

# CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA EN EL PATOGENO OPORTUNISTA *Scedos porium apiospermum* IMPLICADA EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

## Resumen

La actividad microbiana juega un papel importante en la degradación de los hidrocarburos. En los últimos años se ha hecho evidente la importancia de la participación de los hongos en los consorcios para biorremediación y en general se acepta la idea de que las fracciones más complejas y pesadas de los hidrocarburos serán metabolizadas por los hongos y fraccionadas en moléculas más simples, que a su vez serán degradadas por bacterias. Uno de los grupos enzimáticos que ha sido relacionado en la degradación de las fracciones más complejas de los hidrocarburos es el grupo de las enzimas inespecíficas ligninolíticas conformado por las peroxidasas y las lacasas. En un ensayo de degradación de petróleo crudo colombiano (API 33) usando bacterias, se encontró al hongo HDO1 creciendo espontáneamente; el microorganismo fue identificado usando características macroscópicas, microscópicas y secuencia de ITS4 e ITS5 como *Scedosporium apiospermum*, en el phylum ascomycota y de la familia microascaceae. Buscando caracterizar los mecanismos que este hongo usa para degradar hidrocarburos, se evaluó la presencia de genes que codifican para las enzimas lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa, enzimas que actúan de manera inespecífica sobre diferentes sustratos y entre los que se incluye en varios reportes la degradación de hidrocarburos. Se usaron 5 pares de primers reportados anteriormente: Lac1 (Lyons, 2003), Lac2 (Cheong, 2006), LiP1 (Rajakumar, 1996), Lip2 y MnP (Pointing, 2005). Se intentó diseñar primers nuevos pero no fue posible al ser escasas las secuencias reportadas para el gen lacasa en el grupo de los ascomicetes y nulas las secuencias en el caso de genes de las enzimas del complejo de peroxidasa para este mismo grupo. Se obtuvo amplificación para los genes que codifican para lignina peroxidasa y lacasa, pero no para manganeso peroxidasa. Se evaluó la expresión de lignina peroxidasa y lacasa en medio mínimo de sales con petróleo y con glucosa como control, y se obtuvo producto de amplificación a partir del cDNA para el gen de la lignina peroxidasa del hongo crecido en petróleo. Se hizo un BLAST contra la base de datos de NCBI de las secuencias obtenidas en cada uno de los experimentos, pero no se encontraron coincidencias significativas. Se realizó un análisis adicional con los programas MEME y MAST para encontrar motivos comunes con secuencias reportadas para los genes buscados. Para el gen lacasa solo el análisis con MEME encontró motivos correspondientes al grupo de las oxidoreductasas, en el cual se encuentran las enzimas ligninolíticas. Lo anterior puede deberse a la escasa información que se tiene acerca de estas enzimas tanto para el grupo los hongos en general, como en el caso particular de los ascomicetes. En el caso del gen lignina peroxidasa y usando MEME fue encontrado un motivo en común con secuencias de lignina peroxidasa. Se realizó la determinación de actividades enzimáticas peroxidasa y lacasa para el hongo *S. apiospermum* HDO1. La actividad peroxidasa fue medida por el cambio de la coloración en ensayos en medio líquido y sólido suplementados con el colorante Remazol Brilliant blue R. La actividad peroxidasa fue positiva con un cambio de coloración desde el día 3. La actividad lacasa fue medida por la oxidación de una solución de ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Ácido Sulfónico)) usando espectrofotometría en los días 5, 12 y 25. La solución de ABTS fue oxidada después de los 25 días de la inoculación del medio con el hongo. En conjunto, los

resultados obtenidos indican que *S. apiospermum* HDO1 es un hongo con potencial en la degradación de hidrocarburos; en nuestro conocimiento es el primer reporte de la presencia y expresión de enzimas en este hongo de rutas inespecíficas involucradas en la degradación de compuestos complejos presentes en el petróleo. Es importante anotar que *S. apiospermum* es un hongo que ha sido investigado ampliamente en el ámbito clínico por ser un hongo oportunista que puede generar diversos cuadros clínicos en pacientes inmuno comprometidos tales como infecciones masivas, micetomas y pulmonares. Esto sugiere que los ambientes contaminados con hidrocarburos, y dadas las condiciones óptimas, favorecen la proliferación de microorganismos patógenos potenciales para el hombre.

## Abstract

Microbial activity plays an important role in the degradation of hydrocarbons that contaminate the environment. In recent years it has become evident the key role of the fungi in the biodegradation of complex components, otherwise considered as recalcitrant fractions that are not easily removed. One enzymatic group that has been linked with the degradation of heavy compounds in petroleum is the group of unspecific ligninolytic enzymes formed by peroxidase and laccase enzymes. During a biodegradation assay of Colombian crude oil (API 33) using bacterial strains, a fungal strain (named HDO1) was isolated that grew spontaneously in the minimal salt medium supplemented with petroleum. The isolate was identified as *Scedosporium apiospermum* (Microascaceae, Ascomycota) using microscopic and macroscopic traits and the sequence for ITS4-ITS5 region. To characterize the mechanisms used by *S. apiospermum* HDO1 to grow on petroleum as the sole carbon source, we attempted to amplify genes for lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase reported in other fungal genera (due to the lack of knowledge of genes specific for *Scedosporium* and the absence of peroxidase sequences in Ascomycota) (Lac1, Lyons, 2003; Lac2, Cheong, 2006; LiP1, Rajakumar, 1996; LiP2 and MnP, Pointing, 2005). We tried to design new primers in order to amplify laccase genes using just ascomycetes sequences but that was not possible because no significant matches were found respect the gene laccase. We obtained amplicons with the primers designed to target lignin peroxidase and laccase genes. To evaluate the expression of these genes, *S. apiospermum* HDO1 was grown in minimal medium with petroleum as the carbon source, RNA was extracted, cDNA was obtained and used as the DNA source for PCR reactions using the primers previously mentioned. We obtained amplification only with the primers for lignin peroxidase. BLAST analysis of the amplified sequence did not retrieve significant identities but the search of motifs with MEME and MAST found oxidoreductases motifs, a characteristic of ligninolytic enzymes. In the case of laccase, analyses with MEME shows motifs corresponding to oxidoreductases. It is important to note that there are no sequences in the group ascomycete related to this gene. In the case of lignin peroxidase using MEME tool we found a lignin peroxidase motif. Enzymatic activity assays using RBBR and ABTS showed that *S. apiospermum* HDO1 produces peroxidase and, to a lesser extent, laccase. In summary, we found that *S. apiospermum* HDO1 has an interesting potential for use as part of a bioremediation consortium; to the best of our knowledge, this is the first report of the oxidoreductase activity associated with petroleum degradation in this microorganism. *S. apiospermum* HDO1 was isolated from a biodegradation assay where the only possible source for the fungus was the petroleum itself. It is important to mention that *S. apiospermum* is considered an opportunistic pathogen for humans.

## INTRODUCCION

Los hidrocarburos son compuestos ampliamente usados como generadores de energía en forma de combustible. Debido a su continua explotación, se ha incrementado la contaminación generada por la acumulación de algunos de sus derivados en diversos ecosistemas, principalmente en aguas y suelos.

Los microorganismos son los primeros en actuar sobre la degradación de compuestos complejos como los hidrocarburos y lo hacen usándolos como fuente de carbono y energía (Leahy & Colwell 1990). Los hongos tienen gran importancia por su amplia adaptación a ambientes contaminados permitiendo a los inóculos mantenerse más tiempo en el suelo y descomponiendo compuestos complejos, con un amplio espectro de remediación (Potin, 2004). Muchos hongos son conocidos por la propiedad de degradar contaminantes persistentes en el suelo usando enzimas ligninolíticas, enzimas intensamente estudiadas debido a la complejidad de la moléculas de lignina que degrada y a su baja especificidad sobre diferentes tipos de sustratos (Haritash & Kaushik, 2009).

El Centro de Investigaciones Microbiológicas- CIMIC de la Universidad de los Andes y su grupo de Microbiología Ambiental y Bioprospección, ha desarrollado varios trabajos en descontaminación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos. El trabajo desarrollado por Vasco y colaboradores en 2011 encontró alta diversidad de hongos con potencial degradador en suelos que habían sido remediados previamente con bacterias autóctonas, incluyendo algunas estimaciones de la actividad enzimática para las cepas fúngicas encontradas.

En el desarrollo de esta investigación será utilizado como organismo un hongo que denominaremos HDO1 y que fue encontrado como contaminante en repetidas ocasiones en ensayos de degradación de petróleo, por lo que fue escogido como modelo para el estudio de la degradación de hidrocarburos realizada por hongos. En un trabajo simultaneo se encontró que la cepa HDO1 es capaz de utilizar fracciones alifáticas del petróleo entre 9 y 34 carbonos (Manuscrito en preparación, Sandoval y Vives). En el presente trabajo se realizó la identificación del hongo y la evaluación de la presencia de los complejos enzimáticos inespecificos peroxidasa y lacasa probablemente involucrados en el proceso de degradación de hidrocarburos.

## MATERIALES Y METODOS

### Material biológico

En el desarrollo de este proyecto se uso el hongo HDO1 provisto por el CIMIC de su colección de microorganismos, el cual fue aislado de un ensayo de degradación de petróleo O1. El microorganismo se encuentra conservado en agua destilada a -20°C.

### Caracterización morfológica y molecular del hongo

Se realizó una caracterización molecular a partir de la extracción de ácidos nucleicos según el siguiente protocolo: el micelio fue crecido en caldo Sabouraud y colectado por filtración al vacío usando filtros Whatman No. 1; el filtrado fue colocado en frascos de liofilización y congelado a -80°C por 30 minutos; luego el filtrado fue llevado a -20°C por 20 minutos mas y liofilizado en seco por 24 horas; el material resultante fue macerado y 100mg del macerado fueron colocados en un tubo eppendorf junto con 1 ml de buffer de lisis (2% CTAB, 3% SDS, 250 mM NaCl, 200mM Tris-HCl pH 8.5 y 25mM EDTA precalentado a 65°C); el contenido del eppendorf

fue homogenizado con vortex y fueron añadidos 80 µl de 2-mercaptoetanol y de nuevo homogenizado con vortex; el eppendorf fue colocado en baño maría a 65°C durante dos horas homogenizando en contenido del tubo por inversión cada diez minutos; el lisado del eppendorf fue repartido en 2 tubos eppendorf con 500 µl del lisado original y se adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1); los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos; se recuperó el sobrenadante y se adicionó un volumen igual de cloroformo-isoamil alcohol (24:1); los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos; se recuperó el sobrenadante y se adicionó isopropanol a 4°C. Los tubo fueron mezclados por inversión suave y se refrigeraron a -20°C durante una noche; los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos y se conservó el pellet, que fue lavado con 200 µl etanol al 70%; nuevamente el sobrenadantes fue descartado y el pellet de DNA fue secado al aire para luego ser almacenado a -20°C. Para realizar la amplificación por PCR el pellet seco es resuspendido en buffer TE 1X (Tris-HCl 0.1mM y EDTA 10mM) precalentado a 37°C y la amplificación fue realizada usando los primers universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) (White et al., 1990) con Tm de 55°C. La secuenciación fue realizada usando el servicio de secuenciación Macrogen Korea y finalmente la secuencia obtenida fue comparada con las bases de datos del servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para establecer similitud con alguna especie reportada usando un tBlastx a través de la identidad.

Al mismo tiempo fue realizada la caracterización macroscópica (textura, color y velocidad de crecimiento) y microscópica del hongo (estado de las hifas y estructuras reproductivas). Esta caracterización fue llevada a cabo en hongos crecidos durante 8 días en los medio Agar Papa Dextrosa (PDA) y agar malta (AM) y mantenidos a 30°C en incubadora.

### **Detección de genes Lignina peroxidasa, Manganeso peroxidasa y Lacasa**

La presencia de los genes lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lac) fue evaluada a través de la búsqueda de las secuencias correspondientes a los genes LiP, MnP y Lac en el hongo crecido en MMS usando glucosa como fuente de carbono. Los hongos fueron mantenidos en MMS durante tres semanas y luego una extracción de ADN fue realizada bajo el protocolo señalado en la caracterización molecular. Al final de la extracción fueron hechos geles para evaluar la integridad y calidad del material generado y al cantidad del material genético fue medida a través de nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop 2000).

Fueron usados 5 diferentes pares de primers en la evaluación de la presencia de los genes LiP en el hongo HDO1 de secuencia Lip 1 F(5'-GYCTYGTBCCVGAGCCVTTCC-3') y R (5'-AGCTGHGTCTCRAYGAAGAACTG-3') (Raghkumar, 1996) y de tamaño esperado entre 250 y 350 pares de bases; LiP2 F(5'-SCBAACATYGGYCTYACGA-3') y R(5'-TCSABGAAGAACTGSGWGTC-3') (Reddy & D'Souza, 1998; Pointing, 2005) de 400 a 600 pb; MnP F(5'-GMRATGGCCTTCRRTTCYT-3') y R(5'-TTAKGCAGGRCCRTYGAAC-3') (Bogan et al., 1996; Pointing, 2005) de 600 a 1000 pb; Lac1 F (5'-GGIACIWIITGGTAYCAYWSI CA-3') y R (5'-CCRTGIWKRTGIAWIGGRTGIGG-3') (Lyons, 2003; Laccasa Project Haraldkellner) de 900pb; y Lac2 F(5'-CAYTGCCAYGGNTTYTYCA-3') y R(5'-TGNCCTGMARRTGSAANGG-3') (Cheong, 2006; Yeo, 2008; Saparrat 2010) de 200 pb. La especificidad de los primers fue corroborada a través de alineamiento múltiple en NCBI.

Un par de primers adicionales para el gen lacasa fueron diseñados usando las secuencias para este gen registradas en NCBI con los siguientes números de acceso: Q12541.1; AAS38574.1; BAB83131.1; AAO42609.1; AAG13724.1; BAB69775.1; Q12729.1; P56193.1; BAA31217.1; AAL00887.1; AAO72981.2;

P06811.3; P78722.1; AAA64929.1; NP\_195739.2; AM269497.1. Las secuencias fueron ingresadas al programa en línea iCODEHOP (iCODEHOP v1.1, 2008) para la generación de primers degenerados gracias a la poca del alineamiento de las secuencias usadas.

### **Evaluación de la expresión de los genes LiP, MnP y Lac en presencia de petróleo**

Para la evaluación de la expresión de los genes lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lac) por el hongo HDO1, el microorganismo fue crecido durante tres semanas en medio mínimo de sales de la siguiente composición:  $K_2HPO_4$ , 0.4g;  $NH_4Cl$ , 0.8g;  $Na_2SO_4$ , 1.6g;  $KNO_3$ , 1.6g;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.0008g;  $MgSO_4$ , 0.8g y  $FeSO_4$ , 0.00032g en 800 ml de agua y usando como fuentes de carbono glucosa (como control) y petróleo al 1%. Luego, se realizó la extracción de RNA con el siguiente protocolo: los cultivos crecidos en medio mínimo de sales fueron centrifugados a 9000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet mantenido a  $-80^\circ C$ . El pellet celular fue macerado en presencia de nitrógeno líquido y resuspendido en 1000  $\mu l$  Trizol (TRIZOL Reagent Invitrogen); fue dejado 5 minutos en hielo, se adicionaron 200  $\mu l$  de cloroformo, y fue mezclado por inversión y dejado en reposo por 3 minutos más; las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm durante 15 minutos a  $4^\circ C$  y la fase acuosa fue transferida a un eppendorf nuevo a la que se le adicionó 500  $\mu l$  isopropanol; la muestra fue reposada por 10 minutos en hielo y luego centrifugada a 8000 rpm durante 15 minutos a  $4^\circ C$ ; el sobrenadante fue removido y el pellet lavado con etanol al 75% centrifugando a 5000 rpm por cinco minutos a  $4^\circ C$ ; el sobrenadante fue descartado y el pellet secado al aire; el pellet fue diluido en 20  $\mu l$  de agua DPEC; el RNA fue conservado en  $-80^\circ C$  para mantener su integridad. Para la generación de la cadena de cDNA fue usado el kit iscript cDNA síntesis de BioRad, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Purificación y análisis de secuencias**

Después de haber obtenido varias bandas en la amplificación por PCR del ADN extraído y del ADNc de la evaluación de la expresión, la purificación de estas bandas desde el gel se hizo con el kit Wizard SV Gel And PCR Clean-Up System de la casa Promega siguiendo las instrucciones del fabricante excepto en un paso en donde finalmente a la columna son añadidos 15  $\mu l$  de agua libre de nucleasas precalentada a  $70^\circ C$  para hacer una centrifugación final de 1 minuto a 12000 rpm. Finalmente la columna es descartada y el filtrado es almacenado a  $-20^\circ C$ . La secuenciación se realizó con BigDye® Terminator v3 usando un secuenciador Abi Prism 310 de Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas fueron cotejadas con la base de datos del servidor NCBI para encontrar la homología con secuencias de los genes evaluados registradas previamente en la base de datos. Las secuencias también fueron analizadas usando los programas MEME (Motif-based sequence analysis tools por Timothy & Elkan, 1994) y MAST (Motif Alignment and Search tool por Timothy & Gribskov 1998) en la búsqueda de motivos comunes con secuencias reportadas para los genes específicos.

### **Evaluación de la actividad enzimática**

Para todos los ensayos de evaluación de la actividad enzimática, el hongo fue inicialmente cultivado durante 8 días en medio PDA (agar papa dextrosa, OXOID CM0139) a una temperatura de  $30^\circ C$ .

### **Evaluación de la actividad enzimática de la lacasa**

Para la evaluación de la actividad enzimática de las lacasas dos plugs del hongo crecido en PDA fueron transferidos a medio Kirk líquido (Kirk, 1978) y mantenidos durante 30 días a 30°C. Muestras de 150µl de los días 5, 12 y 25 fueron extraídas y transferidas a tubos que contenían 600 µl de buffer succínico 33mM a un pH de 4,5, y 250 µl de solución ABTS (2,2'azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)) 20mM (Vasco et al., 2011). Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 419nm a los 0, 2, 4 y 6 minutos.

### **Evaluación de la actividad enzimática del complejo peroxidasa**

Para la evaluación de la actividad enzimática del grupo peroxidasas las muestras fueron crecidas en medio Kirk sólido, PDA y medio Kirk líquido suplementado con el colorante RBBR (Remazol Brilliant Blue R) a una concentración de 0,02 %. Para el cultivo en medio Kirk Sólido (Kirk, 1978) y PDA (Huiju, 2011), del hongo crecido previamente en PDA fue transferido un plug a una caja de petri con medio Kirk Sólido mas RBBR o PDA mas RBBR y las cajas fueron incubadas en oscuridad a 30°C durante 15 días. La presencia de un halo blanquecino alrededor de la colonia o de un cambio en la coloración del medio indicó la presencia de la actividad (Vasco et al., 2011). Para el cultivo en medio Kirk líquido fueron inoculados dos plugs provenientes del cultivo de PDA en tubos de ensayo que contenían el medio Kirk líquido con el colorante RBBR y fue evaluada la pérdida en el tiempo de la coloración a través de la medición diaria de la absorbancia en un espectrofotómetro a longitudes de 590nm y 500nm (Junghanns, 2006) durante 16 días. Como control positivo fue usado el hongo *Aspergillus terreus* (código 3064) provisto por el cepario del laboratorio LAMFU de la Universidad de los Andes Bogotá- Colombia, aislado previamente (Vasco et al., 2011) y con capacidad de oxidar el colorante. El porcentaje de decoloración fue medido a través de la fórmula: % decoloración= ((Relación para día x - Relación del Control Negativo) / Relación del Control Negativo)\*100. En la validación de los datos se hizo un análisis estadístico ANOVA para los valores de las absorbancias a través del tiempo un valor P de 0.0001 a través del programa SPSS.

## **RESULTADOS**

### **Caracterización del hongo HDO1**

Como resultado de la caracterización molecular y usando los primers ITS4 e ITS5, la comparación de la secuencia resultante por amplificación por PCR contra la base de datos de NCBI usando un tBlastx para comparar la secuencia de nucleótidos contra una base de nucleótidos pero traduciendo y usando seis marcos de lectura para una búsqueda mas intensiva y con un 100% de identidad lo señala como *Scedosporium apiospermum*. Algunas de las características más relevantes del hongo son su temperatura óptima de crecimiento entre 30°C y 37 °C alcanzando un crecimiento óptimo a los 8 días de inoculación en medio PDA, de tener una colonia algodonosa blanca con envés café (figura 1) y de sus conidios son de tipo ovalado que salen de anélicas solas o muy poco ramificadas con la colaboración de María Caridad Cepero de García profesora de la Universidad de los Ande (figura 2).

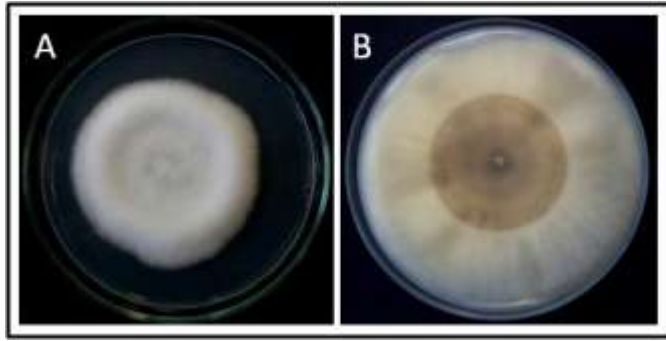
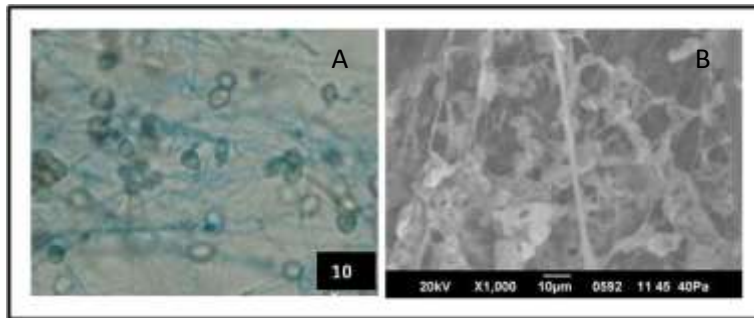


Figura 1. Caracterización macroscópica. En A imagen del característico color blanco de la colonia algodonosa en PDA. En B imagen del reverso de la colonia, característico color café claro.



Figuras 2. Caracterización microscópica. En A microscopio óptico imagen de hifas y conidios ovalados a 100x. En B imagen microscopia electrónica de barrido hifas del hongo a 1000 x.

### **Detección de genes Lignina peroxidasa, Manganeso peroxidasa y Lacasa**

Fueron realizadas PCR para lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa en el hongo *S. apiospermum* HDO1. De los 5 pares de primers amplificados, 4 resultaron en una amplificación positiva para el gen buscado, dos de lignina peroxidasa y dos de lacasas (figura 3). Al ser estos primers degenerados es de esperarse que sean encontradas varias bandas en las corridas de los productos en el gel de agarosa. Para poder extraer las secuencias de nuestros genes de interés fueron realizadas purificaciones desde el gel. En la búsqueda de los genes peroxidasas (con tamaños para lip1 de 230pb y para lip2 de 600pb) y lacasas bandas (con tamaños para Lac1 900pb y para Lac2 500 pb) las secuencias resultantes no tuvieron similitud con secuencias reportadas específicas para estos genes en la base de datos de NCBI.

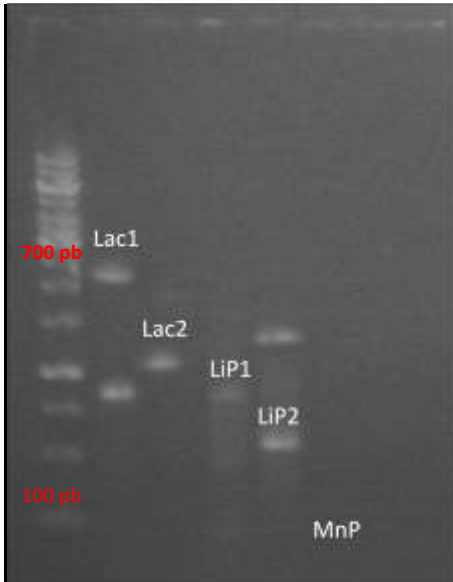


Figura 3. Amplificación por PCR de *S. apiospermum* HDO1, genes de lacasa Lac1 de tamaño esperado de 900pb; lacasa Lac2 de tamaño esperado entre 500 y 600pb; lignina peroxidasa LiP1 con tamaño esperado de 200 a 400pb; lignina peroxidasa Lip2 con tamaño esperado de 200 pb y Manganeso peroxidasa (MnP) de tamaño esperado 600 a 1000 pb que no amplificó. En rojo los pesos del marcador.

Los primers que resultaron de la corrida en iCODEHOP para lacasa fueron comparados con la secuencias de la base de datos de NCBI pero no dieron los resultados esperados en cuanto a la especificidad de las secuencias para el gen lacasa y por esta razón los primers no fueron usados en el desarrollo del trabajo.

### Evaluación de la expresión de los genes LiP, MnP y Lac en presencia de petróleo

Se hicieron extracciones de ARN para evaluar si la expresión de los genes estaba mediada por la presencia de los hidrocarburos usados como única fuente de carbono por parte de *S. apiospermum*. En la figura 4 se muestra en un gel de agarosa al 1% la calidad de la extracción del ARN con las dos bandas correspondientes a las unidades ribosomales y la pureza de la extracción fue corroborada además a través de la cuantificación en nanodrop.

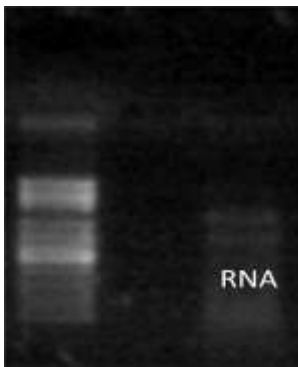


Figura 4. Gel en agarosa al 1%. Corrida de ARN extraído del hongo *S. apiospermum* HDO1.



El cDNA sintetizado a partir del ARN extraído fue amplificado con los primers que previamente habían amplificado sobre DNA, para evaluar la posible expresión de estos genes cuando el hongo crece en presencia de hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono. El par de primers LiP1 fue el único capaz de amplificar, mostrando una banda del tamaño esperado (figura 5). Extracciones de ARN del hongo crecido en MMS usando glucosa como fuente de carbono también fueron realizadas pero los primers evaluados no mostraron ninguna amplificación a través de la PCR. La secuencia obtenida para LiP1 fue analizada haciendo un alineamiento pareado contra la secuencia obtenida de la extracción de ADN y se encontró que eran similares en un 80 %. Por tanto, en los posteriores análisis en la búsqueda de motivos y homologías a genes reportados y para el caso de LiP1 será usada la secuencia obtenida usando como material el ADNc en el análisis de la expresión.

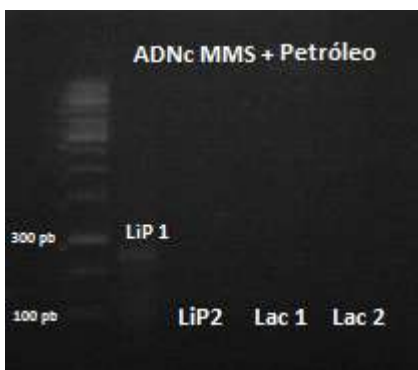


Figura 5. Evaluación de la amplificación por PCR de *S apiospermum* HDO1 en el análisis de la expresión ADNc, genes de: lacasa Lac1 de tamaño esperado de 900pb; lacasa Lac2 de tamaño esperado entre 500 y 600pb; lignina peroxidasa LiP1 con tamaño esperado de 200 a 400pb y lignina peroxidasa Lip2 con tamaño esperado de 200 pb .

Usando las secuencias de Lac2 (obtenida del ADN) y Lip1 (obtenida del ADNc) y escogiendo al azar secuencias de los genes lacasa y lignina peroxidasa alojadas en la base de datos del servidor NCBI, las secuencias fueron analizadas en MEME para buscar motivos similares entre las secuencias reportadas para el gen y la secuencia obtenida en el experimento. En el caso de la secuencia de la lacasa fue encontrado un motivo similar entre las secuencias descargadas y la secuencia obtenida en nuestra investigación que correspondiente al grupo de las oxidoreductasas (con valor p de  $1,68 \times 10^{-32}$ ). Posteriormente el motivo oxidoreductasa es analizado usando MAST pero los resultados no fueron significativos al no encontrarse relacionados con el grupo de los hongos. En el caso de las secuencias para lignina peroxidasa fue usado el mismo método y el motivo entre las secuencias obtenidas desde la base de datos NCBI y la secuencia obtenida de la investigación fue lignina peroxidasa con un valor p de  $5.88 \times 10^{-2}$ . El análisis posterior con MAST no mostro resultados concordantes con organismos del grupo de los hongos.

### Actividad enzimática del Complejo Peroxidasa

Para la evaluación de la actividad peroxidasa se uso el reactivo RBBR que por oxidación pierde su color azul característico. Dos experimentos fueron montados para la evaluación cualitativa y cuantitativa de la pérdida de coloración del medio causada por el crecimiento del hongo. Las figuras 6 y 7 muestran la pérdida de la coloración del medio sólido por el crecimiento de *Scedosporium apiospermum* HDO1 y el control positivo

*Aspergillus terreus* en los medios PDA y Kirk sólido, respectivamente. En PDA, las imágenes muestran un cambio total en la coloración del medio por parte del control positivo (Figura 6C) respecto al control negativo (Figura 6A). Para el hongo HDO1 el cambio en la coloración del medio no es tan notorio y se presenta tan solo como un manchado blanco en ciertas regiones de la caja (Figura 6B). En medio Kirk sólido se observa la misma tendencia, medios de color verde para el control positivo (Figura 7D) y pequeños halos blanquecinos para *S. apiospermum* HDO1 (Figura 7A). En ambos casos los cambios de coloración en todos los medios inoculados revelan la presencia de enzimas del grupo peroxidasas. Una prueba cuantitativa fue realizada usando medio Kirk líquido suplementado con el colorante RBBR y fue evaluada por espectrometría la pérdida de la coloración a través del tiempo con mediciones durante 16 días (Junghanns, 2006) (- Anexo 1. Tabla de Absorbancias RBBR). Los resultados de esta prueba (Figura 8 1) muestran una pérdida de la coloración de un 12,81% durante los 16 días por parte de *S. apiospermum* HDO1 en contraste con *A. terreus* 3064 que en el mismo tiempo fue capaz de degradar el color en un 46,6 %. Un 1,09 % fue el mayor porcentaje registrado en la pérdida de coloración del medio sin ser inoculado y usado como control negativo. El análisis estadístico ANOVA resultó en la validación estadística del experimento con una diferencia en los valores de las absorbancias a través del tiempo un valor P de 0.0001 a través del programa SPSS.

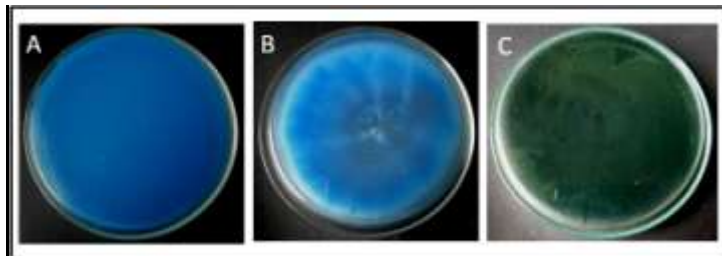


Figura 6. Fotografías del crecimiento de los hongos en medio PDA suplementado con RBBR durante 18 días. En A control negativo del medio sin inoculación. En B degradación por *Scedosporium apiospermum* HDO1 de la coloración azul, observación de manchas blancas. En C control positivo *Aspergillus terreus* cambio de azul a verde oscuro.

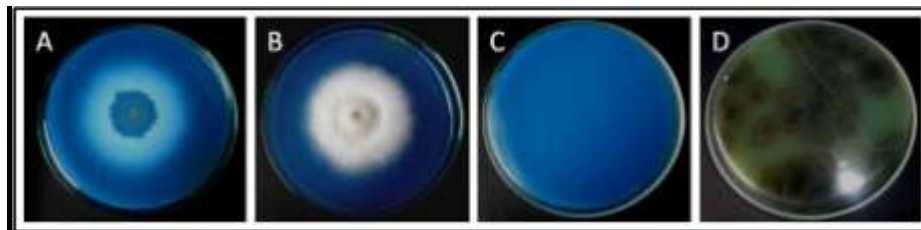


Figura 7. Fotografías del crecimiento de los hongos en medio Kirk suplementado con RBBR durante 14 días. En A envés de la colonia, halo blanco que representa la acción de peroxidasas de *Scedosporium apiospermum* HDO1 sobre el azul del medio RBBR. En B crecimiento del hongo sobre el medio. En C control negativo del medio, coloración original del medio sin inocular. En D el control positivo *Aspergillus terreus* con cambio de coloración de medio a verde claro.

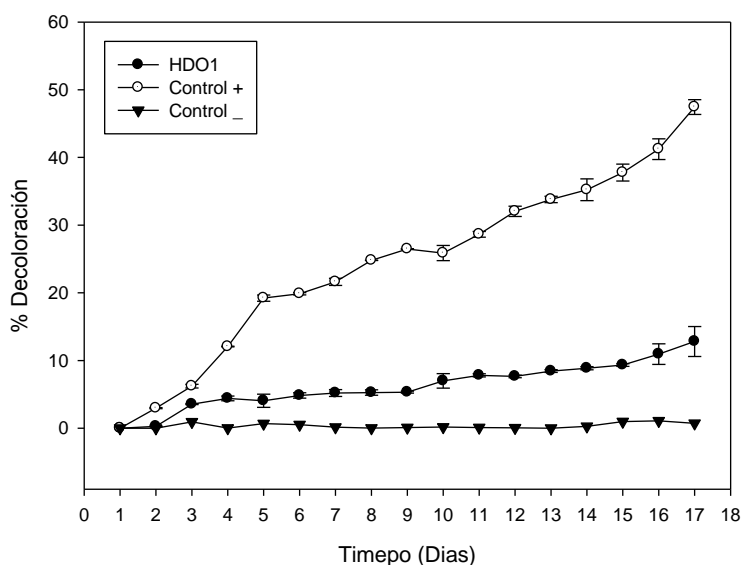


Figura 8. Porcentaje de la pérdida de la coloración dada por la oxidación del RBBR en presencia de enzimas del complejo peroxidasa. Los datos de las absorbancias a 590 y 500 nm son transformados usando la fórmula % decoloración= ((Relación para día x - Relación del Control Negativo) / Relación del Control Negativo)\*100 1.

### Actividad enzimática de Lacasas

En la actividad enzimática de la lacasa una unidad de actividad de esta enzima es la cantidad de enzima que es capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS. Si la concentración de las muestras de enzima es la apropiada, el incremento en la absorbancia durante los 5 primeros minutos debe ser exponencial (Alclade & Bulter , 2003). En el ensayo para la determinación de la actividad para esta enzima extracelular hubo una oxidación del ABTS para el control positivo desde el día 5 con un R de 0,931 y que se mantuvo durante las siguientes medidas. También mostraron que solo desde el día 25 hubo una oxidación del ABTS por las lacasas producidas por *S. apiospermum* HDO1 con un R de 0,839. Los valores de R nos permiten corroborar el incremento lineal en la oxidación del compuesto a través del tiempo para cada uno de los días evaluados (Tabla 1).

	Día	Valor R
Control +	Día 5	0,931
	Día 12	0,931
	Día 25	0,944
<i>S. apiospermum</i> HDO1	Día 5	0,745
	Día 12	0,524
	Día 25	0,839

Tabla 1. Valores R para los días 5, 12 y 25 del control positivo y *Scedosporium apiospermum* HDO1.

## DISCUSIÓN

### Hongo caracterizado

*Scedosporium apiospermum* es un hongo que ha sido investigado ampliamente en el ámbito clínico por ser un hongo oportunista que puede generar diversos cuadros clínicos en pacientes inmuno comprometidos tales como infecciones masivas y micetomas (Cortez, 2008), también están envueltos en la aparición de abscesos cerebrales (Caggiano, 2011) y en infecciones pulmonares. Este oportunismo también puede deberse en gran medida a las temperaturas óptimas de crecimiento que oscilan entre los 30 y 37 °C, pero algunos casos reportan crecimientos incluso a 45°C (Cortez, 2008) y que hacen del cuerpo un lugar propicio para su crecimiento. Los reportes en suelos son innumerables ya que el ese lugar donde primordialmente este hongo es encontrado. Los reportes de *Scedosporium apiospermum* como degradador de hidrocarburos son limitados (April et al., 1998; Makadia et al 2010); aunque estos reportes sean pocos es claro que existe la evidencia del crecimiento de *S. apiospermum* en lugares contaminados con hidrocarburos y de ahí la importancia del conocimiento de sus rutas degradación y efectivo uso en sitios con problemas ambientales tal como es usado en los trabajos de Makadia et al. 2010; April et al. 1998 y algunas investigaciones en rutas metabólicas que incluyen enzimas oxigenasas y deshidrogenasas en la degradación de hidrocarburos como en el trabajo de García-Peña y colaboradores del 2002 y de degradación de compuestos más específicos como los bifenilos policlorados (Tigini et al., 2009).

### **Enzimas Ligninolíticas**

Son varias las investigaciones en las que los hongos son incluidos como degradadores de hidrocarburos (Vasco et al, 2011), (Pozdnyakova et al., 2011), (Ghazali et al., 2004) & (Ponting, 2004) y que son encargados de la degradación de diferentes tipos de compuestos siendo la mayoría representantes de los Phylum ascomicota y basidiomicota (Princke, 2010). Los principales mecanismos de acción sobre la degradación de hidrocarburos por parte de los hongos son transformaciones enzimáticas por citocromos intracelulares y enzimas extracelulares lignolíticas (Wu, 2008) y algunos de los complejos enzimáticos inmersos en la degradación de hidrocarburos son complejos de monooxigenasas, deshidrogenasas, dihidrogenasas, peroxidadas y lacasas (García-Peña et al., 2001). Las enzimas lignolíticas inespecíficas como lignina peroxidasa, mangneso peroxidasa (Silva et al., 2008, Haritash et al., 2009) y las lacasas (Punnapayak et al., 2009) están ligadas a procesos de degradación de hidrocarburos.

### **Peroxidasas: genes y actividad**

Las peroxidadas son un grupo de enzimas que pertenecen al grupo de las oxidoreductasas y que usan el peróxido de hidrógeno para catalizar la oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos. Existen tres grupos distintos de peroxidadas: las heme-peroxidadas o lignina peroxidadas (LiP), las mangneso peroxidadas (MnP) y las peroxidadas versátiles (Wong, 2009). La acción de enzimas lignolíticas es inespecífica y por eso la versatilidad en la capacidad de reconocer y oxidar diferentes compuestos a la lignina, donde fueron por primera vez propuestas (Paszczynski & Crawford, 1995). Esta versatilidad le permite atrapar moléculas carbonadas grandes como el petróleo y desdoblarlas a metabolitos secundarios que pueden ser integrados en las cadenas metabólicas de otros microorganismos. La enzima lignina peroxidasa ha sido reportada en la degradación de fenantreno (Ting et al., 2011). Como había sido mencionado anteriormente existen otras enzimas que actúan sobre los hidrocarburos entre las que se señalan las oxigenasas y deshidrogenasas que actúan en compuestos como pireno, tolueno, etilbenceno y benceno. Son nulas las secuencias registradas para genes de actividad peroxidasa en el grupo de los ascomicetes y aunque no hay reportes que ligen este tipo de actividad exclusivamente a los basidiomicetes podría ser la razón por la cual la velocidad de la decoloración en los medios se ve disminuida. Otra razón por la que podría verse alterada la pérdida de

coloración es que quizá necesite de la presencia de más de un tipo de peroxidasa que, para nuestro hongo en particular, esta solo representada por la presencia de ligninas peroxidadas y son completamente ausentes las manganeso peroxidadas. Muchos son los factores que pueden ser relevantes en el resultado de la secuenciación usando los primers para lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa: primero, estos primers fueron diseñados con secuencias únicamente de hongos basidiomicetes y aunque busquen regiones muy conservadas como las regiones unión a los grupos heme y manganeso (Pointing, 2005) puede que quizá no sean los mismo para el grupo de los ascomicetos que aun esta sin investigar. Este mismo problema se observa al hacer el análisis usando el buscador de motivos MEME. Aunque los motivos encontrados en común con otras secuencias de lignina peroxidasa son efectivamente motivos pertenecientes a los genes buscados, el valor-e de este motivo no es altamente significativo (un valor-e no muy bajo). Estos resultados podrían deberse a que, como se menciona anteriormente, no hay secuencias en ascomicetos y las únicas secuencias en la base de datos que usa MEME como contraste pertenecen al grupo basidiomicetes y como son líneas que divergieron hace mucho tiempo los motivos pueden no ser tan conservados.

Para corroborar la veracidad de las secuencias de genes codificando esa actividad enzimática, los contrastes entre la actividad peroxidasa registrada durante 16 días para el control positivo *Aspergillus terreus* (46%) contra la acción de estas enzimas, es expresada efectivamente la actividad peroxidasa en *Scedosporium apiospermum* (12%) en notable menor medida. La aparente presencia del gen que expresa esta actividad reafirma la actividad, expresión puede estar mediada por algunas características de crecimiento que pueden ser relevantes en la pérdida de la coloración en el medio en el que es crecido el hongo. Ensayos enzimáticos en *S. apiospermum* ya habían sido reportados anteriormente (Tigini et al., 2009). En estos ensayos no hubo una actividad positiva para las peroxidadas por parte del hongo sin embargo fueron otras las pruebas usadas para la detección de esta actividad enzimática.

### **Lacasas: genes y actividad**

Las lacasas pertenecen a un grupo de oxidoreductasas que contienen núcleos multicúpricos y cataliza la reducción de oxígeno molecular por varios compuestos orgánicos y la formación final de agua sin necesidad de peróxido de hidrógeno (Wong et al. 2009). Al igual que las peroxidadas estas enzimas han sido señaladas como enzimas lignolíticas que pueden actuar sobre compuestos orgánicos e inorgánicos de varias clases. Las lacasas son algo comunes en el grupo ascomicota (Chakroun, et al. 2010) y aunque todavía no ha ningún reporte de la actividad para *S. apiospermum*, algunos hongos como *Marasmius quercophilus* (Farnet, et al. 2009), *Pseudotrametes gibbosa*, *Pleurotus ostreatus* (Gao et al. 2008) tienen no solo la capacidad de degradar hidrocarburos tales como naftaleno, fenantreno, antraceno y penzopyreno (Farnet et al. 2009) sino que esta actividad se encuentra ligada efectivamente a la actividad lacasa. A pesar de que las secuencias obtenidas no arrojaron los resultados esperados sobre este gen en específico, es importante resaltar la importancia de encontrar motivos de oxidoreductasas, grupo al que pertenecen las lacasas. Muchas oxidoreductasas han sido relacionadas con la degradación de hidrocarburos como en el caso de Yakimov y colaboradores en el 2007 en su investigación de bacterias marinas que degradan petróleo usando NADH-ferredoxin oxidoreductasa.

## CONCLUSION

La capacidad degradadora del hongo *Scedosporium apiospermum* demostrada en trabajos previos fue la base para el desarrollo de la investigación de las enzimas lignolíticas. Este hongo ha sido reportado en suelos contaminados y en varias ocasiones como un candidato para la degradación específica de los hidrocarburos. Aunque las rutas específicas de la degradación de hidrocarburos del petróleo por parte de los hongos sean aun desconocidas, la evaluación de enzimas de acción inespecíficas como los genes ligninolíticos nos permite dar una aproximación de la forma en la que estos compuestos son tomados por *S. apiospermum* y sustentan el porqué de la importancia de la inclusión de este hongo en procesos de bioremediación. En este trabajo son por primera vez reportados los genes que codifican para las actividades enzimáticas peroxidasa y lacasa para este organismo sustentados a su vez por la evaluación de las actividades ligninolíticas que fueron positivas para ambos casos además de ser el primer reporte de la presencia de peroxidasa para el grupo de los ascomicetes. Sin embargo, aunque las actividades peroxidasa y lacasa se encuentran en el hongo representado por los genes lignina peroxidasa y lacasa no son los únicos que podrían estar mediando la degradación de este tipo de compuestos.

## REFERENCIAS

**Acevedo F.**; Pizzul L.; Castillo, M.dP.; González M.E., Cea M.; Gianfreda L. & Diez, M.C. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracophyllum discolor*. *Chemosphere*, Volume 80, Issue 3, Pages 271-278.

**Alcalde, M.** & Bulter, T. (2003) . Colorimetric Assays for Screening Laccases. Methods in Molecular Biology, Volume 230, II, 193-201.

**April, T.M.**; S.P. Abbott, J.M. Foght, and R.S. Currah. (1998). Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microasceae) *Canadian Journal of Microbiology* 44: 270-278.

**Bogan, B.**; Schoenike, B.; Lamar, R.T. & Cullen, D. (1996). Manganese Peroxidase mRNA and Enzyme Activity Levels during Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil with *Phanerochaete chrysosporium* *Applied And Environmental Microbiology* p. 2381–2386.

**Bonugli-Santos R. C.**; Durranta L. R.; da Silva M.; L. Settec. (2010) Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme and Microbial Technology* 46 32–37.

**Caggiano, G.**; Cantisani P.; Rolli M.; Gianfreda, C.D.; Pizzolante, M. & Montagna M.T. (2011). The Importance of a Proper Aetiological Diagnosis in the Management of Patients with Invasive Mycoses: A Case Report of a Brain Abscess by *Scedosporium apiospermum*. *Mycopathologia* 172:317–322

**Cambria, M. T.**; Minniti, Z.; Librando, V. & Cambria, A. (2008). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Rigidoporus lignosus* and its Laccase in the Presence of Redox Mediators. *Applied Biochemistry Biotechnology* 149:1–8.

**Cebolla, A.**; Sousa, C. & de Lorenzo, V. (1997). Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading *Pseudomonas* define protein sites involved in binding of aromatic inducers. *The journal of biological chemistry*. Vol. 272, No. 7, pp 3986-3992.

**Chakroun, H.; Mechichi, T.; Martinez, M. J., Dhoub, A.&Sayadi S. (2010)** Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: Application on bioremediation of phenolic compounds. *Process Biochemistry* Volume 45, Issue 4, Pages 507-513.

**Cheong, S.;** Yeo, S.; Song, H-G.; Choi, H.(2006).Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluene and its catabolic intermediates in *Trametes versicolor*. *Microbiological Research* 161 316-320.

**Cortez, K.;** Roilides E.;Quiroz-Telles F.; Meletiadis J.; Antachopoulos, C.;Knudsen T.; Buchanan, W.; Milanovich J. (2008). Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 21, No. 1 p. 157–197.

**Das, N. & Chandran, P. (2011).** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International* Vol 2011, 1-13.

**Farnet A.M. ,** G. Gil , F. Ruaudel , A.C. Chevremont , E. FerrePolycyclic aromatic hydrocarbon transformation with laccases of a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Geoderma* 149 (2009) 267–271

**Gao, D.;**Liang H.; Du L.&Chen , J. (2009). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by white rot-fungus *Pseudotrametes gibbosa* isolated from the boreal forest in Northeast China. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9(41), pp. 6888-6893.

**García-Peña E. I.,** S. Hernández, E. Favela-Torres, R. Auria, S. Revah. 2010. Toluene Biofiltration by the Fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnology And Bioengineering*, Vol. 76, NO. 1, p. 61-67.

**Ghazali, F.,** Rahman, A. Salleh A. & Basri, M.(2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium.*International Biodeterioration & Biodegradation* 54 p. 61 – 67.

**Hamme, J., Singh, A. & Ward, O. (2003).** Recent Advances in petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 4: 503-549.



**Haritash, A.K.**, & Kaushik, C.P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review Journal of Hazardous Materials 169 1–15

**Huiju Gao**, Yanwen Wang, Wenting Zhang, Weile Wang and Zhimei Mu (2011). Isolation, identification and application in lignin degradation of an ascomycete GHJ-4. African Journal of Biotechnology Vol. 10(20), pp. 4166-4174.

**iCODEHOP** 2008. <http://dbmi-icode-01.dbmi.pitt.edu/i-codehop-context/Welcome>

**Junghanns, C.**; Krauss G.; Schlosser, Dietmar. (2008) Potential of aquatic fungi derived from diverse freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes . Bioresource Technology 99 1225–1235.

**Kirk T. K.**, E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz and J. G. Zeikus (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of microbiology Vol.117, Number 3, 277-285.

**Leahy J.** & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. Vol. 54, No.3 p. 305-315.

**Lyons J.I.**, Newell S.Y., Buchan A., & Moran M.A. (2003). Diversity of Ascomycete Laccase Gene Sequences in a Southeastern US Salt Marsh. Microbial Ecology 45:270–281.

**Makadia, T. H.**; Eric M. Adetutu,; Keryn L. Simons,; Daniel Jardine,; Petra J. Sheppard & Andrew S. Ball.(2010). Re-use of remediated soils for the bioremediation of waste oil sludge. Journal of Environmental Management 92 866-871

**Mayolo-Deloisa, K.**; Machín-Ramírez, C.; Rito-Palomares, M. & Trejo-Hernández, M. R.(2011). Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Partially Purified Laccase from Residual Compost of *Agaricus bisporus*. Chemical Engineering & Technology Volume 34, Issue 8, pages 1368–1372.

**Paszczynski, A.** & Crawford R. L.(1995). Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Prog.* 11, 368-379

**Pointing, S.;** Pelling, A.L.; Smith, G. J.; Hyde, K. & Reddy, C.A.(2005). Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences *Mycology Research* 109 (1): 115–124

**Potin, O.,** Rafin., C. & Veignie, E. (2004). Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54 (2004) 45 – 52.

**Pozdnyakova, N.;** Dubrovskaya, E. V.; Makarov O. E.; Nikitina, V. E. & Turkovskaya, O. V. (2011). Production of Ligninolytic Enzymes by White-rot Fungi during Bioremediation of Oil-contaminated Soil. *Soil Enzymology, Soil Biology* 22

**Punnapayak, H.;** PrasongsukS.; Messner, K.; Danmek, K. & Lotrakul P. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by laccase from a tropical white rot fungus *Ganoderma lucidum*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (21), pp. 5897-5900.

**Raghukumar, C. D.;** Chandramohan, F. C. & Redd C. A. (1996). Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi. *Biotechnology Letters* Volume 18, Number 1, 105-106.

**Saparrat, M.;** Balatti, P. A.; Martínez, M. J. & Jurado M. (2010). Differential regulation of laccase gene expression in *Coriolopsis rigida* LPSC No. 232. *Fungal Biology* Volume 114, Issues 11-12, Pages 999-1006

**Sietmann, R.;** Hammer, E.; Moody, J., Cerniglia, C. & Schauer, F. (2000) Hydroxylation of biphenyl by the yeast *Trichosporon mucoides*. *Arch Microbiol* 174 :353–361.

**Silva, I.S.,** Grossman, M. & Durrant, L.R. (2008). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very low oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* Vol 63, Issue 2, Pages 224-229.

**Timothy L. Bailey** and Charles Elkan. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California.

**Timothy L.** Bailey and Michael Gribskov, 1998. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches", *Bioinformatics*, 14(1):48-54.

**Tigini V.**, V. Prigione, S. Di Toro, F. Fava & G. C. Varese.(2009). Isolation and characterization of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. *Microbial Cell Factories* 2009, 8:5

**Ting W.T.E.** , S.Y. Yuan , S.D. Wu , B.V. Chang. (2011). Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 238-242

**Vasco, M.F.**; , Cepero , M.C.; Restrepo , S. & Vives-Florez, M.J. (2011). Recovery of mitosporic fungi actively growing in soils after bacterial bioremediation of oily sludge and their potential for removing recalcitrant hydrocarbons *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 pp. 649-655

**Wong, W. S.** (2009). Structure and action mechanism of ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157:174-209.

**Wu, Y.**, Teng, Y., Li, Z., Liao, X. & Luo, Y. (2008). Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry* 40 789–796.

**Yeo, S.**; Kim, M. & Choi, H. (2008). Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellos*. *FEMS Microbiology Letters*. Volume 278, Issue 1, pages 72–77.

**White, T.J.**, Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, CA. M.F. Vasco et al. / *International Biodeterioration & Biodegradation* 65 (2011) 649e655 655

## ANEXOS

**Anexo 1.** Tabla de datos de las absorbancias a 590 y 500 nm tomadas durante 16 días de muestras en medio Kirk suplementado con el colorante RBBR, la pérdida de coloración por la oxidación por parte de las enzimas peroxidadas hace que la absorbancia cambie.

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6
	590/500	590/500	590/500	590/500	590/500	590/500
HDO1-1	0,644/0,16	0,665/0,155	0,504/0,118	0,619/0,155	0,525/0,123	0,543/0,124
HDO1-2	0,575/0,141	0,721/0,168	0,49/0,115	0,567/0,136	0,522/0,128	0,506/0,129
HDO1-3	0,516/0,127	0,738/0,173	0,601/0,446	0,576/0,15	0,533/0,137	0,551/0,138
Control +	0,613/0,155	0,729/0,175	0,535/0,136	0,536/0,161	0,529/0,155	0,54/0,159
Control +	0,616/0,156	0,731/0,175	0,538/0,136	0,541/0,158	0,531/0,151	0,536/0,156
Control -	0,721/0,177	0,73/0,164	0,559/0,125	0,619/0,145	0,563/0,132	0,565/0,131
	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12
	590/500	590/500	590/500	590/500	590/500	590/500
HDO1-1	0,595/0,139	0,569/0,126	0,585/145	0,598/0,138	0,561/0,136	0,598/0,16
HDO1-2	0,542/0,124	0,542/0,131	0,58/0,144	0,56/0,126	0,54/0,128	0,56/0,143
HDO1-3	0,623/0,176	0,576/0,142	0,593/0,152	0,581/0,139	0,551/0,136	0,581/0,166
Control +	0,596/0,185	0,595/0,182	0,589/0,191	0,549/0,159	0,556/0,185	0,549/0,209
Control +	0,574/0,179	0,591/0,179	0,576/0,193	0,556/0,162	0,562/0,184	0,526/0,196
Control -	0,619/0,152	0,59/0,145	0,614/0,151	0,586/0,144	0,578/0,142	0,611/0,15
	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 16		
	590/500	590/500	590/500	590/500		
HDO1-1	0,651/0,16	0,588/0,163	0,551/0,13	0,738/0,169		
HDO1-2	0,602/0,143	0,579/0,156	0,554/0,138	0,615/0,134		
HDO1-3	0,645/0,166	0,591/0,15	0,558/0,143	0,618/0,139		
Control +	0,599/0,209	0,56/0,22	0,544/0,202	0,541/0,198		
Control +	0,572/0,212	0,568/0,219	0,566/0,2	0,538/0,2		
Control -	0,654/0,161	0,605/0,15	0,556/0,138	0,651/0,161		

Tabla 2. Actividad enzimática de las enzimas peroxidadas. Absorbancias a 500 y 590 nm de las muestras (HDO1 y control +) con sus respectivas replicas en los 16 días.

Para hallar los porcentajes es necesario encontrar la relación de las absorbancias medidas (590/500). Luego, la siguiente fórmula es usada para hallar los porcentajes de usando las relaciones halladas:

$$\% \text{ decoloración} = ((\text{Relación para día } x - \text{Relación del Control Negativo}) / \text{Relación del Control Negativo}) * 100.$$

**Anexo2.** Tabla de estadísticos para los datos de la oxidación del RBBR por parte de las peroxidases. R como coeficiente de correlación entre los datos para demostrar el cambio lineal de las absorbancias a través del tiempo.

**Resumen del modelo**

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación
1	,942*	,887	,885	1,57966

a. Variables predictoras: (Constante), VAR00002

**Anexo 3.** Tabla de datos de las absorbancias a 419 nm tomadas durante 30 días de muestras en medio Kirk suplementado con ABTS, la oxidación del ABTS por parte de las enzimas lacasa hace que varíe la absorbancia a través del tiempo para cada día de medición

	Tiempo	HDO1- 1	HDO1- 2	HDO1- 3	Control +1	Control +2
Dia 5	Tiempo 0	0,002	0,004	0,007	0,019	0,008
	Tiempo 2	0,002	0,004	0,006	0,018	0,007
	Tiempo 4	0,002	0,003	0,006	0,018	0,006
	Tiempo 6	0,001	0,003	0,006	0,017	0,006
Dia 12		HDO1- 1	HDO1- 2	HDO1- 3	Control +1	Control +2
	Tiempo 0	0,004	0,003	0,001	0,008	0,014
	Tiempo 2	0,004	0,002	0,001	0,008	0,013
	Tiempo 4	0,004	0,002	0,001	0,007	0,013
Dia 25		HDO1- 1	HDO1- 2	HDO1- 3	Control +1	Control +2
	Tiempo 0	0,003	0,014	0,014	0,011	0,008
	Tiempo 2	0,003	0,014	0,013	0,01	0,007
	Tiempo 4	0,002	0,013	0,012	0,01	0,006
	Tiempo 6	0,002	0,012	0,012	0,009	0,006

Tabla 3. Actividad enzimática de la lacasa. Absorbancia a 419 nm de las muestras (HDO1 y Control +) y sus respectivas replicas.

**1. IDENTIFICACIÓN AUTOR(ES) DEL TRABAJO DE GRADO**

CÓDIGO	DOCUMENTO DE IDENTIDAD		APELLIDOS	NOMBRES	CORREO ELECTRÓNICO
	TIPO	NÚMERO			
200920699	CC	53107051	OROZCO MARTINEZ	MARIA CAMILA	mc.orozco162@uniandes.
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				
	CC				

PROGRAMA	Maestría	<b>ENTREGÓ FORMATO.</b> <input checked="" type="checkbox"/> SB-10 "Entrega trabajo de grado y autorización de uso a favor de la Universidad de los Andes". Documento con el cual el autor permite que su trabajo sea utilizado por la Universidad, para fines de consulta y de mención en sus catálogos bibliográficos, tanto físicos como en línea
FACULTAD	Facultad de Ciencias	
DEPARTAMENTO	Departamento de Ciencias Biológicas	

**1.1 IDENTIFICACIÓN DE TRABAJO DE GRADO PARA DOBLE TITULACIÓN**

PROGRAMA	No Aplica	<b>TESIS PARA DOBLE TITULACIÓN</b> <input type="checkbox"/> Si el trabajo de grado presentado aplica para obtener dos (2) titulaciones, por favor marque esta casilla y diligencie la información de esta sección
FACULTAD	No Aplica	
DEPARTAMENTO	No Aplica	

**2. INFORMACIÓN GENERAL DEL TRABAJO DE GRADO****TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO**

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNINOLÍTICA EN EL PATÓGENO OPORTUNISTA *Scedosporium apiospermum* IMPLICADA EN LA DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

**DESCRIPCIÓN FÍSICA**

Número de páginas: 28  
 Ilustraciones: 8

**MATERIAL ACOMPAÑANTE (Cantidad):**

Cassetes Audio:  Discos compactos:   
 Cassetes Video:  Diapositivas:   
 Disquetes:  Otros: ¿Cuáles?

**FECHA DE ELABORACIÓN**

DD	MM	AAAA
28	01	2013

**\*RESUMEN DEL TRABAJO DE GRADO**

Los hidrocarburos son compuestos ampliamente usados como generadores de energía en forma de combustible. Debido a su continua explotación, se ha incrementado la contaminación generada por la acumulación de algunos de sus derivados en diversos ecosistemas, principalmente en aguas y suelos. El Centro de Investigaciones Microbiológicas- CIMIC de la Universidad de los Andes y su grupo de Microbiología Ambiental y Bioprospección, ha desarrollado varios trabajos en descontaminación de suelos y aguas contaminados con hidrocarburos usando microorganismos. La actividad microbiana juega un papel importante en la degradación de los hidrocarburos. En los últimos años se ha hecho evidente la importancia de la participación de los hongos en los consorcios para biorremediación y en general se acepta la idea de que las fracciones más complejas y pesadas de los hidrocarburos serán metabolizadas por los hongos y fraccionadas en moléculas más simples, que a su vez serán degradadas por bacterias. Uno de los grupos enzimáticos que ha sido relacionado en la degradación de las fracciones más complejas de los hidrocarburos es el grupo de las enzimas inespecíficas ligninolíticas conformado por las peroxidasa y las lacasa. En el desarrollo de esta investigación será utilizado como organismo un hongo que denominaremos HD01 y que fue encontrado como contaminante en repetidas ocasiones en ensayos de degradación de petróleo. En el presente trabajo se realizó la identificación del hongo y la evaluación de la presencia de los complejos enzimáticos inespecíficos peroxidasa y lacasa probablemente involucrados en el proceso de degradación de hidrocarburos.

**OBJETIVOS DEL TRABAJO DE GRADO**

Descripción características morfológicas relevantes e identificación el hongo HD01 a partir de métodos moleculares  
 Evaluación de los genes Lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa asociados a inespecíficas rutas de degradación  
 Determinación de las actividades enzimáticas de la peroxidasa y lacasa del hongo HD01 crecido en medio mínimo de sales

#### METODOLOGÍA DEL TRABAJO DE GRADO

En la caracterización del hongo HD01 se realizó la descripción macroscópica y microscópica de la colonia. Se realizó amplificación con los primer ITS4 e ITS 5 para obtener la identificación molecular del hongo. La presencia de los genes lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lac) fue evaluada a través de la búsqueda de las secuencias correspondientes a los genes LiP, MnP y Lac en el hongo crecido en medio mínimo de sales usando glucosa como fuente de carbono.

Para la evaluación de la expresión de los genes lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y Lacasa (Lac) por el hongo HD01, el microorganismo fue crecido durante tres semanas en medio mínimo de sales y usando como fuentes de carbono glucosa (como control) y petróleo al 1%. Luego, se realizó la extracción de RNA se generaron cadenas de cDNA y sobre este material fue evaluada la presencia de los genes Lip, Mnp y Lac

Para la evaluación de la actividad enzimática de las lacasas se evaluó la producción de enzimas extracelulares que son capaces de oxidar el reactivo ABTS (2,2'azino-bis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) 20mM Para la evaluación de la actividad enzimática del grupo peroxidasa las muestras fueron crecidas en medio Kirk sólido, PDÁ y medio Kirk líquido suplementado con el colorante RBBR (Remazol Brilliant Blue R) y fue evaluada la pérdida de coloración a través del tiempo

#### CONCLUSIONES DEL TRABAJO DE GRADO

La evaluación de enzimas de acción inespecíficas como los genes ligninolíticos nos permitió dar una aproximación de la forma en la que los hidrocarburos son usados por *S. apiospermum*. Fueron por primera vez encontrados los genes que codifican para las actividades de los grupos enzimáticos inespecíficos peroxidasa y lacasa. Este trabajo reporta por primera vez la presencia del gen lignina peroxidasa en el grupo de los ascomycetes. La presencia de estos genes fue sustentada con la positiva actividad enzimática encontrada para cada gen.

#### \*PALABRAS CLAVES (TEMAS) DEL TRABAJO DE GRADO

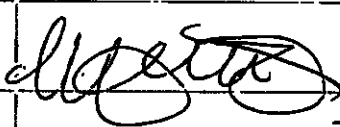
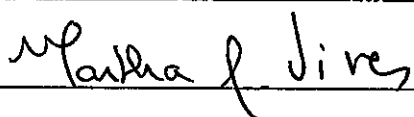

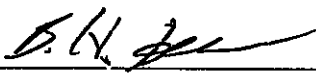

*Scedosporium apiospermum*, actividad ligninolítica, peroxidasas, lacasas, degradación de hidrocarburos

#### ACUERDOS DE CONFIDENCIALIDAD NO TIENE ACUERDO(S) TIENE ACUERDO(S)

Si selecciona tener acuerdo de confidencialidad, por favor diligencie el siguiente cuadro.

Persona natural o jurídica	Desde			Hasta		
	DD	MM	AAAA	DD	MM	AAAA

## 3. FIRMAS

AUTORES (Nombre completo)	*FIRMAS
María Camila Orozco Martínez	
DIRECTORES / ASESORES (Nombre completo)	*FIRMAS
Martha J. Jives Flores	
 Departamento de Ciencias Biológicas SECRETARIA	
JURADO / LECTOR (Nombre completo)	*FIRMAS
Barbara H. Zimmerman	
 Departamento de Ciencias Biológicas SECRETARIA	

Las firmas de Autor y Director/Asesor son obligatorias. Si tiene inconvenientes con el registro de la firma del Jurado/Lector, deberá tramitar ante la respectiva Facultad la autorización para registrar las firmas de pares o un sello que justifique la ausencia de la firma faltante.

SB-09

[Verificar información](#)
[Imprimir](#)



**ENTREGA EJEMPLAR TRABAJO DE GRADO Y AUTORIZACIÓN DE SU USO A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

Yo  , mayor de edad, vecino de Bogotá D.C., identificado con la Cédula de Ciudadanía N°  de  , actuando en nombre propio, en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado:

**Caracterización de la actividad ligninolítica en el patógeno oportunista *Scedosporium apiospermum* implicada en la degradación de hidrocarburos del petróleo**

, hago entrega del ejemplar respectivo y de sus anexos del ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a LA UNIVERSIDAD DE LOS ANDES, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, utilice y esu en todas sus formas, los derechos patrimoniales de reproducción, comunicación pública, transformación y distribución (alquiler, préstamo público e importación) que me corresponden como creador de la obra objeto del presente documento.

PARÁGRAFO: La presente autorización se hace extensiva no sólo a las facultades y derechos de uso sobre la obra en formato o soporte material, sino también para formato virtual, electrónico, digital, óptico, usos en red, internet, extranet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

EL AUTOR - ESTUDIANTES, manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y la realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros, por lo tanto la obra es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre la misma.

PARÁGRAFO: En caso de presentarse cualquier reclamación o por acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, EL ESTUDIANTE - AUTOR, asumirá toda la responsabilidad, y saldrá de defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor, en Bogotá D.C.,

a los   días del mes de  de Dos Mil

**EL AUTOR - ESTUDIANTE.**

(Firma)



Nombre

Cédula

de

SB-10