido con 1 mL de etanol 70 % (v/v). Finalmente se eliminó el etanol por centrifugación a 10625 x g por 5 min a 4 °C y se resuspendió el ADN utilizando agua destilada libre de nucleasas.

2.2.3.2 Análisis de calidad del ADN

La calidad y pureza del ADN genómico obtenido se comprobó mediante el análisis de la relación de absorbancia en las longitudes de onda 260/280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu® UV-1900 utilizando el programa UVProbe V 2.70. De igual manera, también se analizó la integridad del ADN mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 0,8 % (p/v) utilizando 5 µl de ADN genómico y 1 µl de *buffer* de siembra al 6X (glicerol 60 % v/v, EDTA 10 mM, azul de bromofenol 0,1 % p/v), revelando mediante el uso de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) en un transiluminador de luz ultravioleta modelo MUV21 (Major Science®).

2.2.3.3 Marcador molecular para la identificación

Para la identificación molecular de la cepa en estudio se utilizó la región del espaciador interno transcrita (ITS1-5,8S-ITS2) del gen que codifica para el ARN ribosomal. Los cebadores o *primers* utilizados en este caso corresponden al ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* en 1990 (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. *Primers* utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2

Región Amplificada	Nombre del Primer	Secuencia de oligonucleótidos	Referencia
ITS 1-5.8S- ITS 2 del gen de ARN ribosomal	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	White <i>et al.</i> 1990
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	White <i>et al.</i> 1990

2.2.3.4 Amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2

Estos *primers* se utilizaron en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase chain reaction*), de acuerdo a las siguientes condiciones de amplificación:

- Desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min.
- 30 ciclos de 50 s a 94 °C, 50 s a 51 °C y 1 min a 72 °C.
- Extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los fragmentos de ADN amplificados se enviaron a Macrogen Inc. en Seúl, Corea del sur, para su secuenciación por el método de Sanger (Sanger, 1977).

2.2.3.5 Estudio filogenético del amplicón ITS1-ITS4

Para la construcción del árbol filogenético de la región amplificada se realizó primero una búsqueda de secuencias similares en una base de datos no redundantes del Centro Internacional para la Información Biotecnológica (NCBI, del inglés *National Center for Biotechnology Information*) utilizando el motor de búsqueda BLASTn de dicha plataforma. Se buscaron además secuencias de la región ITS1-ITS4 de especies pertenecientes al género *Pleurotus*. Todas las secuencias obtenidas se alinearon mediante un método de alineamiento múltiple utilizando el software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007). La construcción del árbol filogenético se realizó utilizando el método de *Maximum likelihood* con un modelo de Jukes-Cantor (Jukes & Cantor, 1969) con una distribución gamma discreta (parámetro +G = 0.4972), utilizando el

software MEGA versión 10 (Kumar *et al.*, 2018), con un soporte estadístico de 1000 *bootstraps* o repeticiones. Para la selección del modelo de sustitución que mejor se adaptó a los datos se utilizó la herramienta de selección de modelo incluida dentro del programa MEGA utilizando un árbol construido con el método *Neighbor joining* como árbol inicial, utilizando a todos los sitios reconocidos como *gaps* para el cálculo. Se seleccionó como modelo el de Jukes-Cantor con una distribución gamma discreta. Se utilizó como *outgroup* la secuencia de ITS de *Agaricus bisporus* (AF187270.1).

2.3. Resultados

2.3.1 Identificación morfológica

La identificación morfológica de la cepa LBM 105 se llevó a cabo siguiendo las claves taxonómicas descritas por Lechner *et al.* (2004), que detalla las características fenotípicas y la distribución del género *Pleurotus* en Argentina.

A las 4 semanas de crecimiento en el sustrato comercial se pudo obtener el basidiocarpo de la cepa LBM 105 (Figura 2.2A). Este mostró una estructura blanquecina y flabeliforme con una superficie seca y suave, con la notable ausencia de la coremia. Las laminillas del basidiocarpo mostraron una organización decurrente y aglomerada con láminas de 2 mm de grosor de color blanco cremoso (Figura 2.2B). El pie presentó una estructura carnosa de 8 mm de grosor y 10 mm de largo con una inserción lateral. A medida que el basidiocarpo envejecía; el pie, las laminillas y el sombrero del mismo se fueron tornando de color marrón y de consistencia corchosa.

A partir de observaciones al microscopio óptico (aumento 400x) de las hifas del píleo, se pudo determinar que estas presentaban una organización monomítica con hifas generativas transparentes de paredes finas de unos 4,4 a 11 μm de grosor. Las basidiosporas eran de estructura oblonga, hialinas y de paredes delgadas, con medidas de 7,3-8,5 μm de largo por 2,8-3,5 μm de ancho (Figura 2.2C).

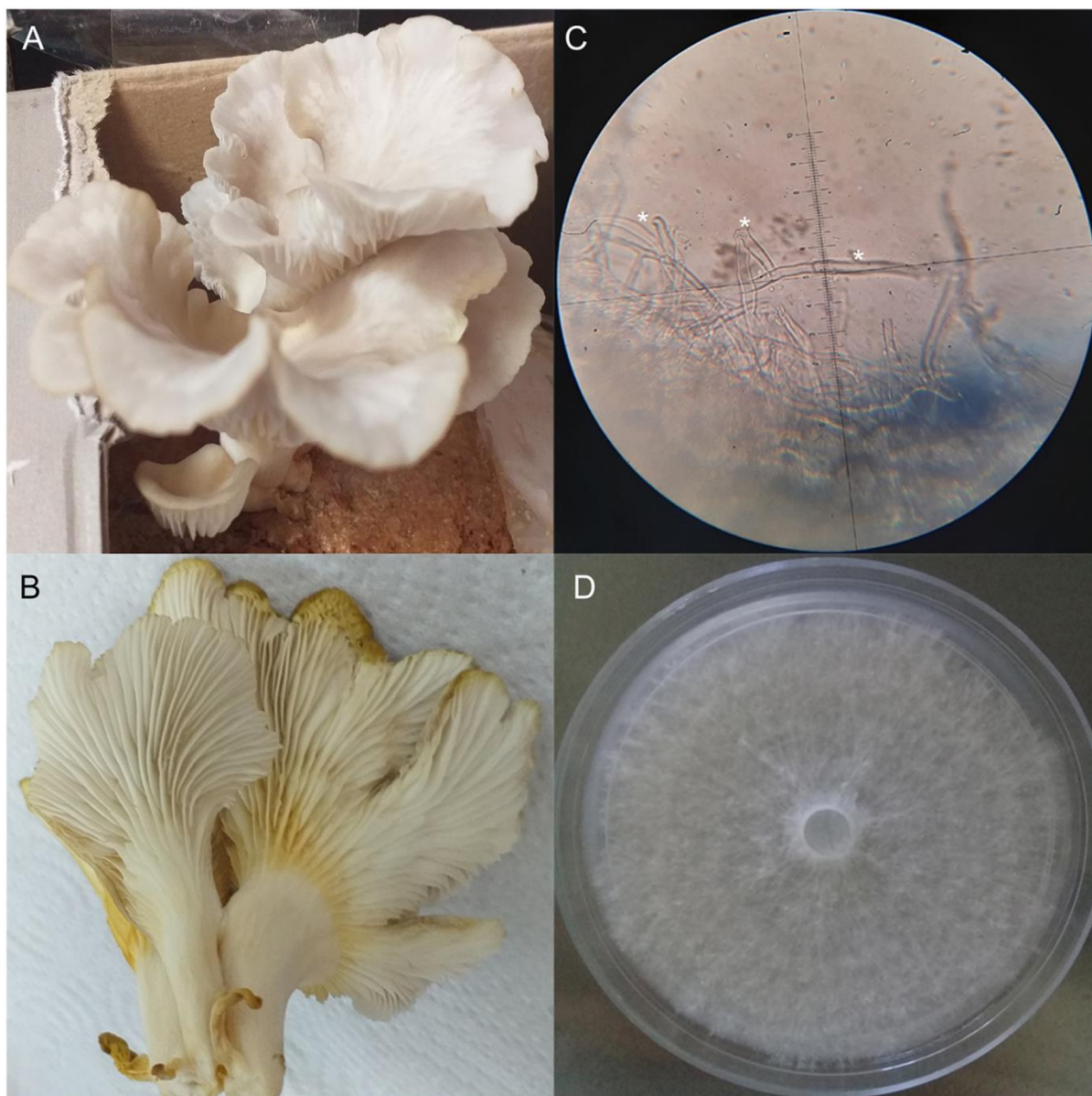


Figura 2.2. Caracterización morfológica de *P. pulmonarius* LBM 105. A) Basidiocarpo a la 4ta semana de desarrollo. B) Vista inferior del basidiocarpo en la 5ta semana de desarrollo. C) Micelio monomítico en un aumento de 400x (*) Hifas germinativas del píleo. Cada unidad de la escala se corresponde a 22 μm . D) Colonia fúngica de 5 días de desarrollo en una placa con MEA.

Durante el crecimiento en medio agarizado, la cepa LBM 105 desarrolló un micelio blanquecino que después de una semana de crecimiento se tornó algodonoso con bordes irregulares (Figura 2.2D). El reverso de la placa permaneció sin cambio evidente. La colonia mostró un crecimiento rápido, cubriendo la totalidad de la placa de 90 mm en 5 días.

Tanto las características de la colonia fúngica como las características macro y microscópicas del basidiocarpo de la cepa LBM 105 se correspondieron con

aquellas descritas por Lechner *et al.* (2004) en su revisión del género *Pleurotus*.

2.3.2 Identificación molecular

A partir de la amplificación de la región ITS1-5,8S-ITS2 se obtuvo un fragmento de 618 pares de bases (pb), que fue depositado en el repositorio de *Genbank* del NCBI bajo el número de acceso "MT940577". Este fragmento contenía una región parcial del espaciador interno transcritto 1, la totalidad del gen 5,8S del ARNr, la totalidad del espaciador interno transcritto 2 y una región parcial de la subunidad mayor del ARNr.

Mediante la utilización de la herramienta de BLASTn se encontró que la secuencia amplificada poseía mayor identidad con secuencias de cepas de *Pleurotus pulmonarius*. En la Tabla 2.2 se puede observar cómo la región amplificada de la cepa LBM 105 obtuvo altos valores de identidad y cobertura con regiones de cepas pertenecientes a la especie de *P. pulmonarius*, respaldados por los bajos puntajes del Valor E.

Tabla 2.2. Primeros 10 resultados del blast de la secuencia de ITS de la cepa LBM 105 en la base de datos no redundante del NCBI.

Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	Valor "E"	Porcentaje de Identidad (%)	Longitud (pb)	Número de acceso
<i>Pleurotus pulmonarius</i> isolate 10	1142	1142	100	0	100	659	MN239983.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> voucher NSK 1014215	1142	1142	100	0	100	791	MN179421.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> voucher NSK 1014280	1142	1142	100	0	100	791	MN179420.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> voucher NSK 1014279	1142	1142	100	0	100	791	MN179419.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> voucher NSK 1014214	1142	1142	100	0	100	791	MN179418.1

Tabla 2.2. Primeros 10 resultados del blast de la secuencia de ITS de la cepa LBM 105 en la base de datos no redundante del NCBI. (Cont.)

Descripción	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura (%)	Valor "E"	Porcentaje de Identidad (%)	Longitud (pb)	Número de acceso
<i>Pleurotus pulmonarius</i> voucher NSK 1014218	1142	1142	100	0	100	791	MN179417.1
<i>Pleurotus</i> cf. <i>pulmonarius</i> voucher NSK 1014217	1142	1142	100	0	100	791	MN179416.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> isolate P4	1142	1142	100	0	100	1055	MK956822.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> isolate P1	1142	1142	100	0	100	676	MK956819.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> strain DMRP-33	1142	1142	100	0	100	645	MK542621.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> strain DMRP-32	1142	1142	100	0	100	645	MK542620.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> strain F15	1142	1142	100	0	100	665	MK370671.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	1142	1142	100	0	100	707	MH395979.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> strain ICMP	1142	1142	100	0	100	697	MH395974.1
<i>Pleurotus pulmonarius</i> isolate DMRP-24	1142	1314	100	0	100	774	MG819743.1

A partir de esta información se procedió a realizar el análisis filogenético utilizando la región ITS1-5,8S-ITS2 de la cepa LBM 105. Para ello se seleccionaron 22 secuencias de organismos del género *Pleurotus* pertenecientes a bases de datos no redundantes del NCBI. Se agregaron también secuencias pertenecientes a

Lentinus sajor-caju, organismo conocido previamente como *Pleurotus sajor-caju*. El set de datos obtenidos resultante constó de las 22 secuencias de ITS pertenecientes a especies cercanas con una longitud en pares de base (pb) de ITS de 600-791, junto con la secuencia de ITS de la cepa LBM 105 (618 pb) utilizando a *Agaricus bisporus* como organismo *outgroup* (724 pb).

Con estas secuencias se realizó el árbol filogenético (Figura 2.10), obtenido por el algoritmo de Máximo likelihood que converge con el valor máximo de verosimilitud (-2550,25). En este árbol se puede observar cómo las secuencias formaron seis clústeres bien definidos. La secuencia obtenida de la cepa LBM 105 quedo agrupada dentro de un clúster junto con secuencias pertenecientes a *Pleurotus pulmonarius* y *Lentinus sajor-caju*. Además, se obtuvieron clústers bien definidos de las especies *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. cornucopiae*, *P. calypratus* y *P. djamor*, todas ellos agrupados con un alto soporte estadístico.

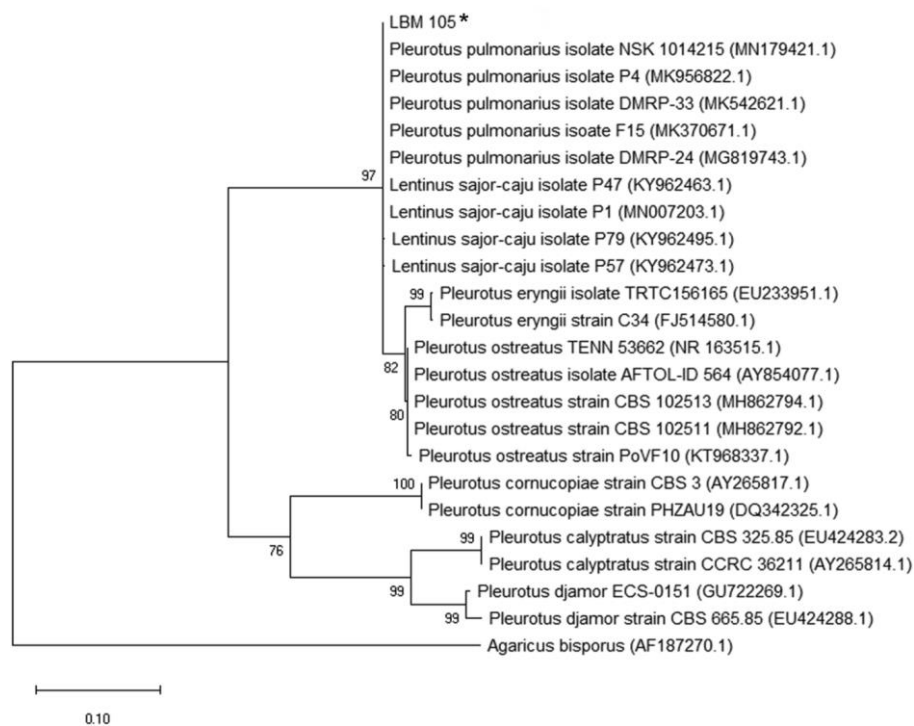


Figura 2.3. Árbol filogenético de las secuencias de ITS de *P. pulmonarius* LBM 105 (*) y de especies relacionadas presentes en las bases de datos. Se muestra el árbol con el logaritmo de similitud (-2550,25). El porcentaje de clusterización entre cada taxón asociado se muestra en las ramas del árbol. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron mediante la aplicación de algoritmos de Neighbor-joining y BioNJ a una matriz de distancias de a pares estimada usando la aproximación de máxima verosimilitud compuesta (MCL, del inglés *Maximum Composite Likelihood*) y luego seleccionando la topología con mayor logaritmo de similitud. Se utilizó una distribución gamma discreta (parámetro +G = 0.4972). El árbol se presenta en escala con la longitud de cada rama medida en cantidad de sustituciones por sitio.

La secuencia obtenida de *P. pulmonarius* LBM 105 se agrupó en un clúster menor con secuencias de especies de *P. pulmonarius* y *L. sajor-caju*. La distancia representada en el árbol para el clúster formado con estas secuencias muestra que existe una gran similitud entre ellas, lo que dificulta la separación de secuencias de ITS de las especies de *P. pulmonarius* y *L. sajor-caju*, comprometiendo entonces la identificación de la cepa LBM en alguna de estas dos taxas. Sin embargo, este fenómeno solo se observó para secuencias pertenecientes a este clúster, ya que las secuencias pertenecientes a otras especies formaron agrupamientos bien delimitados con un alto soporte de *bootstraps*.

2.4 Discusión

La cepa utilizada en este trabajo fue previamente identificada en base a caracteres macro-morfológicos como *P. sajor-caju* y seleccionada por su potencial como agente biorremediador de PCBs (Sadañoski *et al.*, 2019). Es por ello que se realizó una identificación más precisa, caracterizando la macro y micro morfología y la secuenciación del marcador molecular ITS para la construcción de sus relaciones filogenéticas.

En el año 1975, la especie de *P. sajor-caju* (Fr.) Singer fue reubicada en el género *Lentinus* por Pegler. La similitud morfológica de las estructuras reproductivas de *P. pulmonarius* y *L. sajor-caju* han producido cierta confusión entre los micólogos que suelen identificarlas erróneamente (Shnyreva *et al.*, 2012). Sin embargo, la característica determinante para poder diferenciar a estas dos especies radica en la organización del micelio del píleo del cuerpo fructífero. Mientras que el micelio de *P. pulmonarius* presenta un micelio monomítico con hifas germinativas, el micelio de *Lentinus sajor-caju* presenta una organización dimítica o trimítica (Stamets, 2011). Mediante las observaciones al microscopio óptico del micelio del píleo de la cepa LBM 105 se observaron hifas germinativas con organización monomítica presentando hifas germinativas hialinas con paredes delgadas en un rango de 4,4 a 11 μm de diámetro, lo que concuerda con la clave de identificación de la especie de *P. pulmonarius* (Lechner *et al.*, 2004). El píleo flabeliforme blanquecino con su estructura lameral decurrente y aglomerada de la cepa LBM 105, así como también la morfología de las esporas cilíndricas y oblongas, de paredes delgadas y hialinas,

concuerdan también con dicha clave de identificación taxonómica para la especie *P. pulmonarius*.

Debido a que la región de ITS está flanqueada por regiones conservadas de las subunidades mayores y menores del gen ribosomal, el uso de secuencias de ITS que contengan estas regiones conservadas puede aportar un sesgo a la hora de la identificación (Rivers *et al.*, 2018). Es por ello que para la realización de la identificación filogenética de la cepa LBM 105 se utilizaron los cebadores ITS1 (*Forward*) e ITS4 (*Reverse*), ya que estos cebadores amplifican las regiones de los espaciadores internos transcritos, amplificando solamente una mínima porción de los genes de las subunidades mayores y menores del ITS, buscando así reducir el sesgo a la hora de la identificación.

Sin embargo, a partir de la construcción de las relaciones filogenéticas utilizando este marcador en el presente trabajo, las especies de *L. sajor-caju* y *P. pulmonarius* se agrupan dentro del mismo clúster con buen soporte estadístico. Esta problemática no es nueva, ya que Beatrice y Georgios en 1995 obtuvieron un problema similar al intentar hacer una caracterización molecular utilizando sondas provenientes del ADN ribosomal, donde vieron que los dendrogramas construidos con métodos de *UPGMA* no podían diferenciar a cepas identificadas como *P. pulmonarius* y *P. sajor-caju*. En este trabajo se reconoce la dificultad para poder diferenciar a estas dos especies por métodos morfológicos, lo que podría haber ocasionado una incorrecta identificación morfológica inicial de las cepas, reflejada en las discrepancias a la hora de analizar las relaciones filogenéticas (Béatrice & Georgios, 1995).

Actualmente, cuando se realizan los análisis de las relaciones entre taxones emparentados del género *Pleurotus* (Ej. *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. djamor*, entre otros) el taxón de "*P. sajor-caju*" no está incluido (Menolli Junior *et al.*, 2010; Rosnina *et al.*, 2016; Pánek *et al.*, 2019), posiblemente debido a que esta especie en verdad se ubica dentro del género *Lentinus*, no siendo entonces considerada para dichos estudios taxonómicos.

Además de esto, existe una problemática latente en relación a las bases de datos moleculares fúngicas, que debido al incremento y desarrollo de las técnicas moleculares de secuenciación suelen llevar a identificaciones que toman en cuenta únicamente los datos moleculares. Hofstetter *et al.* (2019) realizan una crítica en este aspecto en donde realizaron una verificación de identificaciones de aislados


fúngicos de los bosques de Suiza, evidenciando que alrededor de un 30 % de los casos, las secuencias de ITS ubicadas en las bases de datos de GenBank (NCBI) mostraba que el taxón asociado al mismo era erróneo, ya sea por una identificación inicial errónea o por problemas asociadas a la metadata de la secuencia en la base de datos. Es por ello, que en el caso particular de *P. pulmonarius* y *L. sajor-caju*, donde la similitud morfológica es tan marcada, existe la posibilidad que las secuencias encontradas en la base de datos posiblemente correspondana *P. pulmonarius*, lo que refleja la necesidad de una estrategia de identificación combinada para estos organismos, que combinen tanto métodos de estudio tradicional (estudio morfológico) como moleculares, realizados desde una posición crítica para evitar aumentar el grado de sesgo existente en las bases de datos fúngicos.

De la misma manera, se podrían aplicar técnicas que abarquen un mayor número de datos a analizar, como las aproximaciones de análisis filogenéticos de múltiples loci o el uso de la filogenómica (Lücking *et al.*, 2020). Esta última es una aproximación de estudio a nivel genómico empleado en el estudio de los hongos que sobrepasa las limitaciones de resolución que se suelen encontrar en los estudio con marcadores moleculares simples (Gladieux *et al.*, 2015; Magain *et al.*, 2017; Lorch *et al.*, 2018; Kobmoo *et al.*, 2019; Morin *et al.*, 2019; Haridas *et al.*, 2020). Si bien esta tecnología suele ser impráctica para el estudio en amplitud de la diversidad fúngica, debido a que son más demandantes, en términos de tiempo, que el análisis de marcadores moleculares, el advenimiento de tecnologías de tercera generación, como PacBios o la tecnología de Oxford Nanopore, están ya sobrepasando estas limitantes al uso de la filogenómica para la taxonomía fúngica (Tedersoo *et al.*, 2018; Loit *et al.*, 2019; Stadler *et al.*, 2020; Wibberg *et al.*, 2021)

2.5. Conclusión

La identificación a nivel especie de hongos de interés biotecnológico representa un reto debido a las particularidades propias del reino fúngico, existiendo mucho sesgo a la hora de poder identificar de forma correcta utilizando solamente un método en particular para la ubicación taxonómica de las cepas fúngicas.

En este capítulo, mediante una aproximación complementaria de datos morfológicos (observaciones macro y microscópicas) y datos moleculares (utilizando el marcador de ITS) obtenidos a partir de la cepa LBM 105 se pudo llegar a una identificación a nivel de especie que nos sugiere que esta cepa se ubica dentro de la especie de *Pleurotus pulmonarius*.



Capítulo 3
Remoción de
PCBs y
análisis de
intermediarios
de
degradación

3.1 Introducción

Los hongos de pudrición blanca pueden modificar y remover bifenilos policlorados y compuestos recalcitrantes similares (Lin *et al.*, 2022). Dentro de este subgrupo de hongos, la cepa LBM 105, identificada como *Pleurotus pulmonarius* en el capítulo 2 del presente trabajo, ha demostrado una enorme capacidad de tolerar y remover estos compuestos tóxicos (Sadañoski *et al.*, 2019). Debido a que la modificación metabólica de las moléculas de PCBs puede producir metabolitos más tóxicos que el compuesto parental (como los Hidroxi-PCBs) (Liu *et al.*, 2020), es necesario poder identificar dichos metabolitos y su toxicidad. Esto último puede llevarse a cabo mediante pruebas ecotoxicológicas. Las pruebas ecotoxicológicas incluyen un amplio espectro de procedimientos que varían, dependiendo del modelo biológico utilizado, medio de exposición y efectos medidos (Ceger *et al.*, 2022). Estos tests pueden ser usados para demostrar que un determinado contaminante está biodisponible, evaluar los efectos tóxicos de contaminantes individuales o de un conjunto de contaminantes en un medio y caracterizar el impacto en un organismo dado (Ceger *et al.*, 2022). Existen métodos desarrollados y estandarizados con organismos específicos que han sido seleccionados como organismos modelo debido a su disponibilidad, adaptabilidad, bajo mantenimiento y capacidad de ser utilizados en diferentes estadios de su desarrollo. En el caso de los PCBs, los test estandarizados más utilizados son los que emplean *Lactuca sativa* (Stiborova *et al.*, 2017; Sadañoski *et al.*, 2020) o test de bioluminiscencia bacteriana (Bhalla *et al.*, 2016; Šředlová *et al.*, 2020).

La caracterización de los intermedios productos del metabolismo fúngico durante la degradación de los PCBs, nos permitirá elucidar los procesos metabólicos utilizados por los hongos de pudrición blanca en la modificación de los bifenilos policlorados. Estos métodos complementan la información bioquímica de genes, transcritos y proteínas, ampliando las reconstrucciones metabólicas derivadas de los genomas y nuestro entendimiento de la biología celular, la fisiología y la medicina, mediante la unión de las vías celulares y los mecanismos biológicos (Patti *et al.*, 2012). Čvančarová *et al.* (2012) llevaron a cabo un exhaustivo estudio de los intermediarios de degradación producidos por el hongo *P. ostreatus* durante la degradación de una mezcla de PCBs (Delor 103) (Figura 3.1). Este estudio aportó los primeros indicios de cuáles serían las vías metabólicas

involucradas en la modificación de estos xenobióticos por medio de hongos del género *Pleurotus*. En conjunción con otras técnicas “ómicas” de recolección de datos, como parte de una aproximación de estudio sobre un sistema biológico, el estudio de los intermediarios de degradación puede ampliar el conocimiento sobre vías celulares complejas y mecanismos biológicos aún no comprendidos (Beale *et al.*, 2016).

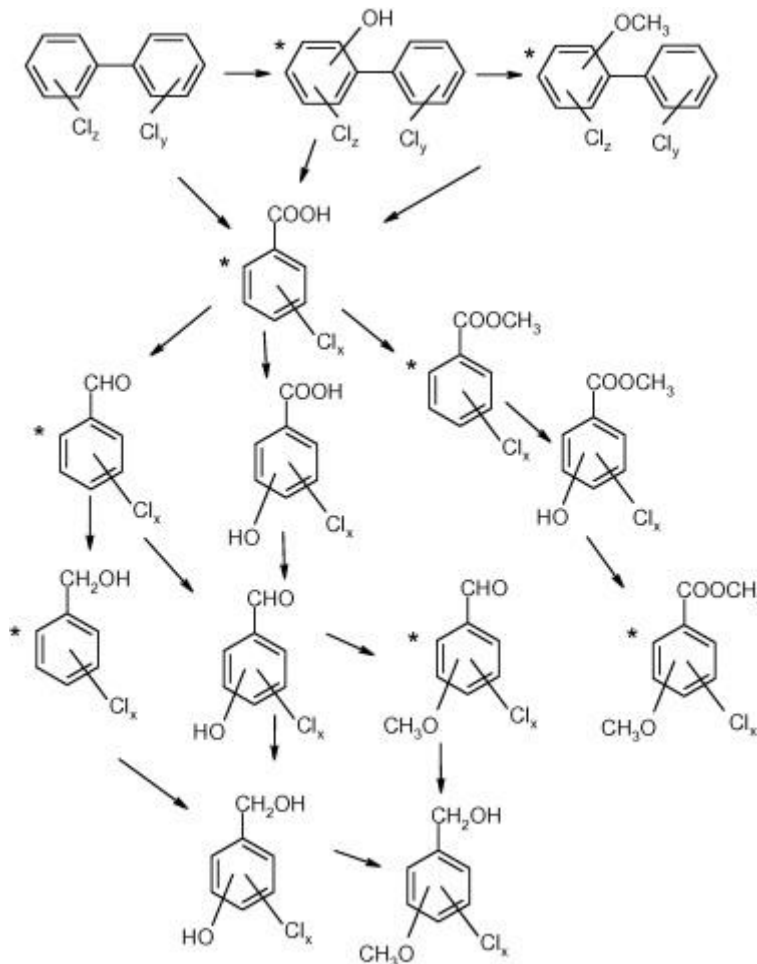


Figura 3.1. Vía metabólica de degradación de PCBs propuesta para los hongos ligninolíticos. (*) Estructuras detectadas durante de la degradación de los PCBs en el trabajo de Čvančarová *et al.* (2012). Los PCBs hidroxilados y metoxilados fueron detectados por Kamei *et al.* (2006a) y Kamei *et al.* (2006b). Los productos de transformación de los ácidos clorobenzoicos fueron detectados por Muzikář *et al.* (2011).

En este capítulo se presenta la evaluación de la capacidad de la cepa de *P. pulmonarius* LMB 105 para la remoción de bifenilos policlorados de una mezcla compleja de Arocloros (1242, 1254, 1260) en cultivo líquido, buscando evidenciar el periodo de mayor degradación de estos contaminantes. Además, se determinará la capacidad de esta cepa para detoxificar esta mezcla compleja de PCBs y se

buscará caracterizar los intermediarios de degradación obtenidos durante dicho proceso.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Análisis de remoción de bifenilos policlorados

3.2.1.1 Condiciones de cultivo

Para la determinación de la capacidad de remoción de bifenilos policlorados a diferentes tiempos de tratamiento por parte de *P. pulmonarius* LBM 105 se utilizó un medio líquido sintético deficiente de nitrógeno, de Glucosa-Asparagina (GA) con un pH final de 4,6 (Haglund *et al.*, 2002).

Composición del medio:

Glucosa.....	10 g L ⁻¹
Asparagina monohidratada.....	0,5 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g L ⁻¹
H ₂ KPO ₄	0,5 g L ⁻¹
HK ₂ PO ₄	0,6 g L ⁻¹
CuSO ₄	0,4 mg L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,1 mg L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,1 mg L ⁻¹
CaCl ₂	0,1 g L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	0,02 mg L ⁻¹
FeCl ₃	1 mg L ⁻¹
ZnCl ₂	3,5 mg L ⁻¹
Tiamina hidrocloreuro.....	3,5 mg L ⁻¹
Tween 80.....	1,7 mmol L ⁻¹

Este medio se utilizó ya que en ensayos anteriores realizados con la misma cepa se obtuvieron altos porcentajes de remoción luego de 35 días (Sadañoski *et al.*, 2019).

Tanto controles como tratamientos se realizaron por triplicado y se incubaron a 28 ± 1 °C bajo condiciones estáticas en oscuridad por 28 días con muestras destructivas tomadas cada 7 días.

Como fuente de bifenilos policlorados se utilizó un aceite de transformador

con una mezcla compleja de los Arocloros 1242, 1254 y 1260, donado por Kioshi S.A. (Buenos Aires, Argentina), el cual fue caracterizado inicialmente por el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) - Centro de Investigación y Desarrollo de Ambiente (Buenos Aires, Argentina).

3.2.1.2 Tratamientos y controles utilizados

Los tratamientos para el ensayo de degradación consistieron en un triplicado de frascos Erlenmeyer de 250 mL con 20 mL de medio GA a los cuales se le inoculó un taco de 5 mm de diámetro de micelio desarrollado de la cepa LBM 105, cultivado previamente en MEA por 5 días, al mismo tiempo que se le adicionó el aceite de transformador disuelto en acetona con una concentración total de PCBs de $855 \pm 34 \text{ mg g}^{-1}$, logrando una cantidad final de PCBs de 4000 μg para cada frasco.

Para este ensayo se emplearon controles para determinar la proporción de remoción de PCBs dada por la acción enzimática de la cepa fúngica y la proporción de remoción dada por la adsorción al micelio fúngico. Los controles para este ensayo fueron los siguientes:

- Control abiótico: consistió en el medio sintético GA sin el inóculo fúngico con el agregado de 4000 μg de PCBs.
- Control autoclavado (\emptyset): la cepa LBM 105 desarrollada en el medio sintético GA durante 7 días, se inactivó por calor ($105 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm por 20 min) con el posterior agregado de 4000 μg de PCBs.

3.2.1.3 Cuantificación de la remoción de PCBs

La determinación de la remoción de PCBs luego del tratamiento con la cepa LBM 105 se realizó mediante el análisis de los PCBs residuales en el sobrenadante. Transcurrido cada periodo de tiempo, se separó el micelio del sobrenadante por centrifugación ($4695 \times g$ por 15 min). El sobrenadante obtenido de los cultivos se acidificó adicionando 200 μL de ácido sulfúrico 1 M para inhibir cualquier acción enzimática posterior (Plaková *et al.*, 2012). Posteriormente, la extracción de los PCBs en tratamientos y controles se realizó mediante 3 lavados con 20 mL de hexano en agitación (250 rpm, $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) seguido de centrifugación ($4695 \times g$ por 15 min). La cuantificación de los PCBs extraídos se realizó mediante un análisis de cromatografía gaseosa acoplado a un detector de captura de electrones (GC-EC) realizado en el "Centro de Química Aplicada" (CEQUIMAP, Córdoba, Argentina).

Dicho análisis cuantitativo se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases Agilent 6890 equipado con una columna capilar HPI (Largo: 30; ID: 0,23 mm; Film: 0,25 µm) con un detector de captura de electrones (uECD). Los materiales de referencia para la cuantificación de los PCBs fueron los Arocloros AccuStandard® 1242, 1254 y 1260 utilizados en una concentración de 50 µg g⁻¹.

El porcentaje de remoción enzimática se obtuvo mediante una comparación entre los controles autoclavados y los tratamientos. Este porcentaje de remoción, expresado como recuperación de PCBs, se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Recuperación de PCBs (\%)} = \frac{(A \times 100)}{B}$$

Donde *A* representa la concentración de PCBs en el sobrenadante luego del tratamiento con la cepa fúngica y *B* la concentración de PCBs en el sobrenadante del control autoclavado. En relación al porcentaje de recuperación, se puede definir al porcentaje de remoción de PCBs de la siguiente manera.

$$\text{Remoción de PCBs (\%)} = 100\% - \text{Recuperación de PCBs}$$

3.2.2 Ensayo de toxicidad

3.2.2.1 Tratamientos y controles

La evaluación de la toxicidad de los intermediarios de degradación producidos por la modificación fúngica de los PCBs con la cepa LBM 105 se llevó a cabo *in vitro* utilizando a *L. sativa* como indicador de toxicidad. El ensayo de elongación de la raíz se llevó a cabo como se describe en el manual de la Asociación de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*) con ligeras modificaciones en el número de semillas utilizadas (EPA, 1996). Los tratamientos en este caso son similares a los realizados en el apartado 3.2.1.2. Los controles para este experimento se detallan a continuación:

- Control (PCB +): control abiótico de medio GA sin presencia de la cepa LBM 105 con el agregado de la mezcla de Arocloros.
- Control (PCB -): control abiótico de medio GA sin presencia de la cepa LBM 105 y sin el agregado de la mezcla de Arocloros.
- Control Biótico: medio GA inoculado con la cepa LBM 105 sin el agregado de la mezcla de Arocloros.
- Control Acetona: control abiótico de medio GA con una concentración final de

acetona 0,03 M.

3.2.2.2 Condiciones del ensayo

Tanto tratamientos como controles se realizaron por triplicado y se incubaron a 28 ± 1 °C en oscuridad por 28 días. El valor de pH de los controles se ajustó para igualar al de los tratamientos.

Para el ensayo en cuestión se seleccionaron semillas de *L. sativa* obtenida del mercado agropecuario local con características similares (tamaño e integridad). Estas se desinfectaron superficialmente con un lavado de hipoclorito de sodio al 10 % v/v por 10 min y un lavado con agua destilada por 1 h. Luego, se agregaron 2 mL de sobrenadante de los tratamientos y controles sobre un papel de filtro Whatman N° 3 ubicados en placas de Petri de 90 mm de diámetro. Se colocaron 10 semillas de *L. sativa* sobre el papel de filtro y se incubó en oscuridad por 5 días a 24 ± 1 °C. En la Figura 3.2. se puede observar un esquema que resume los tratamientos y controles utilizados para el ensayo de toxicidad.

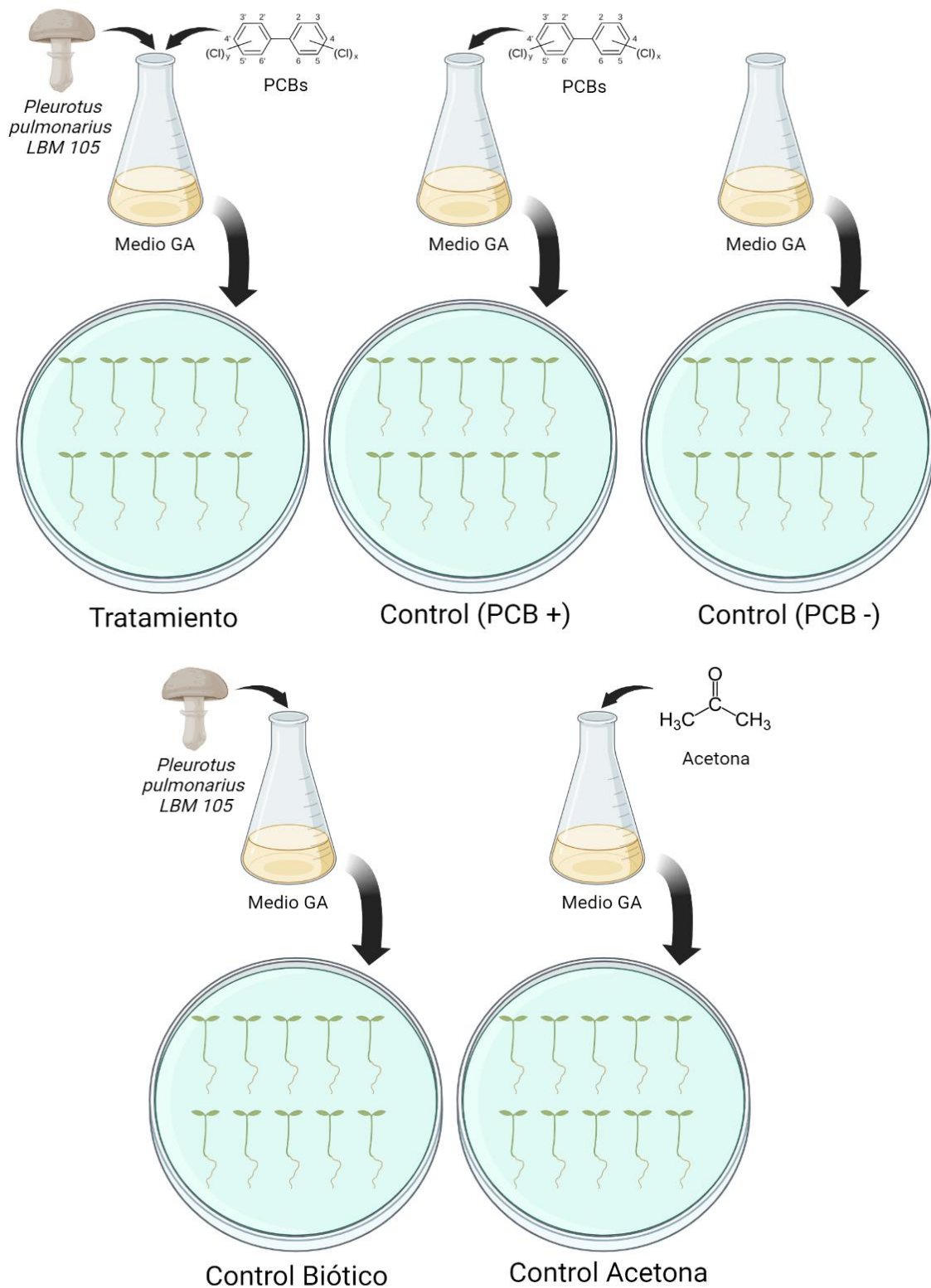


Figura 3.2. Esquema representativo de tratamientos y controles utilizados para los ensayos de toxicidad utilizando a *L. sativa*. En cada placa de Petri se utilizaron 10 semillas de *L. sativa* y un total de 2 mL de medio proveniente de los cultivos de tratamientos y controles.

3.2.2.3 Cálculo de índices de germinación y elongación

Los valores de germinación y elongación de la radícula se midieron utilizando un calibre electrónico y se utilizaron para calcular los índices de germinación (GI, del inglés *Germination Index*) y el índice de crecimiento relativo (RGI, del inglés *Relative growth index*) (Young *et al.*, 2012). Estos índices se calcularon de la siguiente manera:

$$RGI = \frac{LRM}{LRC}$$

$$GI (\%) = \frac{LRM \times SGM \times 100}{LRC \times SGC}$$

Donde LRM hace referencia a la longitud de la radícula en la muestra, LRC al largo de la radícula en un control agua, SGM a la cantidad de semillas germinadas en la muestra y SGC a las semillas germinadas en un control agua.

Los valores de RGI se pueden dividir en 3 categorías según los posibles efectos de los compuestos sometidos a prueba sobre la elongación de la radícula (Young *et al.*, 2012):

- Inhibición de la elongación de la radícula: $0 < x < 0,8$
- Sin efecto significativo: $0,8 < x < 1,2$
- Estimulación de la elongación de la radícula: $x > 1,2$

3.2.2.4 Análisis estadístico

Finalmente, un análisis univariado de la varianza se realizó utilizando los valores de la longitud de la radícula para corroborar la reducción del efecto ecotoxicológico de los PCBs de tratamientos y controles, utilizando el software Statgraphics Centurion XV (versión 15.2.06). Los test de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) y de Levene (Levene, 1960) se utilizaron para probar la normalidad y la homocedasticidad de los datos, respectivamente. La prueba LSD de Fisher se utilizó para las comparaciones múltiples de las medias de longitud de radícula de cada tratamiento y control.

3.2.3 Análisis de Intermediarios de degradación

3.2.3.1 Acondicionamiento de las muestras

Los sobrenadantes obtenidos de los tratamientos en la sección 3.2.1.2. se enviaron al “Centro de Química Aplicada” (CEQUIMAP, Córdoba, Argentina) para su análisis exploratorio utilizando cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas. Allí se procedió a extraer los bifenilos policlorados residuales en el medio, mediante 5 lavados con 10 mL de acetato de etilo y luego las muestras se secaron con sulfato de sodio. Estos extractos luego se concentraron en un rotavapor a un volumen final de 10 mL.

3.2.3.2 Determinación por cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masas

Los extractos concentrados se inyectaron directamente en un cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masa. El inyector del mismo se mantuvo a 300 °C. Una columna HP1 se utilizó para la separación (30 m, 0,23 mm diámetro interno, 0,25 µm grosor del film) con un flujo de 2 mL min⁻¹. El programa de temperaturas fué el siguiente:

- El modo sin divisor comenzó en 80 °C y fue mantenido por 1 min.
- El divisor se abrió en un radio de 1:50 y el horno se calentó a 115 °C a una tasa de 25 °C min⁻¹.
- Se elevó la temperatura luego a 300 °C con una tasa de temperatura de 1,5 °C min⁻¹ donde se mantuvo por 20 min.

El tiempo de retraso del solvente se programó a 5 min y la línea de transferencia de temperatura fue 300 °C. Los espectros de masas se programaron a 3 escaneos por segundo bajo un impacto de electrones de 70 eV y un rango de masas de 50 a 450 unidades de masa atómica. El potencial de excitación para los espectros MS/MS fue de 0,2 V e incrementado a 0,8 V para iones más estables. Los compuestos obtenidos se identificaron mediante una comparación de los espectros con la biblioteca *NIST MS Search 2.0* (<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku>). Para la cuantificación relativa de los compuestos, se realizó una derivación del área bajo la curva para cada pico correspondiente a cada compuesto.

3.3. Resultados

3.3.1 Remoción de PCBs por la cepa LBM 105

Para la determinación de la remoción de PCBs por la acción enzimática de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105 se comparó el porcentaje de recuperación de PCBs de tratamientos y de controles autoclavados. El uso de los controles autoclavados permite diferenciar la cantidad de PCBs removidos por adsorción al micelio fúngico, considerando entonces únicamente la acción de la remoción enzimática. En la Figura 3.3 se puede observar la remoción enzimática de los PCBs a diferentes tiempos de cultivo expresados como porcentaje de recuperación de PCBs. A los 7 días de cultivo, se observó una alta recuperación de PCBs, equivalente a una escasa remoción por parte de la cepa LBM 105. Sin embargo, al avanzar los días se evidenció un descenso abrupto en la recuperación de PCBs. Al día 14 de cultivo se logró obtener una remoción del contaminante de $29,69 \pm 9,67$ %, mientras que se obtuvo un $65,50 \pm 8,09$ % y un $80,40 \pm 8,58$ % para los días 21 y 28 respectivamente.

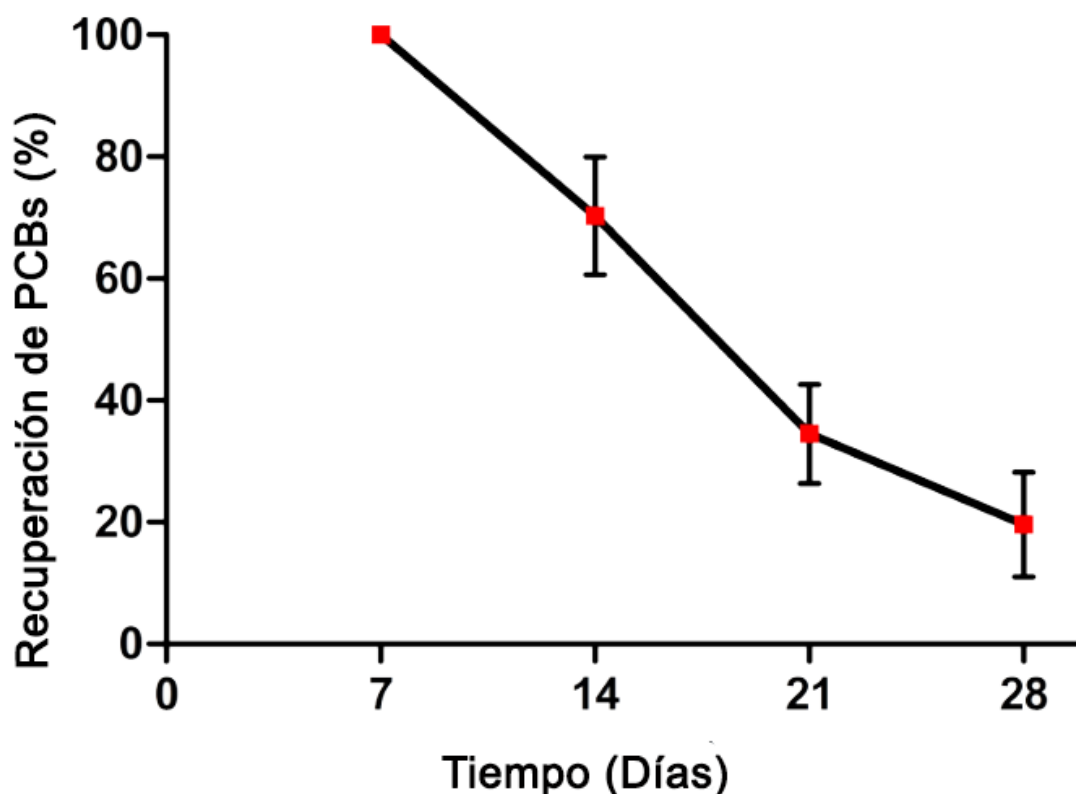


Figura 3.3. Remoción enzimática de PCBs luego del tratamiento con *P. pulmonarius* LBM 105 en medio líquido GA, expresado como porcentaje de recuperación (adaptado de Chelaliche *et al.*, 2021). Desvío Estándar: Día 14 \pm 9,67 %. Día 21 \pm 8,09 %. Día 28 \pm 8,58 %.

Además, a partir de estos datos se puede observar que a los 21 días de se obtuvo la mayor tasa remoción de PCBs por parte de la cepa LBM 105, evidenciado por la pendiente de la relación recuperación de PCBs/tiempo (Figura 3.3). Este día fue seleccionado para los posteriores estudios, bajo la suposición de que en este período se expresa la mayor cantidad de enzimas involucradas en los procesos de remoción del contaminante. De la comparación de los controles abióticos con los controles autoclavados se pudo obtener una remoción de PCBs de $12,59 \pm 1,89 \%$, porcentaje que puede ser referido a la adsorción por parte del micelio fúngico. Los perfiles cromatográficos obtenidos del estudio de remoción tanto de controles como de tratamientos pueden observarse en el Anexo 1.

3.3.2 Ensayos de toxicidad

Para la evaluación de toxicidad de los intermediarios de degradación producidos durante la remoción de los PCBs debido a la acción del metabolismo fúngico, se realizó un ensayo de toxicidad *in vitro* utilizando a *L. sativa* como indicador ecotoxicológico. A partir de los estudios estadísticos de normalidad y homocedasticidad se observó que los datos obtenidos mostraban una distribución normal ($p < 0,05$), lo que permitió el estudio de análisis de la varianza.

En la Figura 3.4 se puede observar el efecto de tratamientos y controles sobre la elongación radicular de las semillas de *L. sativa*. En la misma se puede observar cómo los medios contaminados tratados con la cepa LBM 105 de *P. pulmonarius* mostraron un aumento considerable en la longitud de la radícula cuando se lo compara con el control contaminado con PCBs y sin la presencia del hongo. Además, se observa como el tratamiento con dicha cepa logró obtener valores de longitud de radícula muy similares a los controles sin PCBs (control biótico y abiótico sin agregado de PCBs).

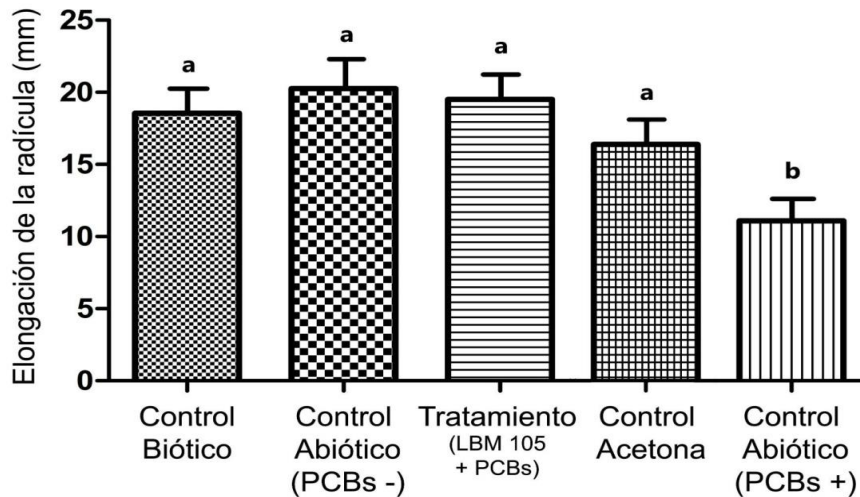


Figura 3.4. Efecto de tratamientos y controles sobre la elongación de la radícula de *L. sativa*. Se muestran los valores medios e intervalos de confianza del 95 %. Se puede observar las condiciones que muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) según el test LSD de Fisher (marcados con letras “a” y “b”) (adaptado de Chelaliche *et al.*, 2021).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas entre el control con acetona y los controles bióticos y abióticos con ausencia de PCBs.

A partir del análisis de la Figura 3.5, se pueden observar los índices de crecimiento relativo y los índices de germinación obtenidos a partir de las pruebas de toxicidad con *L. sativa*. A partir del análisis de los valores de los índices de crecimiento relativo, se observa que tanto el tratamiento con la cepa LBM 105, como el control biótico y el control abiótico sin PCBs, obtuvieron índices de crecimiento relativo mayores a 0,8, lo que se traduce como una falta de un efecto inhibitorio de los sobrenadantes sobre la elongación de la radícula tal como se describe en el trabajo de Young *et al.* (2012).

Al analizar los índices de germinación, se evidencia un patrón similar al anterior, donde el tratamiento con la cepa LBM 105 obtuvo índices similares a los controles que no contenían PCBs. En ambos casos, los controles abióticos que contenían PCBs mostraron una marcada inhibición de tanto la longitud de la radícula (Figura 3.5-A) como de la capacidad de germinación de las semillas (Figura 3.5-B).

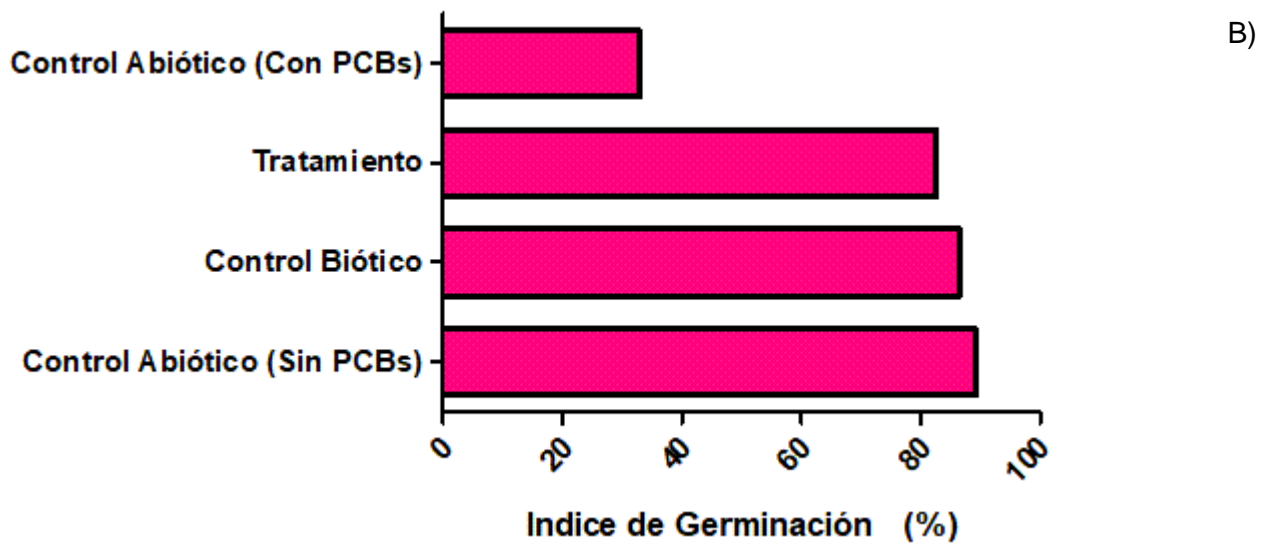
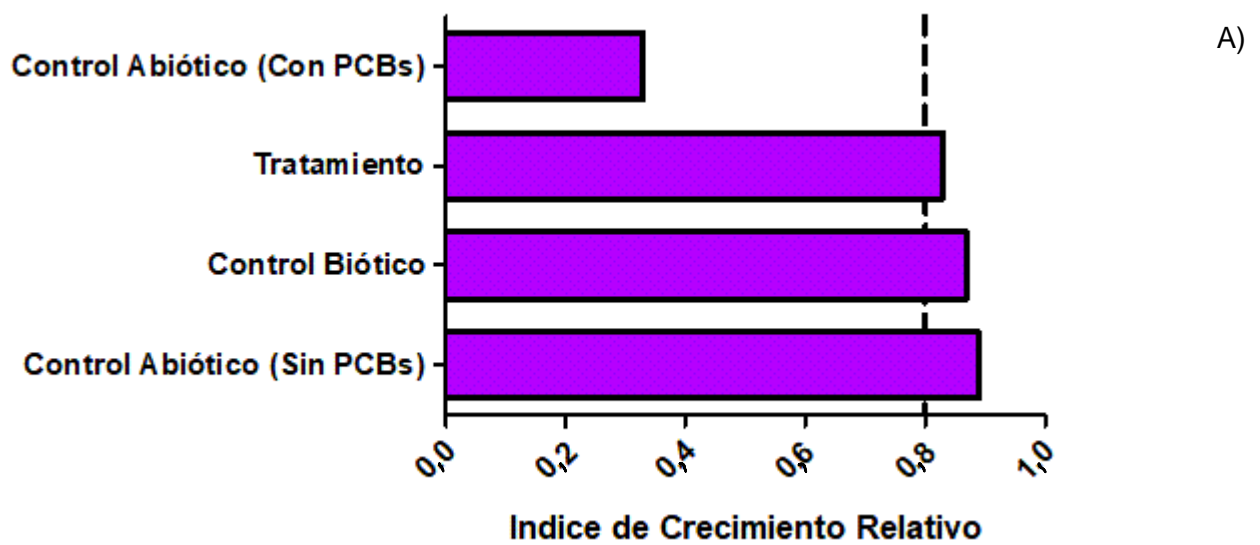


Figura 3.5. A) Índice de crecimiento relativo calculado a partir de los valores longitud de radícula del ensayo de toxicidad de *L. sativa* utilizando los medios tratados con la cepa *P. pulmonarius* LBM 105. La línea punteada hace referencia al valor del índice por debajo del cual se considera un efecto tóxico sobre la elongación de la radícula B) Índice de germinación calculado a partir de los valores de radícula y de cantidad de semillas germinadas del ensayo de toxicidad de *L. sativa* llevado a cabo con los medios tratados con la cepa *P. pulmonarius* LBM 105.

A través de una comparación de las longitudes de las radículas del tratamiento y el control abiótico sin PCBs, se pudo determinar que el tratamiento del medio contaminado con PCBs con la cepa *P. pulmonarius* obtuvo una reducción del 46,47 % de la toxicidad al día 28 de cultivo.

3.3.3 Análisis de los intermediarios de degradación

A partir de los tratamientos en medio de cultivo líquido se realizó un análisis exploratorio de los intermediarios de degradación producidos por el metabolismo fúngico de la cepa LBM 105. En la Tabla 3.1 se describen los 15 intermediarios con mayor prevalencia identificados a partir de la condición del tratamiento con la cepa fúngica en estudio a los 21 días de incubación.

Tabla 3.1. Intermediarios de degradación identificados durante la remoción de una mezcla compleja de PCBs por *P. pulmonarius* LBM 105 a los 21 días de cultivo.

Tiempo Retención	Área	Abundancia Relativa (%)	Compuesto	Fórmula Química
17,66	715.856.998	9,50294	2,2',3,4',5',6-Hexaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
15,2	622.321.816	8,26127	2,2',3,4',5',6-Hexaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
16,24	577.397.905	7,66491	2,2',4,4',5,5'-Hexaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
13,03	555.496.000	7,37416	2,2',4,5',6-Pentaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
14,29	510.439.914	6,77604	2,3',4,5,5'-Pentaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
12,43	418.797.012	5,55949	2,2',3,5,6'-Pentaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
16,46	356.369.986	4,73078	2,2',3,3',4,4'-Hexaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
20,09	335.304.488	4,45114	2,2',3,3',4,5,6'-Heptaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
5,99	300.732.095	3,99219	1,2,3-Triclorobenceno	(C ₆ H ₃ Cl ₃)
15,28	222.406.109	2,95242	2,3',4,5,5'-Pentaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
14,72	210.772.145	2,79798	2,2',3,4',5,6-Hexaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
19,1	196.714.982	2,61137	2,2',3,3',4,5,6'-Heptaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
16,88	176.476.620	2,34271	2,2',3,4,5,5'-Hexaclorobifenilo	(C ₁₂ H ₄ Cl ₆)

En el Anexo 2 se puede observar una lista completa de todos los intermediarios identificados mediante espectrometría de masas.

A partir del análisis de estos resultados se puede destacar que la mayoría de los intermediarios que se encontraban en mayor abundancia relativa dentro de la muestra corresponden a bifenilos policlorados de alto grado de cloración (bifenilos hepta-, hexa- y pentaclorados) y que además la mayoría de estos compuestos presentaban los átomos de cloro en una posición *orto* dentro de la molécula (Figura 3.6).

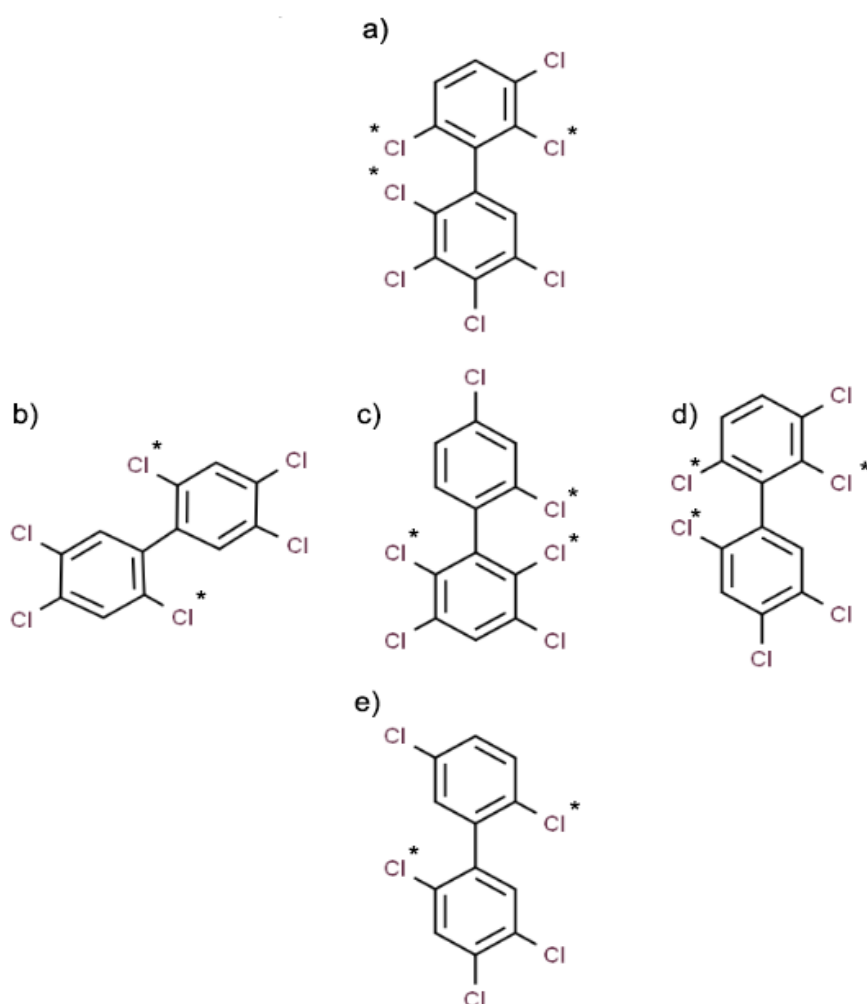


Figura 3.6. Estructura química de algunos de los compuestos con mayor abundancia relativa obtenidos del análisis de intermediarios de degradación del tratamiento de los Arocloros 1242, 1254 y 1260 con la cepa LBM 105. A) 2,2',3,3',4,5,6'-heptaclorobifenil. B) 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenil. C) 2,2',3,4',5,6-hexaclorobifenil. D) 2,2',3,4',5',6-hexaclorobifenil. E) 2,2',4,5,5'-pentaclorobifenil. *) Se muestran los átomos de cloro en posiciones *Orto*.

Además, se identificó en la muestra la presencia de triclorobenceno (tiempo de retención: 5,99 minutos) con una abundancia relativa del 3,99 %, producto asociado a la ruptura de la molécula de bifenilo (Figura 3.7.).

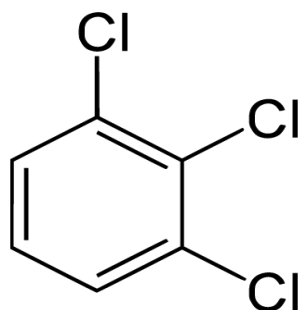


Figura 3.7. Estructura química del 1,2,3-triclorobenceno. Número de CAS: 12002-48-1. Imagen obtenida de la página *CAS-Common Chemistry*³.

En la figura 3.8 se representan los tipos de compuestos encontrados y su prevalencia en la muestra luego de 21 días de tratamiento con la cepa LBM 105. En esta imagen se puede observar que una gran mayoría de los compuestos relacionados a los PCBs en solución corresponden a bifenilos de alto grado de cloración (Pentaclorobifenilos, Hexaclorobifenilos, Heptaclorobifenilos), mientras que aquellos de menor grado de cloración corresponden a una porción menor, incluso menor que la porción correspondiente a los clorobencenos, que como se mencionó anteriormente pueden haber surgido de la ruptura de la unión entre los anillos aromáticos de la molécula de bifenilo policlorado.

³ CAS-Common Chemistry (https://commonchemistry.cas.org/detail?cas_rn=12002-48-1)

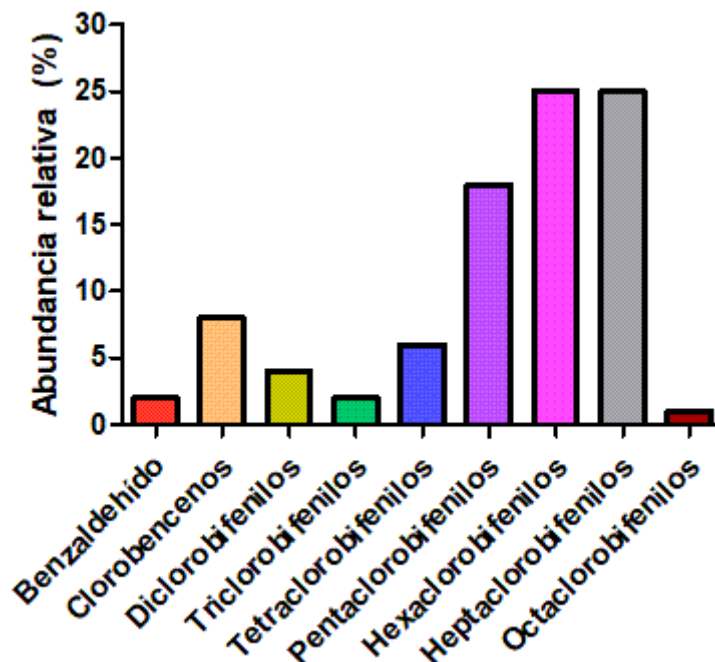


Figura 3.8. Abundancia relativa de las especies de PCBs y los intermediarios de degradación producidos en el tratamiento de los Arocloros 1242, 1254 y 1260 utilizando la cepa *P. pulmonarius* LBM 105 luego de 21 días en medio líquido GA. La identificación de los compuestos se realizó utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

3.4. Discusión

Plantear estrategias de biorremediación que utilicen un organismo o sus enzimas implica no solo conocer el potencial en términos de remoción o transformación de los compuestos contaminantes, sino también la producción de los intermediarios durante el proceso de degradación de PCBs por el metabolismo fúngico. Particularmente en la degradación de los bifenilos policlorados se ha demostrado que compuestos derivados de estos, como los hidroxi-PCBs, presentan una toxicidad aún mayor al compuesto que le dio origen (Liu *et al.*, 2020).

Es bien conocida la capacidad de cepas pertenecientes al género *Pleurotus* de poder remover bifenilos policlorados. Hongos pertenecientes a la especie de *P. ostreatus* alcanzaron porcentajes de degradación de un 87 % en efluentes contaminados con PCBs (Šrédlová *et al.*, 2020). Específicamente la cepa LBM 105 ha demostrado que a los 35 días en cultivo líquido se pueden alcanzar porcentajes de degradación mayores al 90 % (Sadañoski *et al.*, 2019; Benitez *et al.*, 2021). A partir de estos estudios previos, en este capítulo se intentó determinar el intervalo,

en días, en el que se evidenciara una mayor tasa de remoción del contaminante, y de esta forma poder utilizar ese período de tiempo para los posteriores estudios transcriptómicos y proteómicos, bajo la hipótesis de que durante el mismo existiría una mayor representación de las enzimas que están involucrados en las vías de remoción de los PCBs. Los estudios demostraron que la mayor tasa de remoción de PCBs ocurría a los 21 días, demostrado por la mayor pendiente en la reducción de la concentración de estos contaminantes con relación a los otros días (Figura 3.3).

Debido a la capacidad de esta cepa de alcanzar porcentajes altos de degradación, el estudio y evaluación de la toxicidad al finalizar estos ensayos se vuelve un paso crítico. Como se planteó anteriormente, los hongos de pudrición blanca son ampliamente estudiados por su capacidad de atacar compuestos recalcitrantes mediante una degradación aeróbica. En el trabajo de Čvančarová *et al.* (2012), que estudió el potencial biorremediador de diferentes hongos de pudrición blanca, se observó que diferentes especies de este subgrupo de hongos diferían en su potencial de degradación de estos contaminantes. En este contexto, la cepa *P. ostreatus* 3004 CCBAS fue capaz de degradar más del 90 % de los bifenilos policlorados en una mezcla comercial de Delor 103 (equivalente a I Aroclor 1242) siendo éste el único hongo capaz de reducir la toxicidad en un 35 % de forma significativa (*t*-test, $p < 0,05$), demostrando así la capacidad de los organismos pertenecientes a este género de atenuar los efectos tóxicos de estos xenobióticos.

De forma similar, al analizar los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de los tratamientos de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105, se demostró que esta era capaz de reducir la toxicidad del medio de cultivo, tratado luego de 28 días, en un porcentaje igual al 46,47 %, sumando evidencia a la capacidad de los hongos del género *Pleurotus* de remover estos contaminantes. Además, se observó que utilizando los índices ecotoxicológicos de germinación y de crecimiento relativo planteados por Young *et al.* (2012) para *L. sativa*, se evidencia que los medios contaminados tratados con la cepa LBM 105 obtuvieron índices muy similares a aquellas condiciones control sin el agregado de PCBs, lo que refleja la atenuación de la toxicidad mediada por la acción del metabolismo fúngico.

Esta reducción en la toxicidad podría estar dada no solo por la remoción de aquellos bifenilos policlorados de menor grado de cloración y su posterior transformación en compuestos derivados (como clorobencenos o benzaldehidos), sino debido a que los bifenilos policlorados que no llegan a ser modificados por

dicho metabolismo son aquellos que presentan átomos de cloro en posición *orto* dentro de la molécula, cuya toxicidad es mucho menor comparado aquellas especies sin átomos de cloro en esta posición. La dioxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina o TCDD, es usada como referencia para poder comparar los efectos citotóxicos de los PCBs mediante un factor de equivalencia tóxica (TEF, del inglés *Toxicity equivalency factor*). Al comparar los valores de TEF de diversos tipos de PCBs existentes se puede observar que la presencia de un solo átomo de cloro en posición *orto* puede reducir el valor TEF (y por lo tanto de la toxicidad) entre bifenilos policlorados con un mismo grado de cloración (Reddy *et al.*, 2019; Kojima *et al.*, 2018). Esta reducción de la toxicidad está íntimamente ligada a la respuesta del receptor de hidrocarburos de arilo, que presenta una mayor afinidad por aquellos PCBs similares a las dioxinas que no poseen los átomos de cloro en la posición *orto* (Perkins *et al.*, 2016) y desencadena una respuesta intracelular que genera un aumento en el estrés oxidativo de la célula (Liu *et al.*, 2020), por lo que se observa que el medio tratado por la cepa LBM 105 presenta una proporción mayoritaria de los bifenilos policlorados restantes con una estructura no similar a las dioxinas, con valores de TEF bajos.

En los trabajos de Sadañoski *et al.* (2019) y Benitez *et al.* (2021), si bien es observable una reducción de la toxicidad por parte de la misma cepa, los porcentajes de reducción son diferentes. Una explicación a este hecho viene dada por los indicadores de toxicidad utilizados en los diferentes trabajos. Es sabido que entre los ensayos de toxicidad estándares (como el *L. sativa*, elaborado por la EPA) y los ensayos de toxicidad alternativos (como los realizados en estos trabajos con *Ganoderma* sp) pueden existir variaciones dadas por las diferentes sensibilidades de los indicadores de toxicidad (Ågerstrand *et al.*, 2011).

Finalmente, se sabe que los bifenilos policlorados de más alto grado de cloración son más recalcitrantes, tienen un tiempo de vida mayor en las matrices contaminadas y suelen ser más resistentes a su transformación por el metabolismo fúngico (Šrédlová & Cajthaml, 2022). Esto explicaría la alta proporción de compuestos de alto grado de cloración durante el periodo de degradación estudiado. Posiblemente, periodos más prolongados de degradación posibiliten la transformación de estos PCBs de alto grado de cloración en compuestos más simples y aún menos tóxicos.

Es evidente que la cepa LBM 105 es capaz de remover una gran proporción

de los bifenilos policlorados presentes en la mezcla de arocloros utilizada en este trabajo, acompañada con una reducción de la toxicidad considerable, alcanzando su mayor tasa de degradación a los 21 días de cultivo. Esta capacidad hace que esta cepa sea un elemento clave para el planteamiento de estrategias de biorremediación de matrices que se encuentren contaminadas con estos xenobióticos, ya que combina la capacidad de degradación de los contaminantes con la reducción de toxicidad necesaria para su ejecución en planes de remediación de ambientes contaminados reales.

3.5. Conclusión

A partir de los ensayos realizados en medio de cultivo líquido deficiente de nitrógeno (GA) utilizando la cepa LBM 105 se demostró que esta cepa es capaz de alcanzar un porcentaje de remoción de 29,69 ± 9,67 %, 65,50 ± 8,09 % y un 80,40 ± 8,58 % a los 14, 21 y 28 días respectivamente. A los 21 días de cultivo se registró la mayor tasa de remoción de PCBs por parte de esta cepa.

Además se comprobó, mediante pruebas de ecotoxicidad utilizando a *L. sativa*, que la cepa LBM 105 puede disminuir la toxicidad del medio en un 46,47 %, demostrando que los índices de crecimiento relativo y de germinación, obtenidos en el medio tratado, son similares a aquellos de los medios de control sin PCBs.

A partir del estudio de los intermediarios de degradación realizado en la muestra tratada a 21 días, se demostró una mayor prevalencia de especies de PCBs con alto grado de cloración (Pentaclorobifenilos, Hexaclorobifenilos y Heptaclorobifenilos), en su mayoría bifenilos no similares a las dioxinas; así como también la presencia de clorobencenos producto de la ruptura de las moléculas de bifenilo.



Capítulo 4 Análisis Transcriptómico

4.1. Introducción

En los capítulos anteriores de este trabajo de tesis se pudo evidenciar como algunos hongos de pudrición blanca son capaces de tolerar y degradar compuestos altamente recalcitrantes, como los PCBs. Si bien existen algunas enzimas las cuales se saben pueden estar involucradas en la modificación de los bifenilos policlorados, el metabolismo específico de cepas con alto potencial biorremediador aún requiere de un mayor estudio.

Una forma de indagar acerca de dicho metabolismo es el estudio de expresión de los genes durante la degradación, también conocido como transcriptoma. El transcriptoma representa el set completo de transcritos en una célula en un contexto de desarrollo o en un ambiente fisiológico dado (Hassan *et al.*, 2020).

Este campo de investigación comenzó a desarrollarse en los años 90 (Thompson *et al.*, 2016) y en los últimos años su uso y desarrollo ha aumentado hasta convertirse en una de las técnicas de estudio “ómico” más utilizada (Futschik *et al.*, 2018). Esta metodología utiliza métodos de alto rendimiento capaces de obtener un gran volumen de datos en relación a los ARN codificantes y no codificantes, como *microarrays* o secuenciación del ARN, por plataformas del tipo Illumina (Morgensztern *et al.*, 2018).

El análisis comparativo de transcriptomas brinda información de la cantidad de transcritos y la variación de la expresión génica entre diferentes muestras, lo que permite elucidar los mecanismos moleculares de un determinado proceso biológico en estudio. Ejemplos sobre el uso de esta metodología se han llevado a cabo en varios macrohongos como *Agrocybe aegerita* (Zhou *et al.*, 2014), *Cordyceps militaris* (Yin *et al.*, 2012), *Ganoderma lucidum* (Yu *et al.*, 2012) y *Lentinula edodes* (Song *et al.*, 2018).

En el campo de la biorremediación, esta técnica es una poderosa herramienta que ha sido utilizada para indagar sobre los genes involucrados en la tolerancia al cadmio de *Chlamydomonas reinhardtii* (Yu *et al.*, 2020), en la regulación de los mecanismos de mineralización del cadmio dado por la bacteria *Bacillus velezensis* (Huang *et al.*, 2022), en estudios de tolerancia de *Geobacter uraniireducens* al uranio en sedimentos contaminados (Holmes *et al.*, 2009) y para evaluar la respuesta y las vías de detoxificación de *P. ostreatus* y *Pleurotus*

cornucopia frente a la remoción de cadmio (Xu *et al.*, 2021), entre otros.

En este capítulo se presenta el análisis de los perfiles de expresión génica de *P. pulmonarius* LBM 105 mediante el ensamblaje y análisis del transcriptoma en presencia y ausencia del contaminante, buscando genes que presenten una expresión diferencial y que puedan estar involucrados en la transformación de los bifenilos policlorados.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1 Obtención del ARN

4.2.1.1 Condiciones de cultivo

Para la obtención del transcriptoma de *P. pulmonarius* LBM 105 durante la degradación de los PCBs se procedió a desarrollar dicha cepa en condiciones similares a la detallada en el apartado 3.2.1.1. El tratamiento se realizó en frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL con 20 mL de medio líquido GA inoculados con un taco de agar de 5 mm de diámetro con micelio joven desarrollado de un cultivo en medio sólido (MEA) de 5 días de incubación. Luego se agregó la mezcla de Arocloros disuelto en acetona para alcanzar una cantidad total final de PCBs de 4000 µg por frasco. El control en este caso constó del mismo medio líquido inoculado con la cepa LBM 105 pero sin el agregado de la mezcla de Arocloros. Tanto tratamientos como controles se realizaron por triplicado (réplicas biológicas) y se incubaron a 28 ± 1 °C bajo condiciones estáticas en oscuridad por 21 días. En la Figura 4.1. se puede observar el flujo de trabajo llevado a cabo para el análisis transcriptómico.

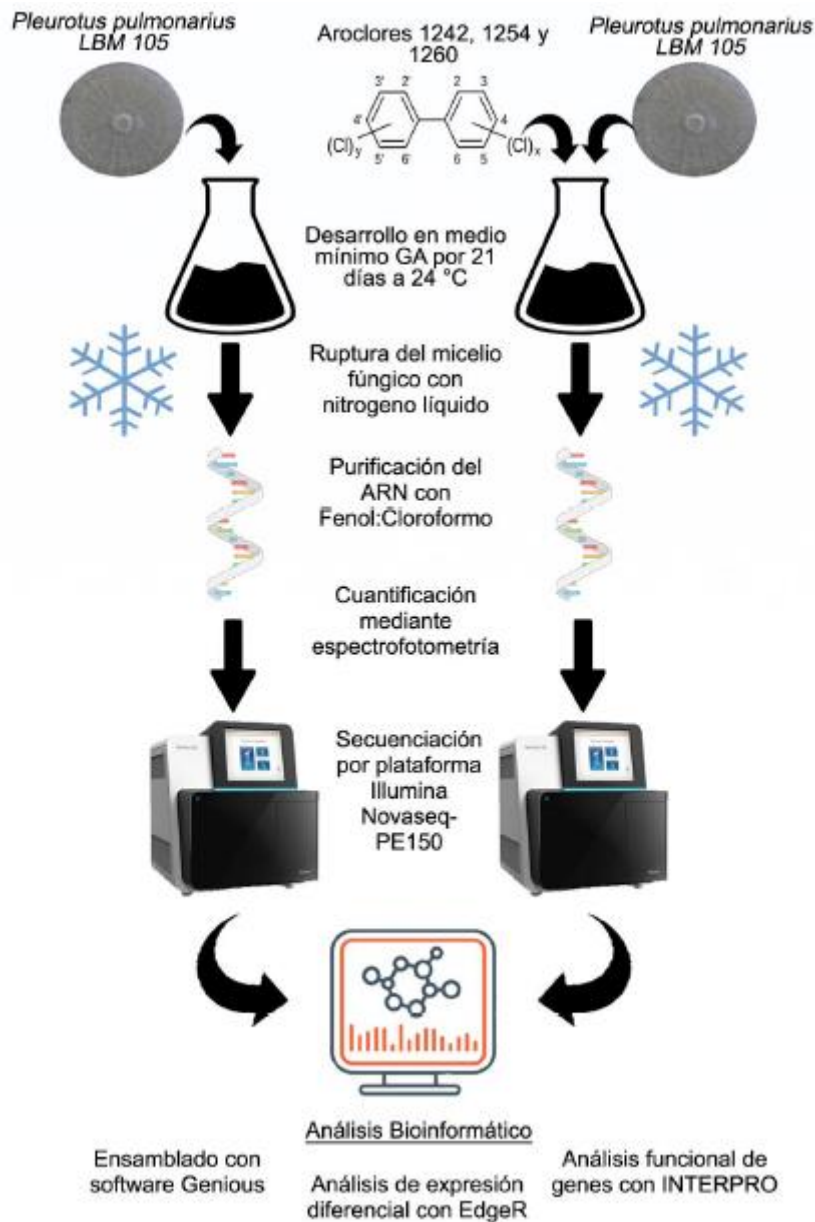


Figura 4.1. Flujo de trabajo para el análisis de expresión diferencial de los transcriptomas de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia y ausencia de los PCBs.

4.2.1.2 Extracción y purificación del ARN

Luego de 21 días se separó el micelio del sobrenadante por centrifugación (4695 x g por 15 min). El micelio obtenido se sometió inmediatamente a una ruptura mecánica utilizando nitrógeno líquido, mortero y pilón. Luego se fraccionó el lisado en tubos de 1,5 mL y se le adicionaron 500 µL de *buffer* de extracción (tiocianato de guanidinio 4 M; Tris-HCl 0,1 M pH 7; NaCl 1,5 M; EDTA 0,02 M; Triton X-100 1 % v/v). Se incubó por 20 min a 4 °C y se centrifugó (10625 x g, 10 min, 4 °C) para obtener la fracción de ácidos nucleicos en el sobrenadante. Para la purificación de

ARN se agregó un volumen similar de fenol al sobrenadante obtenido a cada uno de los tubos, se realizó un vórtex a cada tubo para homogeneizar las muestras y se centrifugó (10625 x g, 2 min, 4 °C) recuperándose el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 300 µL de cloroformo a cada muestra, se realizó un vórtex para homogeneizar la muestra y se centrifugó para obtener la fracción de la muestra que contenía el ARN (10625 x g, 5 min, 4 °C). A continuación, se agregaron 150 µL de Acetato de potasio 3 M a cada muestra, se realizó un vórtex y se centrifugó (10625 x g, 5 min, 4 °C), recuperándose el sobrenadante. Para la precipitación del ARN se agregó 1 mL de Isopropanol a cada muestra y se mantuvo por 1 hora a -20 °C. Luego, se centrifugó (10625 x g, 10 min, 4 °C) para obtener el *pellet* de ARN, que fue lavado utilizando 500 µL de etanol (70 % v/v). Luego de un último paso de centrifugación (10625 x g, 2 min, 4 °C), se resuspendió en agua libre de ARNasas. Las muestras obtenidas se trataron con ADNasas (Promega).

4.2.2 Secuenciación del Transcriptoma

4.2.2.1 Construcción de las bibliotecas y secuenciación

Las muestras obtenidas se enviaron a Novogene (Sacramento, USA) para su secuenciación. Primero, la integridad y cantidad de ARN se corroboró utilizando el instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent). Luego, el ARN fue sujeto a dos rondas de hibridación con perlas de oligo(dT)(Dynal). De igual forma, antes de la generación de los ADN complementarios (ADNc) se removió el ARN ribosomal (ARNr) utilizando un kit de Ribo-zero (Illumina). Se utilizaron 100 ng de ARN mensajero obtenido (ARNm) como molde para la generación de los ADNc. Para ello, el ARNm se fragmentó con la adición de un *buffer* de fragmentación 5X (Tris-acetato 200 mM pH 8,2; acetato de potasio 500 mM y acetato magnesio 150 mM) y se calentó a 94 °C por 2 min. Luego de la fragmentación, el ADNc se sintetizó utilizando el ARNm como molde para la transcripción reversa con el agregado de cebadores hexámeros aleatorios (100 µM) utilizando el kit de síntesis de ADNc de Invitrogen. Luego de la síntesis de la primera hebra se agregó un *buffer* de síntesis (Illumina), dNTPs, ARNasa H y una polimerasa I de *Escherichia coli* para la síntesis de la segunda hebra. Para ello se incubó por 2,5 h a 16 °C. La reacción se sometió a una limpieza utilizando una columna QiaQuick PCR (Qiagen) eluida con 30 µL de *buffer* EB (Qiagen). Finalmente, se completó la librería de ADNc mediante la reparación

terminal de los ADNc, la ligación de los adaptadores de la secuenciación, una selección de tamaño y un enriquecimiento con PCR. El control de calidad de la biblioteca se realizó utilizando un fluorímetro Qubit 2.0 (ThermoFisher) para determinar la concentración, el bioanalizador 2100 (Agilent) para estimar el tamaño de los insertos y una PCR cuantitativa para determinar la concentración efectiva de la biblioteca. Las bibliotecas cuya calidad y longitud fueron comprobadas se seleccionaron para ser secuenciadas en una plataforma Novaseq-PE150 (Illumina).

4.2.2.2 Análisis de calidad y ensamblado del transcriptoma

Una vez realizada la secuenciación, las secuencias de los adaptadores se removieron usando el software Cutadapt V 2.10 (Martin, 2011). El control de calidad de las lecturas se realizó con el software FASTQc⁴. Aquellas lecturas con una identificación de bases menor al 99 % se removieron para garantizar el correcto ensamblaje del transcriptoma. Luego del filtrado de los datos, las lecturas de buena calidad se ensamblaron utilizando el software Geneious V 8.0⁵ (Kearse *et al.*, 2012) y como referencia el genoma de *P. pulmonarius* "GCA_012979565.1", disponible en la base de datos de *Assembly* del NCBI con el algoritmo propio del software con 3 iteraciones.

4.2.2.3 Análisis de expresión diferencial

Una vez ensamblado los transcriptomas de la cepa LBM 105 obtenidos en presencia y ausencia de PCBs, se realizó un conteo de la cantidad de lecturas que mapeaban en cada gen del genoma de referencia utilizado en ambas condiciones. Este conteo se normalizó mediante el método de *Trimmed M values* y a partir de los conteos normalizados se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando el software EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) en un entorno de R V 3.6.2. Para cada gen expresado diferencialmente se ajustó el valor p asociado a estos genes mediante el método de Benjamini & Hochberg (1995). Los cambios de expresión se convirtieron a logaritmo en base 2 para un mejor manejo matemático. Aquellos transcritos que presentaban un cambio de expresión logarítmica mayor a 1 o menor a -1, una tasa de descubrimiento falso (FDR, del inglés *False discovery rate*) mayor a 0,1 y un

⁴ <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

⁵ <https://www.geneious.com/>

valor p menor a 0,05 se consideraron como diferencialmente expresados entre las dos condiciones.

4.2.3 Análisis de dominios y ubicación

Se realizó adicionalmente un análisis de dominios funcionales para aquellos genes cuya función no fue definida en el genoma de referencia, mediante el uso de las bases de datos de Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) e Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), para la inferencia de las funciones de las proteínas codificadas por aquellos genes. Además, se realizó una predicción subcelular de las proteínas codificadas por los genes expresados diferencialmente mediante los servidores de Signal IP 4.0 y DeepLoc-1-0. Para la visualización de los datos se utilizó la función heatmap.2 en un entorno de R (V.3.6.2).

4.3. Resultados

Aproximadamente 149,405 millones de lecturas de 150 pares de bases se generaron a partir de la secuenciación de ARN de las muestras de tratamientos y 161,922 millones de lecturas para los controles de *P. pulmonarius* LBM 105 durante la degradación de PCBs. Luego del filtrado de los mismos según su calidad, se realizó un ensamble del transcriptoma de cada condición utilizando la referencia del genoma GCA_012979565.1 de *P. pulmonarius* disponible en la base de datos *Assembly* del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>). A partir de este ensamblaje se obtuvo un total de 293.172.428 transcritos mapeados a un total de 12.066 genes, de los cuales 152.418.217 transcritos pertenecen a la condición control y 140.754.211 al tratamiento con PCBs.

Una vez obtenidos los conteos de las diferentes lecturas en los diferentes genes, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial utilizando el paquete EdgeR en un entorno de trabajo de R (Versión 4. 1. 3). En el Anexo 3a se muestran todos los genes que presentaron una expresión diferencial en relación al control con la función de las proteínas derivadas de dichos genes junto con su localización subcelular. Así también en el Anexo 3b se ven los 100 genes con mayor cambio en su expresión en presencia de los PCBs.

A partir del análisis de la función de las proteínas derivadas de los genes que se expresaron de manera diferencial durante el desarrollo de la cepa LBM 105 en

presencia de PCBs, se pudo observar que hubo cuatro vías metabólicas que tuvieron una mayor implicancia en los procesos llevados a cabo por esta cepa durante la transformación de estos compuestos contaminantes. Entre estos se encontraron aquellos relacionados al metabolismo oxidativo, metabolismo de los xenobióticos, el metabolismo de los lípidos y el metabolismo de los carbohidratos.

4.3.1 Metabolismo oxidativo

Al observar el comportamiento de los genes codificantes para proteínas involucradas en el metabolismo oxidativo del hongo, se evidenció un aumento en la expresión de la mayoría de estas proteínas. En la figura 4.2 se puede observar un *heatmap* con todos los genes que presentaron un patrón de expresión diferencial en presencia de los bifenilos policlorados y que además estuvieron involucrados en el metabolismo oxidativo de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105.

Entre las enzimas observadas se destacó la presencia de lacasas, peroxidasas versátiles fúngicas, reductasas de cadena corta y aldo/ceto reductasas sobreexpresadas en una medida similar a aquellas encontradas en el análisis proteómico total de esta cepa fúngica. La presencia diferencial de estas enzimas también fue observada en los estudios proteómicos discutidos en el siguiente capítulo.

Mediante el estudio de estos genes se pudo observar la presencia de genes identificados como codificantes para enzimas citocromo P450, pertenecientes a la clase E y a los grupos I y IV. A partir del estudio del transcriptoma de la cepa LBM 105 se pudo observar una variedad de genes que codifican para estas proteínas, en su mayoría sobreexpresadas en presencia del contaminante.

En el anexo 3c se pueden observar los 5 genes con mayor expresión en este metabolismo frente a los PCBs.

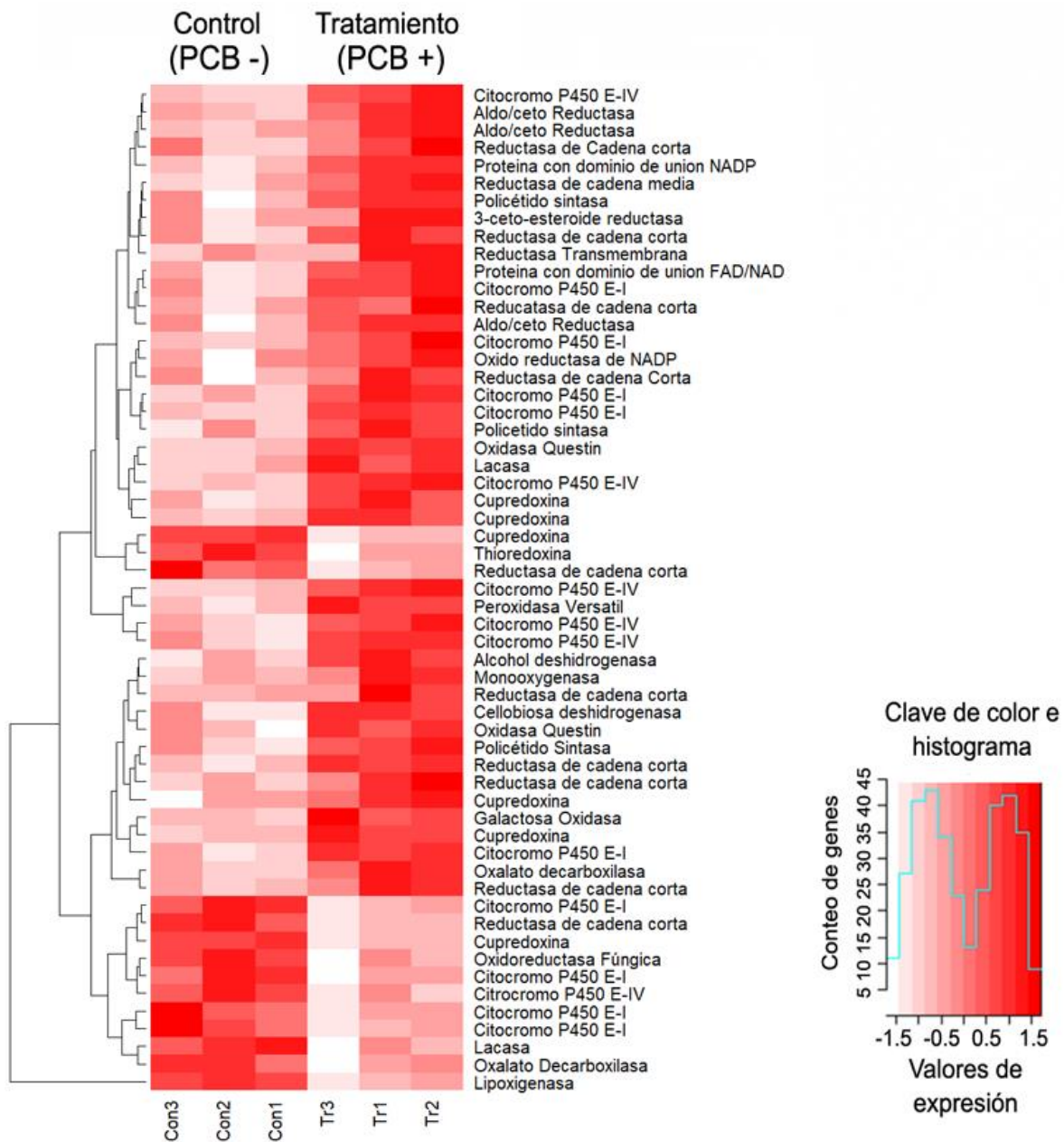


Figura 4.2. Heatmap del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo oxidativo de *P. pulmonarius* LBM 105. Con: Control. Tr: Tratamiento. Los valores se encuentran expresados como un score z de desviación del valor medio de expresión.

Además, se lograron identificar varios genes de cuproproteínas o proteínas con dominio de cupredoxina, que son proteínas que contienen grupos de cobre. El estudio de dominios de estas proteínas logró determinar que solamente contenían uno de estos dominios de unión al cobre, no pudiendo derivar su función ulterior.

Finalmente, se observó la presencia de varios policétido sintasas que son enzimas reductoras que están involucradas en el metabolismo de los policétidos. Las policétido sintasas encontradas en este trabajo presentaron dominios con

función enoíl reductasas, una de las tantas actividades deshidratasas presentes en las policétido sintasas. Debido a su capacidad reductora, estas enzimas presentan una clasificación de función (GO:0016491, proveniente del sistema de clasificación *Gene Ontology*) de actividad oxidoreductasa, por lo que se decidió incluir a dichas enzimas bajo la clasificación de metabolismo oxidativo para su estudio.

4.3.2 Metabolismo de los xenobióticos

Al enfocarse en los genes cuyos productos tienen funciones involucradas en el metabolismo de los diferentes xenobióticos, se observó que presentaron una expresión diferencial aumentada en relación al control.

En este sentido, se observó la presencia de varias dienolactona hidrolasas diferentes, enzimas involucradas en la degradación de clorocatecol, un metabolito secundario formado en la vía de degradación de los bifenilos policlorados. También se evidenció que de todas las dienolactona hidrolasas encontradas, estuvieron sobreexpresadas en cantidad al menos dos veces más en relación con el control (Figura 4.3).

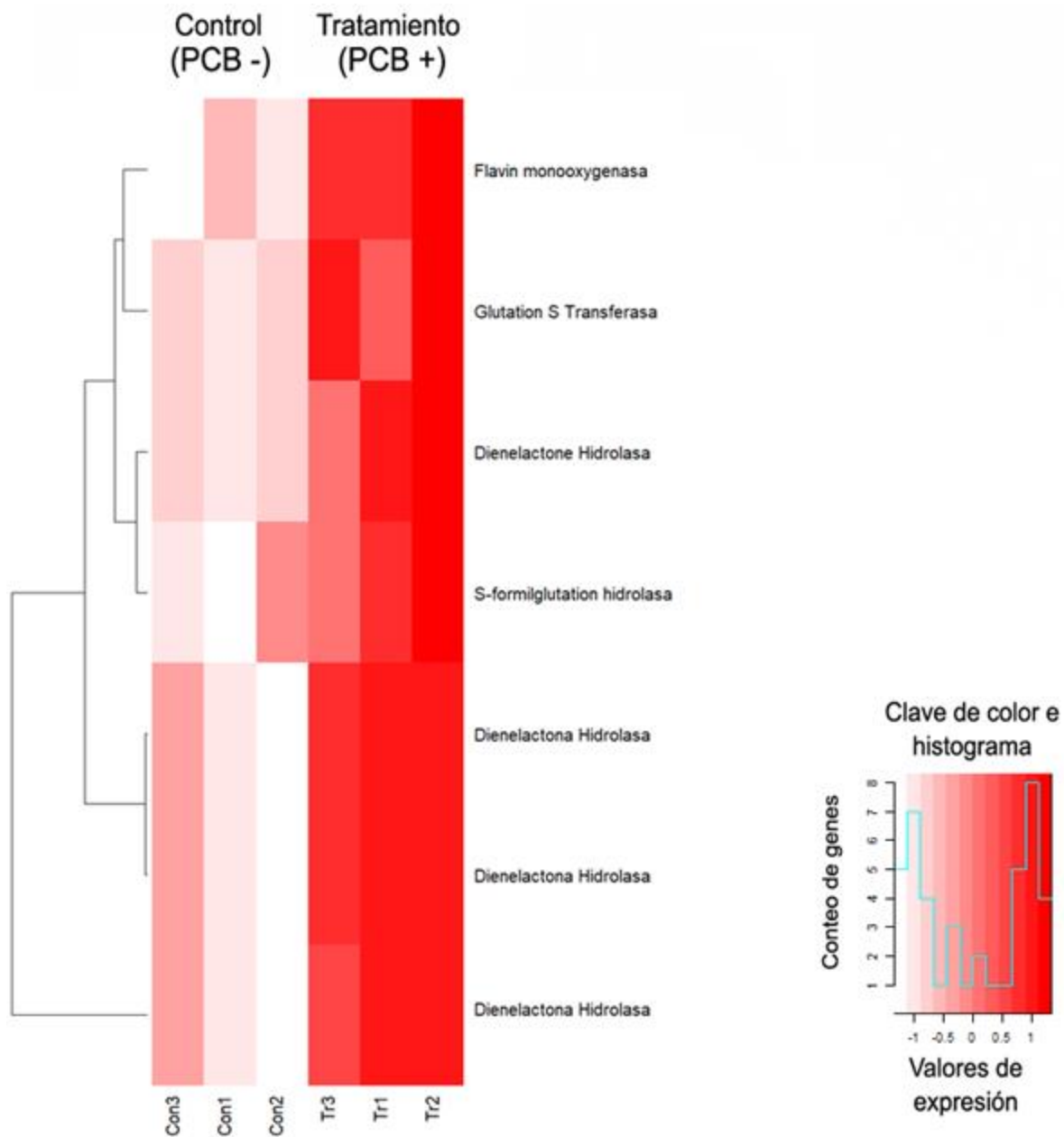


Figura 4.3. *Heatmap* del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo de los xenobióticos de la cepa LBM 105 de *P. pulmonarius*. Con: Control. Tr: Tratamiento. Los valores se encuentran expresados como un score z de desviación del valor medio de expresión.

Además, se encontró un gen de glutatión-S-transferasa sobreexpresado, proteína involucrada en la conjugación de xenobióticos aromáticos altamente electronegativos mediante del tripéptido glutatión.

Finalmente, se puede destacar la presencia sobreexpresada de una flavin monooxygenasa, enzima con una función similar al citocromo P450 durante la transformación metabólica de los xenobióticos, propiciando las primeras

modificaciones a los grupos funcionales de los mismos. Así también se pudo identificar a una S-formilglutación hidrolasa, enzima que mediante la reacción con una molécula de agua permite la formación del glutatión a partir de una molécula de formilglutación, siendo el primero un importante sistema antioxidante no enzimático para la protección del estrés oxidativo producido por la presencia de PCBs.

En el anexo 3d se pueden observar los 5 genes con mayor expresión en este metabolismo frente a los PCBs.

4.3.3 Metabolismo de los lípidos

Al momento de analizar el perfil de expresión de los genes cuyos productos se encuentran involucrados en el metabolismo de los lípidos se pudo observar que existen varios de estos genes que se encuentran sobreexpresados en presencia de los contaminantes (Figura 4.4). La expresión de CDP-diacilglicerol-inositol-3-fosfatidil transferasa, esteroles reductasas y oxidasas estuvo aumentada en todos los tratamientos del medio contaminado con PCBs.

Los análisis de los dominios funcionales de estas proteínas determinaron que su función dentro del metabolismo de los lípidos está relacionada con reacciones redox durante la biosíntesis de diferentes lípidos.

En el anexo 3e se pueden observar los 5 genes con mayor expresión en este metabolismo frente a los PCBs.

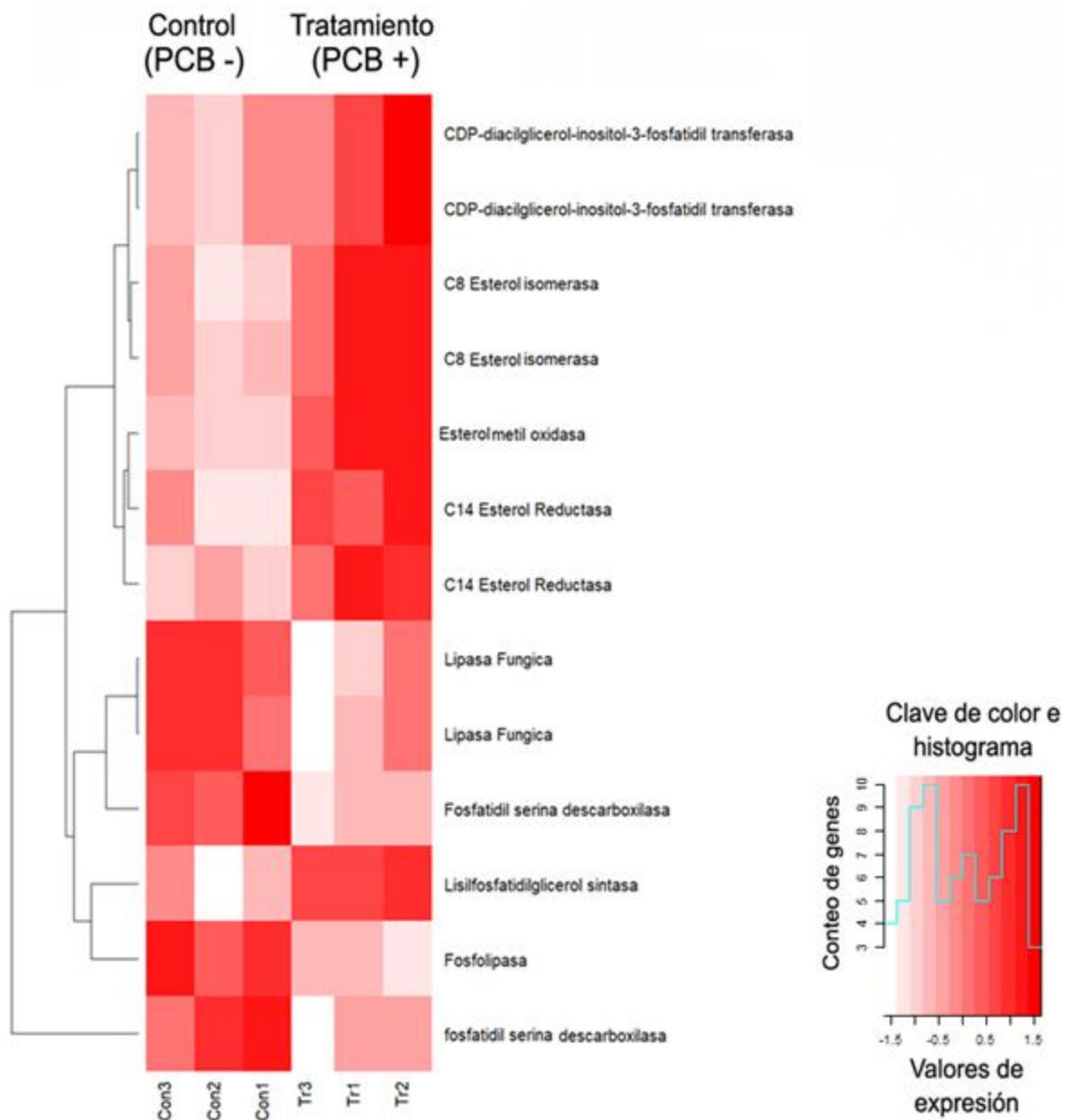


Figura 4.4. Heatmap del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo de los lípidos de *P. pulmonarius* LBM 105. Con: Control. Tr: Tratamiento. Los valores se encuentran expresados como un score z de desviación del valor medio de expresión.

4.3.4 Metabolismo de los carbohidratos

El metabolismo de los carbohidratos es la vía metabólica que sufrió la mayor represión de la expresión frente a los bifenilos policlorados. Al analizarse el perfil de expresión génico a través del estudio transcriptómico de *P. pulmonarius* LBM 105 (Figura 4.5), se observó un patrón similar con el patrón de abundancia diferencial del estudio proteómico (Capítulo 5). La mayoría de los genes

involucrados en el metabolismo de carbohidratos se encontraron con una disminución notable de su expresión en comparación al control, siendo pocos los genes que demostraron un aumento de su expresión en presencia del contaminante, como el caso de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, enzima oxidativa presente en el ciclo del ácido tricarboxílico. En el anexo 3f se pueden observar los 5 genes con mayor expresión en este metabolismo frente a los PCBs.

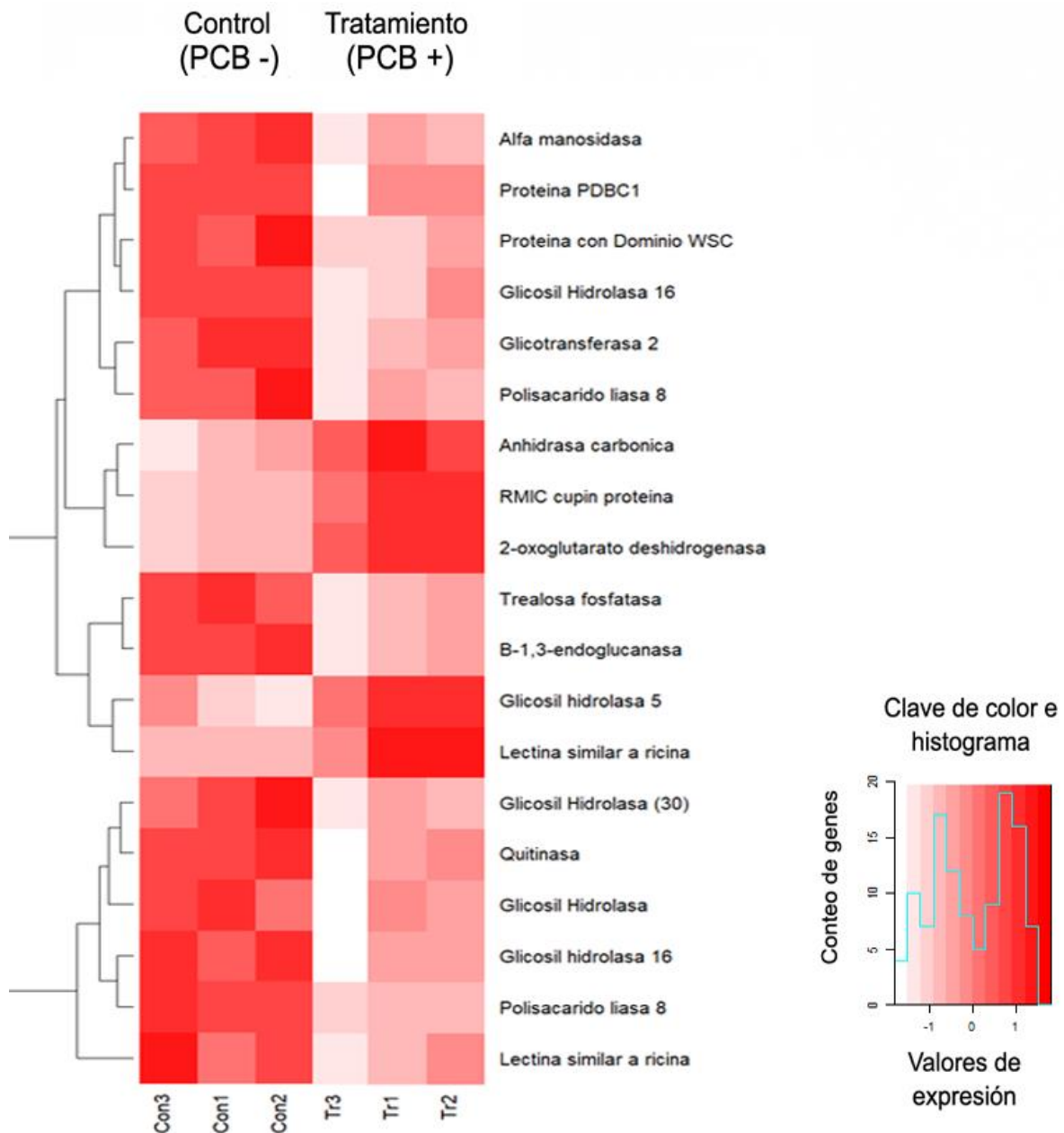


Figura 4.5. Heatmap del análisis de expresión comparativa de los genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos de *P. pulmonarius* LBM 105. Con: Control. Tr: Tratamiento. Los valores se encuentran expresados como un score z de desviación del valor medio de expresión.

4.4. Discusión

4.4.1. Expresión del sistema oxidativo fúngico

Al analizar los resultados obtenidos en el perfil de expresión del metabolismo oxidativo es de especial interés el estudio del comportamiento de las proteínas citocromo P450, cuya expresión se modificó debido a la presencia del contaminante. Las citocromo P450 (CYP450) pertenecen a un grupo de enzimas oxigenasas, también conocidas como monooxigenasas o oxidasas multifuncionales, que catalizan la oxidación de varios compuestos orgánicos mediante la transferencia de electrones al oxígeno (Lin *et al.*, 2022). Las CYP450s forman superfamilias de enzimas que pueden encontrarse en el citoplasma o en la membrana celular y participan de diferentes reacciones de las cuales se puede mencionar transporte, metabolismo y catabolismo de sustratos orgánicos mediante hidroxilación, dealquilación, sulfoxidación, peroxidación y N-óxido reducción (Roccatano, 2015). Existen diferentes formas de clasificar a las CYP450s, una de ellas es su división por número de subunidades de su sistema: las CYP450s de clase B (3 subunidades) y las de clase E (2 subunidades). De esta última clase, se pueden encontrar 5 tipos diferentes de CYP450s, que se diferencian en las reacciones que catalizan (Munro *et al.*, 2007). De las CYP450s identificadas en este trabajo mediante el análisis de dominio utilizando el servidor de InterPro, se pudieron encontrar CYP450 pertenecientes a la Clase E subdivisión I, donde se halla el mayor número y variedad de CYP450s y, por lo general, su función está asociada al metabolismo de sustancias exógenas y al metabolismo de compuestos endógenos fisiológicamente activos, y CYP450s pertenecientes al grupo E subdivisión IV que representan una serie de enzimas relacionados a la producción de micotoxinas fúngicas, la actividad colesterol hidroxilasa y lanosterol desmetilasa (Munro *et al.*, 2007).

La importancia de estas enzimas radica en el hecho de que las CYP450 pertenecientes a los hongos de pudrición blanca han demostrado que son capaces de catalizar la degradación de contaminantes orgánicos aromáticos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (Young *et al.*, 2015), insecticidas (Mori *et al.*, 2021) y benzoatos (Matsuzaki & Wariishi, 2005). Se conoce además que estas enzimas está involucrada en los primeros pasos de degradación de los ácidos clorobenzoicos, resultando en la formación de metabolitos intermedios

monohidroxilados (Stella *et al.*, 2013). Estas CYP450s fúngicas tienen la particularidad de poder llevar a cabo reacciones de hidroxilación, epoxidación, dealquilación, sulfoxidación, desaminación, desulfuración, deshalogenación y nitro reducción, lo que permite la modificación y posterior degradación de los contaminantes (Lin *et al.*, 2022). La capacidad de lograr una deshalogenación de los contaminantes aromáticos resulta una aptitud clave para el proceso de biotransformación de los bifenilos policlorados, sin embargo, la hidroxilación de los PCBs puede llegar a formar metabolitos intermediarios de una toxicidad mayor, como los hidrox-PCBs. Frente a este fenómeno se hace clave la presencia de otras enzimas capaces de degradar rápidamente estos compuestos creados y así evitar una acumulación de compuestos que puedan contribuir al aumento del estrés oxidativo de la célula.

Entre los diversos mecanismos de acción propuestos para la degradación de PCBs, las enzimas oxidasas fúngicas se posicionan como candidatas responsables del ataque y transformación de estos compuestos clorados. Estas fenoloxidasas son capaces de declorar compuestos relacionados a los PCBs (Hirai *et al.*, 2004), hidrox-PCBs y PCBs coplanares (Takagi *et al.*, 2007; Kordon *et al.*, 2010), llevando a una reducción de la toxicidad por la eliminación de los átomos de cloro en posiciones no *orto* de la molécula, reduciendo la toxicidad mediada por el receptor de hidrocarburos de arilo (Loganathan & Masunaga, 2020). En este capítulo se corrobora la presencia de estas enzimas ya que se pudo determinar una sobreexpresión en genes identificados como lacasas y peroxidasas versátiles, acentuando la importancia del sistema enzimático ligninolítico fúngico para poder modificar estos compuestos recalcitrantes. Además, una serie de proteínas oxidasas identificadas con dominios de unión al cobre (cuprodoxinas) se vieron sobreexpresadas en estas condiciones de degradación. Las multicobre oxidasas, como las enzimas lacasas, son un ejemplo de enzimas contenedoras de estos dominios (Stoj & Kosman, 2011). Es probable que estos genes identificados como codificantes para enzimas oxidasas con dominio de cuprodoxina correspondan a diversas lacasas de la cepa LBM 105, que como ya se sabe es capaz de cambiar su perfil de expresión en presencia de PCBs, presentando una diversidad de isoformas de esta enzima (Sadañoski *et al.*, 2019).

Así también es notable el aumento de expresión de enzimas reductasas (aldo/ceto reductasas, seductasas de cadena corta y media) en presencia de los

contaminantes. Ciertas reductasas bacterianas son capaces de deshalogenar productos permitiendo a estos microorganismos aprovechar los halogenuros orgánicos durante la respiración celular (Wang *et al.*, 2018). Las reductasas de cadena corta corresponden a una superfamilia de reductasas identificadas en múltiples organismos, desde procariotas a eucariotas e incluso en virus, y se caracterizan por adoptar un plegamiento de Rossmann y de utilizar NADH o NADPH como fuente para la reducción de sustratos (Fellows *et al.*, 2018). En cambio, las aldo/ceto reductasas pertenecen a una superfamilia que propicia la reducción de un rango amplio de compuestos carbonilos como aldehídos aromáticos y alifáticos, cetonas, esteroides e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Tanokura *et al.*, 2015), las cuales utilizan también NADPH para su función reductora, evidenciado por sus dominios de unión a este. Si bien puede existir una acción directa de modificación de los bifenilos policlorados por parte de estas enzimas, la mayor contribución posible al metabolismo fúngico es la de poder proveer un equilibrio, en términos de compuestos, de poder reductor (como el NADH y NADPH) disponibles en la célula. Esta hipótesis surge de la definición del balance de ROS optimizada, planteada por el grupo de trabajo de O'Rourke (Aon *et al.*, 2010) que especifica que la pérdida del balance redox conlleva a una sobreproducción de ROS, no solo por un aumento del ámbito oxidativo dentro de la célula, sino también por un aumento de estos compuestos con capacidad reductora (Aon *et al.*, 2010; Cortassa *et al.*, 2014). Es por ello que la sobreexpresión de estas enzimas está más asociada a un mecanismo de mantenimiento del equilibrio redox dentro de la célula por medio del manejo de la cinética de compuestos de capacidad reductora.

4.4.2. Expresión del metabolismo de xenobióticos

Además de la expresión diferencial del metabolismo oxidativo planteada previamente, el análisis de la modificación de la expresión de aquellos genes involucrados en el metabolismo de los xenobióticos es determinante para poder entender y explicar las particularidades atribuidas a la cepa LBM 105 en relación con su capacidad de remover los bifenilos policlorados.

De forma similar a lo sucedido durante el análisis del proteoma total de dicha cepa, se pudo identificar la sobreexpresión de genes de glutatión-S-transferasas y dienolactona hidrolasas, dos enzimas involucradas en la transferencia de grupos

glutación a compuestos orgánicos aromáticos y en la degradación del clorocatecol, respectivamente. La glutatión-S-transferasa conjuga un tripéptido glutatión a los xenobióticos hidrofóbicos y que presentan átomos muy electrofílicos (como el cloro). En el caso de que el xenobiótico contenga suficientes átomos de este tipo, la conjugación dada por esta enzima es directa, sin ninguna modificación anterior del compuesto (Parkinson & Ogilvie, 2008). La expresión diferencial de dicha proteína puede indicar una posible función en la modificación intracelular de los PCBs mediante esta vía de la conjugación, incluso frente al efecto disruptor de los PCBs frente al glutatión (Deng *et al.*, 2019).

Es destacable sin embargo la presencia de la expresión aumentada de un gen de flavino monooxigenasa durante la degradación de PCBs. Este tipo de enzimas están involucradas, junto con las CYP450s, en la primera fase del metabolismo de los xenobióticos y se hipotetiza que llevan a cabo alrededor del 6 % de todas las reacciones de esta fase (Basaran & Benay, 2017). Estas enzimas poseen un amplio rango de sustratos, los cuales pueden modificar mediante el metabolismo oxidativo (utilizando NADPH), fosfinas, hidrazinas, sulfitos, compuestos que contienen átomos de boro, yodo, selenio y aminas primarias, secundarias y terciarias, transformando así xenobióticos lipofílicos en metabolitos polares, oxigenados, con una mejor capacidad para la excreción y modificación (Basaran & Benay, 2017). Esta enzima entonces podría tener una acción sinérgica con las demás enzimas oxidativas en las primeras etapas de modificación de los PCBs.

Finalmente, la sobreexpresión del gen de una S-formilglutatión hidrolasa resulta destacable en las condiciones ensayadas. Esta enzima cataliza la hidrólisis del S-formilglutatión para producir ácido fórmico y glutatión. Se cree que la función formadora de glutatión por parte de esta enzima podría tener un rol importante en la oxidación reversible de las esterasas (Legler *et al.*, 2012). Esta capacidad de poder contribuir a los procesos de reversión de la oxidación de enzimas dentro de la célula fúngica podría ser ventajoso en un ambiente altamente oxidativo como el de la célula en presencia de los PCBs. Además, como se discutió anteriormente, el glutatión forma parte del sistema antioxidante no enzimático de la célula, permitiendo a las enzimas capaces de formar este tripéptido a partir de precursores como el s-formilglutatión contribuir a amortiguar el efecto tóxico de los PCBs, debido a un aumento del estrés oxidativo.

4.4.3. Peroxidación de los lípidos y modificación del metabolismo lipídico

La membrana fosfolipídica es una diana común para el daño oxidativo causado por las ROS. En un proceso denominado peroxidación de lípidos, se tiene una reacción en cadena de radicales mediante una abstracción inicial de un átomo de hidrógeno de la cadena lateral de los lípidos insaturados, determinado comúnmente por la acción de un radical hidroxilo, formando un radical carbonado. Este radical formado es capaz de reaccionar con el oxígeno para formar peroxilo, un radical capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de otra molécula de lípido, extendiendo así la reacción en cadena (Li *et al.*, 2009). Los productos de esta peroxidación lipídica son conocidos como especies electrofílicas reactivas (RES, del inglés *Reactive electrophile species*), o también conocidas como lípidos electrófilos u oxilipinas, y son capaces de modificar una variedad de compuestos nucleofílicos como lípidos de membrana, ADN y proteínas (Patel & Williamson, 2016). La producción de RES no solo está mediada por la peroxidación lipídica, sino que existen enzimas como las lipoxigenasas que también pueden generar estas especies. Durante el análisis transcriptómico se observó una disminución de la expresión de un gen codificante para lipoxigenasa, debido a que su actividad podría contribuir a la producción de RES, siendo nociva para la célula fúngica.

En este mismo contexto, se identificó la sobreexpresión de varios genes involucrados en la biosíntesis de ergosteroles en los tratamientos en presencia de PCBs. El ergosterol es un lípido troncal para la viabilidad fúngica, así como también para la fluidez y la permeabilidad de la membrana celular fúngica (Li *et al.*, 2021). Además, el ergosterol junto con los esfingolípidos y otros esteroides constituyen microdominios en la membrana conocidos como balsas de lípidos en la membrana celular fúngica (Dhingra & Cramer 2017; Francois 2016; Song *et al.* 2020). Estos microdominios suelen estar enriquecidos con diversas proteínas de importancia biológica como bombas iónicas, transportes de nutrientes y bombas de eflujo de drogas, que cumplen un rol troncal en la adaptación y la respuesta frente a los diferentes tipos de estrés (Athanasopoulos *et al.* 2019; Francois 2016). Las enzimas esteroles reductasas y esteroles oxidasas son necesarias para la producción de estos lípidos de membrana, y en el caso de los hongos se comprobó que las reductasas

C14 son esenciales para el metabolismo del ergosterol, impactando directamente en la viabilidad de la célula fúngica y en la homeostasis de la misma (Li *et al.*, 2021).

Por ello, el perfil de expresión diferencial observado en relación al metabolismo lipídico surge como una respuesta no solo al balance de las condiciones redox mediante la expresión de oxidasas y reductasas, reprimiendo además la expresión de enzimas con capacidad de contribución a la peroxidación lipídica, sino que además se genera para favorecer la producción de ergosterol y los esteroides formadores de las balsas de lípidos.

4.4.4. Represión del metabolismo de los carbohidratos

A partir del análisis de la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos, se puede observar una disminución global de la expresión de estos genes involucrados en estas vías metabólicas.

Si bien la mayoría de los genes estudiados en el transcriptoma sufrieron una disminución de la expresión, el gen de una 2-oxoglutarato deshidrogenasa aumentó marcadamente su expresión frente a los bifenilos policlorados. Esta enzima participa en el ciclo del ácido tricarboxílico catalizando la descarboxilación oxidativa del 2-oxoglutarato generando succinil-coenzima A y dióxido de carbono. Este gen incluso está propuesto como un marcador genético de expresión para el análisis del crecimiento y la respiración en hongos (Hasby *et al.*, 2021). Además se demostró que, en mamíferos, la 2-oxoglutarato deshidrogenasa se encuentra sobreexpresada en condiciones de estrés, mediando la producción de energía, en forma de NADPH y ATP (Graf *et al.*, 2013). En el contexto de este estudio, esta enzima podría significar una inducción del ciclo de ácido tricarboxílico para poder aportar la energía necesaria para llevar a cabo los demás procesos necesarios para la supervivencia del hongo, y para la remoción del contaminante al que se viera expuesto.

4.5. Conclusión

Los perfiles de expresión génica analizados a lo largo de este capítulo apuntan a una adecuación del metabolismo fúngico al estrés oxidativo generado por la presencia de los bifenilos policlorados y las reacciones enzimáticas necesarias para su modificación.

Enzimas oxidasas fúngicas como lacasas, peroxidasas, flavino

monooxigenasas y las CYP450s aparecen como las principales involucradas en las primeras modificaciones de los contaminantes, así como las responsables de la ruptura inicial de la molécula de bifenilo para la formación de los ácidos clorobenzóicos. Sin embargo, existe una inducción sobre muchas enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo que no modifican de forma directa a los PCBs, sino que cumplen el rol de mantener el balance redox dentro de la célula mediante la utilización y creación de agentes reductores, como el NADPH, buscando no solo amortiguar los procesos de oxidación formados por la creación de ROS durante el metabolismo de los PCBs, sino también controlando los niveles de estos agentes ya que la inclinación del ambiente redox a uno que sea altamente reductor también viene acompañado de una cascada de radicales de oxígeno capaces de dañar irreversiblemente a la célula.

Se pudo corroborar, además, la expresión de enzimas involucradas en las fases posteriores del metabolismo de los xenobióticos, como las glutatión-S-transferasas y las dienolactona hidrolasas. En este análisis además, se pudo observar la contribución de una S-formilglutatión hidrolasa con capacidad de formar glutatión, un tripéptido con acción antioxidante y necesario para la enzima glutatión-S-transferasa, por lo que demuestra el rol de este sistema de conjugación en la reducción de la toxicidad de los PCBs.

Finalmente, se destaca la capacidad de los bifenilos policlorados de afectar al metabolismo de los carbohidratos, donde se pudo observar una disminución de la expresión de muchos de los genes involucrados. Es evidente que el ambiente producido por la presencia de PCBs y las modificaciones de estos compuestos, requiere de una adaptación tanto del sistema de tolerancia al estrés oxidativo como el de obtención de energía mediante la metabolización de compuestos carbonados. La sobreexpresión del gen de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa podría dar un indicio de que en este ambiente el ciclo del ácido tricarbóxico sería una de las vías de preferencia para la manutención de las necesidades energéticas del hongo.



Capítulo 5 Análisis Proteómico

5.1. Introducción

De la misma forma que los estudios transcriptómicos aportan información acerca de la expresión de genes involucrados en la transformación metabólica de los bifenilos policlorados por la cepa fúngica en análisis, los estudios proteómicos pueden brindar información adicional y complementaria para el conocimiento de dichos procesos. El término “proteómica” fue acuñado por primera vez en los años 90 (Anderson & Anderson, 1998), es reconocida como una rama de la bioquímica que ha aportado importantes herramientas y metodologías en el campo de la identificación proteica. Los principios fundamentales de la proteómica incluyen la habilidad de identificar y cuantificar un determinado conjunto de proteínas (conocido como proteomas) que son expresados en una dimensión temporo-espacial determinada, dado una célula, tejido u organismo específico, bajo una condición en particular (Jan *et al.*, 2019; Noor *et al.*, 2021).

Actualmente, la mayoría de los estudios de esta rama utilizan la técnica analítica de espectrometría de masas (MS, del inglés *Mass spectrometry*). La misma es usada para la identificación y cuantificación proteica en un estado gaseoso según la relación masa/carga de las muestras en un sistema de vacío, para la caracterización de la secuencia, así como para la localización celular y el estudio de la expresión proteica (Noor *et al.*, 2021).

Este tipo de estudio a gran escala permite el análisis de cuantificación de proteínas, interacción proteína-proteína y modificaciones postraduccionales (Chakraborty *et al.* 2015; Minton 2016). Asimismo, puede ser usado para determinar qué proteínas están sobreexpresadas o reprimidas en respuesta a la presencia de un contaminante determinado, siendo un buen indicador de las vías metabólicas que están implicadas en la modificación de un compuesto dado (Chelaliche *et al.*, 2021).

Mediante análisis proteómicos se pudo determinar el rol de las enzimas citocromo tipo *c* de especies del género *Geobacter* durante la biorremediación de uranio (Yun *et al.*, 2016); así como también los cambios fisiológicos que ocurren en organismos utilizados en estrategias de fitorremediación, y para el análisis de las vías de degradación de contaminantes y la selección de cultivares resistentes (Mohanty, 2021).

En el estudio de la micorremediación, esta técnica ha sido utilizada en las experiencias de la remoción de pesticidas como el *alachloro* (*alachlor*) por el hongo

Paecilomyces marquandii (Szewczyk *et al.*, 2015), y estudios realizados al hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium* durante la degradación de ácidos benzoicos (Matsuzaki *et al.*, 2008), donde se determinaron las proteínas involucradas en estos procesos llevados a cabo por estos hongos.

Debido a las características particulares de los hongos utilizados en las estrategias de micorremediación, específicamente su capacidad de secretar enzimas con potencial acción de transformación de xenobióticos, resulta interesante centrarse en el estudio de estas proteínas extracelulares, combinando así esta información con la del proteoma intracelular. Dentro de la rama de la proteómica se puede definir un estudio dirigido únicamente a las proteínas de la matriz extracelular, proteínas que se desprenden de la membrana celular y las proteínas de secreción externa. El estudio de este grupo particular de proteínas se denomina estudio secretómico y es caracterizado por ser dinámico y por verse alterado en respuesta a estímulos ambientales (Caccia *et al.*, 2013; Cortázar *et al.*, 2014).

En este capítulo se presentará el estudio de las proteínas con una abundancia diferencial relativa durante la degradación de los bifenilos policlorados llevada a cabo por *P. pulmonarius* LBM 105 mediante una aproximación de proteómica integral y secretómica, buscando relacionar dicha abundancia a las vías metabólicas involucradas en la modificación de los PCBs.

5.2. Materiales y Métodos

5.2.1 Preparación de las muestras para el análisis proteómico intracelular

Para el análisis proteómico integral se utilizó el micelio obtenido en los ensayos de remoción de bifenilos policlorados de la sección 3.2.1.2 de este trabajo de tesis, por triplicado. Este micelio se obtuvo por centrifugación en frío (4695xg por 15 min, 4 °C) e inmediatamente fue sometido a una ruptura celular utilizando nitrógeno líquido con ayuda de un pilón y mortero. Luego de la ruptura, el lisado se colocó en tubos de 1,5 mL y se agregaron 500 µL de una solución de *buffer* de extracción, cuya composición era Tris-HCl 0,1 M pH 7; NaCl 1,5 M; EDTA 0,05 M y β-mercaptoetanol 10 mM. El lisado se incubó junto con el *buffer* a temperatura ambiente por 1 h y luego se sometió a una centrifugación (10625xg, 10 min, 4 °C) recuperándose el sobrenadante con el extracto proteico. Se determinó la

concentración proteica de cada muestra utilizando un Kit de determinación proteica Pierce TM de Ácido Bicinconínico (Thermo Scientific). Una vez determinada la concentración proteica de cada muestra, se redujo el extracto proteico agregando una solución de ditioneol a una concentración final de 10 mM por muestra e incubando por 45 min a 56 ± 1 °C. Luego de la reducción, se agregó una solución de iodoacetamida para la alquilación de los residuos de cisteína en las proteínas, hasta alcanzar una concentración final de 20 mM e incubando por 45 min a temperatura ambiente en oscuridad.

Finalmente, para precipitar las proteínas se agregó un volumen de ácido tricloroacético 100 % (p/v), igual a una quinta parte del extracto proteico, y se lo almacenó a -20 °C por 2 h. Todas las muestras se centrifugaron (10625xg, 10 min, 4 °C) y el *pellet* obtenido se lavó 3 veces con 500 µL de acetona fría (4 °C). En la Figura 5.1 se puede observar el flujo de trabajo para el análisis proteómico integral llevado a cabo.

5.2.2 Preparación de las muestras para el análisis secretómico

Para el análisis de las proteínas secretadas por la cepa LBM 105, o también llamado estudio secretómico, se utilizó parte del sobrenadante de cada uno de los tratamientos y controles descritos en la sección 3.2.1.2, por triplicado. El procedimiento de adecuación de las muestras se realizó con un paso adicional de filtrado inicial del sobrenadante de los tratamientos y controles utilizando filtros de 0,22 µm (Chromafil[®] Extra) para remover cualquier remanente celular que hubiera quedado en suspensión. Luego, se procedió a realizar los pasos de cuantificación, reducción, alquilación y precipitación como se mencionó en la sección 5.2.1.

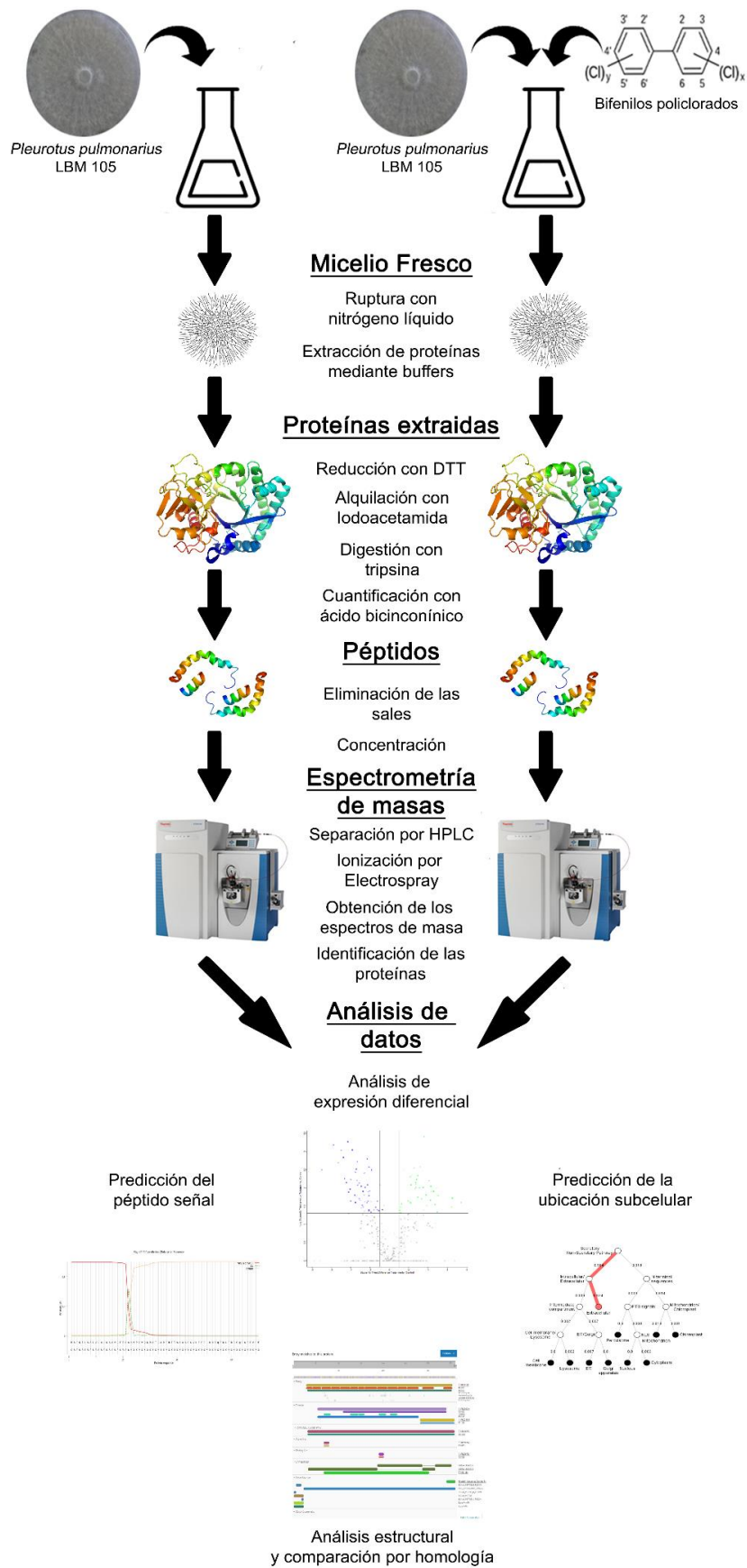


Figura 5.1. Flujo de trabajo para el análisis proteómico de la cepa LBM 105 durante la degradación de bifenilos policlorados (Adaptado de Chelaliche *et al.*, 2021).

5.2.3 Análisis de los péptidos obtenidos por espectrometría de masas

5.2.3.1 Digestión trípica de las proteínas

Las muestras de ambos experimentos se enviaron al “Centro de estudios químicos y biológicos por espectrometría de masas” (CEQUIBIEM) en Buenos Aires para su procesamiento. Allí, los *pellets* obtenidos de ambos procedimientos se resuspendieron en un *buffer* bicarbonato de amonio (50 mM, pH 8) junto con 200 ng de tripsina (Promega®) en un volumen final de 50 μ L, incubando por 12 h. A continuación, las muestras se liofilizaron utilizando un concentrador SpeedVac y luego se resuspendieron en 10 μ L de ácido fórmico al 0,1 % (v/v), finalizando con la eliminación de sales y concentración de péptidos utilizando Zip Tip con resina C18.

5.2.3.2 Separación de las muestras por nanoHPLC

A partir de la digestión con tripsina se obtuvieron los péptidos que se separaron utilizando un nanoHPLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a un electro spray EASY-SPRAY (Thermo Scientific). Para ello las muestras se colocaron en una pre-columna de C18 PepMap (ID: 75 μ m, Longitud: 20 mm, tamaño de partícula: 3 μ m) y luego se los proceso a través de una columna EASY-SPRAY Accucore (ID: 75 μ m, Longitud: 150 mm, tamaño de partícula: 3 μ m) utilizando las siguientes condiciones:

- Temperatura de 35 °C
- Flujo de 300 nL/min
- Solución A: Agua con 0,1 % de Ácido fórmico
- Solución B: Acetonitrilo con 0,1 % de Ácido fórmico

La separación de los péptidos en este caso se llevó a cabo usando un gradiente de 0 % - 35 % de la solución B por 110 min y un gradiente de 35 % - 95 % de la solución B por 1 min.

5.2.3.3 Identificación de los péptidos

Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un espectrómetro Q-*exactive* (Thermo Scientific). Luego del primer escaneo de los espectros de masas

(*Full Scan MS*) se seleccionaron los 12 iones más intensos para su disociación en una celda de disociación de alta colisión, obteniéndose como resultado sus espectros de fragmentación. Los espectros obtenidos se analizaron con el software *Proteome Discoverer* (Thermo Scientific) utilizando una base de datos para el género *Pleurotus*. Para este análisis se permitieron 2 errores de corte por parte de la Tripsina, una tolerancia de masa del ion precursor de 10 ppm, una tolerancia de masa del ion de 0,05 Dalton, la oxidación como una modificación dinámica y la Carbamidometilación como una modificación estática.

Todas las proteínas que luego del paso de identificación se definieron como “Proteínas no caracterizadas” se analizaron posteriormente utilizando las bases de datos de *Uniprot*⁶ (Universal Protein Resource, <http://www.uniprot.org/>) e Interpro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, Blum *et al.*, 2020) para la búsqueda y caracterización de los dominios de las proteínas y así inferir su posible función. De la misma forma, se predijo la localización subcelular de las proteínas utilizando los servidores de Signal IP 4.1⁷ (Petersen *et al.*, 2011) y DeepLoc-1.0⁸ (Almagro Armenteros *et al.*, 2017).

5.2.3.4 Análisis de expresión diferencial

La cuantificación relativa de las proteínas (tanto las caracterizadas como no caracterizadas) se llevó a cabo con el software *Perseus* (Tyanova *et al.*, 2016) y se analizó con la prueba *t* de Student. Se consideraron con mayor abundancia a aquellas proteínas cuya cantidad supere al control en dos veces o con menor abundancia a aquellas proteínas que tengan al menos dos veces su cantidad disminuida en relación al control, en ambos casos el valor *p* de la prueba *t* de Student debería ser menor a 0,05 para que esta diferencia sea considerada estadísticamente significativa. Para tener una aproximación cuantitativa de aquellas proteínas que solo se encontraron específicamente en una condición se calculó el índice exponencialmente modificado de abundancia proteica (emPAI, del inglés *Exponentially modified protein abundance index*, Ishihama *et al.*, 2005). A partir de la definición del índice de abundancia proteica definido como:

⁶ UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic acids research*, 2021, vol. 49, no D1, p. D480-D489.

⁷ <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-4.1>

⁸ <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?DeepLoc-1.0>

$$PAI = \frac{N_{obs}}{N_{obst}}$$

Donde el N_{obs} es el número de péptidos observado por proteínas en la muestra y N_{obst} es el número observable de péptidos por proteína obtenida de una digestión *in silico* de estas proteínas. A partir de este parámetro se puede definir al emPAI como:

$$emPAI = 10^{PAI} - 1$$

5.3. Resultados

5.3.1 Proteoma de *P. pulmonarius* LBM 105 durante la degradación de bifenilos policlorados

5.3.1.1 Identificación de las proteínas

A partir del análisis proteómico total obtenido de la cepa LBM 105 en condiciones de presencia y ausencia de PCBs realizado mediante espectrometría de masas, se obtuvieron un total de 705 proteínas identificadas utilizando el software *Proteome Discoverer*. De estas 705 proteínas identificadas, 111 se encontraron únicamente en los tratamientos contaminados con PCBs (Anexo 5) y 390 se encontraron en los controles libres de PCBs (Anexo 6). Las demás proteínas estuvieron presentes en ambas condiciones.

Mediante la prueba *t* de Student utilizando el software *Perseus*, se pudo observar que un total de 92 proteínas mostraban un patrón de abundancia diferencial, estando aumentadas (Anexo 4) o disminuidas en su cantidad (Anexo 5).

5.3.1.2 Análisis funcional de dominios proteicos

A partir del análisis funcional de los dominios de las proteínas se puede observar que la presencia de los PCBs favorece la síntesis de proteínas involucradas en los procesos oxidativos de la célula fúngica.

De las proteínas que mostraron una síntesis aumentada en presencia de los PCBs se observó un alto número de reductasas (tales como reductasas de cadena corta y aldo/ceto reductasas) así como también de oxidasas fúngicas características (lacasas, galactosa oxidasas y peroxidasas versátiles). De las proteínas

involucradas en el metabolismo de compuestos aromáticos se observó el aumento de una dienolactona hidrolasa (A0A067P4E6). Se destacaron además dos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas, que en presencia de PCBs mostraron un aumento en su abundancia de 6 veces más que en la condición control. Finalmente, algunas proteínas ribosomales presentaron un aumento en su síntesis en presencia de PCBs, pero al mismo tiempo se evidenció una disminución de proteínas de la misma familia de la misma magnitud, lo que indicaría un cambio del perfil de proteínas ribosomales en términos más cualitativos que cuantitativos.

A partir del análisis de las proteínas que se encontraban reprimidas en presencia de los PCBs, se pudo observar que una alta proporción de éstas estaban involucradas en el metabolismo de los carbohidratos (Figura 5.2). De la misma forma, proteínas involucradas en la dinámica del plegamiento y la vida media de las demás proteínas fueron afectadas negativamente, ya que se vio una disminución de proteínas con actividad proteolítica y proteínas chaperonas (como las chaperonas *Heat shock protein 70* y *Heat shock protein 90*). Finalmente, se observó que algunas proteínas con funciones estructurales o involucradas en el transporte intracelular, como la septina fúngica, actinas y β -tubulinas, mostraron una disminución de su síntesis frente a los PCBs.

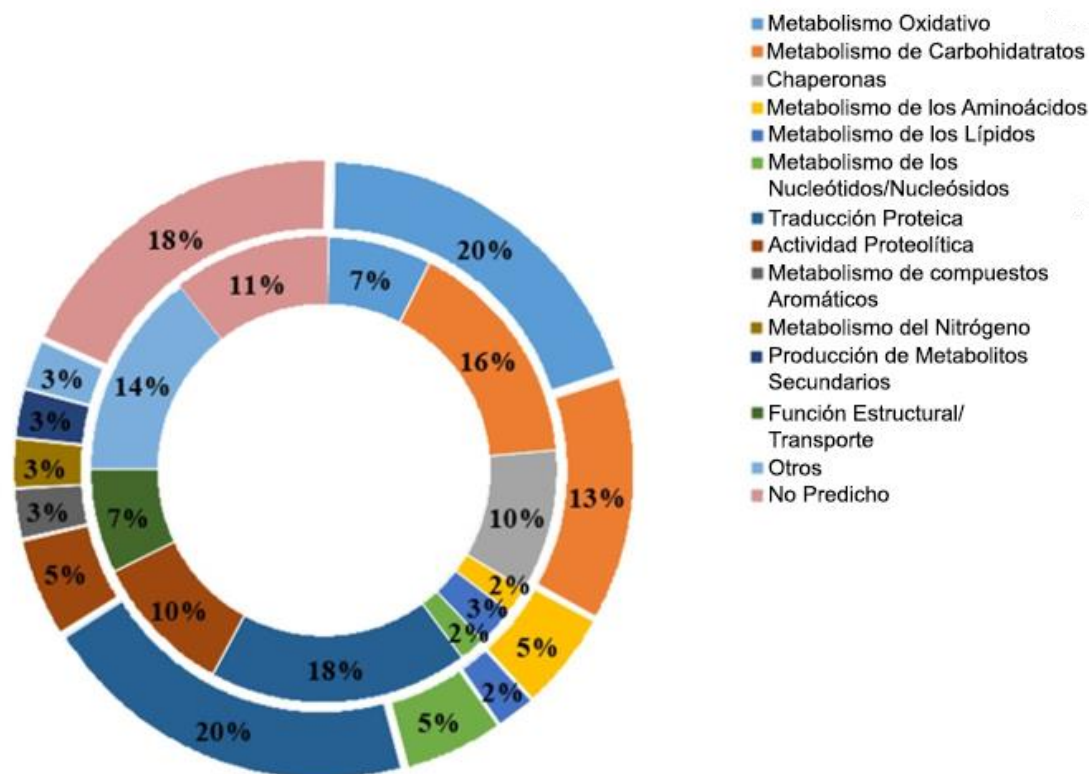


Figura 5.2 Distribución de los procesos biológicos afectados de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. El anillo exterior representa a las proteínas con síntesis aumentada en relación al control y el anillo interior representa aquellas enzimas cuya síntesis se vio reprimida en relación al control. Todas las proteínas de los procesos identificados presentaron una abundancia diferencial con un $p < 0,05$ según la prueba t de Student (adaptado de Chelaliche *et al.*, 2021).

5.3.1.3 Análisis de localización subcelular

En la figura 5.3 se observa la localización subcelular de todas las proteínas que mostraron modificación en su síntesis en presencia de los PCBs. En esta figura se puede observar que la mayoría de las proteínas cuya abundancia aumentó se concentraban en la porción del citoplasma, mitocondria y el ambiente extracelular. Al analizar las proteínas que mostraron una disminución en su abundancia se observó que, de éstas, la mayoría se ubicaron en el citoplasma de la célula fúngica, mientras que las proteínas remanentes se encontraban igualmente distribuidas en los demás compartimientos subcelulares.

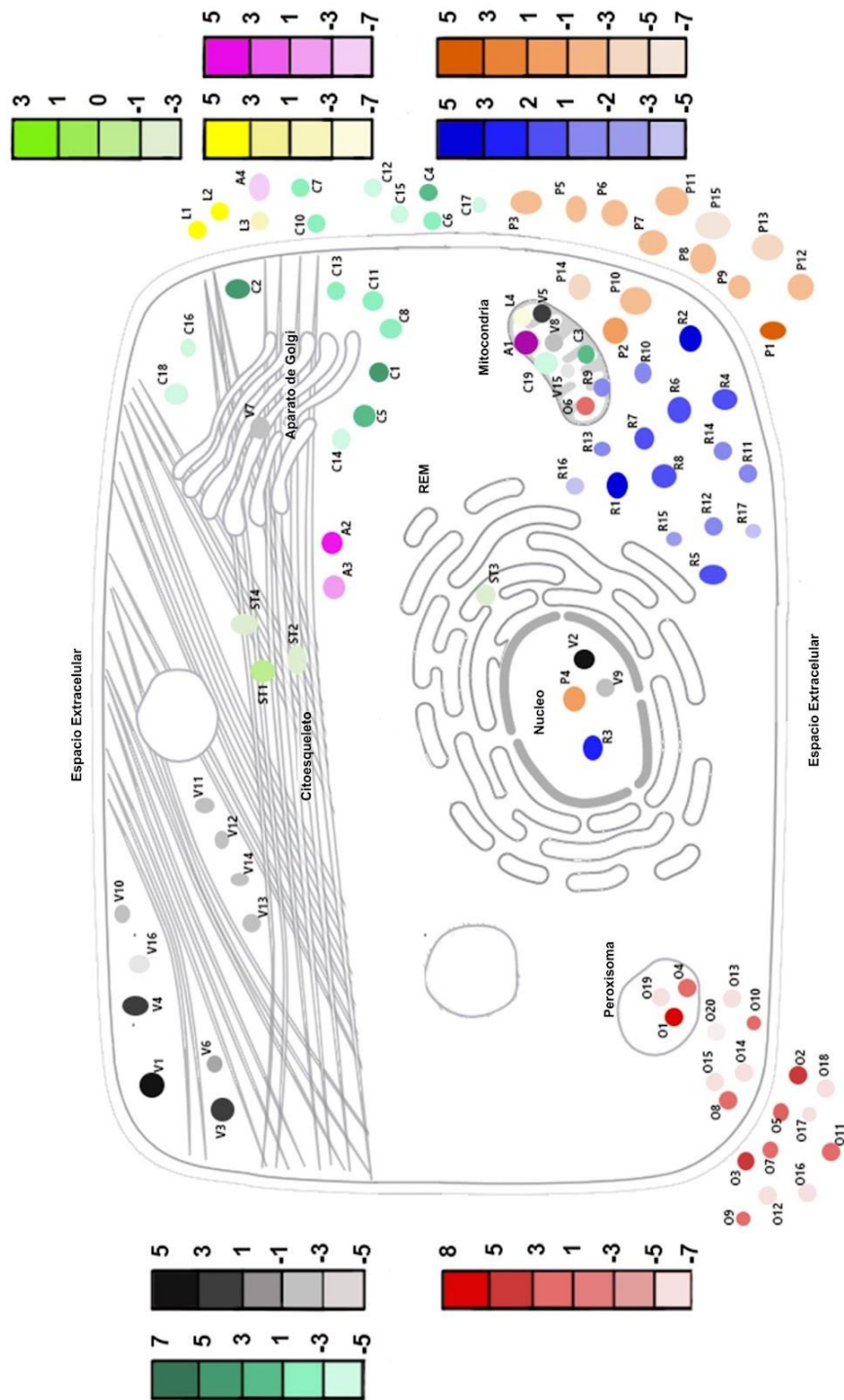


Figura 5.3. Localización subcelular predicha de las proteínas con abundancia diferencial en el tratamiento del medio con PCBs. Cada punto representa una proteína, el color de la misma refleja el proceso metabólico involucrado y la intensidad del mismo refleja los cambios en su síntesis en relación al control, expresados en una escala de Log_2 . (O) Metabolismo oxidativo - Color Rojo. (L) Metabolismo de los lípidos - Color Amarillo. (C) Metabolismo de los carbohidratos - Color verde oscuro. (P) Actividad peptidasa - Color naranja. (A) Metabolismo de los Aminoácidos - Color rosado. (R) Traducción y transcripción del ADN - Color azul. (ST) Estructura y transporte - Color verde claro. (V) Procesos biológicos varios - Color Negro. REM: Retículo endoplasmático (adaptado de Chelaliche *et al.*, 2021).

5.3.1.4 Proteínas únicas en cada condición de cultivo

Entre las proteínas únicas encontradas en la condición de exposición a los PCBs se destaca la presencia de proteínas que están activamente involucradas en el metabolismo oxidativo y en la respuesta al estrés oxidativo. Se pudo observar la presencia de dos catalasas fúngicas (Q876Y9, A0A067NHY5) con valores altos de emPAI (13,45 y 10,54 respectivamente) lo que indica un alto nivel de síntesis para estas dos enzimas involucradas en la atenuación del estrés oxidativo (Anexo 6). Del mismo modo se identificó la presencia de enzimas lacasas propias de esta condición (A9UCA0, Q2VT18), aldo/ceto reductasas (A0A067N6F8), reductasas de cadena corta (A0A067N7V9, A0A067P208), todas ellas involucradas en el metabolismo oxidativo del hongo. Así también, se identificaron enzimas involucradas en el metabolismo de los xenobióticos como la dienolactona hidrolasa (A0A067NDE9), lactoilglutación liasa (A0A067NUY3) y glutati6n-S-transferasa (A0A067NRW7) en presencia de PCBs.

Analizando las proteínas únicas de la condición control, se pudo observar la presencia de proteínas involucradas en la traducci6n proteica, transcripci6n del ADN y metabolismo del carbohidrato. Se observ6 que la cantidad de proteínas involucradas en estos procesos era casi el doble que el de las proteínas únicas presentes en la condici6n de exposici6n a PCBs.

Finalmente, es necesario recalcar que se identific6, en la condici6n control, la enzima citocromo P450, una prote6na relacionada a los primeros pasos del metabolismo de xenobi6ticos, mientras que no fue observada ni como enzima con expresi6n diferencial ni presente en la condici6n expuesta a los PCBs.

5.3.1.5 Análisis secret6mico

A partir del análisis secret6mico de la cepa LBM 105, realizado en condiciones de degradaci6n de PCBs y en la condici6n control, sin exposici6n al mismo, se lograron identificar un total de 62 prote6nas, de las cuales 17 de ellas fueron encontradas únicamente en presencia del contaminante y 22 en ausencia del mismo. En relaci6n a las prote6nas con abundancia diferencial, 23 prote6nas se encontraron con un cambio en su s6ntesis cuando estaban en presencia del contaminante.

De las proteínas con su síntesis aumentada en presencia de los contaminantes se debe destacar la presencia de varias lacasas (A0A067NMI4, A0A067NLM3, Q2VT19), mientras que la proteína con una mayor abundancia observada en este análisis fue una carboxilesterasa (A0A067NL60), con un patrón similar al observado en el proteoma total.

Con relación a las proteínas que vieron su síntesis disminuida, se observa que la mayoría de las proteínas en esta condición juegan un rol dentro del metabolismo de los carbohidratos o son enzimas con actividad peptidasa, un patrón similar al del análisis proteómico antes descrito.

En relación a las proteínas únicas encontradas en ambas condiciones, se puede destacar que dos lacasas únicas fueron encontradas en condiciones de presencia de los PCBs (Anexo 8) y dos lacasas únicas fueron observadas en la condición control (Anexo 8), lo que indica un cambio en el perfil de síntesis de enzimas oxidativas en respuesta a los contaminantes. Finalmente, se identificaron dos cerato-plataninas en presencia de PCBs, proteínas que están estrechamente relacionadas con la morfogénesis de las paredes de las hifas fúngicas.

5.3.1.6 Comparación de los sets de datos proteicos

Al comparar todos los sets de datos proteicos generados por los estudios proteómicos de la presente tesis, pueden verse algunas intersecciones en presencia de algunas proteínas en las condiciones estudiadas (Figura 5.4). Entre las proteínas de los sets de datos en presencia de PCBs (secretoma y proteoma total) se puede identificar la presencia de una cerato platanina (A0A067P468), una oxalato descarboxilasa (A0A067NAB0), una galactosa oxidasa (A0A067NGG9), una metalopeptidasa (A0A067NB23) y una lipasa fúngica (A0A067NF68). Se destaca la presencia de dos lacasas que fueron identificadas en todos los set de datos, una con su síntesis aumentada (Q2VT19) y una que se vió disminuida (A0A238DAH4) cuando el PCB fue adicionado. Finalmente, dos α -1,2-manosidasas (A0A067NUL1; A0A067NVM1) y una serie de peptidasas (A0A067P0X3; A0A067NXA1; A0A067NVS1) estaban presentes en todos los sets de datos, pero en presencia de los PCBs todas ellas mostraron una disminución en su síntesis.

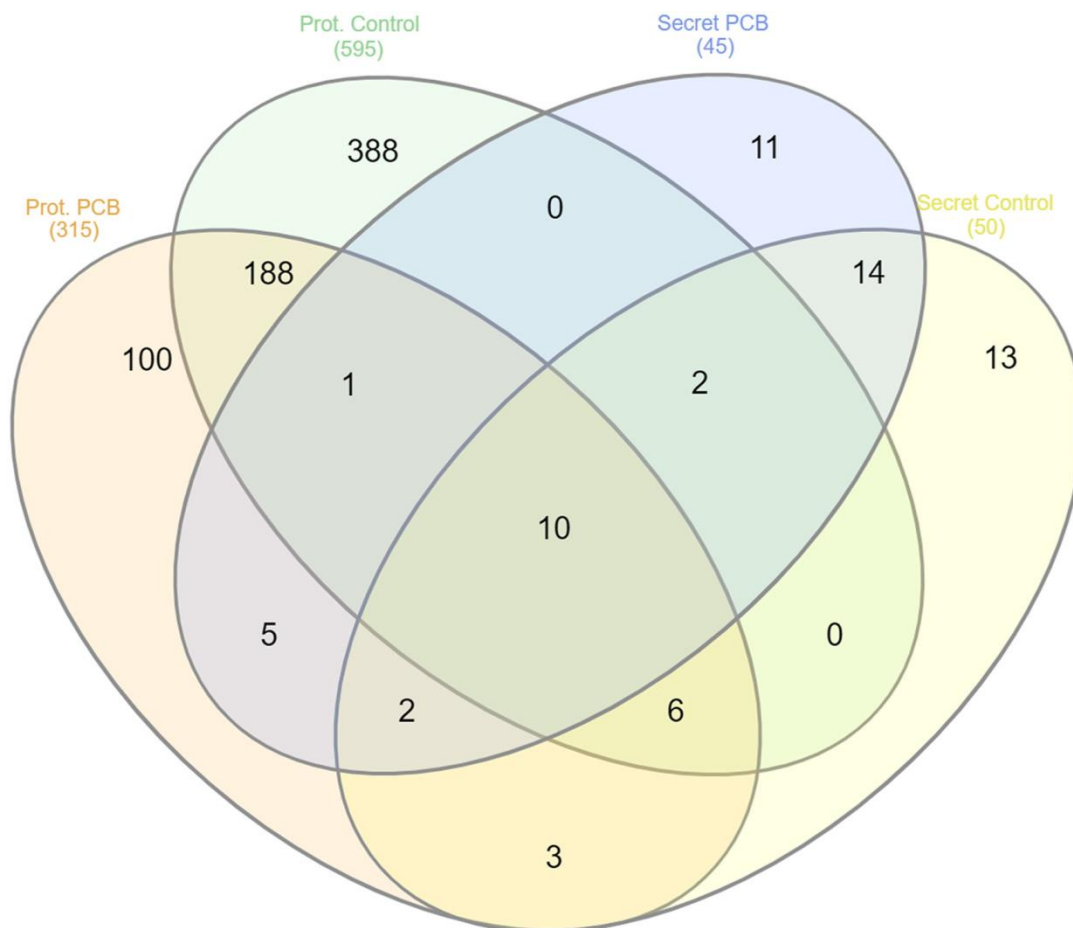


Figura 5.4. Diagrama de Venn mostrando las proteínas identificadas, tanto únicas de cada condición como las compartidas del análisis proteómico integral (Prot.) y del estudio secretómico (Secret), tanto en condiciones de exposición a los PCBs como en condiciones control. El gráfico se realizó con el servidor InteractiVenn (Heberle *et al.*, 2015) (tomado de Chelaliche *et al.* (2021)).

5.4. Discusión

5.4.1 Acción de las enzimas fúngicas sobre los PCBs

Como se pudo comprobar, el perfil de abundancia proteica de *P. pulmonarius* LBM 105 relacionado al metabolismo oxidativo es complementario y corrobora los resultados obtenidos en el análisis transcriptómico del capítulo 4. En ambos estudios se pudo observar que la mayoría de los genes y proteínas que estaban involucrados en este metabolismo en específico se vieron sobreexpresados en presencia de los PCBs, comparada contra la situación control.

Como se describió en los apartados anteriores, la acción de las fenoloxidasas sobre los contaminantes, y en particular sobre los PCBs, ha sido ampliamente descrita. De forma complementaria, Šrédlová *et al* (2021) ha demostrado cómo estas enzimas provenientes de *P. ostreatus*, son capaces de realizar el ataque

inicial y las modificaciones subsecuentes en los bifenilos policlorados, mediante la ruptura de la molécula de bifenilo y la dimerización de las moléculas de PCBs, específicamente de las especies con mayor grado de cloración.

En la figura 5.3 se pueden observar lacasas de *P. pulmonarius* LBM 105 con una abundancia diferencial en presencia del contaminante, simbolizadas como O2, O3, O5 y O7, que en su mayoría se encuentran con un aumento de su síntesis. En el trabajo de Sadañoski *et al.* (2019) se había observado que la cepa de *P. pulmonarius* LBM 105 produce un perfil diferencial de enzimas lacasas frente a los PCBs, lo que podría confirmar una variedad de estas enzimas presente en los análisis proteómicos y su característico patrón de regulación. Es necesario además tomar en cuenta esta variabilidad de las enzimas lacasas, ya que diferentes isoformas de estas enzimas son capaces de diferir en su especificidad de sustrato (en este caso las diferentes configuraciones de los PCBs), lo que determina la capacidad de remoción de estos compuestos (Šrédlová *et al.*, 2021). El hecho de que la cepa LBM 105 haya demostrado un cambio en la síntesis de las diferentes isoformas de las enzimas lacasas indica una adaptación del metabolismo de dicha cepa frente a la presencia del contaminante. Tal aumento en la abundancia de las enzimas lacasas, observada en este trabajo con la cepa LBM 105, en presencia de los bifenilos policlorados, puede deberse principalmente a su inducción debida a los elementos de respuesta a los xenobióticos (XRE) que están presentes en las regiones promotoras de las diferentes lacasas de los hongos de pudrición blanca (Sadañoski *et al.*, 2019).

Una respuesta similar fue observada con la peroxidasa versátil (D2JY79) de *P. pulmonarius* LBM 105, denominada como O11 en la figura 5.3. Šrédlová *et al.* (2021) pudieron comprobar que estas enzimas oxidasas pueden continuar la modificación de los PCBs una vez realizada la ruptura inicial de la molécula de bifenilo por las enzimas lacasas. Además, estas enzimas oxidasas están involucradas en la degradación de otros compuestos (como los hidrocarburos policíclicos aromáticos) (Pozdnyakova *et al.*, 2010), lo que señala que estas enzimas participarían en el metabolismo de degradación de más de un compuesto.

Es necesario resaltar que durante el análisis proteómico integral no se observaron cambios en la síntesis de la proteína citocromo P450. Esta enzima ha sido blanco de estudio a lo largo de varios trabajos de investigación ya que participa en las primeras instancias del metabolismo de contaminantes orgánicos aromáticos

(Matsuzaki & Wariishi, 2005; Cajthaml *et al.*, 2008; Covino *et al.*, 2010; Šrédlová *et al.*, 2021) generando productos monohidroxilados de los ácidos clorobenzoicos. Si se compara el comportamiento de las Citocromos P450 entre los estudios proteómicos y transcriptómicos se puede observar una discrepancia en términos de expresión y abundancia, ya que en el análisis transcriptómico se pudo observar la sobreexpresión de múltiples genes codificantes de esta proteína pero en el análisis proteómico no se pudo determinar una abundancia diferencial de dicha enzima. Esta diferencia puede deberse a una limitante del método de preparación de la muestra para el análisis proteómico, que acarreó un muestreo pobre de estas enzimas. Los flujos de trabajo proteómicos dependen de una apropiada solubilidad de las proteínas bajo las condiciones experimentales, esto puede conllevar a la pérdida de muestra durante las primeras etapas de la preparación. Sin embargo, la solubilidad representa un desafío para las proteínas de membrana, como las CYP450s, que suelen presentar de 1 a 20 dominios hidrofóbicos que están en contacto con la membrana celular. Son estos dominios los que tienden a agregarse y posteriormente precipitar en métodos convencionales de preparación de muestra (Helbig *et al.*, 2010). Es por ello que la falta de representatividad de esta enzima en el análisis proteómico no concuerda con el perfil de expresión génica analizada desde una aproximación transcriptómica.

Entre los posibles subproductos de degradación de los PCBs, se cree que los alcoholes clorobencílicos podrían ser modificados posteriormente por aril-alcohol oxidasas (Ferrerira *et al.*, 2005). Durante el análisis proteómico de la cepa LBM 105 en presencia de los PCBs, una aril-alcohol oxidasa (A0A0F7VKF7) fue encontrada únicamente cuando dicha cepa se enfrentó a la presencia de los PCBs, siendo esta otra de las enzimas involucradas en la modificación de los metabolitos secundarios del metabolismo fúngico. De la misma manera, la biotransformación de los clorobenzaldehídos (otro subproducto de la ruptura de la molécula de bifenilo) se llevó a cabo por una combinación de enzimas ligninolíticas fúngicas dependientes de manganeso en presencia de glutatión (Šrédlová *et al.*, 2021), un mediador capaz de inducir la oxidación de sustratos no fenólicos en las enzimas ligninolíticas fúngicas (Covino *et al.*, 2010). En nuestro trabajo, si bien no se encontraron las peroxidasas dependientes de manganeso clásicas, las peroxidasas versátiles que se encuentran inducidas en presencia de los PCBs podrían llevar a cabo estas modificaciones.

Otra proteína de interés capaz de modificar los subproductos del metabolismo de los PCBs es la glutatión-s-transferasa (A0A067NRW7), relacionada con la segunda fase del metabolismo de los xenobióticos (Parkinson & Ogilvie, 2008), cuya función fue descrita en el capítulo anterior. Esta proteína se observó en la condición de exposición a los PCBs.

Finalmente, la presencia de dos cerato-plataninas en la condición de exposición a los PCBs podría explicar los cambios en la morfología de las hifas de la cepa de *P. pulmonarius* LBM 105 observado por Sadañoski *et al.* (2019). Mediante el uso de microscopía electrónica se observó el micelio del hongo más espaciado y lineal en presencia de PCBs en el medio de cultivo. Se sabe que las cerato-plataninas son proteínas de la pared celular fúngica similares a las expansinas (Bacelli, 2015) y se cree que pueden tener un rol en la remodelación de la pared celular. La presencia de estas proteínas frente a los PCBs y los cambios vistos en la morfología de las hifas sugieren un rol de estas proteínas en los cambios morfológicos del micelio de la cepa LBM 105. Sin embargo, las razones de estos cambios frente a los PCBs todavía no han sido estudiadas.

5.4.2 Los PCBs como inductores del estrés oxidativo

Como se mencionó anteriormente, los bifenilos policlorados son poderosos inductores del estrés oxidativo en las células. En condiciones fisiológicas normales, existe un balance entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la actividad de enzimas antioxidantes. Sin embargo, el daño oxidativo ocurre cuando la producción de las ROS excede las capacidades protectoras de las enzimas antioxidantes (Lassen *et al.*, 2008). Se pudo observar que la exposición de peces a los PCBs 126 y 169 aumentó significativamente la producción de ROS en los microsomas del hígado, induciendo así el estrés oxidativo en dichas células (Schlezingner *et al.*, 2006). En este mismo trabajo, Schlezingner *et al.* sugirieron que la inducción del citocromo P450 sin la presencia de un sustrato adecuado puede causar la producción del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno. Además, Buha *et al.* (2015) revelaron que los PCBs pueden reprimir la acción de superóxido dismutasas dependiente de cobre y zinc, así como la acción del antioxidante glutatión, lo que lleva a la incapacidad de las células de compensar el impacto oxidativo de las ROS. Asimismo, Deng *et al.* (2019) encontraron una disminución en

el glutatión de células hepáticas murinas, mientras que observaron un aumento del conjugado de glutatión 4-hidroxi-nonenal, un importante marcador del estrés oxidativo.

En el estudio proteómico se pudo determinar la disrupción del sistema enzimático de defensa en presencia de los PCBs, donde se pudo observar que la superóxido dismutasa (A0A067NQW4) disminuyó 8,11 veces su cantidad. Sin embargo, en estas mismas condiciones se vio la presencia de dos catalasas fúngicas con un alto valor de emPAI (Q876Y9, A0A067NH5). Las catalasas juegan un rol central en la defensa contra del estrés oxidativo, protegiendo a las proteínas de la oxidación (Montibus *et al.*, 2015). Estas proteínas son particularmente resistentes a la inactivación por calor y no son inhibidas por altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, reflejando la importancia de las mismas en su habilidad de ayudar a la célula a soportar el estrés (Díaz *et al.*, 2001). Li *et al.* (2011) encontraron también un incremento en la actividad catalasa en microorganismos del suelo, durante la degradación del PCB-5. Del mismo modo, se vio que estas enzimas poseen actividad antioxidante y son responsables de la supervivencia fúngica durante la biorremediación de metales pesados (Chakraborty *et al.*, 2013; Mitra *et al.*, 2014). El rol protector de estas enzimas y su expresión frente a la presencia de contaminantes recalcitrantes podría explicar la capacidad de esta cepa de sobrevivir al estrés oxidativo inducido por los PCBs, catalizando el exceso de peróxido de hidrógeno, utilizado además por las mismas oxidorreductasas fúngicas involucradas en la transformación de los PCBs, así como también evitando la oxidación proteica mediada por los ROS.

En este entorno de estrés, la síntesis de proteínas, y por ende los procesos de transcripción y traducción deben ser estrictamente regulados (Sorensen & Loeschcke, 2007). La cepa LBM 105 presentó entre sus proteínas con mayor nivel de síntesis dos gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasas (GAPDH), cumpliendo un rol en la respuesta al estrés oxidativo fuera de su función clásica en la glicólisis. Existe evidencia de que esta enzima es capaz de modular las vías de señalización celular en respuesta al estrés oxidativo (inducida por el peróxido de hidrógeno) a través de la S-tiolización de un residuo de cisteína, que lleva a la GAPDH a interactuar con el regulador Mcs4 (Tristan *et al.*, 2011). Esta interacción conduce a un cambio metabólico para redireccionar el flujo de carbono de la glicólisis a la vía de las pentosas, generando NADPH, como agente reductor capaz de proteger a la

célula del estrés oxidativo (Ralser *et al.*, 2007). Además, el GAPDH forma parte del complejo transmembrana NADH-diclorofenol-indofenol oxidoreductasa que tiene un rol también en la respuesta celular frente al estrés oxidativo (Dastoor & Dreyer, 2000). Además, en el trabajo de Dastoor & Dreyer (2001), se vio cómo ante la exposición a peróxido de hidrógeno el GAPDH mostraba un cambio de localización, translocándose al núcleo, donde posiblemente cumpla funciones alternativas a su función clásica, como la de sensor redox uniéndose al factor de transcripción Oct-1 regulando así la transcripción proteica durante la fase S de las células (Dai *et al.*, 2008). La síntesis de estas enzimas junto con una aldolasa putativa (A0A067NXX1) y una enolasa putativa (A0A067P4U9), componentes del complejo transmembrana NADH-diclorofenol-indofenol oxidoreductasa, señala el rol alternativo de esta enzima frente al estrés oxidativo afectando las vías de señalización celular y de transcripción proteica de la cepa LBM 105.

Otra proteína involucrada en la transcripción proteica que se vio aumentada 9 veces más en presencia de PCBs, es la subunidad beta del complejo asociado al polipéptido naciente, conocida como factor de transcripción basal 3 (BTF3b). El BTF3b tiene un rol central en la regulación de genes relacionados al estrés biótico y abiótico en plantas (Li *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Este factor regula que los polipéptidos nacientes de ribosomas pequeños se plieguen correctamente para evitar la translocación de proteínas incompletas al retículo endoplasmático, evitando el estrés debido a la deposición de proteínas anormales (Jamil *et al.*, 2015). Este factor además se considera como un controlador de la homeostasis en la mitocondria y el retículo endoplasmático ya que se vio que una disminución en su síntesis del mismo causa una pérdida de la homeostasis celular y el inicio de muerte celular (Oloriz *et al.*, 2012). El BTF3b tiene un patrón de inducción muy rápido, lo que asegura la regulación de los genes relacionados al estrés (Wang *et al.*, 2012). Un solo gen de BTF3b puede ser activado por numerosos factores de estrés, demostrando su diversidad en términos de función regulatoria frente a diferentes condiciones (Jamil *et al.*, 2015). Finalmente, se observó que el silenciamiento del gen del BTF3b en células vegetales reduce la expresión de genes clave en la defensa contra las ROS producidos por el metabolismo normal de las plantas (Jamil *et al.*, 2015). En este trabajo se observó cómo la cantidad de enzimas oxidoreductasas aumentadas en presencia de los PCBs lleva a un aumento de los factores de transcripción involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, lo que

explica además el perfil de síntesis proteica particular de los ribosomas, observado en este capítulo, donde algunas proteínas ribosomales se veían favorecidas frente a otras cuando el hongo era expuesto al contaminante.

5.5. Conclusión

En este capítulo se pudo comprobar que la presencia de los PCBs en el medio de cultivo causó un perfil de síntesis diferencial en proteínas involucradas mayoritariamente en el metabolismo oxidativo de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105. Desde el punto de la modificación de la transcripción y traducción proteica, enzimas como la GADPH y el BTF3b podrían estar cumpliendo un rol como factores de transcripción íntimamente relacionados con la respuesta al estrés oxidativo dado por la presencia de los PCBs. Incluso, a pesar de la inducción de este tipo de estrés determinado por la presencia de estos contaminantes, se demostró un aumento en la síntesis de enzimas oxidativas ligninolíticas, determinantes para la modificación de las moléculas de PCBs. Entre las enzimas identificadas, las enzimas lacasas, peroxidasas versátiles, reductasas de cadena corta, aldo/ceto reductasas, aril-alcohol oxidasas y glutation-s-transferasas se posicionaron como candidatas posiblemente responsables de la modificación y transformación de estos xenobióticos recalcitrantes.



Capítulo 6 Remediación *In vitro*

6.1. Introducción

Si bien la biorremediación mediante la utilización de microorganismos es una práctica que cada vez gana más terreno en términos de construcción de estrategias basadas en ella, la degradación de los contaminantes de esta forma suele ser un proceso lento, lo que disminuye su factibilidad en prácticas reales (Ghosh, *et al.*, 2017). Es por ello que las prácticas en las cuales se utilizan las enzimas microbianas separadas de las células comenzaron a ser usadas para poder superar esta limitación temporal (Thatoi *et al.*, 2014). Las enzimas son capaces de aumentar la tasa de reacción de los procesos bioquímicos involucrados en las vías de degradación de los contaminantes mediante una disminución de la energía de activación de las moléculas involucradas (Kalogerakis *et al.*, 2017).

Entre las ventajas de las estrategias basadas en las enzimas purificadas o semi-purificadas encontramos que estas no dependen del crecimiento de un microorganismo en particular, sino de la actividad catalítica intrínseca de la enzima (Ruggaber & Talley, 2006). Por ello, en suelos deficientes de nutrientes, este tipo de aproximaciones es más factible. Además, en comparación a los microorganismos, el uso de enzimas tiene la ventaja de un mejor acceso a los contaminantes debido a una mayor movilidad de las mismas dado su menor tamaño (Sharma *et al.*, 2018). Además, el uso de cocteles enzimáticos semi-purificados para su aplicación en remediación ambiental significaría una reducción aún mayor del costo de aplicación, sin impactar en su eficacia.

Se ha visto la aplicación de este tipo de aproximación para la evaluación de la remediación de metales pesados como el mercurio (Pietro-Souza *et al.*, 2020), la reducción de cromo por cromato reductasas (Thatoi *et al.*, 2014), la remediación de herbicidas por atrazina dechlorinasas (Scott *et al.*, 2010), la degradación de organofosforados por enzimas fitasas (Shah *et al.*, 2017), la remoción de clorofenoles mediante peroxidasas (Bilal *et al.*, 2017b), entre otros. Además, se conoce la capacidad de las enzimas provenientes de hongos de pudrición blanca, en específico de *P. ostreatus*, de transformar *in vitro* hidroxi-PCBs y sus metabolitos secundarios (Šrédlová *et al.*, 2021).

A fin de poder profundizar en el rol de las enzimas de *P. pulmonarius* LBM 105 y su localización celular, en este capítulo se abordará la capacidad de los extractos enzimáticos en la biorremediación. Se hará una evaluación tanto del

homogenato proteico interno de dicha cepa, así como de las enzimas secretadas y de su combinación. Dichos extractos se obtuvieron a partir de la cepa desarrollada en presencia de PCBs y de cultivos controles sin el contaminante, buscando observar si existe diferencias en la capacidad de remediación de las enzimas presentes en ambas condiciones.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1 Condiciones de cultivo para la obtención de las enzimas

Para estudiar la capacidad de las enzimas producidas por *P. pulmonarius* LBM 105 de remover los bifenilos policlorados *In vitro* se procedió a cultivar el hongo en condiciones previamente descritas (Sección 3.2.1.1). Tanto las enzimas intracelulares como extracelulares de la cepa LBM 105 se obtuvieron de un medio de cultivo que se suplementó con 4000 µg de PCBs de una mezcla de arocloros disuelto en acetona y desarrollado por 21 días en oscuridad de forma estática a 28 ± 1 °C. Mientras tanto, las enzimas consideradas como control para este caso se obtuvieron a partir del medio de cultivo que solamente contenía el inóculo fúngico, sin el agregado de PCBs, y que se desarrollaron por 21 días en oscuridad de forma estática a 28 ± 1 °C. En la figura 6.1 se puede observar un esquema representativo de la obtención de las enzimas tanto intracelulares como extracelulares para los posteriores ensayos de remediación *In vitro*.

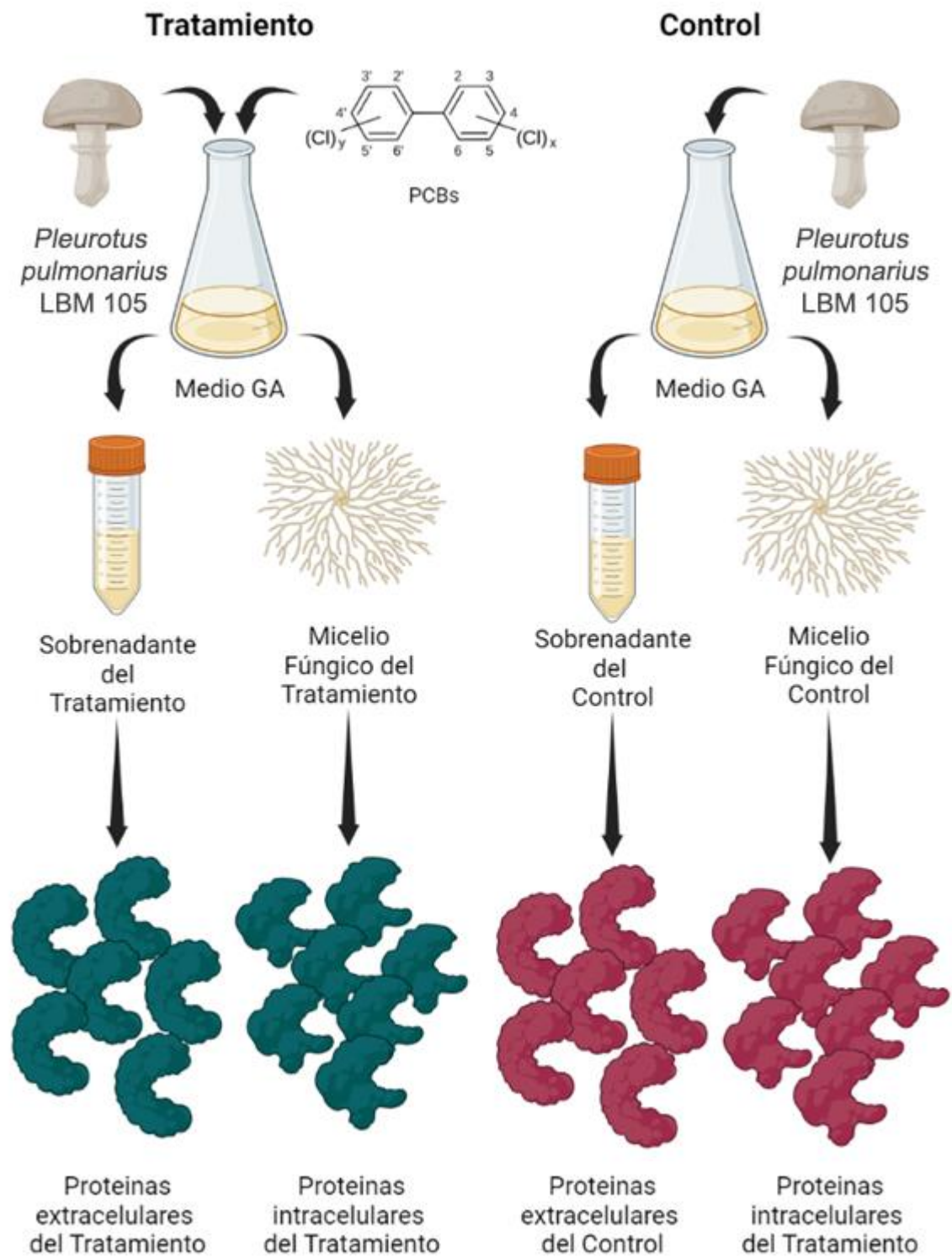


Figura 6.1. Esquema representativo de las condiciones de ensayo y el flujo de trabajo utilizado para la obtención de los extractos enzimáticos intracelulares y extracelulares de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105. En verde se esquematizan las enzimas obtenidas a partir de la cepa desarrollada en un medio contaminado con PCBs y en rojo las enzimas obtenidas de una condición control sin el agregado de PCBs. La obtención de las enzimas intracelulares se realizó mediante una ruptura con nitrógeno líquido.

6.2.2 Remediación *in vitro* con enzimas extracelulares

Las enzimas extracelulares obtenidas de la condición control y de los tratamientos se obtuvieron por centrifugación del medio de cultivo previamente descrito (4695 x g por 15 min). El sobrenadante obtenido se filtró para eliminar los restos celulares utilizando filtros hidrofílicos de 0,22 μm (Chromafil® Xtra). La concentración de proteínas en los sobrenadantes resultantes se determinó por el método del Ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985). Una vez determinada la concentración proteica en cada muestra, se utilizaron estas proteínas extracelulares en una solución de reacción que consistió en *buffer* acetato de sodio 60 mM (pH 5,0), 200 ppm de PCBs disueltos en acetona obtenidos a partir de una mezcla compleja de arocloros y 160 μg del extracto proteico en un volumen final de 2 mL. Tanto tratamientos como controles se incubaron 2 h a 28 °C en agitación a 150 rpm. Para detener la reacción, se acidificaron las muestras con 10 μL de una solución de H_2SO_4 1 M. En la figura 6.2 se muestra el procedimiento llevado a cabo para los ensayos de remediación *In vitro* utilizando las enzimas extracelulares de la cepa LBM 105.

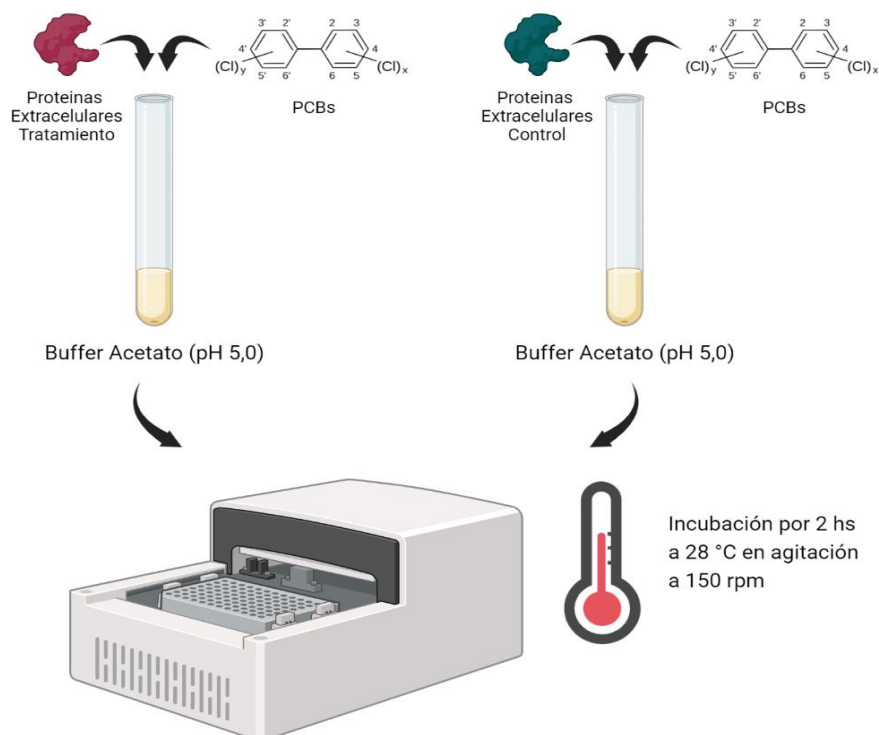


Figura 6.2. Esquema representativo de los ensayos de remoción *In vitro* para las enzimas extracelulares de la cepa LBM 105. Los ensayos se realizaron en un agitador en baño seco. En todos los casos se utilizaron igual cantidad de proteínas totales (160 μg).

6.2.3 Remediación *in vitro* con enzimas intracelulares

A partir del micelio fúngico desarrollado en la sección 6.2.1 se cosechó el micelio por centrifugación (4695 x g por 15 min). Una vez cosechado el micelio, este se sometió a una ruptura mecánica utilizando nitrógeno líquido, mortero y pilón. El extracto obtenido se colocó en tubos de 1,5 mL junto con 500 µL de *buffer*, ya sea de *buffer* fosfato (pH 6,0; 60 mM) o acetato de sodio (pH 5,0; 60 mM), dependiendo del *buffer* a ser utilizado en los ensayos de reacción posteriores.

Se realizó un paso de centrifugación (10625 x g, 10 min, 4 °C) para eliminar los restos celulares y luego se procedió a precipitar las proteínas con el agregado de 4 volúmenes de acetona fría (-20 °C), dejando precipitar por 24 h. Posteriormente, se realizaron dos lavados con acetona fría (-20 °C), se recuperó el *pellet* por centrifugación (10625 x g, 5 min, 4 °C) y las muestras se resuspendieron en sus respectivos *buffers* (acetato de sodio y fosfato). La concentración de homogenatos proteicos obtenidos se cuantificó por el método del ácido bicinconínico. Para los ensayos de remoción en este caso se utilizaron dos soluciones de reacción diferentes, que difirieron solamente en el *buffer* utilizado, simulando tanto el pH interno de la célula (pH \cong 6) y al pH externo de la célula en un medio limitado en nitrógeno GA (pH \cong 5). Las soluciones de reacción utilizadas para este ensayo constaban del *buffer* de reacción (o bien *buffer* Acetato de Sodio 60 mM pH 5,0 o *buffer* fosfato pH 6,0 60 mM), 200 ppm de PCBs obtenidos de una mezcla de arocloros disuelto en acetona y 160 µg del extracto proteico, con un volumen final de 2 mL. Las soluciones de reacción del tratamiento y los de la condición control se incubaron por 2 h a 28 °C en agitación a 150 rpm. Para detener la reacción, se acidificaron las muestras con 10 µL de una solución de H₂SO₄ 1 M. En la figura 6.3 se muestra el procedimiento llevado a cabo para los ensayos de remediación *In vitro* utilizando las enzimas intracelulares de la cepa LBM 105.

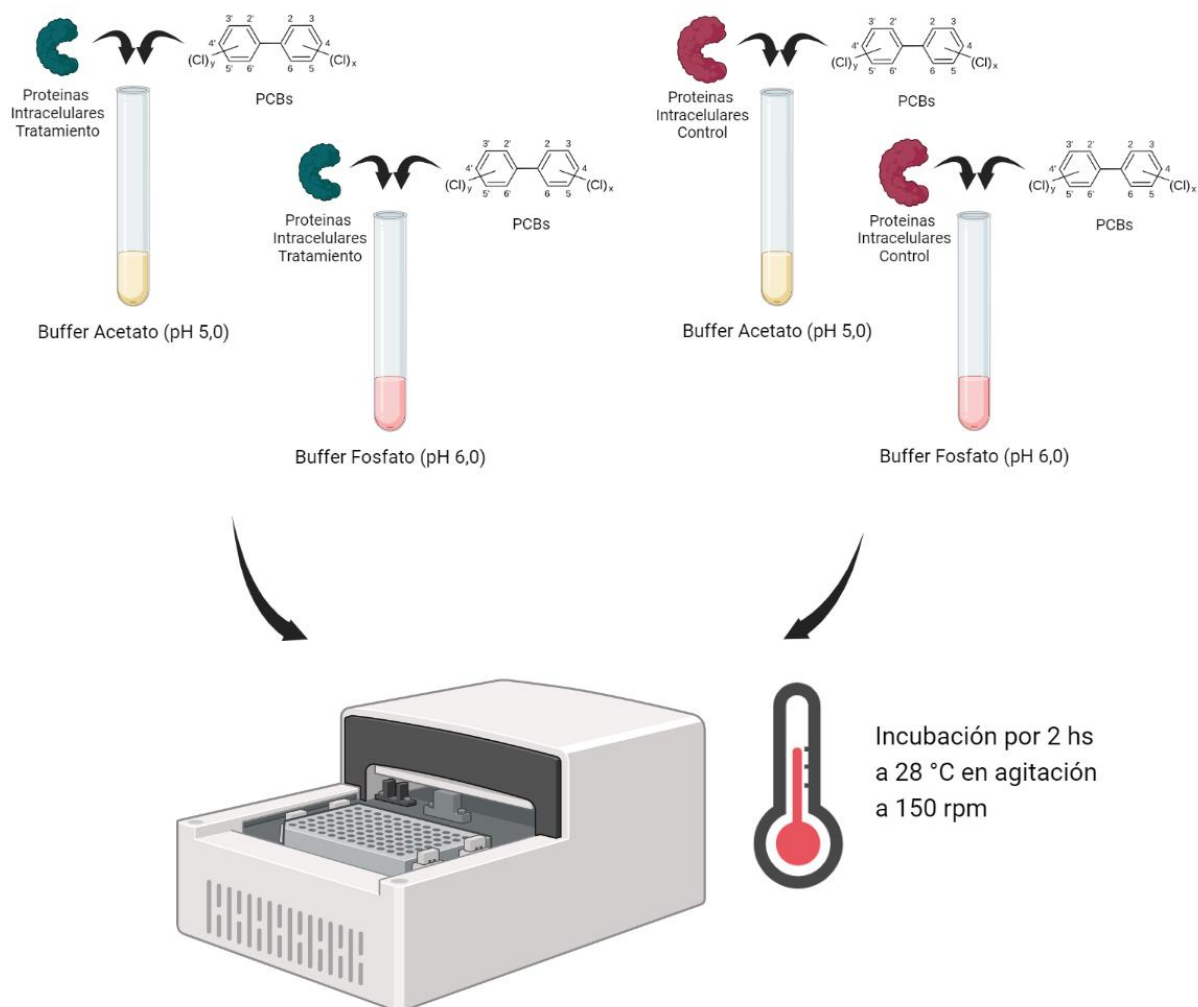


Figura 6.3. Esquema representativo de los ensayos de remoción *In vitro* para las enzimas intracelulares de la cepa LBM 105. Se muestran los diferentes *buffers* utilizados para las soluciones de reacción tanto a pH 5 (*Buffer* acetato de sodio 60 mM) como a pH 6 (*Buffer* fosfato 60 mM) Los ensayos se realizaron en un agitador en baño seco. En todos los casos se utilizaron igual cantidad de proteínas totales (160 µg).

6.2.4 Remediación *in vitro* con la combinación de enzimas extracelulares e intracelulares

Para corroborar la capacidad de remoción *In vitro* de la combinación de proteínas extracelulares e intracelulares, se tomaron cantidades iguales de proteínas tanto del homogenato interno obtenido en la sección 6.2.3 como del sobrenadante obtenido en la sección 6.2.2. Estas proteínas se utilizaron en dos soluciones de reacción diferentes. Las soluciones de reacción constaban del *buffer* de reacción (*buffer* Acetato de Sodio 60 mM pH 5,0 o *buffer* fosfato pH 6,0 60 mM), 200 ppm de PCBs obtenidos de una mezcla de arocloros disueltos en acetona y el

extracto proteico, llegando a un volumen final de 2 mL. Las soluciones de reacción se incubaron por 2 h a 28 °C en agitación a 150 rpm y se detuvo la reacción mediante acidificación de las muestras con 10 µL de una solución de H₂SO₄ 1 M. En la figura 6.4 se muestra el procedimiento llevado a cabo para los ensayos de remediación *In vitro* utilizando tanto enzimas extracelulares como intracelulares de la cepa LBM 105.

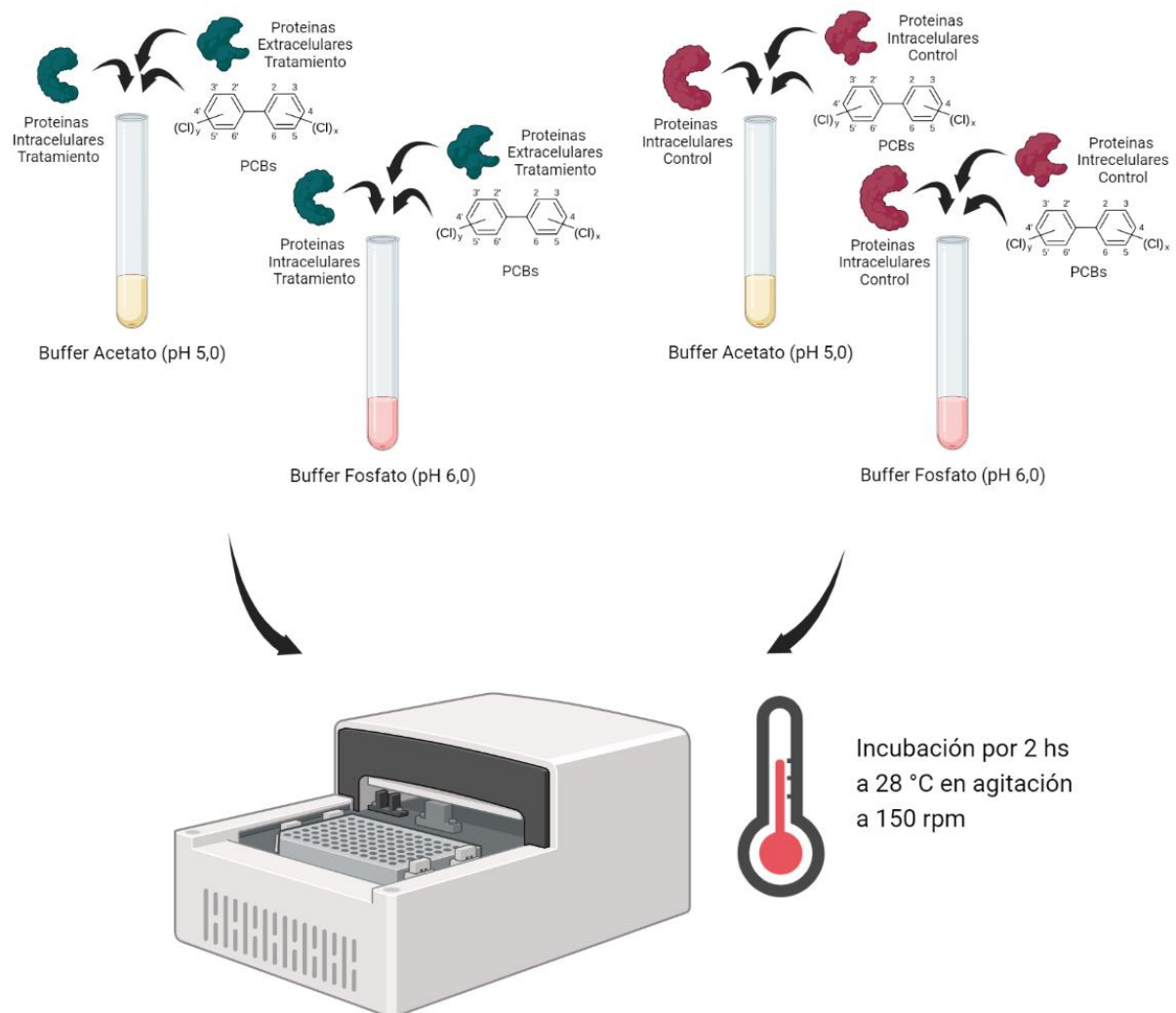


Figura 6.4. Esquema representativo de los ensayos de remoción *In vitro* para las enzimas intracelulares y extracelulares de la cepa LBM 105. Se muestran los diferentes *buffers* utilizados para las soluciones de reacción tanto a pH 5 (*Buffer* acetato de sodio 60 mM) como a pH 6 (*Buffer* fosfato 60 mM). Los ensayos se realizaron en un agitador en baño seco. En todos los casos se utilizaron igual cantidad de proteínas totales (160 µg).

6.2.5 Evaluación de la toxicidad del tratamiento *in vitro* de PCBs

Para la evaluación de la toxicidad de los metabolitos producidos durante los ensayos de remoción *in vitro* por parte de las enzimas de la cepa LBM 105 de *P.*

pulmonarius, se realizó un ensayo de toxicidad *in vitro* utilizando a *L. sativa* como modelo biológico. Para ello se siguió la metodología descrita en la sección 3.2.2.2 del capítulo 3. Los valores de germinación y elongación de la radícula se utilizaron para calcular los índices de germinación y de crecimiento relativo. Para los casos en donde no se observó germinación de las semillas los índices se consideraron como nulos.

Debido a que los índices de germinación se calculan mediante una comparación contra el control con agua, se puede obtener un valor aproximado de la reducción de la toxicidad para cada uno de los controles y tratamientos mediante una comparación con los índices de dichas condiciones y el índice obtenido para el control PCBs.

Además, se realizó un análisis de la varianza univariado utilizando los valores del largo de la radícula para corroborar la reducción del efecto ecotoxicológico de los PCBs de tratamientos y controles mediante el software Statgraphic Centurion XV (versión 15.2.06). Los test de Shapiro-Wilk y de Levene fueron usados para probar la normalidad y la homocedasticidad de los datos, respectivamente. La prueba LSD de Fisher se usó para las comparaciones múltiples de las medias de longitud de radícula de cada tratamiento y control.

6.3. Resultados

6.3.1 Efecto de los tratamientos sobre la longitud de la radícula

A partir de los estudios estadísticos de normalidad y homocedasticidad, se observó que los valores de la longitud de la radícula de las semillas de *L. sativa* mostraban una distribución normal ($p < 0,05$), lo que permitió el estudio de las mismas mediante un análisis de la varianza.

En la figura 6.5 se observan los efectos de los tratamientos y controles sobre la elongación de la radícula. En esta se evidencia cómo los tratamientos y controles lograron mejorar la elongación de la radícula de *L. sativa* cuando se los compara con el control que solo contenía el medio de reacción contaminado con PCBs. Además, se nota una mejoría estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las longitudes de las radículas para los medios de reacción que contenían una combinación de las proteínas del homogenato interno (HI) y el sobrenadante (S), cuando se comparan con los medios de reacción con proteínas del homogenato

interno únicamente.

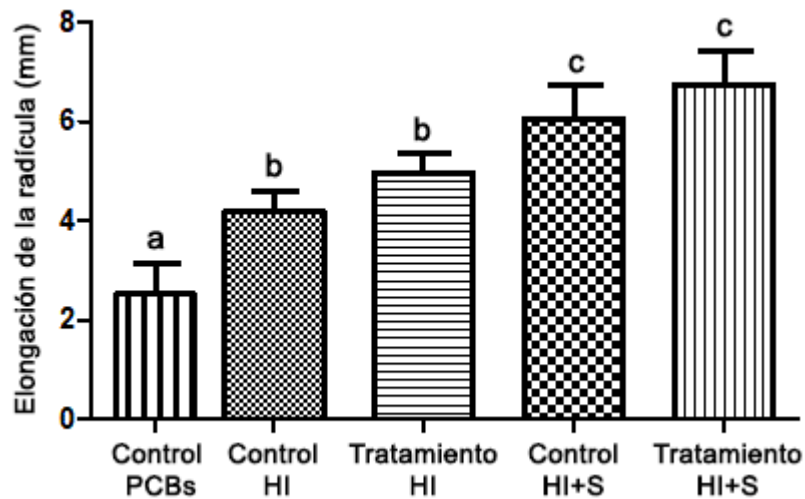


Figura 6.5. Efecto de tratamientos y controles en la elongación de la radícula de *L. sativa* en los ensayos de remoción *In vitro* con las proteínas de *P. pulmonarius* LBM 105. Se muestran los valores medios e intervalos de confianza del 95 %. Se puede observar las condiciones que muestran diferencia significativa ($p < 0,05$) según el test LSD de Fisher (marcados con letras “a”, “b” y “c”). HI= Proteínas del Homogenato Interno. S= Proteínas del Sobrenadante

6.3.2 Índice de crecimiento relativo

A partir de los valores de longitud de la radícula y de los valores de germinación obtenidos en cada condición, se pudieron calcular los índices de crecimiento relativo y los índices de germinación. En la figura 6.6 se puede observar los valores de crecimiento determinados para los diferentes extractos enzimáticos obtenidos a partir de la cepa LBM 105.

Sin embargo, ninguno de los tratamientos ensayados utilizando el *buffer* acetato permitió la germinación de las semillas, reflejando la posible acción inhibitoria de algún componente de dicho *buffer* en la germinación, por lo que sus valores se consideraron como nulos.

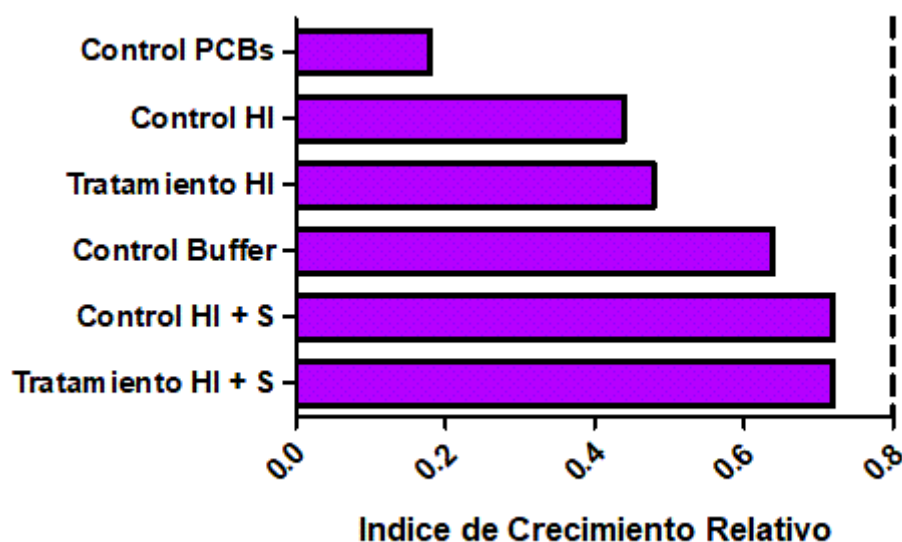


Figura 6.6. Índice de crecimiento relativo calculado a partir de los valores de radícula del ensayo de toxicidad de *L. sativa* llevado a cabo con los medios tratados con las enzimas de de *P. pulmonarius* LBM 105 en *buffer* fosfato (pH = 6). HI: Proteínas del homogenato interno. S: Proteínas del sobrenadante. La línea punteada indica el límite por debajo del cual se considera una acción tóxica del medio por sobre la elongación de la radícula.

Se mostró el efecto tóxico sobre la extensión de la radícula en todos los tratamientos y controles denotado por un índice menor a 0,8. Sin embargo, es evidente la reducción del efecto inhibitorio en la extensión de la radícula mediado por la acción enzimática de las proteínas de la cepa LBM 105 (Figura 6.6). A partir de la comparación de los índices de crecimiento del control del medio contaminado con PCBs y sin el hongo (control PCBs) y los demás tratamientos y controles, se observó que en todos los casos el agregado de las enzimas de *P. pulmonarius* LBM 105 determinó una atenuación del efecto tóxico sobre las semillas de lechuga. Además, se pudo observar que la combinatoria de las enzimas intracelulares y extracelulares mejoraron el desempeño al reducir la toxicidad del medio al compararlo con solo el homogenato interno.

6.3.3 Índice de germinación

A partir del cálculo de los índices de germinación en cada una de las condiciones, se observó un perfil similar al obtenido con el índice de crecimiento relativo con algunas ligeras connotaciones (Figura 6.7). En relación a los índices de crecimiento, se pudo apreciar que el control adicionado únicamente con PCBs

muestra el menor índice de germinación de todos. Seguido a este, se ubica el homogenato interno obtenido del medio control (cepa LBM 105 sin una previa exposición a PCBs) mostrando una mejoría tanto en la elongación de la radícula como en la cantidad de semillas germinadas, comparado al control PCBs. Luego, tanto el homogenato interno del tratamiento (cepa LBM 105 expuesta previamente a los PCBs), como la combinación de homogenato interno y sobrenadante del control obtuvieron índices similares. Finalmente, la combinación del homogenato interno y el sobrenadante obtuvo el mayor índice de germinación de todos los tratamientos y controles, llegando a obtener un índice similar al del control que contenía solamente el *buffer* fosfato.

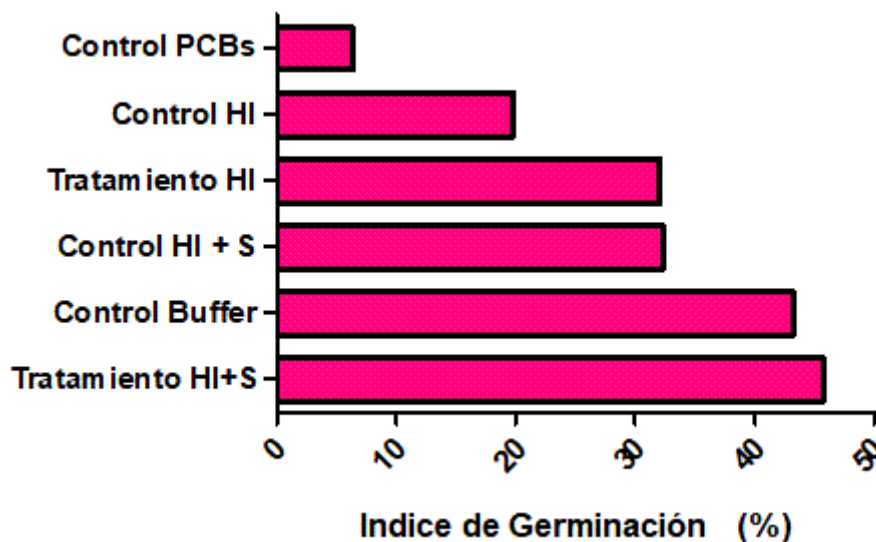


Figura 6.7. Índice de germinación calculado a partir de los valores de radícula y de cantidad de semillas germinadas del ensayo de toxicidad de *L. sativa* llevado a cabo con los medios tratados con las enzimas de *P. pulmonarius* LBM 105 en *buffer* fosfato 60 mM (pH = 6). HI: Proteínas del homogenato Interno. S: Proteínas del sobrenadante.

6.3.4 Reducción de la toxicidad

A partir de la comparación de los índices obtenidos se determinó que la combinación del homogenato interno y el sobrenadante del tratamiento tuvo una mayor atenuación por sobre la toxicidad de los PCBs, reduciendo la misma en un 39,45 % (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Reducción de toxicidad de cada una de las condiciones ensayadas para el análisis de remoción *In vitro*. El porcentaje de reducción se calculó a partir de la comparación de los índices de germinación de cada condición con el índice de germinación del control PCBs. HI: Homogenato interno. S: Sobrenadante. En este caso el índice de germinación del control PCB se consideró como el punto de referencia de mayor toxicidad (100%) para calcular el porcentaje de reducción de la toxicidad.

Condición	Reducción de Toxicidad (%)
Tratamiento HI + S	39,45
Control HI + S	36,90
Tratamiento HI	25,99
Control HI	13,55

6.4. Discusión

Como se planteó en el apartado de discusión del capítulo 3, cualquier estrategia de biorremediación debe estar acompañada de su correspondiente análisis de toxicidad, más aún cuando se trate de un ensayo que tenga como objetivo la remediación de los PCBs, ya que es sabido que los metabolitos producidos durante la degradación de estos xenobióticos suelen tener una toxicidad aún mayor que el compuesto parental que le dio origen (Liu *et al.*, 2020).

Durante el desarrollo de este trabajo se pudo observar que *P. pulmonarius* LBM 105 es capaz de producir y secretar enzimas cuya actividad estaba íntimamente ligada a la modificación de los bifenilos policlorados. En este capítulo se buscó corroborar si esa actividad continuaba presente incluso sin la presencia del hongo, y si el desarrollo de la cepa en un medio contaminado lograba la inducción de un perfil enzimático con capacidad diferencial para la acción contra los xenobióticos.

Como se observó, el extracto enzimático mantuvo la capacidad de reducir la toxicidad del medio, por lo que las enzimas de la cepa LBM 105 retuvieron su capacidad de acción sobre estos compuestos. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos por Šrédlová *et al* (2021), donde el extracto enzimático de *P. ostreatus* logró transformar diferentes congéneres de hidroxi-PCBs en presencia de diferentes mediadores, atribuyéndole esta actividad a

la acción de enzimas lacasas, manganeso peroxidasas, aril-alcohol oxidasas y citocromos P450 oxidasas.

De la misma forma, Takagi *et al.* (2007) lograron que las fracciones enzimáticas del sobrenadante de *T. versicolor*, que demostraron tener capacidad de oxidación del 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfonato), abreviado ABTS, un sustrato comúnmente utilizado para la determinación de las enzimas fenoloxidasas fúngicas, fueran capaces de reducir la concentración de los PCBs coplanares en ensayos de remoción *in vitro*.

Sin embargo, es necesario destacar que, durante los ensayos realizados, las soluciones de reacción que contenían el *buffer* acetato de sodio, las cuales fueron utilizadas para los ensayos de sobrenadante, no permitieron la germinación de las semillas, por lo que la capacidad de reducción de la toxicidad de las enzimas extracelulares no pudo ser evaluada. Esto podría deberse al hecho de que los iones de sodio, presentes en la solución, impediría la absorción de agua por parte de las semillas, reduciendo así el potencial osmótico (Kim *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2020). Sin embargo, este no fue el caso de las soluciones de reacción que utilizaron *buffer* fosfato, con las que sí se pudieron determinar los índices de germinación y de crecimiento relativo tanto de las proteínas del homogenato interno como la combinación de estas con las del sobrenadante. Se puede destacar la capacidad aumentada que demostró la combinación del sobrenadante con el homogenato interno de reducir la toxicidad de los medios en *buffer* fosfato, lo que nos indica una acción sinérgica tanto de las enzimas secretadas como de aquellas presentes en el interior de la célula.

Los efectos individuales de cada una de las posibles enzimas que podrían estar actuando como mediadoras de la remoción de los PCBs ya han sido descritas en capítulos anteriores. Sin embargo, dentro de las enzimas que se ha comprobado tienen la capacidad de acción por sobre estos compuestos, las lacasas son una de las que mayor atención recibieron y que más han sido probadas para la remoción *In vitro* de estos contaminantes. En su trabajo Keum & Li (2004) evaluaron la capacidad de esta enzima *In vitro* de poder metabolizar hidroxi-PCBs, viendo que una de las mayores modificaciones que ocurren es la de polimerización de los PCBs mediada por radicales, donde se observó además que la presencia de hidrógenos o cloros en las posiciones *orto* de la molécula tenían una mayor susceptibilidad al ataque y subsecuente polimerización por parte de los radicales producidos por la

actividad lacasa. Se sabe, además, que estas enzimas son capaces de mediar la declorinación, dimerización y biotransformación de los PCBs *In vitro* en presencia de mediadores enzimáticos (pequeños compuestos que facilitan la transferencia de electrones entre la enzima y el sustrato), como 1-hidroxibenzotriazol hidrato o Siringaldehído (Šrédlová *et al.*, 2021).

Si bien estas enzimas junto con otras oxidasas fúngicas conocidas tienen una gran capacidad de acción sobre estos compuestos tóxicos, es evidente que existen enzimas intracelulares encargadas de llevar a cabo otros tipos de transformaciones que permiten ulteriores modificaciones de los bifenilos policlorados, reduciendo su toxicidad. Esto se evidencia aún más cuando se comparan los índices obtenidos a partir de las pruebas de toxicidad utilizando los medios donde se desarrollaba la cepa LBM 105 (capítulo 3) y los medios tratados solo con las enzimas de dicha cepa (capítulo 6). A partir de esta comparación se puede observar cómo en los medios tratados con la cepa LBM 105 mostraban índices de crecimiento relativo por encima del valor de corte de 0,8 para la inhibición de la elongación de la radícula, mientras que si bien las enzimas de dicha cepa lograron atenuar en gran medida la toxicidad inducida por medio de los PCBs, no lograron valores de índices de crecimiento por encima de ya mencionado valor de corte, lo que refleja la persistencia del efecto de inhibición.

Finalmente, estos resultados demuestran que, de forma basal, la cepa LBM 105 de *P. pulmonarius* produce enzimas con capacidad biorremediadora sobre los bifenilos policlorados. Esto se pudo ver debido a que las enzimas obtenidas a partir de cultivos que no habían sido expuestos al contaminante previamente, podían reducir de forma parcial el efecto tóxico de estos compuestos. Las enzimas obtenidas a partir de desarrollar la cepa LBM 105 en presencia de PCBs tuvieron una mayor acción a la hora de reducir la toxicidad de los PCBs en las condiciones ensayadas. Esto nos habla de una inducción mediada por los PCBs a un perfil enzimático con mayor capacidad de biotransformación de estos compuestos. Se conoce que los hongos de pudrición blanca contienen regiones promotoras conocidas como “elementos de respuesta a los xenobióticos” tanto en enzimas lacasas (-691 y -389 bases aguas arriba en *P. ostreatus*) y las manganeso peroxidasas (-571 y -269 bases aguas arriba en *Ceriporiopsis subvermispora*)(Janusz *et al.*, 2013). La presencia de estos motivos en enzimas que se sabe están involucradas en modificación de los bifenilos policlorados, sumado al

hecho de que dichos compuestos son los responsables de activar estos centros promotores y que ya se evidenció con los estudios proteómicos y transcriptómicos una presencia y expresión aumentada de estas enzimas, explicaría el aumento en la capacidad detoxificadora de los extractos enzimáticos obtenidos de cultivos que se desarrollaron en presencia de dichos compuestos, ya que estos estarían sirviendo de inductores para un perfil de enzimas oxidasas con una mayor afinidad para la modificación y acción por sobre los PCBs.

Los resultados descritos en este capítulo reflejan los primeros ensayos de desarrollo de una estrategia de biorremediación que permita sobrepasar las barreras y limitaciones asociadas al trabajo con microorganismos para la descontaminación, en especial para los hongos de pudrición blanca que, al ser organismos que dependen de un sustrato lignocelulósico para su desarrollo en estado natural, implicaría costos adicionales. Estos resultados podrían cementar estrategias que optimicen su utilización en un entorno *In vitro*. Esto se debe a que la eficiencia de la remoción de los sustratos de las fenoloxidasas fúngicas pueden cambiar según las condiciones de pH, principalmente debido a cambios en las propiedades electrostáticas de las superficies de las proteínas o en sus sitios activos, así como también pueden cambiar las propiedades fisicoquímicas de los sustratos mismos, teniendo así un gran impacto en la actividad final de la enzima y consecuentemente en la eficacia del tratamiento de biorremediación.

6.5. Conclusión

Los ensayos de remediación *In vitro* utilizando las enzimas intra y extracelulares de *P. pulmonarius* LBM 105 demostraron que dichas enzimas mantienen la capacidad de reducir la toxicidad de los PCBs en solución acuosa.


La mayor reducción de la toxicidad fue dada por la combinación de las enzimas intracelulares y extracelulares de la cepa LBM 105, previamente desarrollada en presencia de PCBs (39,45 %), seguido por la combinación de enzimas internas y externas de la misma cepa, pero habiendo sido desarrollada en un medio sin la adición de estos contaminantes (36,90 %). Esto nos permite dilucidar que existe una producción basal de enzimas con capacidad remediadora de PCBs por parte de esta cepa, con capacidad de expresar un perfil proteico más especializado en la modificación de estos compuestos (posiblemente mediante una

inducción mediada por los elementos de respuesta a los xenobióticos) determinando una mayor remoción de los PCBs, y consecuentemente una reducción en la toxicidad.

Además, se demostró la existencia de un efecto sinérgico entre las enzimas presentes al interior de la célula y las proteínas del sobrenadante, debido a que los porcentajes de reducción de toxicidad fueron mayores cuando se combinaron dichos extractos (39,45 % para la combinatoria de extractos del tratamiento y 36,90 % para la del control) que si solo se utilizaba el homogenato interno del mismo (25,99 % para el tratamiento y 13,55 % para el control). Esto también se vio corroborado en el análisis de la varianza de la elongación de la radícula de las semillas de *L. sativa*.

Finalmente, la posible acción de los iones sodio presentes en el *buffer* acetato de sodio, usado para los ensayos de remediación *In vitro*, utilizando las enzimas extracelulares de la cepa LBM 105, podrían estar interfiriendo en la germinación de las semillas de *L. sativa*.

Estos resultados obtenidos de este análisis exploratorio abren las puertas para futuras investigaciones que tengan como objetivo el mejorar las condiciones de reacción para que las proteínas involucradas en estos procesos de biorremediación logren su óptimo, apuntando al desarrollo de estrategias de biorremediación de mayor eficacia.



Capítulo 7 Discusión y conclusiones finales

7. Discusión y conclusiones

Es evidente que los bifenilos policlorados representan un peligro ecotoxicológico reflejado por su posición a lo largo de los años en la lista prioritaria de compuestos peligrosos confeccionada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. Su capacidad de bioacumularse a través de la cadena alimenticia y su alta permanencia en suelos y sedimentos, sumado a su alta resistencia a la degradación natural hacen necesaria la búsqueda de métodos de tratamiento más efectivos, pero que al mismo tiempo tengan un menor impacto ecológico y que minimicen la cantidad de metabolitos tóxicos que puedan producirse durante dicho procedimiento.

Nuestro país no está exento de la contaminación por parte de estos xenobióticos, y aunque la producción y uso de estos compuestos fue prohibida ya en el año 2002 a partir de la sanción de la Ley N° 25670, carece de las tecnologías para la remoción por métodos químicos, debiendo exportar los residuos contaminados a otros países para su manejo y eliminación (Arias *et al.*, 2013). Esto no solo representa un alto costo económico, sino que puede contribuir a la dispersión de los contaminantes asociado al transporte de los mismos.

En el contexto de esta problemática, los tratamientos que se centran en la utilización de los microorganismos y sus enzimas son presentados como alternativas que pueden solucionar tanto los problemas del costo económico que representa en la actualidad el tener que transportar e incinerar las matrices contaminadas en suelo argentino.

Numerosos estudios presentan a los hongos de pudrición blanca como modelos apropiados para el desarrollo de estrategias de biorremediación que se enfoquen en el tratamiento de los bifenilos policlorados. Ya sea por su tipo de crecimiento hifal, que permite la mejor penetración en las matrices a tratar, aumentando la superficie de accesibilidad del contaminante, o por su batería enzimática extracelular con capacidad de modificar estos compuestos.

Diferentes géneros de este subgrupo de hongos han sido estudiados por su capacidad de remover a los bifenilos policlorados, logrando altos porcentajes de degradación. De dichos géneros, el género *Pleurotus* ha demostrado una excelente capacidad de acción por sobre estos contaminantes. Los trabajos de Čvančarová *et al.* (2012), Sadañoski *et al.* (2019) y Šrédlová *et al.* (2021) forman fundamentales

precedentes en el trabajo con este género, probando tanto la capacidad de degradación, los metabolitos producidos y la atenuación de la toxicidad, remarcando la factibilidad del trabajo con este tipo de organismos para la tarea de saneamiento ambiental.

La cepa *P. pulmonarius* LBM 105 fue elegida para su estudio en detalle debido a su capacidad de tolerar y de degradar a los bifenilos policlorados en medio líquido. El objetivo de este trabajo fue el de abordar los cambios transcriptómicos y proteómicos de dicha cepa durante la degradación de los bifenilos policlorados esperando encontrar patrones que indicaran la participación de enzimas y vías que sean determinantes para la transformación de los PCBs por parte de esta cepa fúngica.

Para ello, se determinó el periodo de mayor degradación de los bifenilos policlorados por parte de esta cepa en un medio de glucosa asparagina deficiente de nitrógeno. Se pudo observar que a los 21 días se produjo la mayor reducción de los bifenilos policlorados en el medio estudiado ($65,50 \pm 8,09$ %). En este periodo se llevaron a cabo, bajo la hipótesis de que ésta mayor degradación está dada por una mayor presencia de las enzimas involucradas en la transformación de los PCBs, los análisis transcriptómicos y proteómicos.

A partir de dichos estudios se pudo obtener información acerca de cómo afecta la presencia de los PCBs al metabolismo fúngico, así como también que enzimas podrían estar involucradas en la obtención de los altos valores de degradación de los bifenilos policlorados observados en los ensayos de remoción. Primeramente, tanto los ensayos transcriptómicos como proteómicos demostraron que existe una sobreexpresión del sistema oxidativo fúngico en presencia de los PCBs. Los bifenilos policlorados son conocidos inductores del estrés oxidativo, ya que al tener afinidad por el receptor de hidrocarburos de arilo, se liga a este y de esta forma activa genes cuya actividad tiene un efecto directo por sobre el balance redox dentro de la célula.

Sin embargo, la tolerancia observada por la cepa *P. pulmonarius* LBM 105 podría estar dada por la presencia de forma basal de enzimas que no solo tienen capacidad de acción por sobre los PCBs, modificándolos y por ende reduciendo su capacidad citotóxica, sino a la presencia de enzimas y otros agentes capaces de estabilizar el desbalance redox que produce el metabolismo de estos xenobióticos.

Se determinó, mediante los estudios realizados en este trabajo, la mayor

abundancia relativa de catalasas fúngicas, enzimas que metabolizan el peróxido de hidrógeno intracelular, también la de enzimas que participan en el metabolismo del glutatión (glutathione-S-transferasa y S-formilglutatión hidrolasa), un conocido agente reductor no enzimático capaz de atenuar la oxidación producida por la liberación de especies reactivas del oxígeno, y varias enzimas oxidasas y deshidrogenasas que participan tanto en el metabolismo oxidativo como en el metabolismo de los lípidos. Todas estas enzimas, si bien no se ha comprobado su acción directa, modificando los bifenilos policlorados, contribuyen a la manutención de las especies con capacidad redox dentro de la célula (NADH, NADPH, etc.) evitando así cascadas de oxidación de lípidos y proteínas que llevarían a la muerte de la célula fúngica. Además, la presencia aumentada de factores de transcripción involucrados en la primera línea de respuesta frente al estrés oxidativo (complejo NADH-diclorofenol-indofenol oxidoreductasa, BTF3b) refleja los procesos de control exhaustivos por parte de la célula.

Una posible explicación para la presencia de tal defensa en contra del estrés oxidativo deviene del metabolismo característico de los hongos de pudrición blanca. Este subgrupo de hongos utiliza una variedad de enzimas oxidoreductasas, siendo alguna de estas dependientes del peróxido de hidrógeno, para poder degradar la lignina y así poder acceder a la celulosa vegetal. Estas enzimas, como por ejemplo la enzima lacasa, tienen un mecanismo de acción por el cual se producen especies reactivas de oxígeno, lo que en condiciones normales significa un incremento del estrés oxidativo. Es por ello que la célula fúngica tiene las herramientas necesarias para poder resistir al incremento del estrés derivado de la presencia de los PCBs.

La acción de las enzimas involucradas en la transformación directa de los bifenilos policlorados por parte de esta cepa puede dividirse en dos, siguiendo las etapas clásicas del metabolismo de los xenobióticos.

Se tiene, por un lado, la primera fase donde existe una modificación de los grupos funcionales de los contaminantes. En esta etapa, son las mismas enzimas oxidorreductasas que degradan la lignina, las que se sabe tienen una acción directa en la modificación de los bifenilos policlorados. Šrédlová *et al.* (2021) comprobaron de forma *in vitro* los mecanismos de transformación de estas enzimas viendo cómo y en presencia de qué compuestos se llevaban a cabo las modificaciones de estos xenobióticos.

Dentro de este grupo de enzimas, las lacasas son, sin lugar a dudas, las que

más han destacado en los estudios de remediación de PCBs por parte de hongos de pudrición blanca. Así mismo, las fenoloxidasas son capaces de modificar compuestos no fenólicos por medio de vías que involucran la creación de radicales libres. Estas enzimas están involucradas en la modificación de los PCBs mediante la ruptura de la molécula de bifenilo, formando los consecuentes ácidos benzoicos. Además, se observó que incluso son capaces de formar agregados de estos compuestos, modificaciones que potencialmente pueden reducir la toxicidad de estos al tener una menor afinidad con el receptor de hidrocarburos de arilo. El perfil de expresión de las lacasas pertenecientes a la cepa LBM 105 fue muy notable. En todos los casos, la presencia de los bifenilos policlorados aumentó la cantidad de enzimas lacasas expresadas y determinadas tanto en el análisis del proteoma total, en el sobrenadante y en el análisis transcriptómico. Más interesante aún, hubo un cambio del perfil de expresión de lacasas, debido a que algunas lacasas se vieron reprimidas en presencia de PCBs mientras que una mayor cantidad de isoformas de éstas tuvieron un aumento de su expresión. Esto está en concordancia con lo observado por Sadañoski *et al.* (2019) al enfrentar a esta cepa con los PCBs, donde se observó una multiplicidad de estas enzimas mediante zimografía.

Este tipo de perfil de expresión fue similar al de la enzima del tipo peroxidasa versátil, cuya expresión fue corroborada tanto en el análisis transcriptómico como proteómico. Esta enzima tiene una acción similar a la de las manganeso peroxidasas fúngicas y además se sabe que tiene la capacidad de modificar a los clorobenzaldehídos, en presencia de glutatión, metabolitos intermediarios en la ruta metabólica de la degradación de los PCBs. En este trabajo se observa la relación de la sobreexpresión de enzimas con actividad directa en la modificación de los PCBs (peroxidasa versátil) y la sobreexpresión de enzimas que participan en el equilibrio de intermediarios necesarios para que ocurran estas reacciones, como la S-formilglutatión hidrolasa que tiene como producto el glutatión que puede ser utilizado por las peroxidasas para actuar sobre los PCBs.

Es necesario destacar también a las proteínas citocromo P450, cuya expresión fue la más notoria en el análisis transcriptómico de la cepa LBM 105 en presencia de los PCBs. Estas enzimas son unas de las primeras en actuar durante los pasos iniciales del metabolismo de diferentes tipos de xenobióticos. La amplia gama de reacciones que estas enzimas, en particular las citocromo P450 fúngicas, pueden llevar a cabo, como hidroxilación, epoxidación, dealquilación, sulfoxidación,

desaminación, desulfuración, deshalogenación y nitro reducción, les permiten ser metabólicamente versátiles para modificar contaminantes que ingresan a la célula. Nuestros estudios sobre la expresión de esta enzima durante la degradación de los bifenilos policlorados, determinaron que existen diferentes isoformas de estas que se encuentran en mayor abundancia, lo que junto con el conocimiento acerca de su capacidad de atacar a los ácidos clorobenzóicos, producto de la ruptura inicial por las enzimas lacasas, nos indica el rol central de este grupo de enzimas en el metabolismo de los bifenilos policlorados.

Así también, el aumento de expresión de los genes codificantes de otras oxidasas como la aril alcohol oxidasa, responsables de ser una de las fuentes de peróxido de hidrógeno para las peroxidasas fúngicas, podrían estar involucradas en la transformación de otros metabolitos intermediarios, como lo proponen Šrédlová *et al.* (2021), al observar la modificación de los alcoholes clorobencílicos por parte de las enzimas de *P. ostreatus*.

Las reductasas fueron también altamente representadas en ambos estudios “ómicos” realizados sobre la cepa LBM 105. La mayoría de las reductasas identificadas en este trabajo pertenecen a las reductasas de cadena corta, oxidoreductasas dependientes de NADH y NADPH, así como aldo/ceto reductasas, oxidoreductasas monoméricas dependientes de NADPH. Diversas isoformas de estas enzimas se encontraron sobreexpresadas en condiciones de degradación de PCBs, y si bien su rol en la modificación de estos compuestos no está del todo claro, su mayor contribución a la tolerancia de la cepa a los xenobióticos estaría dada por su participación en el balance de NADPH, conocido agente reductor, controlando así el equilibrio redox dentro de la célula fúngica.

La mayoría de las enzimas descritas hasta el momento podrían estar involucradas en lo que se conoce como la primera etapa del metabolismo de los xenobióticos, donde ocurren las modificaciones a los grupos funcionales de los mismos. Sin embargo, también se hicieron evidentes en estos estudios, enzimas involucradas en la segunda etapa de este metabolismo. La glutatión-S-transferasa es una enzima capaz de llevar a cabo la conjugación del tripéptido glutatión con compuestos aromáticos, como los PCBs y sus derivados, en procesos posteriores a las modificaciones llevadas a cabo por la batería de enzimas oxidoreductasas fúngicas. Además, la presencia de una S-formilglutatión hidrolasa nos permite inferir que el equilibrio del glutatión en estas condiciones es esencial, debido a que no sólo

sirve para la conjugación en las ulteriores etapas del metabolismo de los xenobióticos, sino que es conocida por su capacidad de conjugarse de forma espontánea, reemplazando grupos muy electronegativos, como los átomos de cloro de los PCBs, reacción que se comprobó en quinonas de PCBs (Song *et al.*, 2009).

Estos resultados nos muestran un perfil de expresión caracterizado por la presencia y abundancia aumentada de enzimas oxidoreductasas, capaces de atacar directamente a las moléculas de bifenilos policlorados, ya sea rompiendo a la molécula de bifenilo o mediante una dimerización de los mismos, teniendo además la capacidad de continuar modificando los diferentes metabolitos secundarios que se producen propios de este metabolismo. Es por ello que, mediante una adecuación de los datos obtenidos en este trabajo, junto al análisis exhaustivo de los intermediarios llevado a cabo por Čvančarová *et al.* (2012) y Šrédlová *et al.* (2021) se propone la siguiente vía de acción metabólica de los PCBs por parte de la cepa *P. pulmonarius* LBM 105, resaltando la participación de las enzimas identificadas en este trabajo pertenecientes a las dos etapas del metabolismo de los xenobióticos (Figura 7.1).

El estudio de esta cepa fúngica y de su capacidad de degradación de PCBs está motivado por el interés de su aplicación en estrategias de biorremediación de matrices que estén contaminadas por dichos compuestos. Es por ello que acompañado al estudio realizado de las enzimas involucradas en la remoción de los bifenilos policlorados se realizaron los ensayos ecotoxicológicos utilizando a *L. sativa* como modelo biológico. A partir de estos ensayos se pudo determinar que los tratamientos llevados a cabo en medio líquido, utilizando la cepa LBM 105 de *P. pulmonarius*, redujeron la toxicidad en un 46,47 %. Esta reducción de la toxicidad en parte puede estar explicada por los resultados obtenidos en el análisis exploratorio de los intermediarios metabólicos producidos por la cepa LBM 105 a los 21 días de contacto con los PCBs. En este análisis se observó que la mayoría de las especies remanentes de PCBs presentaban uno o dos átomos de cloro en las posiciones *orto* de la molécula, siendo estas mucho menos tóxicas debido a su menor afinidad por el receptor de hidrocarburos de arilo, receptor que media en la toxicidad inducida por la presencia de estos xenobióticos.

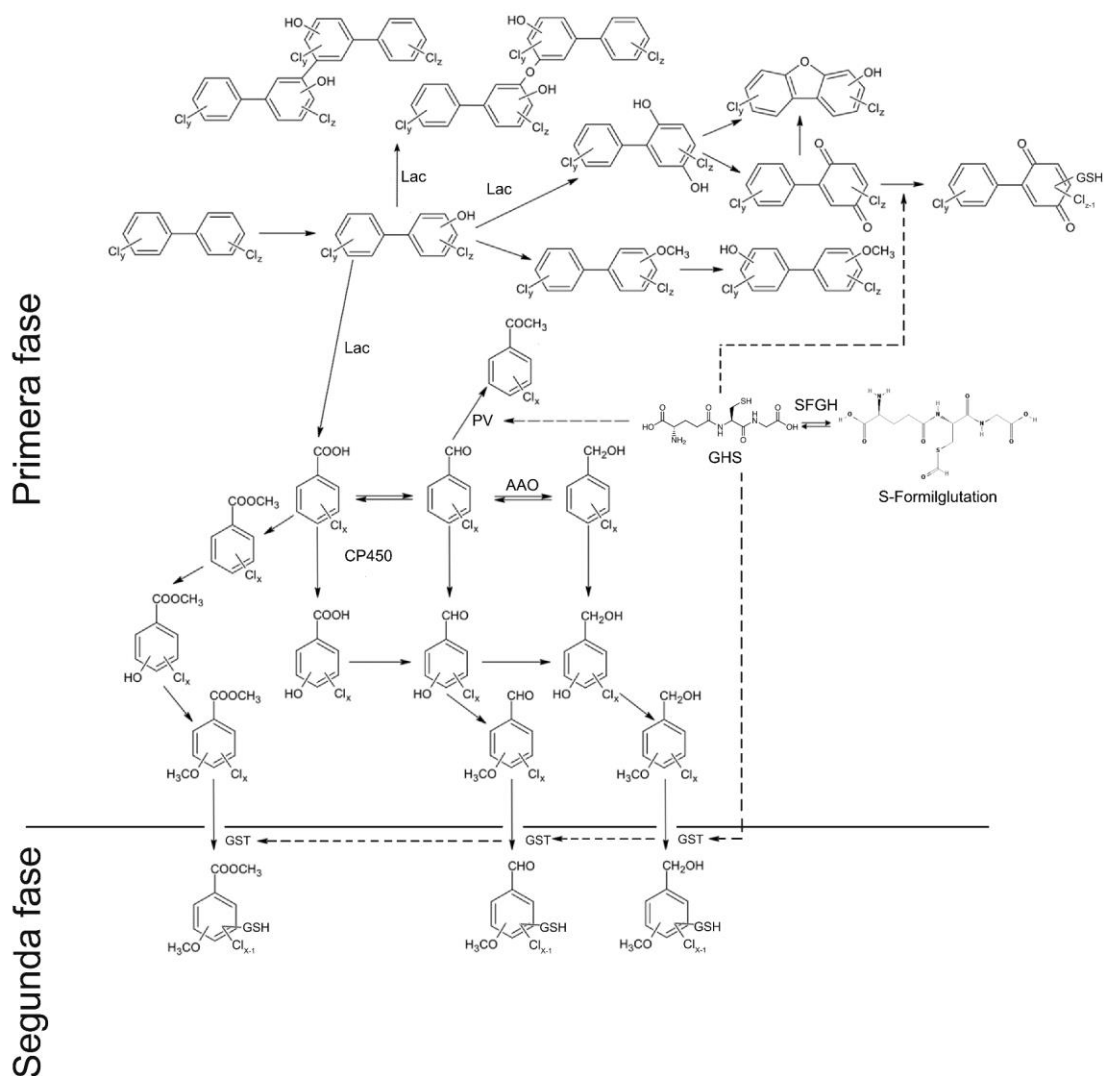



Figura 7.1. Vía propuesta para la transformación de los PCBs y sus intermediarios de degradación por la cepa *P. pulmonarius* LBM 105. Esta vía surge de la combinación de los estudios realizados por Šrédlová *et al.* (2021), Čvančarová *et al.* (2012), Song *et al.* (2009) y los resultados obtenidos de los estudios transcriptómicos y proteómicos de la cepa LBM 105 en presencia de PCBs. Las líneas punteadas denotan los pasos hipotéticos a partir de los resultados de este trabajo. La separación en fases hace referencia a las fases del metabolismo de los xenobióticos, donde la primera fase denota los procesos de transformación de los grupos funcionales de los xenobióticos, mientras que la segunda fase corresponde a los fenómenos de conjugación de los mismos. Lac= Lacasa; AAO = Ariol Alcohol Oxidasa; PV = Peroxidasa versátil; SFGH = S-formilglutacion hidrolasa; GST= Glutacion-s-transferasa

Esta capacidad de reducir la toxicidad no solo se evidenció en los ensayos ecotoxicológicos de los medios tratados con la cepa LBM 105, sino que además se pudo comprobar que las enzimas de esta cepa retenían la capacidad de detoxificar

los medios contaminados con PCBs. Los ensayos de remoción *in vitro* demostraron que la combinación de enzimas intracelulares y las del sobrenadante de cultivo previamente expuestos incubadas a pH 6 en *buffer* fosfato obtuvieron el mayor porcentaje de reducción de la toxicidad (39,45 %), observándose una mejoría en la capacidad de detoxificar de los extractos enzimáticos en comparación a las enzimas que no habían sido expuestas a los PCBs (36,90 %). Esto nos lleva a concluir que además de que existe una expresión basal de enzimas con capacidad biorremediadora producida por la cepa LBM 105 *P. pulmonarius*, se puede inducir un perfil enzimático más especializado hacia el tratamiento de estos contaminantes.

Debido a que este tipo de inducción acrecentaría la cantidad de manejo y uso de PCBs, aunque sea para su posterior eliminación, es necesario la búsqueda de otros compuestos capaces de inducir de la misma manera las diferentes enzimas estudiadas a lo largo de este trabajo, así también se deberían optimizar las condiciones de remoción llevadas a cabo por los extractos enzimáticos de la cepa LBM 105. De igual forma, y dentro de esta misma temática, el estudio en profundidad del genoma de esta cepa nos permitiría entender aún más los mecanismos de acción e inducción de los genes que codifican para las enzimas involucradas en la transformación de los PCBs, de esta forma se podrían desarrollar estrategias de biorremediación que optimicen la actividad de este conjunto de enzimas, cuya capacidad de degradación, se ha comprobado, se mantiene incluso en cultivos libres de hongos, permitiendo el avance en el desarrollo de métodos de remediación que sean eco-amigables y con una capacidad de acción comparable con los métodos *gold standard* para la degradación de bifenilos policlorados.



Recomendación para trabajos futuros

Este trabajo constituye un gran aporte al estudio de una variedad de enzimas involucradas en diversas etapas de la remoción de los PCBs. Los resultados presentados en este trabajo pueden contribuir para el desarrollo de futuras estrategias de biorremediación que utilicen las enzimas producidas por *P. pulmonarius* LBM 105. Para ello es necesario profundizar estudios que optimicen las condiciones de degradación de estos cócteles enzimáticos, probando diferentes condiciones de temperatura, pH, cantidad de proteínas, entre otras, buscando maximizar la eliminación de los PCBs hasta obtener porcentajes de remoción y reducción de la toxicidad similares a aquellos alcanzados en los cultivos con el hongo presente.

Así también, el conocimiento de las enzimas claves para los procesos de modificación de estos xenobióticos da lugar a alternativas de producción de estas enzimas mediante expresión heteróloga en organismos como *Pichia pastoris*. Una aproximación de este tipo podría mejorar la producción en términos de cantidad de estas enzimas involucradas en los procesos de transformación de PCBs, lo que permitiría un futuro escalado del proceso de biorremediación. En este sentido, conocer los promotores de los genes que controlan la expresión de estas enzimas es relevante para encontrar vías alternativas de inducción que no involucren el uso de compuestos aromáticos contaminantes.

Finalmente, se podría plantear la aplicación de los cocteles enzimáticos obtenidos de *P. pulmonarius* LBM 105 a matrices reales contaminadas con estos xenobióticos, siendo este el último paso lógico en el desarrollo de una estrategia alternativa de biorremediación que aproveche un mecanismo molecular adaptado a la modificación de estos compuestos recalcitrantes, logrando el objetivo de descontaminar dichas matrices con el menor impacto ecológico posible.



Producción Científica

Trabajos en Congresos


- ANÁLISIS SECRETÓMICO DEL HONGO PLEUROTUS SAJOR CAJU LBM 105 DURANTE LA DEGRADACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS. JORNADAS CIENTÍFICAS TECNOLÓGICAS - 45 ANIVERSARIO DE LA UNAM Y CENTENARIO REFORMA UNIVERSITARIA – 9 al 11 de Mayo del 2018 – Posadas, Argentina
- PERFIL PROTEÓMICO DEL HONGO DE PUDRICIÓN BLANCA PLEUROTUS SAJOR-CAJU LBM 105 EN CONDICIONES DE REMOCIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS Y SU IMPLICANCIA COMO AGENTE BIORREMIADOR XIV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL SAMIGE – 25 al 27 de Septiembre del 2019 – Buenos Aires, Argentina
- MICORREMIACIÓN MOLECULAR: AVANCES EN LA REMOCIÓN DE LOS BIFENILOS POLICLORADOS. JORNADAS FRACO-AMÉRICA AUSTRAL EDICIÓN 2020 - 27 de Noviembre del 2020 – Jornada Virtual
- RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL DE PLEUROTUS PULMONARIUS LBM105 DURANTE LA DEGRADACIÓN DE BIFENILOS POLICLORADOS – PRIMERAS JORNADAS INSTITUCIONALES INBIOMIS “10 Años Construyendo Biotecnología” – 23 y 24 de junio de 2022 – Posadas, Argentina

Producción Científica

- Proteomic insight on the polychlorinated biphenyl degrading mechanism of *Pleurotus pulmonarius* LBM 105. Autores: Chelaliche A. S., Alvarenga A. E., López M. C. A., Zapata P. D., Fonseca M. I. *Chemosphere* (Índice H: 248, Factor de Impacto: 7.086). Año 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.129093
- Whole Shotgun Proteomics and Its Role in Mycoremediation. Autores: Chelaliche A. S., Alvarenga A. E., Zapata P. D., Fonseca M. I. Capítulo de libro en *Mycoremediation Protocols* - Editorial Springer-Verlag New York Inc. Año 2022.
- Proteoma de *Pleurotus pulmonarius* durante la degradación de PCB. Autores: Chelaliche, A. S., Zapata, P. D., Alvarenga, A. E., & Fonseca, M. I. Año: 2020.

En Repositorio UNaM: <https://rid-muleto.unam.edu.ar/handle/20.500.12219/2614>

- Dataset: Pleurotus pulmonarius proteome during PCBs degradation. Autores: Chelaliche A. S., Alvarenga A. E., Zapata P. D., Fonseca M. I. Año 2022. Mendeley Data, V4, doi: 10.17632/648cgcw5y6.4
- Dataset: Expression analysis of Pleurotus pulmonarius LBM 105 during PCBs degradation. Autores: Chelaliche A. S., Alvarenga A. E., Zapata P. D., Fonseca M. I. Año 2022. Mendeley Data, V2, doi: 10.17632/7jkcb4mn9z.2



Proyectos de Investigación y Becas

Proyectos que financiaron este trabajo

- 16/Q660-PI CAMBIOS TRANSCRIPTÓMICOS Y PROTEÓMICOS DURANTE LA DEGRADACIÓN DE BIFENILPOLICLORADOS POR PLEUROTUS SAJOR CAJU LBM 105 NATIVO DE MISIONES (ARGENTINA).
- 16/Q1186-PDTS BIOADSORCIÓN Y MICORREMEDIACIÓN COMO ESTRATEGIAS COMBINADAS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA CITRÍCOLA
- 16/Q1321-FE BIOSENSORES AMBIENTALES DESCARTABLES: DETECCIÓN DE PESTICIDAS EN AGUAS SUPERFICIALES CON LACASA RECOMBINANTE INMOVILIZADA SOBRE NANOPARTÍCULAS ESFÉRICAS DE SÍLICE (SiO₂).

Becas que financiaron este trabajo

- Beca Doctoral CONICET – Año 2017 al 2023 – Res D N° 4252.



Bibliografía

Bibliografía

- Ågerstrand, M., Breitholtz, M., & Rudén, C. (2011). Comparison of four different methods for reliability evaluation of ecotoxicity data: a case study of non-standard test data used in environmental risk assessments of pharmaceutical substances. *Environmental Sciences Europe*, 23(1), 1-15.
- Akdogan, H. A., & Pazarlioglu, N. K. (2011). Fluorene biodegradation by *P. ostreatus*—part I: biodegradation by free cells. *Process Biochemistry*, 46(4), 834-839.
- Akhtar, N., & Mannan, M. A. U. (2020). Mycoremediation: expunging environmental pollutants. *Biotechnology reports*, 26, e00452.
- Almagro Armenteros, J. J., Sønderby, C. K., Sønderby, S. K., Nielsen, H., & Winther, O. (2017). DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*, 33(21), 3387-3395.
- Alvarenga, P., Clemente, R., Garbisu, C., & Becerril, J. M. (2018). Indicators for monitoring mine site rehabilitation. In *Bio-Geotechnologies for Mine Site Rehabilitation* (pp. 49-66). Elsevier.
- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853-1861.
- Aon, M. A., Cortassa, S., & O'rourke, B. (2010). Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797(6-7), 865-877.
- Arias, A. H., Vazquez-Botello, A., Diaz, G., & Marcovecchio, J. E. (2013). Accumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in navigation channels, harbors and industrial areas of the Bahia Blanca Estuary, Argentina.
- Athanasopoulos, A., André, B., Sophianopoulou, V., & Gournas, C. (2019). Fungal plasma membrane domains. *FEMS microbiology reviews*, 43(6), 642-673.
- Baccelli, I. (2015). Cerato-platanin family proteins: one function for multiple biological roles?. *Frontiers in plant science*, 5, 769.
- Başaran, R., & Benay, C. A. N. (2017). Flavin containing monooxygenases and metabolism of xenobiotics. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 14(1), 90.
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J. I., Sunde, M., & Latge, J. P. (2012). Hydrophobins—unique fungal proteins. *PLoS pathogens*, 8(5), e1002700.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.

- Béatrice, L., & Georgios, Z. (1995). Molecular systematics of the genus *Pleurotus*: analysis of restriction polymorphisms in ribosomal DNA. *Microbiology*, 141(6), 1479-1490.
- Beale, D. J., Karpe, A. V., & Ahmed, W. (2016). Beyond metabolomics: a review of multi-omics-based approaches. *Microbial metabolomics*, 289-312.
- Bedard, D. L., Quensen, J. F. (1995). Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*, Wiley-Liss, New York, 127-216.
- Bedard, D. L., Ritalahti, K. M., & Loffler, F. E. (2007). The Dehalococcoides population in sediment-free mixed cultures metabolically dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260. *Applied and environmental microbiology*, 73(8), 2513-2521.
- Behnood, M., Nasernejad, B., & Nikazar, M. (2014). Biodegradation of crude oil from saline wastewater using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4), 1879-1885.
- Benitez, S. F., Sadañoski, M. A., Velázquez, J. E., Zapata, P. D., & Fonseca, M. I. (2021). Comparative study of single cultures and a consortium of white rot fungi for polychlorinated biphenyls treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 131(4), 1775-1786.
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of biotechnology*, 124(1), 128-145.
- Bhalla, R., Tehrani, R., & Van Aken, B. (2016). Toxicity of hydroxylated polychlorinated biphenyls (HO-PCBs) using the bioluminescent assay Microtox®. *Ecotoxicology*, 25(7), 1438-1444.
- Bhattacharya, S., Das, A., Palaniswamy, M., & Angayarkanni, J. (2017). Degradation of benzo [a] pyrene by *Pleurotus ostreatus* PO-3 in the presence of defined fungal and bacterial co-cultures. *Journal of Basic Microbiology*, 57(2), 95-103.
-
- Bilal, M., Asgher, M., Parra-Saldivar, R., Hu, H., Wang, W., Zhang, X., & Iqbal, H. M. (2017a). Immobilized ligninolytic enzymes: an innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants—a review. *Science of the Total Environment*, 576, 646-659.
- Bilal, M., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2017b). Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *Journal of environmental management*, 188, 137-143.

- Blum, M., Chang, H. Y., Chuguransky, S., Grego, T., Kandasaamy, S., Mitchell, A., ... & Finn, R. D. (2021). The InterPro protein families and domains database: 20 years on. *Nucleic acids research*, 49(D1), D344-D354.
- Borja, J., Taleon, D. M., Auresenia, J., & Gallardo, S. (2005). Polychlorinated biphenyls and their biodegradation. *Process biochemistry*, 40(6), 1999-2013.
- Buha, A., Antonijević, B., Milovanović, V., Janković, S., Bulat, Z., & Matović, V. (2015). Polychlorinated biphenyls as oxidative stress inducers in liver of subacutely exposed rats: implication for dose-dependence toxicity and benchmark dose concept. *Environmental Research*, 136, 309-317.
- Caccia, D., Dugo, M., Callari, M., & Bongarzone, I. (2013). Bioinformatics tools for secretome analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1834(11), 2442-2453.
- Carpenter, D. O. (2006). Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health. *Reviews on environmental health*, 21(1), 1-24.
- Cajthaml, T., Erbanová, P., Kollmann, A., Novotný, Č., Šašek, V., & Mougín, C. (2008). Degradation of PAHs by ligninolytic enzymes of *Irpex lacteus*. *Folia microbiologica*, 53(4), 289-294.
- Ceger, P., Vinas, N. G. R., Allen, D., Arnold, E., Bloom, R., Brennan, J. C., ... & Odenkirchen, E. (2022). Current ecotoxicity testing needs among selected US federal agencies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 105195.
- Céspedes, M. A., Galindo, M. I., & Couso, J. P. (2010). Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One*, 5(11), e15382.
- Chakraborty, S., Mukherjee, A., & Das, T. K. (2013). Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: an implication of bioremediation of lead from liquid media. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 134-142.
- Chakraborty, S., Salekdeh, G. H., Yang, P., Woo, S. H., Chin, C. F., Gehring, C., ... & Komatsu, S. (2015). Proteomics of important food crops in the Asia Oceania Region: current status and future perspectives. *Journal of proteome research*, 14(7), 2723-2744.
- Chelaliche, A. S., Alvarenga, A. E., Lopez, C. A. M., Zapata, P. D., & Fonseca, M. I. (2021). Proteomic insight on the polychlorinated biphenyl degrading mechanism of *Pleurotus pulmonarius* LBM 105. *Chemosphere*, 265, 129093.
- Chen, A., Zeng, G., Chen, G., Zhang, C., Yan, M., Shang, C., ... & Zuo, Y. (2014). Hydrogen sulfide alleviates 2, 4-dichlorophenol toxicity and promotes its degradation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 109, 208-212.

- Cloete, T. E., & Celliers, L. (1999). Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus *Coriolus versicolor* in the presence of different concentrations of Mn (IV) oxide. *International biodeterioration & biodegradation*, 44(4), 243-253.
- Coelho-Moreira, J. D. S., Bracht, A., Souza, A. C. D. S. D., Oliveira, R. F., Sá-Nakanishi, A. B. D., Souza, C. G. M. D., & Peralta, R. M. (2013). Degradation of diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: role of ligninolytic enzymes and cytochrome P450. *BioMed research international*, 2013.
- Colpa, D. I., Fraaije, M. W., & van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases: a promising and versatile class of enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 1-7.
- Cortassa, S., O'Rourke, B., & Aon, M. A. (2014). Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(2), 287-295.
- Cortázar, A. R., Aransay, A. M., Alfaro, M., Oguiza, J. A., & Lavín, J. L. (2014). SECRETOOL: integrated secretome analysis tool for fungi. *Amino Acids*, 46(2), 471-473.
- Covino, S., Svobodová, K., Křesinová, Z., Petruccioli, M., Federici, F., D'Annibale, A., ... & Cajthaml, T. (2010). In vivo and in vitro polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus* CBS 577.79. *Bioresource technology*, 101(9), 3004-3012.
- Crinnion, W. J. (2011). Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences. *Alternative Medicine Review*, 16(1).
- Cruz, Y. W., Vieira, Y. A., Vilar, D. S., Torres, N. H., Aguiar, M. M., Cavalcanti, E. B., ... & Ferreira, L. F. (2020). Pulp wash: a new source for production of ligninolytic enzymes and biomass and its toxicological evaluation after biological treatment. *Environmental Technology*, 41(14), 1837-1847.
- Čvančarová, M., Křesinová, Z., Filipová, A., Covino, S., & Cajthaml, T. (2012). Biodegradation of PCBs by ligninolytic fungi and characterization of the degradation products. *Chemosphere*, 88(11), 1317-1323.
- Dai, R. P., Yu, F. X., Goh, S. R., Chng, H. W., Tan, Y. L., Fu, J. L., ... & Luo, Y. (2008). Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD⁺/NADH redox status. *Journal of Biological Chemistry*, 283(40), 26894-26901.
- Dastoor, Z., & Dreyer, J. (2000). Nuclear translocation and aggregate formation of heat shock cognate protein 70 (Hsc70) in oxidative stress and apoptosis. *Journal of Cell Science*, 113(16), 2845-2854.

- Dastoor, Z., & Dreyer, J. L. (2001). Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *Journal of cell science*, 114(9), 1643-1653.
- Deng, P., Barney, J., Petriello, M. C., Morris, A. J., Wahlang, B., & Hennig, B. (2019). Hepatic metabolomics reveals that liver injury increases PCB 126-induced oxidative stress and metabolic dysfunction. *Chemosphere*, 217, 140-149.
- Díaz, A., Rangel, P., de Oca, Y. M., Lledías, F., & Hansberg, W. (2001). Molecular and kinetic study of catalase-1, a durable large catalase of *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1323-1333.
- Ding, J., Chen, B., & Zhu, L. (2013). Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* in aqueous solution. *Chinese Science Bulletin*, 58(6), 613-621.
- Dhingra, S., & Cramer, R. A. (2017). Regulation of sterol biosynthesis in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: opportunities for therapeutic development. *Frontiers in microbiology*, 8, 92.
- Elangovan, S., Pandian, S. B. S., SJ, G., & Joshi, S. J. (2019). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental fate, challenges and bioremediation. In *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds* (pp. 165-188). Springer, Singapore.
- EPA, United States Environmental Protection Agency. (1996). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200–Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test.
- Espinosa-Ortiz, E. J., Rene, E. R., & Gerlach, R. (2022). Potential use of fungal-bacterial co-cultures for the removal of organic pollutants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 42(3), 361-383.
- Falade, A. O., Nwodo, U. U., Iweriebor, B. C., Green, E., Mabinya, L. V., & Okoh, A. I. (2017). Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *MicrobiologyOpen*, 6(1), e00394.
- Faroon, O., & Ruiz, P. (2016). Polychlorinated biphenyls: new evidence from the last decade. *Toxicology and industrial health*, 32(11), 1825-1847.
- Fellows, R., Russo, C. M., Silva, C. S., Lee, S. G., Jez, J. M., Chisholm, J. D., ... & Nanao, M. H. (2018). A multisubstrate reductase from *Plantago major*: structure-function in the short chain reductase superfamily. *Scientific reports*, 8(1), 1-13.
- Ferreira, P., Medina, M., Guillén, F., Martínez, M. J., Van Berkel, W. J., & Martínez, Á. T. (2005). Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochemical Journal*, 389(3), 731-738.
- Fonseca, M. I., Fariña, J. I., Sadanoski, M. A., D'Errico, R., Villalba, L. L., & Zapata, P. D. (2015). Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization

of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 443-451.

- Francois, J. M. (2016). Cell surface interference with plasma membrane and transport processes in yeasts. *Yeast membrane transport*, 11-31.
- Futschik, M. E., Morkel, M., Schäfer, R., & Sers, C. (2018). The Human Transcriptome: Implications for Understanding, Diagnosing, and Treating Human Disease. In *Molecular Pathology* (pp. 135-164). Academic Press.
- Ghosh, A., Dastidar, M. G., & Sreerishnan, T. R. (2017). Bioremediation of chromium complex dyes and treatment of sludge generated during the process. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 448-460.
- Gladieux, P., Wilson, B. A., Perraudeau, F., Montoya, L. A., Kowbel, D., Hann-Soden, C., ... & Taylor, J. W. (2015). Genomic sequencing reveals historical, demographic and selective factors associated with the diversification of the fire-associated fungus *Neurospora discreta*. *Molecular ecology*, 24(22), 5657-5675.
- Gomes, H. I., Dias-Ferreira, C., & Ribeiro, A. B. (2013). Overview of in situ and ex situ remediation technologies for PCB-contaminated soils and sediments and obstacles for full-scale application. *Science of the Total Environment*, 445, 237-260.
- Gore, A. C. (2001). Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine*, 14(2), 235-246.
- Graf, A., Trofimova, L., Loshinskaja, A., Mkrtychyan, G., Strokina, A., Lovat, M., ... & Bunik, V. I. (2013). Up-regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase as a stress response. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(1), 175-189.
- Guarino, C., Spada, V., & Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation–Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10-16.
- Haelewaters, D., De Kesel, A., & Pfister, D. H. (2018). Integrative taxonomy reveals hidden species within a common fungal parasite of ladybirds. *Scientific reports*, 8(1), 1-16.
- Haglund, C., Levin, L., Forchiassin, F., Lopez, M., & Viale, A. (2002). Degradation of environmental pollutants by *Trametes trogii*. *Revista Argentina de microbiologia*, 34(3), 157-162.
- Haridas, S., Albert, R., Binder, M., Bloem, J., LaButti, K., Salamov, A., ... & Grigoriev, I. V. (2020). 101 Dothideomycetes genomes: A test case for predicting lifestyles and emergence of pathogens.

- Hasby, F. A., Barbi, F., Manzoni, S., & Lindahl, B. D. (2021). Transcriptomic markers of fungal growth, respiration and carbon-use efficiency. *FEMS microbiology letters*, 368(15), fnab100.
- Hashmi, M. Z., Kalim, M., Farooq, U., Su, X., Chakraborty, P., & Rehman, S. U. (2022). Chemical remediation and advanced oxidation process of polychlorinated biphenyls in contaminated soils: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-16.
- Hassan, M. A., Al-Sakkaf, K., Shait Mohammed, M. R., Dallol, A., Al-Maghrabi, J., Aldahlawi, A., ... & Choudhry, H. (2020). Integration of transcriptome and metabolome provides unique insights to pathways associated with obese breast cancer patients. *Frontiers in oncology*, 10, 804.
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, 16(1), 1-7.
- Helbig, A. O., Heck, A. J., & Slijper, M. (2010). Exploring the membrane proteome—challenges and analytical strategies. *Journal of proteomics*, 73(5), 868-878.
- Hirai, H., Nakanishi, S., & Nishida, T. (2004). Oxidative dechlorination of methoxychlor by ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Chemosphere*, 55(4), 641-645.
- Hofstetter, V., Buyck, B., Eyssartier, G., Schnee, S., & Gindro, K. (2019). The unbearable lightness of sequenced-based identification. *Fungal Diversity*, 96(1), 243-284.
- Holmes, D. E., O'neil, R. A., Chavan, M. A., N'guessan, L. A., Vronis, H. A., Perpetua, L. A., ... & Lovley, D. R. (2009). Transcriptome of *Geobacter uraniireducens* growing in uranium-contaminated subsurface sediments. *The ISME journal*, 3(2), 216-230.
- Hu, D., Martinez, A., & Hornbuckle, K. C. (2011). Sedimentary records of non-Aroclor and Aroclor PCB mixtures in the Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 37(2), 359-364.
- Hu, J., Qian, M., Zhang, Q., Cui, J., Yu, C., Su, X., ... & Shi, J. (2015). *Sphingobium fuliginis* HC3: a novel and robust isolated biphenyl-and polychlorinated biphenyls-degrading bacterium without dead-end intermediates accumulation. *PloS one*, 10(4), e0122740.
- Hu, C., Huang, D., Zeng, G., Cheng, M., Gong, X., Wang, R., ... & Liu, Y. (2018). The combination of Fenton process and *Phanerochaete chrysosporium* for the removal of bisphenol A in river sediments: mechanism related to extracellular enzyme, organic acid and iron. *Chemical Engineering Journal*, 338, 432-439.

- Hu, C., Huang, D., Zeng, G., Cheng, M., Gong, X., Wang, R., ... & Liu, Y. (2018). The combination of Fenton process and *Phanerochaete chrysosporium* for the removal of bisphenol A in river sediments: mechanism related to extracellular enzyme, organic acid and iron. *Chemical Engineering Journal*, 338, 432-439.
- Hu, K., Peris, A., Torán, J., Eljarrat, E., Sarrà, M., Blánquez, P., & Caminal, G. (2020). Exploring the degradation capability of *Trametes versicolor* on selected hydrophobic pesticides through setting sights simultaneously on culture broth and biological matrix. *Chemosphere*, 250, 126293.
- Huang, S., Liu, R., Sun, M., Li, X., Guan, Y., & Lian, B. (2022). Transcriptome expression analysis of the gene regulation mechanism of bacterial mineralization tolerance to high concentrations of Cd²⁺. *Science of The Total Environment*, 806, 150911.
- Huang, G., & Elferink, C. J. (2012). A novel nonconsensus xenobiotic response element capable of mediating aryl hydrocarbon receptor-dependent gene expression. *Molecular pharmacology*, 81(3), 338-347.
- IARC (2016) Polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 107.
- Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., ... & Meyer, W. (2015). International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database—the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Medical mycology*, 53(4), 313-337.
- Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J., & Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein* s. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(9), 1265-1272.
- Iwamoto, T., & Nasu, M. (2001). Current bioremediation practice and perspective. *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(1), 1-8.
- Jamil, M., Wang, W., Xu, M., & Tu, J. (2015). Exploring the roles of basal transcription factor 3 in eukaryotic growth and development. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 31(1-2), 21-45.
- Jan, N., Qazi, H. A., Raja, V., & John, R. (2019). Proteomics: A tool to decipher cold tolerance. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 31(1), 183-213.
- Janusz, G., Kucharzyk, K. H., Pawlik, A., Staszczak, M., & Paszczyński, A. J. (2013). Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. *Enzyme and Microbial technology*, 52(1), 1-12.

- Joseph, C. G., Farm, Y. Y., Taufiq-Yap, Y. H., Pang, C. K., Nga, J. L., & Puma, G. L. (2021). Ozonation treatment processes for the remediation of detergent wastewater: A comprehensive review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 106099.
- Jukes, T. H., & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism*, 3, 21-132.
- Kalogerakis, N., Fava, F., Corvine P. F. (2017). Bioremediation advances. *New Biotechnology*, 38 (1), 41-42.
- Kamei, I., Kogura, R., & Kondo, R. (2006a). Metabolism of 4, 4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(3), 566-575.
- Kamei, I., Sonoki, S., Haraguchi, K., & Kondo, R. (2006b). Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(4), 932-940.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.
- Keum, Y. S., & Li, Q. X. (2004). Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 56(1), 23-30.
- Kim, H. O., Lim, J. M., Joo, J. H., Kim, S. W., Hwang, H. J., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2005). Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology*, 96(10), 1175-1182.
- Koch, R. A., Wilson, A. W., Séné, O., Henkel, T. W., & Aime, M. C. (2017). Resolved phylogeny and biogeography of the root pathogen *Armillaria* and its gasteroid relative, *Guyanagaster*. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 1-16.
- Koch, R. A., Jean Lodge, D., Sourell, S., Nakasone, K., McCoy, A. G., & Catherine Aime, M. (2018). Tying up loose threads: revised taxonomy and phylogeny of an avian-dispersed Neotropical rhizomorph-forming fungus. *Mycological Progress*, 17(9), 989-998.
- Kobmoo, N., Mongkolsamrit, S., Arnarnart, N., Luangsa-Ard, J. J., & Giraud, T. (2019). Population genomics revealed cryptic species within host-specific zombie-ant fungi (*Ophiocordyceps unilateralis*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 140, 106580.

- Kohlmeier, S., Smits, T. H., Ford, R. M., Keel, C., Harms, H., & Wick, L. Y. (2005). Taking the fungal highway: mobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environmental science & technology*, 39(12), 4640-4646.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Iida, M., Nakayama, S. F., & Shiozaki, T. (2018). A sensitive, rapid, and simple DR-EcoScreen bioassay for the determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in environmental and food samples. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), 7101-7112.
- Korashy, H. M., & El-Kadi, A. O. (2006). The role of aryl hydrocarbon receptor in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Drug metabolism reviews*, 38(3), 411-450.
- Korcan, S. E., Ciğerci, İ. H., & Konuk, M. (2013). White-rot fungi in bioremediation. In *Fungi as Bioremediators* (pp. 371-390). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kordon, K., Mikolasch, A., & Schauer, F. (2010). Oxidative dehalogenation of chlorinated hydroxybiphenyls by laccases of white-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(3), 203-209.
- Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Singh, M., Joshi, D., ... & Saxena, A. K. (2021). Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(20), 24917-24939.
- Krouzek, J., Durdak, V., Hendrych, J., Masin, P., Sobek, J., & Spacek, P. (2018). Pilot scale applications of microwave heating for soil remediation. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 130, 53-60.
- Kruse, J., Piątek, M., Lutz, M., & Thines, M. (2018). Broad host range species in specialised pathogen groups should be treated with suspicion—a case study on *Entyloma* infecting *Ranunculus*. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41(1), 175-201.
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Levin, L. (2015). Enhancement of laccase production and malachite green decolorization by co-culturing *Ganoderma lucidum* and *Trametes versicolor* in solid-state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 238-243.
- Kulkarni, S., Nene, S., & Joshi, K. (2017). Production of Hydrophobins from fungi. *Process biochemistry*, 61, 1-11.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Labianca, C., De Gisi, S., Todaro, F., Notarnicola, M., & Bortone, I. (2022). A review of the in-situ capping amendments and modeling approaches for the remediation of contaminated marine sediments. *Science of The Total Environment*, 806, 151257.

- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lassen, N., Black, W. J., Estey, T., & Vasiliou, V. (2008, April). The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 19, No. 2, pp. 100-112). Academic Press.
- Lauber, C., Schwarz, T., Nguyen, Q. K., Lorenz, P., Lochnit, G., & Zorn, H. (2017). Identification, heterologous expression and characterization of a dye-decolorizing peroxidase of *Pleurotus sapidus*. *AMB Express*, 7(1), 1-15.
- Lechner, B. E., Wright, J. E., & Albertó, E. (2004). The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, 96(4), 845-858.
- Legler, P. M., Leary, D. H., Hervey IV, W. J., & Millard, C. B. (2012). A role for His-160 in peroxide inhibition of *S. cerevisiae* S-formylglutathione hydrolase: evidence for an oxidation sensitive motif. *Archives of biochemistry and biophysics*, 528(1), 7-20.
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. *Contributions to probability and statistics*, 278-292.
- Li, Q., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2009). Oxidative stress in industrial fungi. *Critical reviews in biotechnology*, 29(3), 199-213.
- Li, H., Liu, L., Lin, C., & Wang, S. (2011). Plant uptake and in-soil degradation of PCB-5 under varying cropping conditions. *Chemosphere*, 84(7), 943-949.
- Li, G. X., Chen, H. M., Wu, M. S., & He, C. Y. (2012). Generation and molecular identification of transgenic lines with overexpressed *OsBTF3* gene. *Current Biotechnology*, 2, 39-43.
- Li, Y., Wang, Z., Xu, X., & Jin, L. (2015). A Ca-alginate particle co-immobilized with *Phanerochaete chrysosporium* cells and the combined cross-linked enzyme aggregates from *Trametes versicolor*. *Bioresource technology*, 198, 464-469.
- Li, Y., Dai, M., Zhang, Y., & Lu, L. (2021). The sterol C-14 reductase *Erg24* is responsible for ergosterol biosynthesis and ion homeostasis in *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3), 1253-1268.
- Lin, S., Wei, J., Yang, B., Zhang, M., & Zhuo, R. (2022). Bioremediation of organic pollutants by white rot fungal cytochrome P450: The role and mechanism of CYP450 in biodegradation. *Chemosphere*, 134776.
- Liu, L., Tindall, J. A., & Friedel, M. J. (2007). Biodegradation of PAHs and PCBs in soils and sludges. *Water, Air, and Soil Pollution*, 181(1), 281-296.
- Liu, J., Qi, Z., Zhao, Z., Li, X., Buekens, A., Yan, J., & Ni, M. (2015). Thermal desorption of PCB-contaminated soil with sodium hydroxide. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), 19538-19545.

- Liu, Z., Shao, B., Zeng, G., Chen, M., Li, Z., Liu, Y., ... & Yan, M. (2018). Effects of rhamnolipids on the removal of 2, 4, 2, 4-tetrabrominated biphenyl ether (BDE-47) by *Phanerochaete chrysosporium* analyzed with a combined approach of experiments and molecular docking. *Chemosphere*, 210, 922-930.
- Liu, J., Tan, Y., Song, E., & Song, Y. (2020). A critical review of polychlorinated biphenyls metabolism, metabolites, and their correlation with oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 33(8), 2022-2042.
- Loganathan, B. G., & Lam, P. K. S. (Eds.). (2011). *Global contamination trends of persistent organic chemicals*. CRC Press.
- Loganathan, B. G., & Masunaga, S. (2020). PCBs, dioxins, and furans: human exposure and health effects. In *Handbook of toxicology of chemical warfare agents* (pp. 267-278). Academic Press.
- Loit, K., Adamson, K., Bahram, M., Puusepp, R., Anslan, S., Kiiker, R., ... & Tedersoo, L. (2019). Relative performance of MinION (Oxford Nanopore Technologies) versus Sequel (Pacific Biosciences) third-generation sequencing instruments in identification of agricultural and forest fungal pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(21), e01368-19.
- Lorch, J. M., Palmer, J. M., Vanderwolf, K. J., Schmidt, K. Z., Verant, M. L., Weller, T. J., & Blehert, D. S. (2018). *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 41(1), 56-70.
- Lothe, A. G., Kalra, S. S., Wang, M., Mack, E. E., Walecka-Hutchison, C., Kickhoefer, V. A., ... & Mahendra, S. (2020). Vault packaged enzyme mediated degradation of amino-aromatic energetic compounds. *Chemosphere*, 242, 125117.
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T., ... & Schoch, C. L. (2020). Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. *IMA fungus*, 11(1), 1-32.
- Magain, N., Miadlikowska, J., Mueller, O., Gajdeczka, M., Truong, C., Salamov, A. A., ... & Lutzoni, F. (2017). Conserved genomic collinearity as a source of broadly applicable, fast evolving, markers to resolve species complexes: a case study using the lichen-forming genus *Peltigera* section *Polydactylon*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117, 10-29.
- Manavalan, T., Manavalan, A., & Heese, K. (2015). Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current microbiology*, 70(4), 485-498.
- Mao, L., Lu, J., Gao, S., & Huang, Q. (2010). Transformation of 17 β -estradiol mediated by lignin peroxidase: the role of veratryl alcohol. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 59(1), 13-19.

- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17(1), 10-12.
- Mariussen, E., Myhre, O., Reistad, T., & Fonnum, F. (2002). The polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254 induces death of rat cerebellar granule cells: the involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor and reactive oxygen species. *Toxicology and applied pharmacology*, 179(3), 137-144.
- Martínez, Á. T., Speranza, M., Ruiz-Dueñas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillén, F., ... & Río Andrade, J. C. D. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin.
- Martínez-Guzmán, C., Cortés-Reynosa, P., Pérez-Salazar, E., Murillo-González, F. E., & Elizondo, G. (2020). Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) induces human glutathione S transferase alpha 1 (hGSTA1) expression. *Chemico-Biological Interactions*, 331, 109284.
- Martínez-Sánchez, J., Membrillo-Venegas, I., Martínez-Trujillo, A., & García-Rivero, A. M. (2018). Decolorization of reactive black 5 by immobilized *Trametes versicolor*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 107-121.
- Matsuzaki, F., Shimizu, M., & Wariishi, H. (2008). Proteomic and metabolomic analyses of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* exposed to exogenous benzoic acid. *Journal of proteome research*, 7(6), 2342-2350.
- Matsuzaki, F., & Wariishi, H. (2005). Molecular characterization of cytochrome P450 catalyzing hydroxylation of benzoates from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4), 1184-1190.
- Menolli Junior, N., Asai, T., Capelari, M., & Paccola-Meirelles, L. D. (2010). Morphological and molecular identification of four Brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 397-408.
- Minton, K. (2016). Reading protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(11), 676-677.
- Mitra, A., Roy, D., Roy, P., Bor, A. M., & Sarkar Mitra, A. K. (2014). Sustainability of *Aspergillus* spp. in metal enriched substrate aiming towards increasing bioremediation potential. *World J Pharm Pharm Sci*, 3, 864-878.
- Moeder, M., Cajthaml, T., Koeller, G., Erbanová, P., & Šašek, V. (2005). Structure selectivity in degradation and translocation of polychlorinated biphenyls (Delor 103) with a *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) culture. *Chemosphere*, 61(9), 1370-1378.

- Mohanty, M. (2021). Proteomics and Bioinformatics as Novel Tools in Phytoremediation Technology-An Overview. *Journal of Botanical Research*, 3(3).
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., & Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical reviews in microbiology*, 41(3), 295-308.
- Morgensztern, D., Devarakonda, S., Mitsudomi, T., Maher, C., & Govindan, R. (2018). Mutational events in lung cancer: Present and developing technologies. In *IASLC Thoracic Oncology* (pp. 95-103). Elsevier.
- Morin, E., Miyauchi, S., San Clemente, H., Chen, E. C., Pelin, A., de la Providencia, I., ... & Martin, F. M. (2019). Comparative genomics of *Rhizoglyphus irregularis*, *R. cerebriforme*, *R. diaphanus* and *Gigaspora rosea* highlights specific genetic features in Glomeromycotina. *New Phytologist*, 222(3), 1584-1598.
- Mori, T., Ohno, H., Ichinose, H., Kawagishi, H., & Hirai, H. (2021). White-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* metabolizes chloropyridinyl-type neonicotinoid insecticides by an N-dealkylation reaction catalyzed by two cytochrome P450s. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123831.
- Munro, A. W., Girvan, H. M., & McLean, K. J. (2007). Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(3), 345-359.
- Muzikář, M., Křesinová, Z., Svobodová, K., Filipová, A., Čvančarová, M., Cajthamlová, K., & Cajthaml, T. (2011). Biodegradation of chlorobenzoic acids by ligninolytic fungi. *Journal of hazardous materials*, 196, 386-394.
- Nagy, L. G., Kocsubé, S., Csanádi, Z., Kovács, G. M., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Papp, T. (2012). Re-mind the gap! Insertion–deletion data reveal neglected phylogenetic potential of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) of fungi. *PloS one*, 7(11), e49794.
- Nagy, L. G., Tóth, R., Kiss, E., Slot, J., Gácsér, A., & Kovács, G. M. (2017). Six key traits of fungi: Their evolutionary origins and genetic bases. *Microbiol. Spectr.* 5.
- Nielsen, H. (2017). Predicting secretory proteins with SignalP. In *Protein function prediction* (pp. 59-73). Humana Press, New York, NY.
- Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F. S., Bengtsson-Palme, J., Jeppesen, T. S., Schigel, D., ... & Abarenkov, K. (2019). The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic acids research*, 47(D1), D259-D264.
- Noor, Z., Ahn, S. B., Baker, M. S., Ranganathan, S., & Mohamedali, A. (2021). Mass spectrometry–based protein identification in proteomics—a review. *Briefings in bioinformatics*, 22(2), 1620-1638.

- O'Leary, N. A., Wright, M. W., Brister, J. R., Ciuffo, S., Haddad, D., McVeigh, R., ... & Pruitt, K. D. (2016). Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic acids research*, 44(D1), D733-D745.
- Ohtsubo, Y., Kudo, T., Tsuda, M., & Nagata, Y. (2004). Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(3), 250-258.
- Oloriz, M. I., Gil, V., Rojas, L., Portal, O., Izquierdo, Y., Jiménez, E., & Höfte, M. (2012). Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: identification and transcript profiling. *Plant Cell Reports*, 31, 955-969.
- Pánek, M., Wiesnerová, L., Jablonský, I., Novotný, D., & Tomšovský, M. (2019). What is cultivated oyster mushroom? Phylogenetic and physiological study of *Pleurotus ostreatus* and related taxa. *Mycological Progress*, 18(9), 1173-1186.
- Parkinson, A., & Ogilvie, B. W. (2008). Biotransformation of xenobiotics. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*, 7, 161-304.
- Passatore, L., Rossetti, S., Juwarkar, A. A., & Massacci, A. (2014). Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): state of knowledge and research perspectives. *Journal of hazardous materials*, 278, 189-202.
- Patel, T. K., & Williamson, J. D. (2016). Mannitol in plants, fungi, and plant–fungal interactions. *Trends in plant science*, 21(6), 486-497.
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Pegler, D. N. (1975). The classification of the genus *Lentinus* Fr. (Basidiomycota). *Kavaka*, 3, 11-20.
- Perkins, J. T., Petriello, M. C., Newsome, B. J., & Hennig, B. (2016). Polychlorinated biphenyls and links to cardiovascular disease. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(3), 2160-2172.
- Pessah, I. N., Lein, P. J., Seegal, R. F., & Sagiv, S. K. (2019). Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls and related organohalogenes. *Acta neuropathologica*, 138(3), 363-387.
- Pezzella, C., Macellaro, G., Sannia, G., Raganati, F., Olivieri, G., Marzocchella, A., ... & Piscitelli, A. (2017). Exploitation of *Trametes versicolor* for bioremediation of endocrine disrupting chemicals in bioreactors. *PLoS one*, 12(6), e0178758.
- Pieper, D. H., & Seeger, M. (2008). Bacterial metabolism of polychlorinated biphenyls. *Microbial Physiology*, 15(2-3), 121-138.

- Pietro-Souza, W., de Campos Pereira, F., Mello, I. S., Stachack, F. F. F., Terezo, A. J., da Cunha, C. N., ... & Soares, M. A. (2020). Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. *Chemosphere*, 240, 124874.
- Plačková, M., Svobodová, K., & Cajthaml, T. (2012). Laccase activity profiling and gene expression in PCB-degrading cultures of *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 22-28.
- Pozdnyakova, N. N., Nikiforova, S. V., Makarov, O. E., Chernyshova, M. P., Pankin, K. E., & Turkovskaya, O. V. (2010). Influence of cultivation conditions on pyrene degradation by the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(2), 205-211.
- Przystaś, W., Zabłocka-Godlewska, E., & Grabińska-Sota, E. (2013). Effectiveness of dyes removal by mixed fungal cultures and toxicity of their metabolites. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(5), 1-9.
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products*, 80(3), 756-770.
- Ralser, M., Wamelink, M. M., Kowald, A., Gerisch, B., Heeren, G., Struys, E. A., ... & Krobitsch, S. (2007). Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of biology*, 6(4), 1-18.
- Recio-Vega, R., Mendez-Henandez, A., Gabriel, A. P. Y., Jacobo-Avila, A., Portales-Castanedo, A., Hernandez-Gonzalez, S., ... & Ocampo-Gomez, G. (2013). Potentially estrogenic polychlorinated biphenyls congeners serum levels and its relation with lung cancer. *Journal of applied toxicology*, 33(9), 906-914.
- Reddy, A. V. B., Moniruzzaman, M., & Aminabhavi, T. M. (2019). Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment: recent updates on sampling, pretreatment, cleanup technologies and their analysis. *Chemical Engineering Journal*, 358, 1186-1207.
- Rivers, A. R., Weber, K. C., Gardner, T. G., Liu, S., & Armstrong, S. D. (2018). ITSxpress: Software to rapidly trim internally transcribed spacer sequences with quality scores for marker gene analysis. *F1000Research*, 7.
- Robertson, L. W., & Ludewig, G. (2011). Polychlorinated Biphenyl (PCB) carcinogenicity with special emphasis on airborne PCBs. *Gefahrstoffe, Reinhaltung der Luft*, 71(1-2), 25.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *bioinformatics*, 26(1), 139-140.

- Roccatano, D. (2015). Structure, dynamics, and function of the monooxygenase P450 BM-3: insights from computer simulations studies. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(27), 273102.
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Marco-Urrea, E., & Caminal, G. (2010). Degradation of naproxen and carbamazepine in spiked sludge by slurry and solid-phase *Trametes versicolor* systems. *Bioresource Technology*, 101(7), 2259-2266.
- Rosales, E., Pazos, M., & Ángeles Sanromán, M. (2013). Feasibility of Solid-State Fermentation Using Spent Fungi-Substrate in the Biodegradation of PAHs. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 41(6), 610-615.
- Rosnina, A. G., Tan, Y. S., Abdullah, N., & Vikineswary, S. (2016). Morphological and molecular characterization of yellow oyster mushroom, *Pleurotus citrinopileatus*, hybrids obtained by interspecies mating. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 1-9.
- Ruiz-Aguilar, G. M., Fernández-Sánchez, J. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Poggi-Valardo, H. (2002). Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research*, 6(4), 559-568.
- Ruggaber, T. P., & Talley, J. W. (2006). Enhancing bioremediation with enzymatic processes: a review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 10(2), 73-85.
- Saatcioglu, F. A. H. R., Perry, D. J., Pasco, D. S., & Fagan, J. B. (1990). Multiple DNA-binding factors interact with overlapping specificities at the aryl hydrocarbon response element of the cytochrome P450IA1 gene. *Molecular and cellular biology*, 10(12), 6408-6416.
- Sadañoski, M. A., Benítez, S. F., Fonseca, M. I., Velázquez, J. E., Zapata, P. D., Levin, L. N., & Villalba, L. L. (2019). Mycoremediation of high concentrations of polychlorinated biphenyls with *Pleurotus sajor-caju* LBM 105 as an effective and cheap treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7(6), 103453.
- Sadañoski, M. A., Tatarin, A. S., Barchuk, M. L., Gonzalez, M., Pegoraro, C. N., Fonseca, M. I., ... & Villalba, L. L. (2020). Evaluation of bioremediation strategies for treating recalcitrant halo-organic pollutants in soil environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110929.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, 27(2), 185-194.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

- Sayqal, A., & Ahmed, O. B. (2021). Advances in heavy metal bioremediation: an overview. *Applied Bionics and Biomechanics*, 2021.
- Schlezinger, J. J., Struntz, W. D., Goldstone, J. V., & Stegeman, J. J. (2006). Uncoupling of cytochrome P450 1A and stimulation of reactive oxygen species production by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Aquatic toxicology*, 77(4), 422-432.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & Chen, W. (2012). Fungal barcoding consortium; fungal barcoding consortium author list: nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(16), 6241-6246.
- Scott, C., Lewis, S. E., Milla, R., Taylor, M. C., Rodgers, A. J., Dumsday, G., ... & Russell, R. J. (2010). A free-enzyme catalyst for the bioremediation of environmental atrazine contamination. *Journal of Environmental Management*, 91(10), 2075-2078.
- Shah, P. C., Kumar, V. R., Dastager, S. G., & Khire, J. M. (2017). Phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 for a novel application to degrade organophosphorus pesticides. *AMB express*, 7(1), 1-11.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591-611.
- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: a review. *Journal of environmental management*, 210, 10-22.
- Shimizu, E., Velez Rueda, J. O., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2009). Relación entre degradación de colorantes y oxidación de lignina residual causados por *Ganoderma applanatum* y *Pycnoporus sanguineus* en el licor negro kraft. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (12), 46-51.
- Shin, J., Kim, J. E., Lee, Y. W., & Son, H. (2018). Fungal cytochrome P450s and the P450 complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. *Toxins*, 10(3), 112.
- Shnyreva, A. A., Sivolapova, A. B., & Shnyreva, A. V. (2012). The commercially cultivated edible oyster mushrooms *Pleurotus sajor-caju* and *P. pulmonarius* are two separate species, similar in morphology but reproductively isolated. *Russian Journal of Genetics*, 48(11), 1080-1088.
- Smith, P. E., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., ... & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Song, J., Liu, X., & Li, R. (2020). Sphingolipids: Regulators of azole drug resistance and fungal pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 114(6), 891-905.

- Song, H. Y., Kim, D. H., & Kim, J. M. (2018). Comparative transcriptome analysis of dikaryotic mycelia and mature fruiting bodies in the edible mushroom *Lentinula edodes*. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.
- Song, Y., Ambati, J., Parkin, S., Rankin, S. E., Robertson, L. W., & Lehmler, H. J. (2011). Crystal structure and density functional theory studies of toxic quinone metabolites of polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 85(3), 386-392.
- Song, Y., Wagner, B. A., Witmer, J. R., Lehmler, H. J., & Buettner, G. R. (2009). Nonenzymatic displacement of chlorine and formation of free radicals upon the reaction of glutathione with PCB quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9725-9730.
- Sørensen, J. G., & Loeschcke, V. (2007). Studying stress responses in the post-genomic era: its ecological and evolutionary role. *Journal of biosciences*, 32(3), 447-456.
- Šrédlová, K., & Cajthaml, T. (2022). Recent advances in PCB removal from historically contaminated environmental matrices. *Chemosphere*, 287, 132096.
- Šrédlová, K., Šírová, K., Stella, T., & Cajthaml, T. (2021). Degradation products of polychlorinated biphenyls and their in vitro transformation by ligninolytic fungi. *Toxics*, 9(4), 81.
- Šrédlová, K., Škrob, Z., Filipová, A., Mašín, P., Holecová, J., & Cajthaml, T. (2020). Biodegradation of PCBs in contaminated water using spent oyster mushroom substrate and a trickle-bed bioreactor. *Water research*, 170, 115274.
- Stadler, M., Lambert, C., Wibberg, D., Kalinowski, J., Cox, R. J., Kolařík, M., & Kuhnert, E. (2020). Intragenomic polymorphisms in the ITS region of high-quality genomes of the Hypoxylaceae (Xylariales, Ascomycota). *Mycological Progress*, 19(3), 235-245.
- Stamets, P. (2011). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten speed press.
- Stella, T., Covino, S., Křesinová, Z., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Čvančarová, M., & Cajthaml, T. (2013). Chlorobenzoic acid degradation by *Lentinus (Panus) tigrinus*: In vivo and in vitro mechanistic study-evidence for P-450 involvement in the transformation. *Journal of hazardous materials*, 260, 975-983.
- Stiborova, H., Kolar, M., Vrkoslavova, J., Pulkrabova, J., Hajslova, J., Demnerova, K., & Uhlik, O. (2017). Linking toxicity profiles to pollutants in sludge and sediments. *Journal of hazardous materials*, 321, 672-680.
- Stoj, C. S., & Kosman, D. J. (2011). Copper proteins: oxidases. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*.
- Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y. W., & Yadav, J. S. (2010). Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases

oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochemical and biophysical research communications*, 399(4), 492-497.

- Szewczyk, R., Soboń, A., Słaba, M., & Długoński, J. (2015). Mechanism study of alachlor biodegradation by *Paecilomyces marquandii* with proteomic and metabolomic methods. *Journal of Hazardous Materials*, 291, 52-64.
- Takagi, S., Shirota, C., Sakaguchi, K., Suzuki, J., Sue, T., Nagasaka, H., ... & Sonoki, S. (2007). Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. *Chemosphere*, 67(9), S54-S57.
- Tanokura, M., Miyakawa, T., Guan, L., & Hou, F. (2015). Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(9), 1391-1401.
- Tausz, J., & Donath, P. (1930). Über die Oxydation des Wasserstoffs und der Kohlenwasserstoffe mittels Bakterien.
- Tedersoo, L., Tooming-Klunderud, A., & Anslan, S. (2018). PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases and perspectives. *New Phytologist*, 217(3), 1370-1385.
- Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383-399.
- Thompson, S. D., Prahalad, S., & Colbert, R. A. (2016). Integrative genomics. In *Textbook of pediatric rheumatology* (pp. 43-53). WB Saunders.
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S., & Sato, H. (2012). High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of ascomycetes and basidiomycetes in environmental samples. *PloS one*, 7(7), e40863.
- Tran, N. H., Urase, T., & Kusakabe, O. (2010). Biodegradation characteristics of pharmaceutical substances by whole fungal culture *Trametes versicolor* and its laccase. *Journal of Water and Environment Technology*, 8(2), 125-140.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W., & Sawa, A. (2011). The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cellular signalling*, 23(2), 317-323.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., ... & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote) omics data. *Nature methods*, 13(9), 731-740.
- Vilaplana, M., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Barón, E., Gorga, M., Sarrà, M., Caminal, G., ... & Barceló, D. (2015). Biodegradation of Polybrominated DiphenylEthers in Liquid Media and Sewage Sludge by *Trametes versicolor*. *International Journal of Environmental Research*, 9(1), 273-280.

- Wang, Y., Zhang, X., Lu, S., Wang, M., Wang, L., Wang, W., ... & Tu, J. (2012). Inhibition of a basal transcription factor 3-like gene Osj10gBTF3 in rice results in significant plant miniaturization and typical pollen abortion. *Plant and Cell Physiology*, 53(12), 2073-2089.
- Wang, S., Qiu, L., Liu, X., Xu, G., Siegert, M., Lu, Q., ... & Qiu, R. (2018). Electron transport chains in organohalide-respiring bacteria and bioremediation implications. *Biotechnology advances*, 36(4), 1194-1206.
- Westerink, R. H. (2014). Modulation of cell viability, oxidative stress, calcium homeostasis, and voltage-and ligand-gated ion channels as common mechanisms of action of (mixtures of) non-dioxin-like polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(10), 6373-6383.
- Wibberg, D., Stadler, M., Lambert, C., Bunk, B., Spröer, C., Rückert, C., ... & Kuhnert, E. (2021). High quality genome sequences of thirteen Hypoxylaceae (Ascomycota) strengthen the phylogenetic family backbone and enable the discovery of new taxa. *Fungal Diversity*, 106(1), 7-28.
- Wiegel, J., & Wu, Q. (2000). Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS microbiology ecology*, 32(1), 1-15.
- Williams RT: *Detoxification Mechanisms*, 2d ed. New York: Wiley, 1971.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wójcik, A., Perczyk, P., Wydro, P., & Broniatowski, M. (2020). Dichlorobiphenyls and chlorinated benzoic acids—Emergent soil pollutants in model bacterial membranes. Langmuir monolayer and Grazing Incidence X-ray Diffraction studies. *Journal of Molecular Liquids*, 307, 112997.
- Wolska, L., Mechlińska, A., Rogowska, J., & Namieśnik, J. (2012). Sources and fate of PAHs and PCBs in the marine environment. *Critical reviews in environmental science and technology*, 42(11), 1172-1189.
- Worrich, A., König, S., Miltner, A., Banitz, T., Centler, F., Frank, K., ... & Wick, L. Y. (2016). Mycelium-like networks increase bacterial dispersal, growth, and biodegradation in a model ecosystem at various water potentials. *Applied and environmental microbiology*, 82(10), 2902-2908.
- Wu, B. Z., Chen, H. Y., Wang, S. J., Wai, C. M., Liao, W., & Chiu, K. (2012). Reductive dechlorination for remediation of polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, 88(7), 757-768.

- Wu, J., Hu, J., Wang, S., Jin, J., Wang, R., Wang, Y., & Jin, J. (2018). Levels, sources, and potential human health risks of PCNs, PCDD/Fs, and PCBs in an industrial area of Shandong Province, China. *Chemosphere*, 199, 382-389.
- Xing, G. H., Wu, S. C., & Wong, M. H. (2010). Dietary exposure to PCBs based on food consumption survey and food basket analysis at Taizhou, China—the world's major site for recycling transformers. *Chemosphere*, 81(10), 1239-1244.
- Xing, Z., Hu, T., Xiang, Y., Qi, P., & Huang, X. (2020). Degradation mechanism of 4-chlorobiphenyl by consortium of *Pseudomonas* sp. strain CB-3 and *Comamonas* sp. strain CD-2. *Current Microbiology*, 77(1), 15-23.
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *Genome*, 59(11), 913-932.
- Xu, F., Chen, P., Li, H., Qiao, S., Wang, J., Wang, Y., ... & Xu, H. (2021). Comparative transcriptome analysis reveals the differential response to cadmium stress of two *Pleurotus* fungi: *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 125814.
- Ye, W., Chen, R., Chen, X., Huang, B., Lin, R., Xie, X., ... & Wen, J. (2019). AhR regulates the expression of human cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) by recruiting Sp1. *The FEBS Journal*, 286(21), 4215-4231.
- Yin, Y., Yu, G., Chen, Y., Jiang, S., Wang, M., Jin, Y., ... & Sun, H. (2012). Genome-wide transcriptome and proteome analysis on different developmental stages of *Cordyceps militaris*. *PLoS one*, 7(12), e51853.
- Young, B. J., Riera, N. I., Beily, M. E., Bres, P. A., Crespo, D. C., & Ronco, A. E. (2012). Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 182-186.
- Young, D., Rice, J., Martin, R., Lindquist, E., Lipzen, A., Grigoriev, I., & Hibbett, D. (2015). Degradation of bunker C fuel oil by white-rot fungi in sawdust cultures suggests potential applications in bioremediation. *PLoS one*, 10(6), e0130381.
- Yu, Z., Zhang, T., & Zhu, Y. (2020). Whole-genome re-sequencing and transcriptome reveal cadmium tolerance related genes and pathways in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110231.
- Yu, G. J., Wang, M., Huang, J., Yin, Y. L., Chen, Y. J., Jiang, S., ... & Sun, H. (2012). Deep insight into the *Ganoderma lucidum* by comprehensive analysis of its transcriptome.
- Yum, S., Woo, S., Kagami, Y., Park, H. S., & Ryu, J. C. (2010). Changes in gene expression profile of medaka with acute toxicity of Arochlor 1260, a polychlorinated biphenyl mixture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(1), 51-56.

- Yun, J., Malvankar, N. S., Ueki, T., & Lovley, D. R. (2016). Functional environmental proteomics: elucidating the role of a c-type cytochrome abundant during uranium bioremediation. *The ISME journal*, 10(2), 310-320.
- Zahmatkesh, M., Spanjers, H., & van Lier, J. B. (2018). A novel approach for application of white rot fungi in wastewater treatment under non-sterile conditions: immobilization of fungi on sorghum. *Environmental technology*, 39(16), 2030-2040.
- Zhao, C., Dong, Y., Feng, Y., Li, Y., & Dong, Y. (2019). Thermal desorption for remediation of contaminated soil: A review. *Chemosphere*, 221, 841-855.
- Zhou, Y., Chen, L., Fan, X., & Bian, Y. (2014). De novo assembly of *Auricularia polytricha* transcriptome using Illumina sequencing for gene discovery and SSR marker identification. *PloS one*, 9(3), e91740.
- Zhuo, R., Zhang, J., Yu, H., Ma, F., & Zhang, X. (2019). The roles of *Pleurotus ostreatus* HAUCC 162 laccase isoenzymes in decolorization of synthetic dyes and the transformation pathways. *Chemosphere*, 234, 733-745.
- Zhuo, R., & Fan, F. (2021). A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants. *Science of the Total Environment*, 778, 146132.
- Zhu, N. M., & Zhang, F. S. (2011). Catalytic dechlorination of polychlorinated biphenyls in subcritical water by Ni/Fe nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 171(3), 919-925.
- Zhu, N. M., Wang, C. F., & Zhang, F. S. (2012). An integrated two-stage process for effective dechlorination of polychlorinated biphenyls in subcritical water in the presence of hydrogen donors. *Chemical engineering journal*, 197, 135-142.
- Zwiernik, M. J., Quensen, J. F., & Boyd, S. A. (1998). FeSO₄ amendments stimulate extensive anaerobic PCB dechlorination. *Environmental science & technology*, 32(21), 3360-3365.

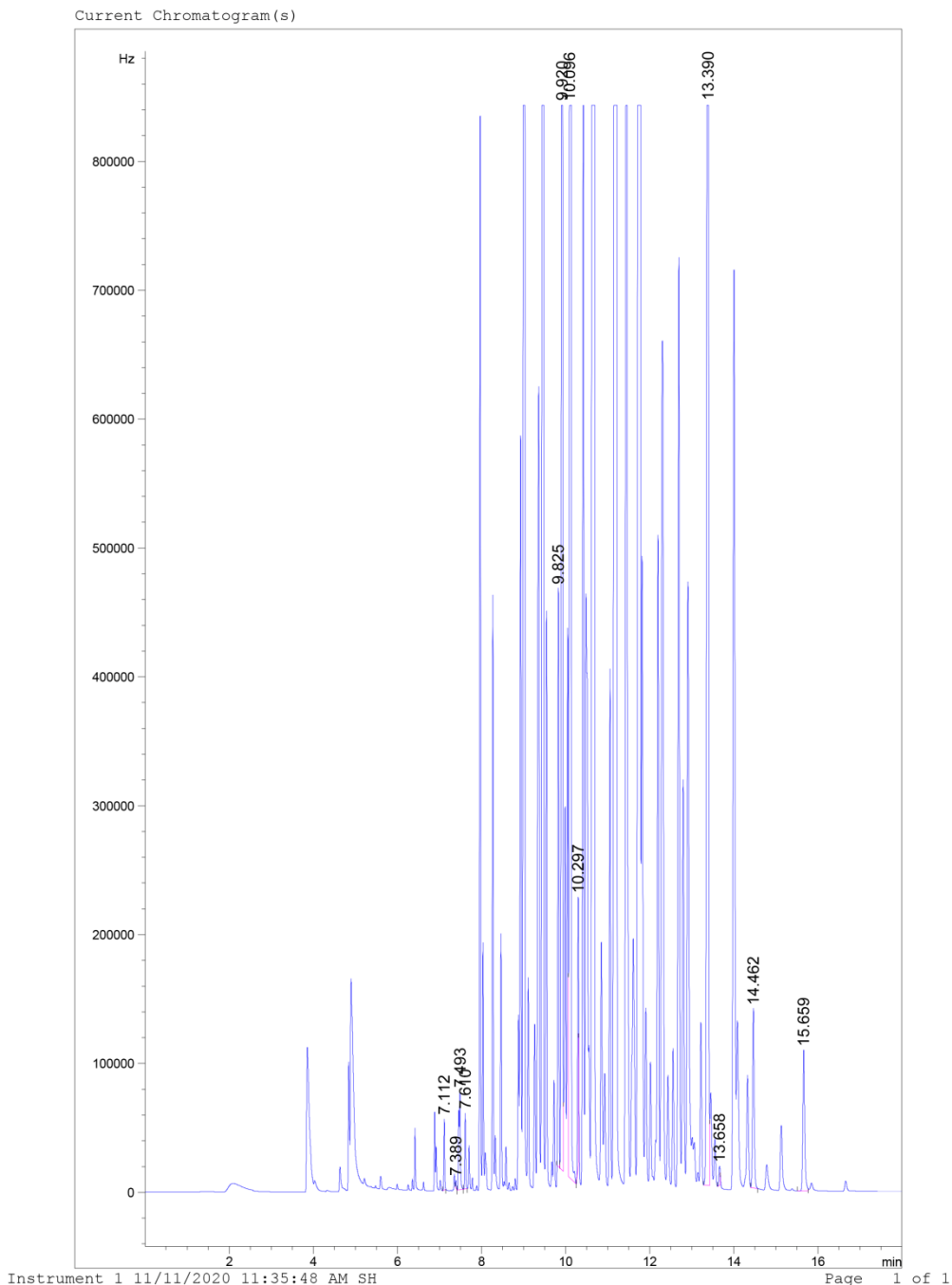


Anexos

Anexo 1: Perfiles cromatográficos de los ensayos de remoción *in vitro* con la cepa *Pleurotus pulmonarius* LBM 105 obtenidos por cromatografía gaseosa y captura de electrones.

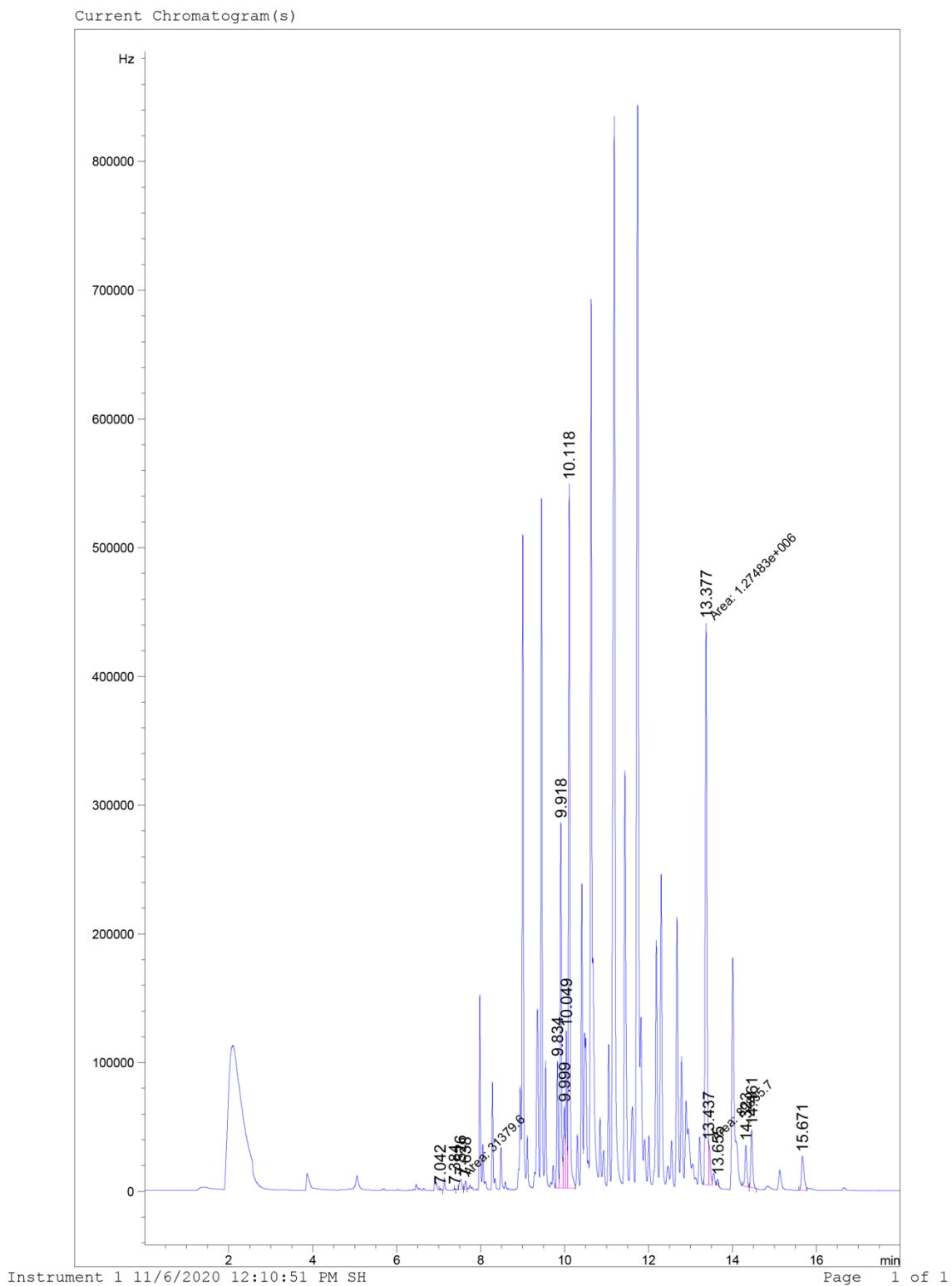
1.1 Perfil cromatográfico del control abiótico (PCB-) a los 28 días.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



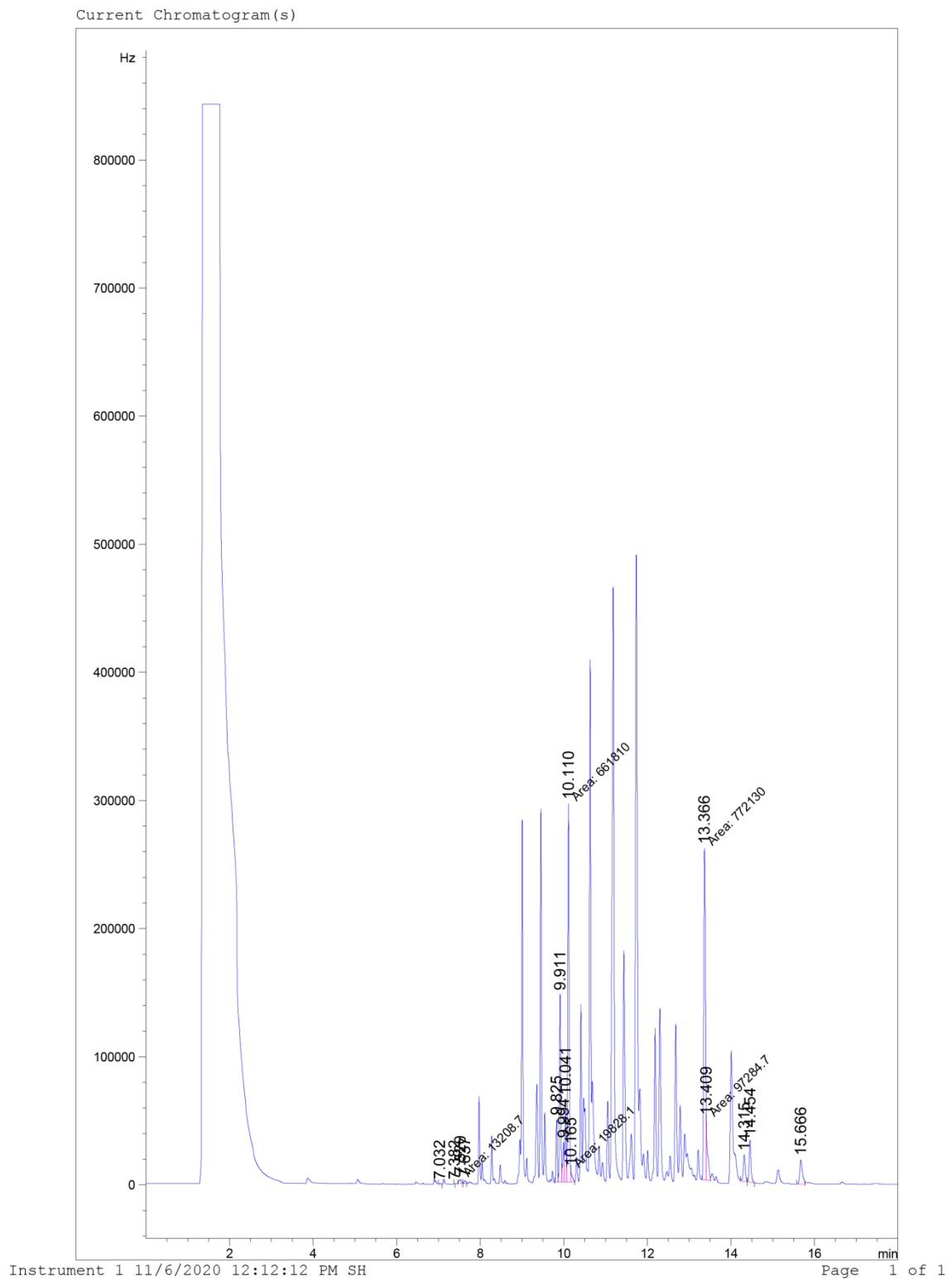
1.2 Perfil cromatográfico del control autoclavado a los 28 días

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



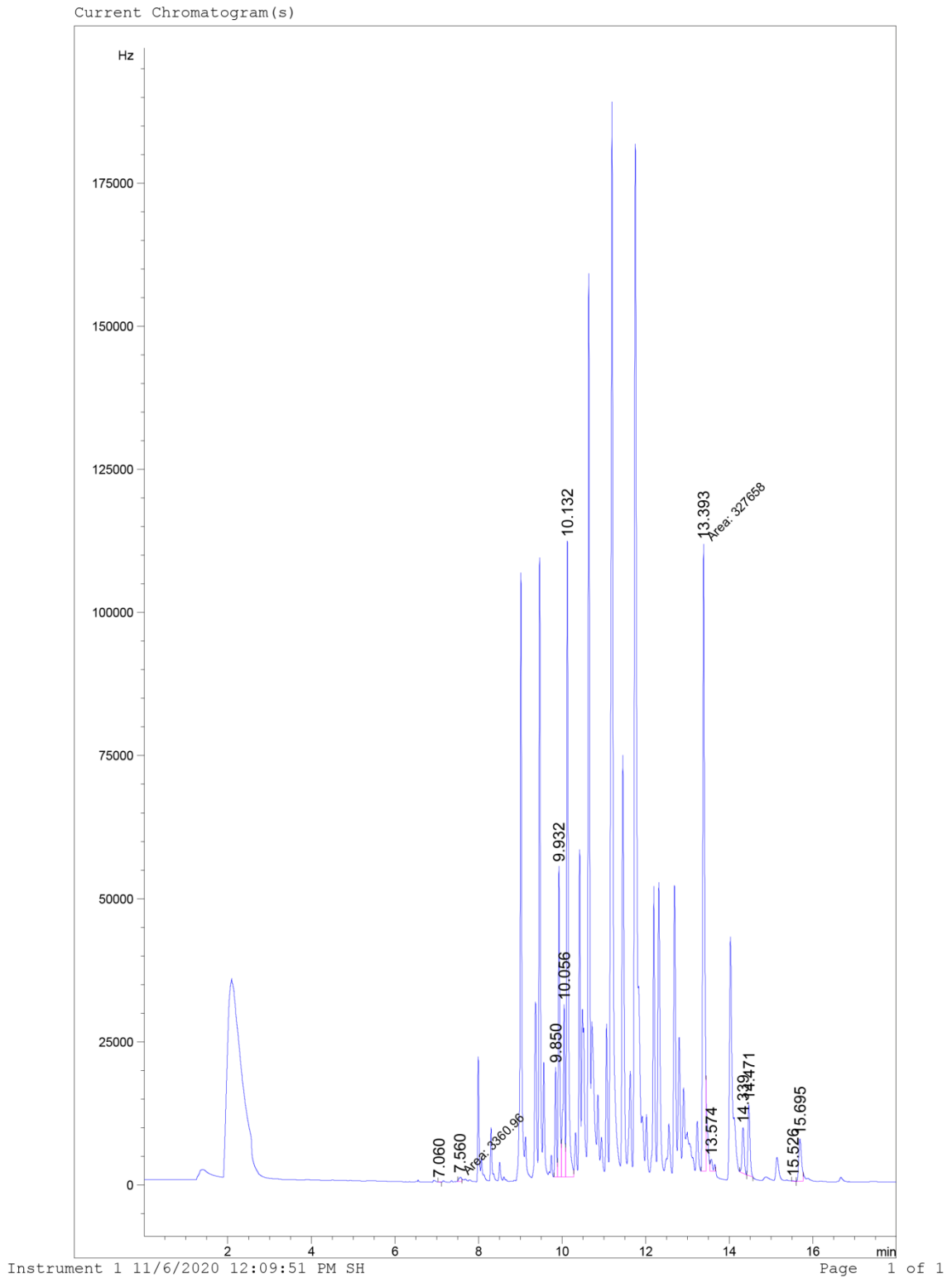
1.3 Perfil cromatográfico tratamiento con la cepa LBM 105 luego de 14 días.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



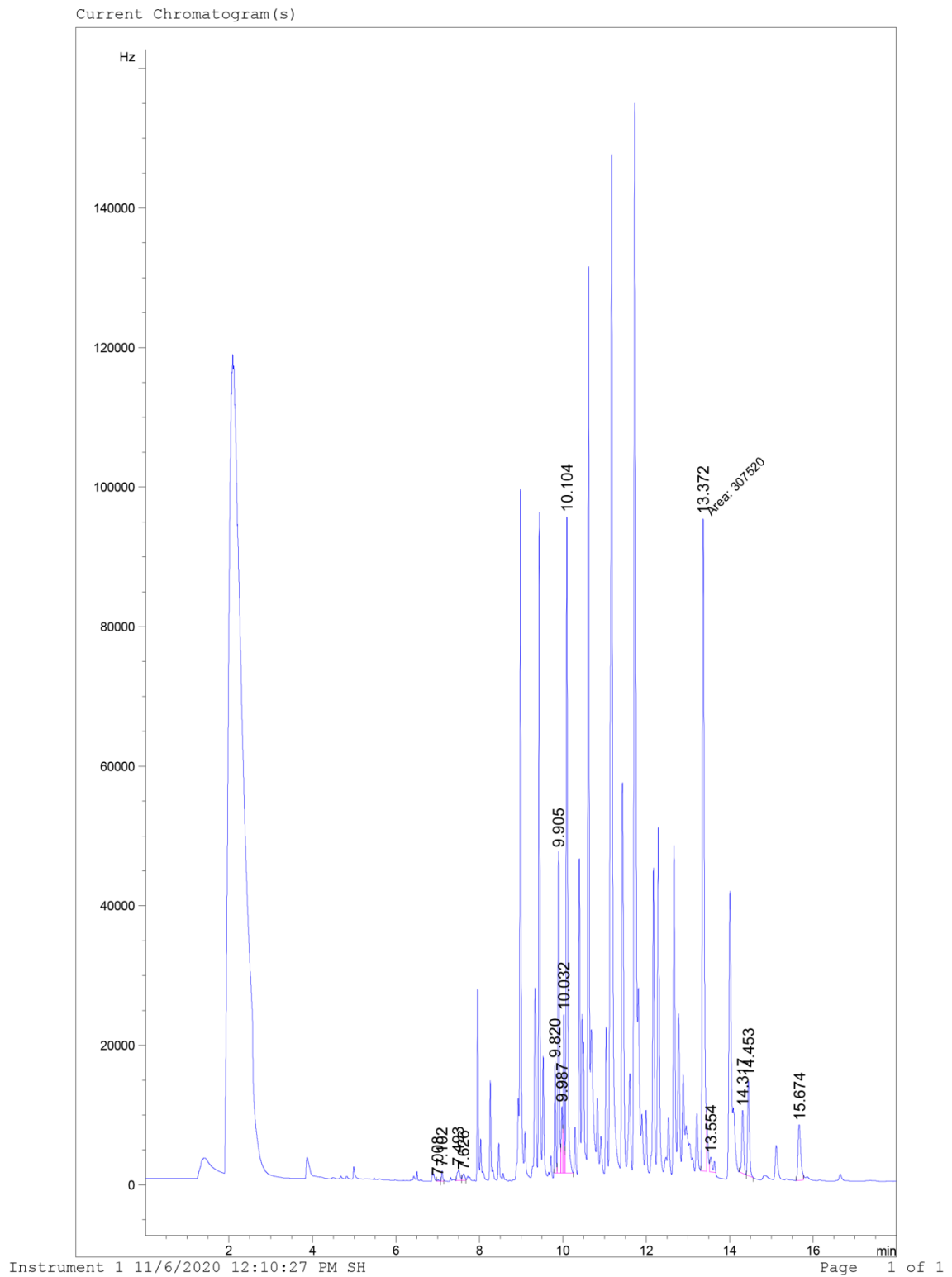
1.4 Perfil cromatográfico tratamiento con la cepa LBM 105 luego de 21 días.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



1.5 Perfil cromatográfico tratamiento con la cepa LBM 105 luego de 28 días.

Print of window 38: Current Chromatogram(s)



1.6 Medias de la concentración total de PCBs obtenidas por cromatografía gaseosa acoplado a captura de electrones.

Muestra	Concentración total de PCBs ($\mu\text{g/L}$)	Desvío estándar (\pm) ($\mu\text{g/L}$)
Control Abiótico	82835.11	20148.93
Control Autoclavado	71579.78	1244.50
Tratamiento día 14	50330.68	3631.83
Tratamiento día 21	24701.63	3137.69
Tratamiento día 28	14034.55	3539.38

Anexo 2: Intermediarios de degradación identificados por espectrometría de masas a partir de la remoción de los PCBs utilizando la cepa LBM 105 *Pleurotus pulmonarius*.

Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Relación m/z de los iones fragmentados (Intensidad Relativa)	Estructura Posible (Fórmula Química)
5,99	180	182 (999), 180 (940), 109 (400), 145 (400), 74 (390), 147 (300), 184 (270), 75 (230), 73 (190), 84 (180)	1,2,3-Triclorobenceno (C ₆ H ₃ Cl ₃)
6,44	136	135 (999), 136 (749), 77 (380), 92 (200), 107 (189), 39 (129), 65 (125), 63 (118), 64 (115), 51 (99)	4-metoxibenzaldehido (C ₈ H ₈ O ₂)
6,92	214	216 (999), 214 (809), 218 (495), 179 (210), 181 (202), 108 (170), 109 (140), 143 (136), 74 (135), 220 (109)	1,2,4,5-Tetraclorobenceno (C ₆ H ₂ Cl ₄)
7,21	214	216 (999), 214 (784), 218 (485), 179 (210), 181 (202), 108 (170), 109 (140), 143 (136), 74 (135), 220 (109)	1,2,4,5-Tetraclorobenceno (C ₆ H ₂ Cl ₄)
7,53	210	210 (999), 215 (960), 195 (940), 197 (890), 167 (750), 169 (720), 97 (500), 63 (300), 214 (300), 61 (280)	1,2,3-tricloro-4-metoxibenceno (C ₇ H ₅ Cl ₃ O)
8,55	222	152 (999), 222 (712), 187 (523), 224 (464), 75 (253), 151 (243), 93 (174), 76 (168), 150 (162), 189 (155)	2,2'-diclorobifenilo (C ₁₂ H ₈ Cl ₂)
9,05	222	222 (999), 152 (718), 224 (624), 75 (216), 151 (211), 223 (145), 150 (140), 76 (106), 226 (104), 74 (101)	4,4'-diclorobifenilo (C ₁₂ H ₈ Cl ₂)
9,62	256	256 (999), 258 (973), 186 (967), 221 (497), 150 (326), 260 (316), 75 (311), 223 (311), 188 (298), 151 (253)	2,2',5-triclorobifenilo (C ₁₂ H ₇ Cl ₃)
10,94	290	292 (999), 220 (862), 290 (795), 222 (562), 294 (489), 150 (324), 110 (321), 111 (210), 92 (175), 74 (173)	2,2',4,4'-tetraclorobifenilo (C ₁₂ H ₆ Cl ₄)
11,40	290	292 (999), 290 (710), 220 (658), 294 (502), 222 (469), 257 (275), 255 (266), 110 (245), 150 (225), 111 (145)	2,2',4,6'-tetraclorobifenilo (C ₁₂ H ₆ Cl ₄)

Anexo 2: Intermediarios de degradación identificados por espectrometría de masas a partir de la remoción de los PCBs utilizando la cepa LBM 105 *Pleurotus pulmonarius*. (Cont.)

Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Relación m/z de los iones fragmentados (Intensidad Relativa)	Estructura Posible (Fórmula Química)
12,30	290	292 (999), 290 (983), 294 (564), 220 (503), 222 (348), 110 (230), 150 (174), 293 (150), 74 (148), 111 (146)	2,3,3',4,- tetraclorobifenilo (C ₁₂ H ₆ Cl ₄)
12,43	324	326 (999), 254 (734), 256 (719), 328 (661), 324 (636), 291 (369), 184 (338), 289 (281), 258 (228), 330 (224)	2,2',3,5,6'- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
12,61	324	326 (999), 324 (572), 328 (490), 256 (465), 254 (448), 291 (367), 289 (288), 127 (244), 128 (219), 184 (204)	2,2',3,3',6- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
12,86	324	254 (999), 256 (965), 326 (864), 328 (575), 291 (572), 324 (572), 127 (564), 128 (540), 289 (454), 184 (452)	2,2',3,3',4- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
13,03	324	326 (999), 254 (656), 324 (636), 328 (617), 256 (615), 127 (604), 128 (511), 109 (457), 184 (351), 110 (339)	2,2',4,5',6- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
13,21	324	326 (999), 324 (561), 328 (491), 256 (447), 254 (430), 127 (250), 109 (212), 128 (199), 184 (183), 330 (150)	2,3,3',5',6- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
13,75	324	326 (999), 328 (627), 324 (619), 256 (609), 254 (472), 127 (301), 128 (290), 109 (235), 184 (232), 291 (221)	2,2',4,5,6'- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
13,93	324	326 (999), 324 (572), 328 (490), 256 (465), 254 (448), 291 (367), 289 (288), 127 (244), 128 (219), 184 (204)	2,2',3,3',6- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
14,22	358	360 (999), 362 (824), 290 (450), 358 (439), 288 (379), 145 (362), 364 (327), 144 (290), 292 (240), 109 (220)	2,3,3',4,4',5'- hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
14,29	324	326 (999), 324 (639), 328 (457), 254 (356), 256 (328), 127 (261), 128 (238), 109 (215), 330 (177), 184 (161)	2,3',4,5,5'- pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
14,72	358	360 (999), 362 (842), 290 (639), 358 (534), 288 (508), 145 (464), 144 (365), 364 (361), 325 (325), 292 (323)	2,2',3,4',5,6- hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
14,89	358	360 (999), 362 (805), 290 (615), 358 (500), 288 (474), 145 (397), 364 (377), 144 (298), 292 (297), 325 (242)	2,2',3,4',5',6- hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)

Anexo 2: Intermediarios de degradación identificados por espectrometría de masas a partir de la remoción de los PCBs utilizando la cepa LBM 105 *Pleurotus pulmonarius*. (Cont.)

Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Relación m/z de los iones fragmentados (Intensidad Relativa)	Estructura Posible (Fórmula Química)
15,20	358	360 (999), 362 (805), 290 (615), 358 (500), 288 (474), 145 (397), 364 (377), 144 (298), 292 (297), 325 (242)	2,2',3,4',5',6-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
15,28	324	326 (999), 324 (639), 328 (457), 254 (356), 256 (328), 127 (261), 128 (238), 109 (215), 330 (177), 184 (161)	2,3',4,5,5'-pentaclorobifenilo (C ₁₂ H ₅ Cl ₅)
15,70	358	360 (999), 362 (842), 290 (639), 358 (534), 288 (508), 145 (464), 144 (365), 364 (361), 325 (325), 292 (323)	2,2',3,4',5,6-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
15,94	358	360 (999), 362 (805), 290 (615), 358 (500), 288 (474), 145 (397), 364 (377), 144 (298), 292 (297), 325 (242)	2,2',3,4',5',6-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
16,24	358	360 (999), 362 (833), 358 (470), 290 (430), 364 (329), 288 (317), 292 (208), 361 (124), 145 (123), 218 (105)	2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
16,46	358	290 (999), 360 (998), 362 (840), 145 (773), 288 (729), 144 (630), 109 (554), 358 (508), 218 (493), 292 (468)	2,2',3,3',4,4'-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
16,88	358	360 (999), 362 (794), 290 (598), 145 (529), 358 (528), 288 (455), 144 (395), 218 (363), 364 (340), 146 (329)	2,2',3,4,5,5'-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
17,03	392	394 (999), 396 (923), 398 (542), 162 (489), 392 (429), 324 (386), 161 (306), 163 (283), 322 (262), 326 (260)	2,3,3',4',5,5',6-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
17,40	392	394 (999), 396 (981), 398 (537), 392 (448), 324 (380), 326 (250), 322 (239), 440 (165), 395 (130), 397 (121)	2,3,3',4,4',5,6-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
17,66	358	360 (999), 362 (805), 290 (615), 358 (500), 288 (474), 145 (397), 364 (377), 144 (298), 292 (297), 325 (242)	2,2',3,4',5',6-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
17,77	358	360 (999), 362 (829), 358 (435), 290 (427), 364 (365), 288 (312), 145 (236), 292 (210), 144 (191), 218 (168)	2,3,3',4',5,6-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
17,99	392	394 (999), 396 (888), 398 (527), 392 (432), 324 (397), 322 (258), 326 (232), 359 (197), 252 (167), 400 (163)	2,2',3,3',4,5',6-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)

Anexo 2: Intermediarios de degradación identificados por espectrometría de masas a partir de la remoción de los PCBs utilizando la cepa LBM 105 *Pleurotus pulmonarius*. (Cont.)

Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Relación m/z de los iones fragmentados (Intensidad Relativa)	Estructura Posible (Fórmula Química)
18,29	392	396 (999), 394 (989), 324 (540), 398 (527), 392 (443), 322 (340), 326 (340), 359 (231), 361 (182), 400 (170)	2,2',3,4',5,5',6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
18,47	392	396 (999), 394 (934), 324 (553), 398 (543), 392 (400), 322 (365), 326 (365), 162 (285), 252 (201), 163 (199)	2,2',3,3',4,6,6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
18,69	358	360 (999), 362 (805), 290 (615), 358 (500), 288 (474), 145 (397), 364 (377), 144 (298), 292 (297), 325 (242)	2,2',3,4',5',6'-hexaclorobifenilo (C ₁₂ H ₄ Cl ₆)
18,85	392	394 (999), 396 (975), 324 (902), 326 (573), 398 (532), 162 (529), 322 (514), 392 (448), 359 (434), 361 (409)	2,2',3,3',4,5,6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
19,10	392	394 (999), 396 (852), 324 (772), 326 (587), 162 (567), 398 (543), 322 (506), 392 (415), 163 (352), 359 (344)	2,2',3,3',4,5,6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
19,30	392	396 (999), 394 (973), 324 (654), 398 (590), 326 (484), 322 (447), 359 (415), 392 (393), 361 (340), 162 (162)	2,2',3,3',5,5',6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
19,48	392	394 (999), 396 (942), 398 (532), 324 (500), 392 (472), 326 (336), 322 (324), 254 (207), 252 (197), 162 (162)	2,3,3',4,4',5',6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
19,71	426	430 (999), 428 (889), 432 (629), 426 (332), 358 (330), 360 (277), 434 (249), 356 (162), 431 (123), 362 (117)	2,2',3,4,4',5,6,6'-Octaclorobifenilo (C ₁₂ H ₂ Cl ₈)
20,09	392	394 (999), 396 (852), 324 (772), 326 (587), 162 (567), 398 (543), 322 (506), 392 (415), 163 (352), 359 (344)	2,2',3,3',4,5,6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
21,30	392	394 (999), 396 (852), 324 (772), 326 (587), 162 (567), 398 (543), 322 (506), 392 (415), 163 (352), 359 (344)	2,2',3,3',4,5,6'-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
21,63	426	430 (999), 428 (890), 179 (718), 180 (684), 432 (635), 358 (555), 144 (437), 143 (391), 178 (373), 360 (363)	2,2',3,3',4,5,5',6'-octaclorobifenilo (C ₁₂ H ₂ Cl ₈)
21,88	426	430 (999), 428 (868), 179 (743), 180 (674), 358 (630), 432 (600), 144 (505), 360 (470), 143 (446), 178 (388)	2,2',3,3',4,4',5,5'-octaclorobifenilo (C ₁₂ H ₂ Cl ₈)

Anexo 2: Intermediarios de degradación identificados por espectrometría de masas a partir de la remoción de los PCBs utilizando la cepa LBM 105 *Pleurotus pulmonarius*. (Cont.)

Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Relación m/z de los iones fragmentados (Intensidad Relativa)	Estructura Posible (Fórmula Química)
22,55	392	394 (999), 396 (919), 324 (627), 398 (534), 162 (511), 392 (483), 326 (437), 322 (417), 161 (303), 163 (293)	2,3,3',4',5,5',6-heptaclorobifenilo (C ₁₂ H ₃ Cl ₇)
23,32	426	430 (999), 428 (947), 432 (687), 360 (535), 179 (507), 358 (497), 180 (439), 426 (371), 356 (323), 288 (309)	2,2',3,4,4', 5,5',6-octaclorobifenilo (C ₁₂ H ₂ Cl ₈)
24,32	426	430 (999), 428 (904), 432 (620), 358 (596), 179 (587), 360 (473), 180 (441), 288 (345), 426 (340), 144 (299)	2,2',3,3',4,4', 5,6-octaclorobifenilo (C ₁₂ H ₂ Cl ₈)

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico.

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
ACT1_3	Actina	Otros	Citoplasma
ARMH5	Halogenasa dependiente de flavina putativa Putative	Metabolismo secundario	Peroxisoma
DIT2_3	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1)	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
ERG2_1	Esterol Isomerasa C8	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG2_2	Esterol Isomerasa C8	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG2_3	Esterol Isomerasa C8	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG24_1	Esterol reductasa C14	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG25_1	Esterolmetil oxidasa	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG3	Esterol reductasa C14	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG4	Esterol reductasa C14	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
ERG5	Citocromo P450(Clase E, Grupo 4) putativa	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
ERG7	Escualeno sintasa putativa	Metabolismo secundario	Retículo endoplasmático
ERG9_2	Escualeno sintasa	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
EYR36_000045	Proteína similar a la Fumarilacetoasa	Metabolismo de los aminoácidos	Mitocondria
EYR36_000050	Proteína similar a la quinasa putativa	Otros	Citoplasma

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_000190	Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-l-metionina	Otros	Citoplasma
EYR36_000212	Hidrofobina putativa	Otros	Extracelular
EYR36_000229	Metalo- β -lactamasa putativa	Otros	Mitocondria
EYR36_000291	Glutación-S-transferasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Citoplasma
EYR36_000311	Aldo/ceto reductasa putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_000362	Policétido sintasa putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_000395	Reductasa transmembrana putativa	Metabolismo oxidativo	Lisosoma
EYR36_000418	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_000422	Proteína MFS putativa	Otros	Aparato de Golgi
EYR36_000467	Celobiosa deshidrogenasa putativa	Metabolismo oxidativo	Membrana celular
EYR36_000588	Subunidad SPc24 del Quinetocoro putativa	Otros	Núcleo
EYR36_000590	Oxidorreductasa dependiente de NADP putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_000692	Aldo/ceto reductasa putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_001016	Proteína MFS putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_001096	Dienelectona hidrolasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Citoplasma
EYR36_001111	Proteína similar a YOR389W	No predicho	Extracelular
EYR36_001155	Alcohol deshidrogenasa putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_001162	Lipasa fúngica putativa	Metabolismo de los lípidos	Extracelular
EYR36_001187	Serin carboxipeptidasa putativa	Proteólisis	Extracelular

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_001284	Glicosil hidrolasa putativa (familia 16)	Metabolismo de los carbohidratos	Membrana celular
EYR36_001310	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo	Membrana celular
EYR36_001333	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_001344	Citocromo P450(Clase E, Grupo 4) putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_001357	Proteína cupin RMIC putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Mitocondria
EYR36_001396	Proteína similar a la Taumatina	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_001482	2-fosfoglicolato fosfatasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_001490	Proteína PDBC1 putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Citoplasma
EYR36_001610	Proteína MFS putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_001706	Proteína reguladora del canal iónico putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_001757	Proteína de unión al NADP	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_001819	Proteína O-metiltransferasa HET putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_002012	O-metiltransferasa	Otros	Peroxisoma
EYR36_002047	Questin oxidasa putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_002058	Questin oxidasa putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_002159	Policétido sintasa putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_002226	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_002244	Factor de transcripción NMRA	Otros	Citoplasma
EYR36_002264	Preniltransferasa putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_002267	Oxidoreductasa putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_002424	Inhibidor de la ribonucleasa putativa	Otros	Núcleo
EYR36_002443	Lisozima putativa	Otros	Mitocondria
EYR36_002466	Anhidrasa carbónica putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_002610	α/β hidrolasa	Otros	Peroxisoma
EYR36_002611	Citocromo P450(Clase E, Grupo 4) putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_002612	Proteína MAF putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_002646	DUF3455 putativa	No predicho	Extracelular
EYR36_002691	Peptidasa S33 putativa	Proteólisis	Citoplasma
EYR36_002718	Transportador ABC putativo	Otros	Membrana celular
EYR36_002807	2-oxoglutarato deshidrogenasa putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Mitocondria
EYR36_002903	Proteína MAF putativa	Otros	Aparato de Golgi
EYR36_002934	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_002976	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_003046	Serin carboxipeptidasa putativo	Proteólisis	Extracelular
EYR36_003047	Factor de transcripción HSM1 putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_003095	Acil-CoA-acetiltransferasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_003169	Citidina deaminasa putativa	Metabolismo de los nucleósidos	Extracelular
EYR36_003178	Perforina putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_003179	Perforina putativa	Otros	Citoplasma

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_003334	Proteína ligasa de Ubiquitina E3 putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_003355	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_003385	Fosfolipasa	Metabolismo de los lípidos	Citoplasma
EYR36_003452	A/β hidrolasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_003500	Peptidasa S8 putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_003507	Proteína con dominio C2	No predicho	Citoplasma
EYR36_003688	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_003746	Sintetasa dependiente de AMP putativa	No predicho	Peroxisoma
EYR36_003965	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_003970	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_003989	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_004032	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_004117	Proteína de unión a la fosfatidiletanolamina	Otros	Citoplasma
EYR36_004149	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_004168	3-ceto-esteroide reductasa putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_004219	Lipasa fúngica putativa	Metabolismo de los lípidos	Extracelular
EYR36_004226	Policétido sintasa putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_004267	Proteína similar YOR389W	No predicho	Extracelular

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_004281	Dienelectona hidrolasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Citoplasma
EYR36_004363	Proteína MFS putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_004538	Dipeptidil Peptidasa putativa	Proteólisis	Citoplasma
EYR36_004797	Subunidad Ndc80 del cinetocoro putativa	Otros	Núcleo
EYR36_004842	Proteína con dominio Band-7	No predicho	Peroxisoma
EYR36_004993	Fosfatidilserin descarboxilasa	Metabolismo de los lípidos	Citoplasma
EYR36_005068	Proteína con dominio MATH	No predicho	Lisosoma
EYR36_005150	Citocromo P450(Clase E, Grupo 4) putativa	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_005390	Proteína de unión a la fosfatidiletanolamina	Otros	Mitocondria
EYR36_005409	Metaloproteasa putativa	Proteólisis	Citoplasma
EYR36_005434	Hidrofobina putativa	Otros	Extracelular
EYR36_005519	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_005540	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_005656	Peptidasa S33 putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_005687	Proteína con dominio rico en glicina	No predicho	Citoplasma
EYR36_005689	A/β hidrolasa putativa	Otros	Extracelular
EYR36_005769	Proteína MAF putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_005889	Proteína de unión al NADP	No predicho	Peroxisoma
EYR36_005904	Proteína de unión al NADP	No predicho	Mitocondria
EYR36_005930	Citocromo P450(Clase E, Grupo 4) proteína	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_005983	Proteína MAF putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_005999	Proteína 14-3-3 putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_006046	Metaloproteasa putativa	Proteólisis	Extracelular

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_006091	Peptidasa aspártica putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_006145	A/β hidrolasa putativa	Otros	Peroxisoma
EYR36_006180	Proteína con dominio repetitivo Ankyrin	Otros	Citoplasma
EYR36_006198	Inhibidor del proteosoma putativo	Otros	Citoplasma
EYR36_006323	Aminoligasa diptina putativa	Metabolismo secundario	Citoplasma
EYR36_006657	Terpeno ciclasa	Metabolismo secundario	Citoplasma
EYR36_006689	Dienelactona hidrolasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Citoplasma
EYR36_006690	Dienelactona hidrolasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Citoplasma
EYR36_006702	Proteína con dominio Monooxigenasa	Metabolismo secundario	Mitocondria
EYR36_006728	O-metiltransferasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_006763	Peptidasa aspártica putativa	Proteólisis	Lisosoma
EYR36_006828	Glicosil hidrolasa (familia 16) putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_006872	Peptidasa M28 putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_006964	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_007138	Proteína NRAMP putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_007321	Citocromo P450(Clase E, Grupo 4) putativa	Metabolismo oxidativo	Reticulo endoplasmático
EYR36_007326	Proteína con dominio de cierre de leucinas	No predicho	Núcleo
EYR36_007370	Polisacárido liasa (familia 8) putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_007393	Polisacárido liasa (familia 8) putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_007420	A/β hidrolasa putativa	Otros	Citoplasma

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_007606	S-formilglutación hidrolasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Citoplasma
EYR36_007671	Proteína con dominio WAF	No predicho	Citoplasma
EYR36_007712	Proteína de unión al FAD-NAD	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_007775	N-acetiltransferasa putativa	Otros	Mitocondria
EYR36_007783	Proteína de biosíntesis de Fenazina	Otros	Citoplasma
EYR36_007804	Metaloproteasa putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_007855	Inhibidor de la ribonucleasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_007872	Proteína MAF putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_007900	Transportador del tetrapéptido putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_007948	Proteína similar a UstYa	Metabolismo secundario	Extracelular
EYR36_007959	Lectina similar a la ricina	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_007991	A/β hidrolasa putativa	Otros	Peroxisoma
EYR36_008064	Epóxido hidrolasa putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_008077	Epóxido hidrolasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_008108	Lisina metiltransferasa putativa	Otros	Mitocondria
EYR36_008144	Lectina similar a la ricina	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_008145	Proteína similar a la lectina	Otros	Extracelular
EYR36_008165	Putative NRAP protein	Otros	Lisosoma
EYR36_008169	Putative Citocromo P450(Clase E, Grupo 1)	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_008182	GTPasa pequeña putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_008197	Proteína con dominio HET	Otros	Citoplasma

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_008239	Proteína con dominio HET	Otros	Citoplasma
EYR36_008301	Proteína de unión al NADP	Otros	Citoplasma
EYR36_008351	Proteína reguladora del canal iónico putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_008447	Proteína MFS putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_008493	Carboxilesterasa putativa	Otros	Extracelular
EYR36_008528	Oxalato descarboxilasa putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_008558	Fosfatidilglicerol lisiltransferasa	Metabolismo de los lípidos	Mitocondria
EYR36_008643	Proteína intercambiadora de cationes putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_008673	Proteína similar a la Beta lactamasa	Otros	Peroxisoma
EYR36_008835	Enoil reductasa putativa	Metabolismo secundario	Citoplasma
EYR36_008844	Proteína con dominio glicosil hidrolasa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_008927	A/β hidrolasa putativa	Otros	Extracelular
EYR36_009008	Factor de transcripción PDR1 putativa	Otros	Núcleo
EYR36_009024	α-Integrina putativa	Otros	Lisosoma
EYR36_009026	α-Integrina putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_009097	Isoprenilcistein carboxilmetiltransferasa putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_009163	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_009326	Lipasa fúngica putativa	Metabolismo de los lípidos	Extracelular
EYR36_009358	Tiorredoxina putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_009400	Proteína MFS putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_009449	Proteína similar a UstYa	Metabolismo secundario	Retículo endoplasmático
EYR36_009489	Quitinasa putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
EYR36_009637	β -lactamasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_009662	Peptidasa aspártica putativa	Proteólisis	Membrana celular
EYR36_009718	Monooxigenasa putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_009815	Proteína DUF1295 putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_009872	Corsimato liasa putativa	Metabolismo secundario	Citoplasma
EYR36_009907	Fosfatidilserin descarboxilasa putativa	Metabolismo de los lípidos	Peroxisoma
EYR36_009918	Proteína MAF putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_009943	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_010038	Proteína GRPD putativa	Stress Response	Citoplasma
EYR36_010043	Quinasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_010214	Proteína transportadora de aminoácidos putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_010277	Oxalato descarboxilasa putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_010410	Proteína SurE putativa	Otros	Extracelular
EYR36_010418	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Peroxisoma
EYR36_010419	Proteína Sur7 putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_010431	Glicosil hidrolasa putativa (familia 30)	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_010489	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_010502	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Retículo endoplasmático
EYR36_010516	Citocromo P450(Clase E, Grupo 1) putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_010577	Ubia preniltransferasa putativa	Otros	Retículo endoplasmático
EYR36_010612	Proteína MAF putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_010644	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_011023	Peptidasa S8 putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_011052	Lipoxigenasa putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_011057	Transportador ABC putativa	Otros	Membrana celular
EYR36_011060	Glutaminasa putativa	Nitrogen Metabolism	Mitocondria
EYR36_011092	Aldo/ceto reductasa putativa	Metabolismo oxidativo	Citoplasma
EYR36_011119	Serin carboxipeptidasa putativa	Proteólisis	Extracelular
EYR36_011145	Fosfotransferasa putativa	Otros	Citoplasma
EYR36_011338	Glicosil hidrolasa putativa (familia 5)	Metabolismo de los carbohidratos	Citoplasma
EYR36_011379	Proteína MAF putativa	Otros	Aparato de Golgi
EYR36_011422	Galactosa oxidasa putativa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
EYR36_011430	Proteína con dominio F-box	No predicho	Núcleo
EYR36_011432	Proteína de unión al NADP	No predicho	Peroxisoma
EYR36_011590	Reductasa de cadena corta putativa	Metabolismo oxidativo	Mitocondria
EYR36_011738	Glicotransferasa putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Retículo endoplasmático

Anexo 3a: Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con expresión diferencial en presencia de PCBs obtenidos mediante el análisis transcriptómico. (Cont.)

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo involucrado	Localización Celular
EYR36_011739	β -1,3-endoglucanasa putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Retículo endoplasmático
EYR36_011897	Flavin Monooxigenasa putativa	Metabolismo de los xenobióticos	Peroxisoma
ILV5	Acetohidroxiácido reductosimersasa bifuncional	Metabolismo de los aminoácidos	Mitocondria
LCC2_3	Lacasa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
LCC5_5	Lacasa	Metabolismo oxidativo	Extracelular
LEU1	3-isopropilmalato deshidrogenasa	Metabolismo de los aminoácidos	Citoplasma
LEU2	3-isopropilmalato deshidrogenasa	Metabolismo de los aminoácidos	Citoplasma
MAK3	N- α -acetiltransferasa	Otros	Citoplasma
MDR1_1	Proteína activadora de la GTPasa	Otros	Membrana celular
MNS1B_1	α -mannosidasa putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
PHO84_1	Transportador de fosfato inorgánico	Otros	Retículo endoplasmático
PIS1_1	CDP-diacilglicerol -inositol-3-fosfatidiltrasnferasa putativa	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
PIS1_2	CDP-diacilglicerol -inositol-3-fosfatidiltrasnferasa putativa	Metabolismo de los lípidos	Retículo endoplasmático
RNY1_2	Ribonucleasa T2	Otros	Extracelular
TPS2	Trealosa fosfatasa putativa	Metabolismo de los carbohidratos	Citoplasma
VPL1_4	Peroxidasa versátil	Metabolismo oxidativo	Extracelular
WSCD2_1	Proteína con dominio WSC	Metabolismo de los carbohidratos	Extracelular
YUH1_1	Hidrolasa de Ubiquitina putativa	Otros	Citoplasma

Anexo 3b: Top de 100 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en presencia de PCBs.

Anexo 3b. Top de 100 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en presencia de PCBs (1) Nivel de expresión frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

Top 50 Subexpresado			
ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo	Nivel de Expresión¹
EYR36_004032	Citocromo P450 EI	Metabolismo Oxidativo	-4.405
EYR36_008144	Lectina similar a ricina	metabolismo carbohidratos	-4.328
EYR36_009026	Integrina Alfa	Otros	-4.208
EYR36_006091	Peptidasa aspartica	Proteolisis	-3.903
EYR36_010261	No Predicho	No Predicho	-3.750
EYR36_009907	Fosfatidil serina descarboxilasa	Metabolismo Lipidos	-3.704
EYR36_002662	No predicho	No predicho	-3.666
EYR36_004993	Fosfatidil serina decarboxylasa	Metabolismo Lipidos	-3.647
EYR36_002264	Peniltransferasa	Otros	-3.394
EYR36_000190	Metiltransferasa dependiente de S-adenosil-L-metionina	Otros	-3.382
EYR36_008169	Citocromo P450	Metabolismo Oxidativo	-3.190
EYR36_011738	Glicotransferasa 2	Metabolismo Carbohidratos	-3.166
EYR36_009165	No Predicho	No Predicho	-3.076
EYR36_008447	MFS proteína	Otros	-3.073
EYR36_001610	Proteína MFS	Otros	-3.070
EYR36_000212	Hidrofobina	Otros	-3.033
EYR36_010090	No Predicho	No Predicho	-2.934
EYR36_006046	Metalopeptidasa	Proteolisis	-2.847
EYR36_002443	Lisosima	otros	-2.844
EYR36_011119	Serin carboxipeptidasa	Proteolisis	-2.748
EYR36_003688	Cupredoxina	Metabolismo Oxidativo	-2.714
EYR36_002934	reductasa de cadena corta	Metabolismo Oxidativo	-2.711
EYR36_010577	UbiA prenilttransferasa	Otros	-2.705
EYR36_008978	No Predicho	No Predicho	-2.699
EYR36_009358	Thioredoxina	Metabolismo oxidativo	-2.687
EYR36_002012	O-metiltransferasa	Otros	-2.594
EYR36_003178	Perforina	Otros	-2.581

Anexo 3b. Top de 100 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en presencia de PCBs (**1**) Nivel de expresión frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo	Nivel de Expresión ¹
EYR36_007981	No predicho	No Predicho	-2.480
EYR36_007393	Polisacarido liasa 8	Metabolismo carbohidratos	-2.452
EYR36_007370	Polisacarido liasa 8	Metabolismo carbohidratos	-2.412
EYR36_000357	No Predicho	No Predicho	-2.376
EYR36_008844	Glicosil Hidrolasa	Metabolismo Carbohidratos	-2.367
EYR36_005045	No Predicho	No Predicho	-2.328
EYR36_009032	No Predicho	No Predicho	-2.321
EYR36_005651	No predicho	No Predicho	-2.290
EYR36_006657	Terpeno ciclaza	Metabolismo secundario	-2.228
PHO84_1	Transporte de fosfato inorganico	Otros	-2.198
EYR36_001162	Lipasa Fungica	Metabolismo Lipidos	-2.198
EYR36_002892	No Predicho	No predicho	-2.151
EYR36_008105	No Predicho	No Predicho	-2.122
EYR36_009024	Integrina Alfa	Otros	-2.110
EYR36_005300	No Predicho	No Predicho	-2.074
EYR36_008145	Proteína Similar Lectina	otros	-2.036
EYR36_010431	Glicosil Hidrolasa (30)	Metabolismo Carbohidratos	-2.026
EYR36_005999	Proteína 14-3-3	Otros	-2.018
EYR36_006964	Reductasa de cadena corta	Metabolismo oxidativo	-2.010
EYR36_001310	Cupredoxina	Metabolismo Oxidativo	-2.006
LCC2_3	Lacasa	Metabolismo Oxidativo	-1.967
EYR36_006828	Glicosil hidrolasa 16	Metabolismo carbohidratos	-1.962
EYR36_006638	No predicho	No Predicho	-1.955

Top 50 Sobreexpresado

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo	Nivel de Expresión ¹
EYR36_009719	No Predicho	No Predicho	2.212
EYR36_000291	Glutation S Transferasa	Metabolismo Xenobioticos	2.231
EYR36_001504	No Predicho	No Predicho	2.234

Anexo 3b. Top de 100 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en presencia de PCBs (**1**) Nivel de expresión frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo	Nivel de Expresión ¹
EYR36_002226	Reductasa de cadena corta	Metabolismo Oxidativo	2.246
ACT1_3	Actina	Otros	2.275
EYR36_009158	No Predicho	No Predicho	2.288
EYR36_000418	Reductasa de cadena corta	Metabolismo oxidativo	2.300
EYR36_001357	RMIC cupin proteína	Metabolismo Carbohidratos	2.311
EYR36_008165	NRAP proteína	Otros	2.348
EYR36_009491	No Predicho	No Predicho	2.349
EYR36_009459	No Predicho	No Predicho	2.404
EYR36_001096	Dienelactona Hidrolasa	Metabolismo Xenobioticos	2.414
EYR36_004281	Dienelactona Hidrolasa	Metabolismo Xenobioticos	2.430
EYR36_010031	No Predicho	No Predicho	2.448
EYR36_005656	Peptidasa S33	Proteolisis	2.465
EYR36_003452	Alfa/beta hidrolasa	Hidrolisis	2.483
EYR36_005390	Proteína de unión a ala fosfatidiletanolamina	Otros	2.603
EYR36_001757	Proteína con dominio de unión NADP	Metabolismo Oxidativo	2.615
EYR36_008301	Proteína con dominio de unión a NADP	Otros	2.633
EYR36_001782	No Predicho	No Predicho	2.659
EYR36_008558	Lisilfosfatidilglicerol sintasa	Metabolismo Lipidos	2.676
EYR36_005930	Citocromo P450 (clase E grupo IV)	Metabolismo oxidativo	2.677
EYR36_003355	Cupredoxina	Metabolismo Oxidativo	2.683
EYR36_008276	No Predicho	No Predicho	2.688
EYR36_006911	No predicho	No Predicho	2.698
EYR36_000311	Aldo/ceto Reductasa	Metabolismo Oxidativo	2.701
EYR36_006702	Prot con Dominio Monooxygenasa biosintetica	Metabolismo secundario	2.717
EYR36_005409	Metalopeptidasa	Proteolisis	2.754
EYR36_006689	Dienelactona Hidrolasa	Metabolismo Xenobioticos	2.789
EYR36_011567	No Predicho	No Predicho	2.847
EYR36_008499	No Predicho	No Predicho	2.857

Anexo 3b. Top de 100 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en presencia de PCBs (1) Nivel de expresión frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log2).

ID del Gen	Función Predicha	Metabolismo	Nivel de Expresión¹
EYR36_002058	Oxidasa Questin	Metabolismo Oxidativo	2.875
EYR36_006906	No predicho	No Predicho	2.967
EYR36_008077	Epoxido Hidrolasa	Hidrolisis	3.021
EYR36_011057	Transportador ABC	Otros	3.207
EYR36_008500	No Predicho	No Predicho	3.222
EYR36_009097	Isoprenilcistein carboxil metiltransferasa	Otros	3.363
EYR36_006180	Proteína con dominio repetitivo Ankyrin	Otros	3.461
EYR36_009002	No Predicho	No Predicho	3.496
EYR36_002122	No Predicho	No Predicho	3.560
EYR36_008239	Proteína con dominio HET	Otros	3.723
EYR36_001819	Proteína HET	Otros	3.759
EYR36_009137	No Predicho	No Predicho	3.953
EYR36_005519	Cupredoxina	Metabolismo oxidativo	4.054
EYR36_007321	Citocromo P450 (clase E grupo IV)	Metabolismo oxidativo	4.170
EYR36_005540	Cupredoxina	Metabolismo oxidativo	4.189
VPL1_4	Peroxidasa Versatil	Metabolismo Oxidativo	4.298
EYR36_010644	Cupredoxina	Metabolismo oxidativo	4.642
EYR36_010502	Citocromo P450 (clase E grupo 1)	Metabolismo oxidativo	4.740
EYR36_002718	ABC transportador	Otros	4.956
EYR36_002047	Oxidasa Questin	Metabolismo Oxidativo	4.983

Anexo 3c: Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en el metabolismo oxidativo frente a los PCBS.

Anexo 3c. Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión en el metabolismo oxidativo frente a los PCBs. (1) Nivel de expresión frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

ID del Gen	Función Predicha	Nivel de Expresión¹
EYR36_003355	Cupredoxina	2.683
EYR36_005930	Citocromo P450 (clase E grupo IV)	2.677
EYR36_001757	Proteína con dominio de unión NADP	2.615
EYR36_000418	Reductasa de cadena corta	2.300
EYR36_002226	Reducatasa de cadena corta	2.246

Anexo 3d: Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en el metabolismo de los xenobióticos frente a los PCBS.

Anexo 3d. Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión en el metabolismo de los xenobióticos frente a los PCBs. (1) Nivel de expresión frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

ID del Gen	Función Predicha	Nivel de Expresión¹
EYR36_000291	Glutation S Transferasa	2.23
EYR36_001096	Dienelactona Hidrolasa	2.41
EYR36_004281	Dienelactona Hidrolasa	2.43
EYR36_006689	Dienelactona Hidrolasa	2.79
EYR36_006690	Dienelactona Hidrolasa	1.30

Anexo 3e: Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en el metabolismo de los lípidos frente a los PCBS.

Anexo 3e. Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión en el metabolismo de los lípidos frente a los PCBS. **(1)** Nivel de expresión frente a la adición de los PCBS ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

ID del Gen	Función Predicha	Nivel de Expresión¹
EYR36_008558	Lisilfosfatidilglicerol sintasa	2.68
ERG3	C14 Esterol Reductasa	2.02
ERG2_3	C8 esterol isomerasa	1.73
ERG2_2	C8 esterol isomerasa	1.65
ERG24_1	C14 Esterol Reductasa	1.53

Anexo 3f: Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión diferencial en el metabolismo de los carbohidratos frente a los PCBS.

Anexo 3f. Top de 5 Genes de *P. pulmonarius* LBM 105 con mayor expresión en el metabolismo de los carbohidratos frente a los PCBS. **(1)** Nivel de expresión frente a la adición de los PCBS ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2).

ID del Gen	Función Predicha	Nivel de Expresión¹
EYR36_001357	RMIC cupin proteína	2.31
EYR36_002466	Anhidrasa carbónica	1.96
EYR36_002807	2-oxoglutarato deshidrogenasa	1.24
EYR36_007959	Lectina similar a ricina	1.23
EYR36_011338	Glicosil hidrolasa 5	1.09

Anexo 4: Proteínas con abundancia aumentada de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs obtenidas a partir del análisis proteómico total.

Anexo 4. Características y ubicación de las proteínas con abundancia aumentada de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. (1) Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. (2) Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular¹	Abundancia²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067N501	Reductasa de cadena corta putativa	Peroxisoma	7,42	Metabolismo Oxidativo	O1
Q9UW96	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Citoplasma	6,53	Metabolismo de los Carbohidratos	C1
G9MD63	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Citoplasma	6,47	Metabolismo de los Carbohidratos	C2
A0A067NFF9	NAD(P) deshidratasa dependiente de ATP	Mitocondria	5,04	No Predicho	-
A0A067NDY3	ATP fosforribosiltransferasa	Mitocondria	4,96	Metabolismo de los Aminoácidos	A1
D5GRP3	Carboxilesterasa	Extracelular	4,92	Metabolismo de los Lípidos	L2
A0A067N568	Epimerasa/Hidratasa dependiente de NADP	Peroxisoma	4,74	No Predicho	-

Anexo 4. Características y ubicación de las proteínas con abundancia aumentada de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067N YP3	S-metil-5-tioadenosina fosfatasa	Citoplasma	4,57	Metabolismo de los Nucleósidos	V1
A0A067P 6V7	Ribonucleoproteína	Núcleo	4,31	Metabolismo de nucleótidos	V2
A0A067P 101	Proteínas Ribosomal L2	Citoplasma	4,28	Traducción Proteica	R1
Q2VT19	Lacasa	Extracelular	4,24	Metabolismo Oxidativo	O3
A0A067N FT1	Proteína Ribosomal S4	Citoplasma	4,12	Traducción Proteica	R2
A0A067N T59	Ureohidrolasa	No predicho	3,86	No Predicho	-
A0A067N GT9	Ribosa 5 fosfato isomerasa	Mitocondria	3,79	Metabolismo de Carbohidrato	C3
A0A067N XA1	Serina Carboxipeptidasa	Extracelular	3,59	Proteólisis	P1
A0A067N XK1	Aldolasa Putativa	Peroxisoma	3,53	Metabolismo Oxidativo	O4
A0A067P 4E6	Dienolactona hidrolasa/Carboximetileno butenolidasa	Citoplasma	3,31	Síntesis de Metabolitos Secundarios	V3

Anexo 4. Características y ubicación de las proteínas con abundancia aumentada de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
S5J1C2	Ureasa	Citoplasma	3,22	Metabolismo de Compuestos Aromáticos	V4
A0A067P7P3	Subunidad beta del complejo asociado al polipéptido naciente	Núcleo	3,12	Metabolismo del Nitrógeno	R3
A0A067PDA2	GTPasa	Aparato de Golgi	2,96	Traducción Proteica	-
A0A067PDG8	Proteína similar a la tautomerasa	Extracelular	2,96	No Predicho	-
A0A067N6F8	Aldo-ceto reductasa	Mitocondria	2,83	No Predicho	O6
A0A067N3M1	Galactosa Oxidasa	Extracelular	2,81	Metabolismo Oxidativo	O7
A0A067NZ52	Proteína Ribosomal L18	Citoplasma	2,76	Metabolismo Oxidativo	R4
A0A067N4M3	Peroxiredoxina	Citoplasma	2,73	Traducción Proteica	O8
A0A067NSI3	Proteína ribosomal S9	Citoplasma	2,67	Metabolismo Oxidativo	R5
A0A067PAK5	Aldo-ceto reductasa	Citoplasma	2,54	Traducción Proteica	O10

Anexo 4. Características y ubicación de las proteínas con abundancia aumentada de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
Q4QZ27	Peroxidasa Versátil	Extracelular	2,27	Metabolismo Oxidativo	O11
D2JY79	Proteína Ribosomal L15	Citoplasma	2,26	Metabolismo Oxidativo	R6
A0A067N HZ5	Proteína Ribosomal S8	Citoplasma	2,21	Traducción Proteica	R7
A0A067N 9V0	Beta-Glucosidasa	Extracelular	2,15	Traducción Proteica	C4
A0A067P 4U9	Enolasa	Citoplasma	2,14	Metabolismo del Carbono	C5
A0A067P BU4	Imidazol glicerol fosfato deshidratasa	Citoplasma	1,95	Metabolismo del Carbono	A2
A0A067P 0Z2	No Predicho	Mitocondria	1,43	Metabolismo de los Aminoácidos	-
A0A067N 2P4	No Predicho	Citoplasma	1,27	No Predicho	-
A0A067P 6M0	Leucina aminopeptidasa	Citoplasma	1,15	No Predicho	P2
A0A067P DE9	Oxoacido CoA Transferasa	Mitocondria	1,14	Proteólisis	V5

Anexo 4. Características y ubicación de las proteínas con abundancia aumentada de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular¹	Abundancia²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067P 2S5	Proteína Ribosomal L13 putativa	Citoplasma	1,08	Otros	R8

Anexo 5: Proteínas con abundancia disminuida de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs obtenidas a partir del análisis proteómico total.

Anexo 5. Características y ubicación de las proteínas con abundancia disminuida de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067N876	Oxilipina	Mitocondria	-6,98	Metabolismo de lípidos	L4
A0A067NS53	Piruvato carboxilasa	Mitocondria	-5,75	Metabolismo de Carbohidratos	C19
A0A067NHH3	Aldehído deshidrogenasa	Citoplasma	-5,28	Metabolismo Oxidativo	O20
A0A067N9N5	Alfa-1,4 glucano fosforilasa	Citoplasma	-4,99	Metabolismo de Carbohidratos	C18
A0A067P9U4	HSp 90	Citoplasma	-4,76	Actividad Chaperona	V16
A0A067NW08	Factor de elongación EF 2	Citoplasma	-4,63	Traducción Proteica	R17
A0A067NHY6	Alfa-D-fosfohexomutasa	Citoplasma	-4,46	Metabolismo de Carbohidratos	C16
A0A067NZJ1	Subunidad alfa 1 del proteosoma	Citoplasma	-4,31	Proteólisis	P14

Anexo 5. Características y ubicación de las proteínas con abundancia disminuida de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
D2SLR0	Factor de elongación de la traducción	Citoplasma	-4,20	Traducción Proteica	R16
A0A067N954	No Predicho	Membrana Celular	-4,06	No Predicho	-
A0A067NLR3	ATP citrato sintasa	Citoplasma	-4,01	Metabolismo de Carbohidratos	C14
A0A067P1I6	Quinunerina Formamidasa	Citoplasma	-4,01	Metabolismo de los Aminoácidos	A3
A0A067NSQ2	Pirofosfatasa inorgánica	Mitocondria	-3,84	Otros	V15
A0A067NEV8	Reductasa de cadena corta	Peroxisoma	-3,56	Metabolismo oxidativo	O19
A0A067NTB4	Peptidasa S8	Extracelular	-3,53	Proteólisis	P12
A0A067NBW9	No Predicho	Membrana Celular	-3,49	No Predicho	-
A0A067PBA8	Nucleósido difosfato cinasa	Citoplasma	-3,46	Metabolismo de Nucleósidos	V14
A0A067NRR6	Proteína Ribosomal L12	Citoplasma	-3,43	Traducción Proteica	R15
A0A067NI38	Triosafosfato Isomerasa	Citoplasma	-3,32	Metabolismo de Carbohidratos	C13

Anexo 5. Características y ubicación de las proteínas con abundancia disminuida de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067NII7	Formato deshidrogenasa	Citoplasma	-3,30	Metabolismo Oxidativo	O15
A0A067NJA5	Peptidilpropil Isomerasa	Citoplasma	-3,26	Chaperona	
A0A067NP31	Piruvato decarboxilasa	Citoplasma	-3,14	Metabolismo de Carbohidratos	C11
A0A067PC25	SKP1 (Complejo ubiquitina ligasa)	Citoplasma	-3,14	Proteólisis	P10
A0A067NQW4	Superóxido dismutasa	Citoplasma	-3,02	Metabolismo oxidativo	O14
A0A067P305	Transcetolasa	Peroxisoma	-2,89	Metabolismo de Carbohidratos	V13
A0A067NRP1	Proteína 14-3-3	Citoplasma	-2,85	Otros	P8
A0A0X8XLC2	Peptidasa similar a subtilisina	Extracelular	-2,83	Proteólisis	O13
A0A067NLX2	Posible Flavocitocromo c	Citoplasma	-2,76	Metabolismo oxidativo	ST4
A0A067N725	Cadena Beta Tubulina	Citoplasma	-2,74	Otros	-
A0A067NEN6	Subunidad central de la Citocromo C reductasa	Mitocondria	-2,68	No Predicho	C8

Anexo 5. Características y ubicación de las proteínas con abundancia disminuida de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067NI01	UTP glucosa 1 fosfato uridiltransferasa	Citoplasma	-2.62	Metabolismo de Carbohidratos	ST3
A0A067NZD8	GTPasa SAR-type	Reticulo Endoplasmatico	-2.61	Otros	-
A0A067N840	Proteína con dominio SUMO	Citoplasma	-2.57	No Predicho	V12
A0A067NHM1	AAA ATPasa	Citoplasma	-2.54	Otros	ST2
A0A067P2E6	Septina	Citoplasma	-2.49	Otros/ Función Estructural	R14
A0A067P4F3	Aspartato tRNA sintetasa	Citoplasma	-2.33	Traducción Proteica	V11
A0A067NR75	UBS27 (Ubiquitina/L27 RNA)	Citoplasma	-2.30	Traducción Proteica	V10
A0A067NYT5	Heat Shock Protein 70	Citoplasma	-2.26	Actividad Chaperona	V9
A0A067NUQ4	Proteína Rad23	Núcleo	-2.22	Otros	-
A0A067NKF5	No Predicho	Núcleo	-2.16	No Predicho	V8
A0A067PCS0	Chaperona DnaJ	Mitocondria	-2.14	Actividad Chaperona	R13

Anexo 5. Características y ubicación de las proteínas con abundancia disminuida de *P. pulmonarius* LBM 105 en presencia de PCBs. **(1)** Ubicación subcelular predicho por el servidor Deep-Loc 1.0. **(2)** Nivel de abundancia frente a la adición de los PCBs ($p < 0.05$) expresado en una escala logarítmica (Log_2). (Cont.)

ID de proteína	Función predicha	Localización celular ¹	Abundancia ²	Proceso biológico involucrado	Código figura
A0A067NCR9	Factor de iniciación de la traducción	Citoplasma	-2.12	Traducción Proteica	R12
A0A067NXJ3	Proteína Ribosomal S17	Citoplasma	-2.12	Traducción Proteica	R11
A0A067NMU9	Proteína Ribosomal L36	Citoplasma	-2.11	Traducción Proteica	V7
A0A067N792	Hsp 70	Reticulo Endoplasmatico	-2.02	Actividad Chaperona	R10
A0A067NQG0	Proteína Ribosomal 40S	Citoplasma	-1.90	Traducción Proteica	P4
A0A067NP99	Nedd8 similar a ubiquitina	Núcleo	-1.89	Proteólisis	-
A0A067NI04	No Predicho	Citoplasma	-1.83	No Predicho	P3
A0A067NJZ0	Peptidasa S8	Extracelular	-1.61	Proteólisis	V6
A0A067PCE4	Hsp 70	Citoplasma	-1.42	Actividad Chaperona	ST1
A0A067P0E7	Actina	Citoplasma	-1.24	Otros/Función Estructural	C6
A0A067NVM1	Aldo-1,2-Manosidasas	Extracelular	-1.23	Metabolismo de Carbohidratos	R9

Anexo 6: Proteínas de *P. pulmonarius* LBM 105 únicas a la condición en presencia de PCBs obtenidas a partir del análisis proteómico total.

Anexo 6. Proteínas únicas de la condición expuesta a PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína.

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
Q876Y9	Catalasa fúngica	13.454	Metabolismo oxidativo
A0A067NHY5	Catalasa fúngica	10.548	Metabolismo oxidativo
A0A067P468	Cerato platanina putativa	5.813	Estructural
A0A067NDY3	ATP-fosforibosiltransferasa putativa	5.158	Metabolismo de los aminoácidos
Q8J1S4	Peroxidasa versátil	4.878	Metabolismo oxidativo
A0A067P0M5	Proteína ribosomal L18	3.281	Transcripción y traducción
A0A067NL68	Subunidad beta de la ATP-sintasa F1F0	3.217	Metabolismo del fosfato
A0A067PDG8	Proteína similar a la tautomerasa putativa	3.217	No predicho
A0A067NL73	Malato deshidrogenasa	3.16	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NBE6	Proteína con dominio cobW	2.981	Metabolismo del nitrógeno
S5J1C2	Ureasa	2.594	Metabolismo del nitrógeno
A0A067P360	Corismato sintasa	2.162	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067P7U7	Galactonato deshidratasa putativa	2.162	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067NY94	Ribonucleoproteína pequeña nuclear	2.162	Transcripción y traducción
A0A067P694	Peptidilprolil isomerasa	2.162	Actividad chaperona
A0A067NC11	Proteína ribosomal L23	2.162	Transcripción y traducción
A0A067NWW6	Ribonucleoproteína pequeña Sm D3	1.783	Transcripción y traducción
A0A067NSA2	Proteína ribosomal L7Ae	1.683	Transcripción y traducción
A0A067NG79	Proteína con dominio RRM	1.683	Otros

Anexo 6. Proteínas únicas de la condición expuesta a PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A9UCA0	Lacasa	1.512	Metabolismo oxidativo
A0A067NMQ1	No predicho	1.424	No predicho
A0A067NX31	Proteína ribosomal L34 putativa	1.371	Transcripción y traducción
A0A067NKHU9	U6 Proteína asociada al snRNA	1.371	Otros
A0A067NBY7	No predicho	1.291	No predicho
S5IHA8	Ureasa	1.246	Metabolismo del nitrógeno
A0A067NYP3	S-metil-5tiadenosina fosfatasa	1.239	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067NLH9	Proteína con dominio de union al calcio	1.154	Otros
A0A067NN68	Proteína con dominio Inos-1-P	1.154	Metabolismo de los lípidos
A0A067N6F8	Aldo/ceto reductasa putativa	1.154	Metabolismo oxidativo
A0A067NE87	Ribonucleoproteína pequeña putativa	1.154	Transcripción y traducción
D5GRP3	Carboxilesterasa	1.096	Metabolismo de los lípidos
A0A067N7V9	Reductasa de cadena corta putativa	1.054	Metabolismo oxidativo
A0A067NM22	No predicho	0.995	No predicho
A0A067NYA5	Lectina putativa	0.995	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NWX0	Proteína ribosomal S23 putativa	0.995	Transcripción y traducción
A0A067NXJ3	Proteína ribosomal S17 putativa	0.931	Transcripción y traducción
A0A067NS56	Lectina putativa	0.931	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NH17	Proteína ribosomal S11	0.931	Transcripción y traducción
A0A067NMU9	Proteína ribosomal L36	0.931	Transcripción y traducción
A0A067NY73	Proteína de unión a la timina putativa	0.931	Otros
D2JY79	Proteína ribosomal L15	0.848	Transcripción y traducción
A0A067NRM1	GTPasa putativa	0.848	No predicho
A0A067P102	Proteína con dominio amidasa	0.848	No predicho

Anexo 6. Proteínas únicas de la condición expuesta a PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067P638	Proteína asociada al snARN U6	0.778	Transcripción y traducción
A0A067NUY3	Lactoilglutation liasa	0.778	Detoxificación
A0A067N5G6	Proteína ribosomal L24 putativa	0.778	Transcripción y traducción
A0A067NT11	Glutamina sintasa	0.751	Otros
A0A067NQJ8	Proteína DUF1349 putativa	0.743	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067N2P4	No predicho	0.719	No predicho
A0A067P3B6	Proteína de unión al GTP putativa	0.719	No predicho
A0A067NLS6	Proteína con dominio VWFA	0.701	Actividad peptidasa
A0A067N698	No predicho	0.668	No predicho
A0A067NX51	Proteína ribosomal L31 putativa	0.668	Transcripción y traducción
A0A067NDE9	Dienolactona hidrolasa putativa	0.668	Detoxificación
A0A067NBY2	Reductasa de cadena corta putativa	0.638	Metabolismo oxidativo
A0A067P6R4	1,2-dihidroxi -3-ceto-5-metiltiopenteno dioxigenasa	0.638	Metabolismo oxidativo
A0A067NTB2	Proteína con dominio NFU1	0.638	No predicho
A0A067NFJ2	Tiamina tiazol sintasa	0.624	Metabolismo secundario
A0A067NRW7	Glutación-S-transferasa putativa	0.624	Detoxificación
A0A067NMH2	Isocorismatasa putativa	0.585	Otros
A0A067NT59	Ureohidrolasa putativa	0.54	Metabolismo del nitrógeno
A0A067NGR0	Enzima tiamina pirofosfato putativa	0.54	Metabolismo secundario
A0A067NF68	Lipasa fúngica	0.54	Metabolismo de los lípidos
A0A067NVZ2	Cadena ligera de la clatrina	0.52	Transporte
A0A067P208	Reductasa de cadena corta putativa	0.501	Metabolismo oxidativo
A0A067NF70	D-aminoácido oxidasa putativa	0.492	Metabolismo oxidativo
A0A067N8Q7	No predicho	0.468	No predicho

Anexo 6. Proteínas únicas de la condición expuesta a PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NEZ7	Chaperona HSP20 putativa	0.468	Actividad chaperona
A0A067NMI0	Acil Co-A deshidrogenasa putativa	0.468	Metabolismo oxidativo
A0A067NYI3	Adenilsuccinato sintasa	0.425	Otros
A0A067NV02	Proteína con dominio hidrolasa Nudix	0.425	Metabolismo secundario
A0A067N455	Metaloproteasa	0.389	Actividad peptidasa
A0A067N825	Bicupin oxalato descarboxilasa putativa	0.389	Metabolismo oxidativo
A0A067NTH6	Proteína ribosomal L16	0.389	Transcripción y traducción
A0A067P954	No predicho	0.389	No predicho
A0A067NKB7	Hidrolasa de la ubiquitina carboxil terminal	0.389	Otros
Q2VT18	Lacasa 2	0.389	Metabolismo oxidativo
A0A067P3S1	No predicho	0.389	No predicho
A0A067NZE9	Deoxihipusina sintasa putativa	0.369	Otros
A0A067N7S5	Peptidasa	0.369	Actividad peptidasa
A0A067NVQ7	PHOSPHO fosfatasa putativa	0.359	Metabolismo del fosfato
A0A067NS38	Componente PIL1/LSP1 del Eisosoma putativa	0.334	Transporte
A0A067P2S5	Proteína ribosomal L13 putativa	0.334	Transcripción y traducción
A0A067NG45	Glicosiltransferasa familia 69	0.311	Estructural
A0A067NXT9	Proteína con dominio Endo/exonucleasa	0.311	No predicho
A0A067P2W0	Proteína ribosomal L32 putativa	0.304	Transcripción y traducción
A0A067NPD5	Peptidasa M36 putativa	0.304	Actividad peptidasa
A0A067NI99	Dihidroxiácido deshidratasa putativa	0.301	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067PCV5	Epimerasa dependiente de NADP	0.292	No predicho
A0A067NLA5	Galactosa oxidasa putativa	0.292	Metabolismo oxidativo
A0A067N8I4	Dioxigenasa putativa	0.292	Metabolismo oxidativo/Ruptura de anillos aromáticos

Anexo 6. Proteínas únicas de la condición expuesta a PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NLC1	No predicho	0.292	No predicho
A0A067NYW8	No predicho	0.292	No predicho
A0A067NAB0	Bicupin oxalato descarboxilasa putativa	0.292	Metabolismo oxidativo
A0A067P3F7	Dioxygenasa de estradiol	0.292	Metabolismo oxidativo
A0A067P034	Uridilato quinasa	0.292	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067NYI1	Proteína con dominio 1,2-Aminotransferasa	0.274	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067NMW5	Peptidasa aspártica putativa	0.274	Actividad Hidrolítica
A0A067P164	Proteína con dominio NUDIX hidrolasa	0.259	Metabolismo de los aminoácidos
A0A067NGG9	Galactosa oxidasa putativa	0.233	Metabolismo oxidativo
A0A067NP30	Peptidasa S53	0.222	Actividad Hidrolítica
A0A067VKF7	Aril-alcohol oxidasa	0.212	Metabolismo oxidativo
A0A067NX11	Alfa-1,2-Manosidasa	0.199	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NWS7	Proteína dependiente de metal	0.194	Actividad Hidrolítica
A0A067NB23	Metaloproteasa extracelular	0.186	Actividad Hidrolítica
A0A067NV51	Dipeptidasa	0.172	Actividad Hidrolítica
A0A067NAG6	No predicho	0.16	No predicho
A0A067N7K0	Glucosa-metanol-colina oxidoreductasa	0.16	Metabolismo oxidativo
Q9UV63	Trealosa fosforilasa	0.105	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NR58	Peptidasa M28 putativa	0.105	Transporte
A0A067PBJ0	No predicho	0.098	No predicho
A0A067PCH4	No predicho	0.078	No predicho

Anexo 7: Proteínas de *P. pulmonarius* LBM 105 únicas a la condición en ausencia de PCBs obtenidas a partir del análisis proteómico total.

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína.

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067PDD5	Glutamina amidotransferasa	233.6	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NSD1	No predicho	157.5	No predicho
A0A067NRV9	Iniciador de la traducción eucariótico factor 3 subunidad B	141.3	Transcripción y traducción
A0A067NK91	Proteína con dominio CPSF_A	133.5	No predicho
A0A067NVQ2	No predicho	130.2	No predicho
A0A067P023	Leucil-tRNA sintetasa putativa	123.1	Transcripción y traducción
A0A067NXR5	Glicosil hidrolasa familia 31	110.2	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NSP9	No predicho	105.5	No predicho
A0A067NZM2	Complejo B N-acetiltransferasa putativa	104.9	Estructural
A0A067NUX7	Proteína con dominio WW	101.9	Transporte
A0A067NJ47	Complejo de inducción del silenciamiento del RNA Putativo - componente SN nucleasa	99.4	Transcripción y traducción
A0A067NIX9	Iniciador de la traducción eucariótico factor 3 subunidad B	95.7	Transcripción y traducción
A0A067P0D1	Coatomero subunidad beta	92.9	Transporte
A0A067P7X2	Glicosil hidrolasa familia 92	87.8	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067PAE8	Piruvato carboxilasa	87.7	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NWR7	NADH-ubiquinona oxidorreductasa (Subunidad NDUFS1)	80.6	Metabolismo Oxidativo

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NBY5	Citocromo P450 reductasa	80.5	Metabolismo Oxidativo
A0A067NPT5	Peptidasa S9 putativa	75.4	Actividad peptidasa
A0A067NYY1	Proteína con dominio B5	71	Transcripción y traducción
A0A067N6Q5	Aciltransferasa Putativa	70.4	No predicho
A0A067PA05	Succinato deshidrogenasa	70.4	Metabolismo Oxidativo
A0A067N626	Hidaintonasa proteína B Putativa	63.1	No predicho
A0A067P3P5	Proteína con dominio amidasa	61.8	Metabolismo del Nitrogeno
A0A067P2V2	Antranilato sintasa componente I putativa	61.2	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067N9I3	Proteína con dominio Rieske	60.3	Metabolismo Oxidativo
A0A067NEG8	Piridina nucleótido-disulfido oxidorreductasa putativa	59.3	Metabolismo secundario
A0A067NTS1	1,3-beta-glucanosiltransferasa	58.3	Estructural
A0A067NXR3	Coatmero subunidad beta	57.4	Transporte
A0A067NS52	No predicho	57	No predicho
A0A067NHG1	Aldehído deshidrogenasa putativa	54.6	Metabolismo Oxidativo
A0A067P4S0	NADH deshidrogenasa-flavoproteína 1	54.5	Metabolismo Oxidativo
A0A067N2N1	Aldehído deshidrogenasa putativa	51.8	Metabolismo Oxidativo
A0A067P1V4	Citrato sintasa	51.2	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067P3S9	Proteína DUF5427	48.9	No predicho
A0A067NVA9	Proteína con dominio de unión al lipoil	47.8	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067N6B4	Epóxido hidrolasa putativa	45.2	Metabolismo Oxidativo
A0A067NA41	proteína similar Sv1	44.9	Metabolismo Oxidativo
A0A067NZ99	Helicasa putativa	44.7	Otros

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067N6C1	Proteína con dominio kinasa	44.6	Metabolismo del fosfato
A0A067NJR9	Proteína con unión al oxilosterol putativa	43.6	Metabolismo de los lípidos
A0A067NKJ0	Difosfomevalonato descaboxilasa	43.5	Metabolismo secundario
A0A067N8V5	Peptidasa M24 Putativa	43.4	No predicho
A0A067NIZ7	Aminotransferasa Putativa	41.8	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NUK2	Proteína fúngica G Putativa	40.4	Otros
A0A067N544	Enoilreductasa Putativa	40.4	Metabolismo Oxidativo
A0A067NRV8	Aspartato-semialdehído deshidrogenasa Putativa	40.2	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NRC3	Peptidasa M28	40.1	Actividad peptidasa
A0A067P7S8	Oxidoreductasa con dominio Rossman	39.6	Metabolismo Oxidativo
A0A067NC03	Factor de exportación de mRNA Gle2/RAE1 putativa	38.9	Transcripción y traducción
A0A067NKW8	Fructosa bifosfato aldolasa	38.7	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NBN1	Citocromo P450	38.3	Metabolismo Oxidativo
A0A067NLG7	Enzima dependiente de pyridoxal-fosfato	38.2	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067P088	Aldo/ceto reductasa putativa	37.8	Metabolismo Oxidativo
A0A067NZQ5	Arginasa	36.2	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NTB8	Proteína con dominio SH3	35.3	No predicho
A0A067P352	Carbono-nitrogeno hidrolasa putativa	34.1	Metabolismo del Nitrogeno
A0A067NP02	Proteína con dominio repetitivo WD	33.9	No predicho
A0A067NSY7	Metaloproteasa putativa	33.9	Actividad peptidasa

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NM16	Proteína ribosomal P0	33.7	Transcripción y traducción
A0A067NLD2	Proteína con dominio CRAL-TRIO	31.8	No predicho
A0A067NRD1	Complejo citocromo b-C1 – Subunidad Rieske	29.8	Metabolismo Oxidativo
A0A067P0D4	Subunidad alfa del Proteosoma	29.7	Otros
A0A067NXG5	Proteína PBDC1	20.5	No predicho
A0A067NAQ7	No predicho	20.4	No predicho
A0A067NAU1	No predicho	17.5	No predicho
A0A067NGP7	Módulo de unión al carbohidrato familia 13	17	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NVI9	Proteína similar a la Coactosina putativo	16,1	Estructural
Q8X1M9	Plurotolisina A	15.1	Actividad peptidasa
D2JY85	Histona H2A	14.6	Otros
A0A067P415	Proteína con dominio de unión al ADN	13.1	Otros
A0A1V0JIC0	Factor de elongación EF1-alfa	12.3	Transcripción y traducción
A0A067NKE1	Proteína similar al Lsm7 putativa	11	Transcripción y traducción
A0A067P6E3	Histona 2B	10.15	Otros
A0A067N3B6	Reductasa de cadena corta	9.17	Metabolismo Oxidativo
A0A067NU07	Poliketido sintasa	9.16	Metabolismo Oxidativo
A0A067NUP7	Aspartato aminotransferasa putativa	8.95	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NWK3	Citocromo b5 reductasa	8.91	Metabolismo Oxidativo
A0A067P1K0	Proteína de maduración del ribosoma	8.75	Transcripción y traducción
A0A067NMJ8	No predicho	8.72	No predicho
D2SLN4	Factor de elongación de la traducción	8.56	Transcripción y traducción

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NEH1	Subunidad B del complejo F0 de la ATPase	8.27	Metabolismo del fosfato
A0A067NJH1	No predicho	8.12	No predicho
D2SLR0	Factor de elongación de la traducción	8.09	Transcripción y traducción
A0A067NF91	Subunidad regulatoria del proteosoma 26S	8.02	Otros
A0A067NCL8	Proteína T del complejo de ruptura de la glicina	7.59	Metabolismo de Aminoácidos
D2SLR3	Factor de elongación de la traducción	7.43	Transcripción y traducción
D2SLP9	Factor de elongación de la traducción	7.43	Transcripción y traducción
A0A067NHX4	Malato sintasa	7.36	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NLX2	Flavocitocromo c putativa	7.3	Metabolismo Oxidativo
A0A067P1A0	Dienelactona hidrolasa	7.27	Detoxificación
A0A067NAS1	No predicho	7.25	No predicho
A0A067PBA8	Difosfato nucleósido kinasa	6.94	Otros
A0A067NZJ1	Subunidad Alfa 1 del proteosoma	6.8	Otros
A0A1V0JIL1	Factor de elongación EF1-alfa	6.74	Transcripción y traducción
D5J783	Factor de elongación EF1-alfa	6.74.	Transcripción y traducción
A0A067P5P8	Proteína de transporte Sec23	6.67	Transporte
A0A067NUI1	Piruvato descarboxilasa	6.61	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067N402	Reductasa de cadena corta	6.61	Metabolismo Oxidativo
A0A067NV48	Alcohol deshidrogenasa putativa	6.61	Metabolismo Oxidativo
A0A067NJE3	Fosfomevalonato quinasa Erg8 putativa	6.6	Metabolismo secundario

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NMF2	Tiolasa	6.58	No predicho
A0A0H4ABQ8	Factor de elongación EF1-alfa	6.57	Transcripción y traducción
A0A067NL93	Helicasa	6.57	Otros
A0A067NJE4	Fenol monooxigenasa	6.54	Metabolismo Oxidativo
A0A067NCK2	Proteína de exportación putativa	6.54	Transporte
A0A067NCE2	No predicho	6.37	No predicho
A0A067NRM5	Proteína de unión al ARN	6.35	Otros
A0A067P5E0	Subunidad COX5A de la citocromo C Oxidasa	6.33	Metabolismo Oxidativo
A0A067NYT0	Ubiquitina hidrolasa	6.24	Actividad peptidasa
A0A067P3F6	Helicasa putativa	6.23	Otros
A0A067NTR2	Enzima desramificante de Glicogeno	6.15	Actividad Peptidasa
A0A067NSN4	Metilmalonato semialdehído deshidrogenasa	6.11	Metabolismo Oxidativo
A0A067NAM1	Aldo/ceto reductasa	6.1	Metabolismo Oxidativo
A0A067NBS6	Proteína con dominio Carrier	6	No predicho
A0A067NV79	Subunidad Alfa 4 del proteosoma	5.97	Otros
A0A067P007	Spermidina sintasa	5.95	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067P0G4	Purina nucleósido fosforilasa	5.91	Otros
A0A067NZQ4	Epimerasa putativa	5.9	Otros
A0A067NQX1	Proteína con dominio MPN	5.9	Otros
A0A067NBC2	Metiltransferasa	5.87	No predicho
A0A067NTA7	Histona H4	5.81	Otros
A0A067P3W4	Histona H4	5.81	Otros
A0A067N250	Oxidoreductasa dependiente de NADP	5.81	Metabolismo Oxidativo
A0A067P4K7	Hsp 100	5.8	Actividad chaperona
A0A067NFQ9	Proteína de unión al NADP	5.76	Otros
A0A067NTY2	Tricalbina	5.74	Transporte

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067P2Z7	Tioredoxina	5.72	Metabolismo Oxidativo
A0A067NZF0	Dipeptidil Peptidasa	5.68	Actividad peptidasa
A0A067NU43	Adenosina quinasa	5.67	Otros
A0A067NS75	Proteína similar a la ferritina	5.66	Otros
A0A067PBN9	Proteína con dominio celulasa	5.66	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067P107	No predicho	5.64	No predicho
A0A067NAT9	Metiltransferasa	5.59	No predicho
A0A067NQW4	superóxido dismutasa	5.58	Metabolismo Oxidativo
A0A067P131	Hexoquinasa	5.57	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NTZ1	MAP-Kinasa	5.5	Otros
M5EF84	Lipoxigenasa	5.48	Metabolismo Oxidativo
A0A067NSW7	Subunidad beta del Proteosoma	5.41	Otros
A0A067P9H9	Fosfoglicerato mutasa	5.4	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067N6X5	Helicasa de RNA putativa	5.38	Otros
A0A067NM35	Inhibidor de la proteína Rho	5.34	Otros
A0A067NP99	Ubiquitina similar a Nedd8	5.31	Otros
A0A067NXE9	Carboxilesterasa	5.21	Metabolismo de los lípidos
A0A067NDL4	Proteína con dominio de depolimerización de actina	5.21	Estructural
A0A067NU40	Subunidad alfa 5 del proteosoma	5.16	Otros
A0A067NCL3	Cdc37	5.05	Otros
A0A067NQZ0	No predicho	5.01	No predicho
A0A1V0JIC8	Factor de elongación EF1-alfa	4.62	Transcripción y traducción
A0A1V0JIC6	Factor de elongación EF1-alfa	4.62	Transcripción y traducción

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A1L2D573	Factor de elongación EF1-alfa	4.62	Transcripción y traducción
A0A067P361	proteína con dominio tioredoxina	4.6	No predicho
A0A0B7G0Q0	Calmodulina	4.28	Otros
A0A067NYD7	Proteína ribosomal L12	4.17	Transcripción y traducción
A0A067NLY3	No predicho	3.64	No predicho
A0A067NBS5	Proteína Carrier	3.21	Transporte
A0A067N8K6	Citocromo c1	2.59	Metabolismo Oxidativo
A0A067P3X5	PCDP 5	2.16	Otros
A0A067NVN9	Translocasa	2.16	Transporte
A0A067NKF3	Citrato Sintasa	1.89	Metabolismo de los carbohidratos
M5EEZ0	Lipoxygenase	1.82	Metabolismo Oxidativo
A0A067NI97	No predicho	1.68	No predicho
A0A067P303	Fosfogluconato deshidrogenasa	1.68	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NJU2	No predicho	1.58	No predicho
A0A067N875	No predicho	1.51	No predicho
A0A067NJ05	Citocromo c1	1.51	Metabolismo Oxidativo
A0A067NPW7	Reductasa de cadena corta	1.51	Metabolismo Oxidativo
A0A067P9S7	Trealosa fosforilasa	1.48	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NS53	Piruvato carboxilasa	1.46	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NSK9	No predicho	1.31	No predicho
A0A067P388	Proteína transportadora de ATP	1.31	Transporte
A0A0A8IDC3	Lipoxygenasa	1.25	Metabolismo Oxidativo

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NYE0	Proteína de unión al ARN	1.25	Transcripción y traducción
A0A067N2L3	Subunidad K de la ATPsintasa	1.15	Metabolismo del fosfato
A0A067NJ61	Proteína ribosomal S13	1.15	Transcripción y traducción
A0A067NV66	Ubiquitin E2 protein	1.15	Otros
A0A067NKH2	Aldo/ceto reductasa	1.01	Metabolismo Oxidativo
A0A067N494	Factor de poliadenilación y clivaje	0.995	Transcripción y traducción
A0A067NSA9	Inhibidor de la Rab GDP	0.931	Transporte
A0A067NP91	Proteína ribosomal L1	0.931	Transcripción y traducción
A0A067N808	Glutación transferasa	0.905	Detoxificación
A0A067N2Y5	No predicho	0.887	No predicho
A0A067NFV5	Tropomiosina	0.874	Estructural
A0A067N2L3	Transaldolasa	0.874	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NIL8	Metilcitrato deshidratasa	0.748	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067N9Q3	Prolina iminopeptidasa	0.73	Actividad peptidasa
Q9UVM4	Hsp 100	0.723	Actividad chaperona
A0A067NS50	Alfa Importina	0.701	Transporte
A0A067P6C7	Ubiquilina	0.701	Otros
A0A067NWN7	Proteína relacionada a la actina	0.701	Otros
A0A067P3U3	Aldo/ceto reductasa	0.688	Metabolismo Oxidativo
A0A067NC36	No predicho	0.668	No predicho
A0A067NIW9	Ribonucleoproteina	0.668	Otros
A0A067NFD3	Peptidasa S9	0.655	Actividad peptidasa

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NF95	Septina	0.65	Estructural
A0A067NF66	Citocromo P450	0.633	Metabolismo Oxidativo
A0A067NCV7	ATPasa, Complejo V1, Subunit B	0.63	Metabolismo del fosfato
A0A067NYR0	No predicho	0.585	No predicho
A0A067NZ04	No predicho	0.585	No predicho
A0A067NQ93	Proteína YOp1	0.585	No predicho
A0A067NZX2	No predicho	0.585	No predicho
A0A067NK42	Proteína ribosomal L14	0.585	Transcripción y traducción
A0A067N530	Proteína de ensamble del Nucleosoma	0.585	Otros
A0A067NQF8	Receptor proteosomal Rpn13	0.585	Otros
A0A067NSH9	Proteína Nud	0.585	No predicho
A0A067P6Z7	Enoil-CoA hidratasa	0.585	No predicho
A0A067PCS0	Chaperona DnaJ	0.585	Actividad chaperona
A0A067P1B7	Aldo/ceto reductasa	0.551	Metabolismo Oxidativo
A0A067P2T4	Aldo/ceto reductasa	0.551	Metabolismo Oxidativo
A0A067NY20	S-(hidroximetil)-glutati6n deshidrogenasa	0.551	Oxidative metabolsim
A0A067NAX0	Ureasa	0.546	Metabolismo del Nitrogeno
A0A067P5S8	Glicotransferasa familia 8	0.54	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067PAR1	Cloroperoxidasa	0.54	Metabolismo Oxidativo
A0A067NZZ6	Proteína con dominio FAS1	0.52	No predicho
A0A067NRJ6	Rho GTPasa	0.52	Estructural
A0A067P2V4	No predicho	0.52	No predicho
A0A067NMV8	Asparagina ARNt ligasa	0.509	Transcripción y traducción
A0A067NEN6	Subunidad central de la Citocromo C reductasa	0.492	No predicho

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067N9K9	Ras GTPasa	0.468	Otros
A0A067PDM5	Factor de elongación EF3	0.468	Transcripción y traducción
A0A067NVV3	Serin/treonin fosfatasa	0.468	Otros
A0A067P0R2	Cadena alfa de la tubulina	0.468	Estructural
A0A067NER0	Cadena alfa de la tubulina	0.468	Estructural
A0A067NVZ7	Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa putativa	0.468	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NZ77	Cadena alfa de la tubulina	0.468	Estructural
A0A067N4B4	Proteína GVP36	0.468	Transporte
A0A067P657	Aldo/ceto reductasa	0.468	Metabolismo Oxidativo
A0A067N8F7	No predicho	0.468	No predicho
A0A067NKQ9	Oxidoreductasa dependiente de NADP	0.468	Metabolismo Oxidativo
A0A067NEB3	Poliprenil sintasa	0.438	Metabolismo secundario
A0A067NFS5	Transportador de fosfato mitocondrial	0.438	Transporte
A0A067NPK7	Isocitrato liasa	0.433	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NS47	Septina	0.425	Estructural
A0A067NFC4	Oxidoreductasa dependiente de molibdeno	0.417	Metabolismo Oxidativo
A0A067NYQ7	Activador Hsp90	0.413	Actividad chaperona
A0A067NQF2	Desaturasa de ácidos grasos putativa	0.413	No predicho
A0A067NGZ1	Hsp 70	0.413	Actividad chaperona
A0A067NRN5	Importina	0.413	Transporte
A0A067NT53	Ribonucleoproteína pequeña	0.413	Transcripción y traducción
A0A067NKF6	No predicho	0.413	No predicho
A0A067P1S4	Aspartato aminotransferasa	0.407	Metabolismo de Aminoácidos

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A077K7X8	Serin aminopeptidasa	0.403	Actividad peptidasa
A0A067NK65	Proteína de unión al ARN	0.389	Transcripción y traducción
A0A067NYE3	Superóxido dismutasa	0.389	Metabolismo Oxidativo
A0A067P0B6	Proteína de unión al ARN	0.389	Transcripción y traducción
A0A067NHL1	No predicho	0.374	No predicho
A0A067NRH1	Fumarato hidratasa tipo II	0.374	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NIF3	Carboxipeptidasa	0.369	Actividad peptidasa
A0A067P8H2	Serin/Treonin quinasa	0.369	Otros
A0A067P4F3	ARNt sintasa	0.365	Transcripción y traducción
A0A067NAP6	No predicho	0.359	No predicho
A0A067NNW3	Tiolasa	0.35	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NVP5	Glutación-S-Transferasa	0.35	Detoxificación
A0A067NLY8	Hexoquinasa	0.346	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NMV9	Glutación-S-Transferasa	0.334	Detoxificación
A0A067NT84	No predicho	0.334	No predicho
A0A067NE70	Proteína asociada a los microtúbulos	0.334	Otros
A0A067NCM1	Subunidad reguladora 6A del proteosoma 26S	0.334	Otros
A0A067N4F4	Lactato/Malato deshidrogenasa	0.334	Metabolismo Oxidativo
A0A067P1M5	Subunidad reguladora del proteosoma 26S	0.318	Otros
A0A067ND80	Fosfatidilserin descarboxilasa	0.311	Metabolismo de los lípidos
A0A067NL05	Metilribosa 1 fosfato deshidrogenasa	0.311	Metabolismo de Aminoácidos

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NI17	Subunidad reguladora PR55 de la fosfatasa 2A	0.304	Otros
A0A067NG33	Glucógeno sintasa	0.301	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NWX3	No predicho	0.292	No predicho
A0A067NQF4	Reductasa de cadena corta	0.292	Metabolismo Oxidativo
A0A067NY82	GTPasa	0.292	Otros
A0A067NSE0	Subunidad reguladora 12 del proteosoma	0.292	Otros
A0A067P833	oxigenasa productora del factor psi	0.292	Metabolismo de los lípidos
A0A067NAX7	Inosin-5-monofosfato deshidrogenasa	0.28	Metabolismo Oxidativo
A0A067NFK1	Subunidad reguladora del proteosoma 26S	0.28	Otros
A0A067NYN0	No predicho	0.278	No predicho
A0A067NZ22	Isocitrato deshidrogenasa	0.274	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NME3	Serin/treonin fosfatasa	0.274	Otros
A0A067NEF9	Serin/treonin fosfatasa	0.274	Otros
A0A067N9G3	Acil-CoA Deshidrogenasa	0.269	Metabolismo Oxidativo
A0A067NXS6	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	0.266	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NIZ1	Importina	0.252	Transporte
A0A067NVT6	Homoserin deshidrogenasa	0.245	No predicho
A0A067NKC5	Aldo/ceto reductasa	0.245	Metabolismo Oxidativo
A0A067NVQ6	Factor iniciador de la traducción tipo 2	0.245	Transcripción y traducción
A0A067P9Z9	Serin/treonin fosfatasa	0.241	Otros
A0A067NV87	Glucosa-6-fosfato Isomerasa	0.241	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067N3C6	Proteína de unión a la actina	0.239	Otros

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067PB21	Factor iniciador 4A	0.233	Transcripción y traducción
A0A067NF12	Acetamidasa	0.225	Actividad peptidasa
A0A067NNX9	DHAP sintasa	0.222	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NGK8	No predicho	0.222	No predicho
A0A067NK95	Peroxidasa versátil	0.222	Metabolismo Oxidativo
A0A067N5H9	Perforina	0.215	Transporte
A0A067PDG2	Factor liberador de la cadena peptídica	0.212	Transcripción y traducción
A0A067N4P4	Transportador del tetrapéptido	0.212	Transporte
A0A067P1I6	Quinunerina formamidasa	0.212	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067P621	Proteína de incompatibilidad del heterocarionte	0.205	Otros
A0A067NPN3	Alcohol deshidrogenasa	0.202	Metabolismo Oxidativo
A0A067NIY4	Proteína con dominio quinasa	0.202	Metabolismo del fosfato
A0A067P0M0	Isocitrato deshidrogenasa	0.202	Metabolismo Oxidativo
A0A067N9H1	Subunidad reguladora del proteosoma 26S	0.194	Otros
A0A067N676	Kreatinasa	0.194	Metabolismo del Nitrogeno
A0A067NV77	Subunidad reguladora del proteosoma Rpn2	0.194	Otros
A0A067NS76	No predicho	0.189	No predicho
A0A067NC76	ATPasa similar a Obg	0.186	Metabolismo del fosfato
A0A067NLW0	Enzima activadora de la ubiquitina	0.182	Otros
A0A067PA11	Oxidoreductasa putativa	0.179	Metabolismo Oxidativo
A0A067PB82	Proteína con dominio de proteosoma	0.179	Otros

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067P0D8	ATPsintasa subunidad A	0.179	Metabolismo del fosfato
A0A067NC64	ARNt Ligasa	0.175	Transcripción y traducción
A0A067NRD2	No predicho	0.172	No predicho
A0A067NQJ2	Proteína de unión al Nadp	0.172	No predicho
A0A067NVM8	ARNt Ligasa	0.172	Transcripción y traducción
A0A067P255	Galactosa Oxidasa	0.172	Metabolismo Oxidativo
A0A067PBC2	Subunidad reguladora del proteosoma 26S	0.172	Otros
A0A067NYL0	UDP-Glucosa-6-deshidrogenasa	0.172	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NHD2	ARNt sintasa	0.17	Transcripción y traducción
A0A067NYB4	Proteína de transporte del oligopéptido	0.166	Transporte
A0A067NNL6	No predicho	0.166	No predicho
A0A067NM60	Treholasa	0.158	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NW74	Proteína de incompatibilidad del heterocarionte	0.158	Otros
A0A067P2R6	Aminopeptidasa	0.157	Actividad peptidasa
A0A067ND63	Acetil CoA Deshidrogenasa	0.155	Metabolismo Oxidativo
A0A067N5C2	Hsp 70	0.155	Otros
A0A067NIV0	Proteína de transporte de membrana	0.155	Transporte
A0A067NP59	Delta-1-pirrolina -5-carboxilato deshidrogenasa	0.15	Metabolismo del Nitrogeno
A0A067PC57	Glicopéptido-N-tetradecanol transferasa	0.15	No predicho
A0A067NZ14	Proteína de unión nuclear	0.148	Transcripción y traducción
A0A067NKQ1	Reductasa de cadena corta	0.145	Metabolismo Oxidativo

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NWF1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	0.145	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NUN3	ATPasa	0.142	Transporte
A0A067NF76	Importina putativa	0.142	Transporte
A0A067NY79	Subunidad reguladora del proteosoma 23	0.141	Otros
A0A067NPL8	Ubiquitin ligasa E3	0.139	Otros
A0A067P2W3	Importina putativa	0.134	Transporte
A0A067P6R1	Quinasa putativa	0.129	Otros
A0A067NKK5	Chaperonina CCT	0.129	Actividad chaperona
A0A067ND37	No predicho	0.122	No predicho
A0A067NMD6	Fenilalanina amino-liasa	0.122	Metabolismo de Aminoácidos
A0A067NNJ9	Enzima ramificante del 1,4-alfa-glucano	0.122	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NTA0	Aminopeptidasa	0.119	Actividad peptidasa
A0A067NU35	Complejo protéico T	0.119	Actividad chaperona
A0A067NBU9	Glutamato deshidrogenasa	0.118	Metabolismo Oxidativo
A0A067NY97	Ligasa ARNt	0.113	Transcripción y traducción
A0A067NUA3	Ligasa ARNt	0.11	Transcripción y traducción
A0A067P3R9	Metaloproteasa M13	0.11	Actividad peptidasa
A0A067NQX9	No predicho	0.108	No predicho
A0A067NXL9	No predicho	0.103	No predicho
A0A067PBX9	Glutamil ARNt sintasa	0.99	Transcripción y traducción
A0A067P386	Fosfoacetilglucosamina mutasa	0.99	Metabolismo de los carbohidratos

Anexo 7. Proteínas únicas de la condición en ausencia de PCBs de *P. pulmonarius* LBM 105. (*) El valor de emPAI expresa cuantas veces más se contabiliza una proteína identificada por espectrometría de masas cuando se la compara a una digestión *in silico* de una unidad de esa misma proteína. (Cont.)

ID de proteína	Función Predicha	emPAI*	Proceso biológico involucrado
A0A067NKB9	Ligasa ARNt	0.94	Transcripción y traducción
A0A067P322	Subunidad reguladora del proteosoma 26S	0.93	Otros
A0A067P1M6	Proteína asociada al orden vacuolar 35	0.91	Otros
A0A067NH08	No predicho	0.91	No predicho
A0A067N2J4	Subunidad Rpn1 del proteosoma 26S	0.89	Otros
A0A067P0Q8	ARNt sintetasa	0.87	Transcripción y traducción
A0A067NLS2	Alfa-manosidasa	0.77	Actividad peptidasa
A0A067NZQ8	Ligasa ARNt	0.75	Transcripción y traducción
A0A067P674	UDP-4-glucosa-Epimerasa	0.7	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NAR2	Sintetasa de ácidos grasos	0.63	Metabolismo de los lípidos
A0A067NRK5	Acetil CoA carboxilasa	0.63	Metabolismo de los lípidos
A0A067NI72	Proteína con dominio KH	0.62	No predicho
A0A067NLN1	Hsp 90	0,5	Actividad chaperona
A0A067NS58	Cadena pesada de la clatrina	0.47	Transporte
A0A067NK22	Activador de la traducción Gcn1	0.3	Transcripción y traducción
A0A067NMB1	Ubiquitin ligasa E3	0.22	Otros

Anexo 8: Proteínas secretadas por *P. pulmonarius* LBM 105 en medio líquido

Proteínas secretadas en condiciones de exposición a los PCBs

ID de proteína	Función predicha	Proceso biológico involucrado
A0A067NIF3	Carboxipeptidasa	Actividad peptidasa
A0A067NE93	Carboxipeptidasa	Actividad peptidasa
A0A067P1X3	Glicosil hidrolasa familia 16	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NAE1	Proteína de unión a carbohidratos familia 13	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NJI9	Glucoamilasa	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067P000	No predicho	No predicho
A0A067NPF5	Proteína de unión a la fosfatidiletanolamina putativa	Otros
A0A067NB23	Metaloproteasa	Actividad peptidasa
A0A067NGG9	Galactosa oxidase putativa	Metabolismo oxidativo
A0A067NSV0	Proteína con dominio peptidasa A1	Actividad peptidasa
A0A067NSY7	Proteína con dominio Aspzincin M35	Actividad peptidasa
A0A067NEM7	Proteína con dominio Lipasa 3	Metabolismo de los lípidos
A0A067P0B2	Proteína con dominio Peptidasa A1	Actividad peptidasa
A0A067P468	Cerato platanina putativa	Estructural
A0A067NH12	Lacasa	Metabolismo oxidativo
A0A067P478	Cerato platanina putativa	Estructural
A0A067NAB0	Oxalato descarboxilasa/oxidasa putativa	Metabolismo oxidativo
A0A1S6YJF7	Lacasa	Metabolismo oxidativo
A0A067NF68	Proteína con dominio Lipasa 3	Metabolismo de los lípidos
Q75NB1	Ribonucleasa T2	Otros

Proteínas secretadas en ausencia de PCBs

ID de proteína	Función predicha	Proceso biológico involucrado
D5GRP3	Carbolixesterasa	Metabolismo de los lípidos
A0A067N9V0	Glicosil hidrolasa familia 3	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NTV2	Peptidasa S8 putativa	Actividad peptidasa
A0A067NDV5	Carbolixesterasa	Metabolismo de los lípidos
A0A067N825	Oxalato descarboxilasa/oxidasa	Metabolismo oxidativo
A0A067NMI4	Subunidad de la lacasa POXA3a	Metabolismo oxidativo
A0A067NAD7	Oxalato descarboxilasa/oxidasa	Metabolismo de los lípidos
A0A067NYE7	Peptidasa	Actividad peptidasa
A0A067NKA2	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo
A0A067NTZ2	Glicerofosfodiester fosfodiesterasa putativa	Metabolismo de los lípidos
A0A067P1C5	Cuproproteína putativa	Metabolismo oxidativo
A0A067P438	Fosfoesterasa similar a la calcineurina putativa	No predicho
A0A067NTJ4	Proteína similar a la fitasa putativa	Metabolismo de los lípidos
A0A067N455	Peptidasa	Actividad peptidasa
A0A067NG07	Galactosa oxidasa putativa	Metabolismo oxidativo
A0A067NSZ9	Lacasa	Metabolismo oxidativo
A0A067NMB6	No predicho	No predicho
A0A067PE74	Glicosil hidrolasa familia 31	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NTN5	Nucleasa S1/P1 putativa	Otros
A0A067NLC9	Carboximuconolactona descarboxilasa putativa	Metabolismo oxidativo
A0A067NBW9	No predicho	No predicho
A0A067NL98	Proteína con dominio AB hidrolasa 1	Actividad peptidasa
A0A067P1A5	Glicosil Hidrolasa (Familia 3)	Metabolismo de los carbohidratos
A0A067NGD7	Esterasa de carbohidratos familia 4	Metabolismo de los lípidos

Proteínas secretadas en ausencia de PCBs

ID de proteína	Función predicha	Proceso biológico involucrado
A0A0F7VKF7	Aril alcohol oxidasa	Metabolismo oxidativo
A0A067NL22	Proteína con dominio Amidasa	Metabolismo de los carbohidratos
