



**UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM**

Facultad de Ciencias de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

**Hongos aislados de muestras de asfalto de la cantera de Pungarayacu, Provincia de Napo, Ecuador: un acercamiento *in silico* a su potencial hidrocarbonoclástico y biotecnológico.**

Melanie Ashley Ochoa Ocampo

18 de marzo de 2021, ciudad de Tena, Napo

## **Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad**

Tena, 18 de marzo de 2021

Yo, Melanie Ashley Ochoa Ocampo con documento de identidad N° 2300049125, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título **(Denominación del título según el Art. 22 del Reglamento de Titulación)** son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente

Firma:

---

**Melanie Ashley Ochoa Ocampo**

## Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: **“Hongos aislados de muestras de asfalto de la cantera de Pungarayacu, Provincia de Napo, Ecuador: un acercamiento *in silico* a su potencial hidrocarbonoclástico y biotecnológico.”** en la modalidad de: proyecto de investigación en formato tesis, fue realizado por: Melanie Ashley Ochoa Ocampo bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 18 de marzo de 2021

Firma

.....

Ph.D.Leopoldo Antonio Naranjo Briceño,

C.I: 1758579294

## **Agradecimientos.**

Agradezco profundamente a mi madre y mejor amiga, Guadalupe Ochoa por ser mi apoyo incondicional. Por ser una mujer luchadora que bajo su ejemplo al criarme sola me ha mostrado que cualquier obstáculo se puede superar con trabajo duro y honesto. Su amor y constante motivación desde muy pequeña han sido mi motor para trabajar por la excelencia.

Agradezco a mi segunda madre, Elena Ocampo quien dedicó toda su vida a criarme para permitir que mi mamá trabaje para pagar mis estudios. No encuentro palabras que puedan expresar todo el amor y gratitud que tengo hacia ellas, pues son los pilares de mi vida.

Agradezco a cada uno de mis familiares que nos apoyaron en momentos duros y permitieron que yo me mude a otra ciudad para estudiar en Ikiam y cumplir mis metas. Sobre todo, a mi tío Froilán Ochoa quien siempre ha estado para nosotras brindándonos su apoyo incondicional.

Por último, agradezco a cada uno de mis amigos, quienes compartieron conmigo todos los altos y bajos que conlleva la vida universitaria

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi tutor, Leopoldo Naranjo Briceño, por ser un guía y amigo excepcional. La dedicación y pasión que tiene por sus investigaciones es una inspiración constante para mí. Estaré siempre agradecida con su disponibilidad en cualquier momento para ayudarme con consejos tanto personales como académicos. Sin duda ese constante apoyo fue una pieza clave para que este proyecto continúe a pesar de los obstáculos que se nos presentaron en el 2020. Dándome una lección importante sobre la resiliencia y la reinención que todo investigador necesita.

Por último, dedico esta investigación a cada una de las técnicas de laboratorio que con mucha paciencia me enseñaron todo lo que involucra trabajar en laboratorios de investigación. Mis sinceros agradecimientos a Katherine Apunte, Sonia Sislema, Andrea Carrera y Susana Araujo. Pues sin su gran apoyo y voto de confianza este trabajo no hubiera sido posible de finalizar.

# ÍNDICE GENERAL

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad .....	II
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular .....	III
Agradecimientos. ....	IV
Dedicatoria .....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.1.1 El petróleo .....	1
1.1.2 Impacto ambiental de la industria petrolera .....	7
1.1.3 Tecnologías de remediación para suelos contaminados con petróleo .....	9
1.1.4 Hongos extremófilos hidrocarbonoclasticos como una alternativa viable para la micorremediación de crudos pesado y extra pesados .....	18
1.1.5 Principales complejos enzimáticos de origen fúngico asociados a procesos de micorremediación. ....	23
1.2 Planteamiento del problema .....	37
1.3 Justificación .....	38
1.4 Objetivos .....	39
1.4.1 Objetivo General .....	39
1.4.2 Objetivos específicos .....	39
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO.....	40
2.1 Aislamiento de hongos de muestras de asfalto provenientes de la cantera de Pungarayacu. ....	40
2.1.1 Sitio de muestreo y georreferencia. ....	40

2.1.2 Extracción de asfaltenos .....	41
2.1.3 Aislamiento de hongos a partir de muestras de asfalto .....	42
2.2 Identificación molecular de hongos aislados en la cantera de Pungarayacu .....	42
2.2.1 Extracción de ADN genómico.....	42
2.2.2 Amplificación de la región ITS.....	44
2.2.4 Construcción de árboles filogenéticos.....	44
2.3 Caracterización funcional de genes y proteínas asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas) .....	45
2.3.1 Análisis del potencial biotecnológico de las cepas aisladas.....	45
2.3.2 Identificación y selección de proteínas asociadas a procesos de micorremediación .....	45
2.3.3 Caracterización in silico de las lacasas hipotéticas.....	46
2.3.4 Construcción de árboles filogenéticos.....	46
2.3.5 Búsqueda de dominios y patrones asociados a lacasas .....	47
2.3.6 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de las lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	47
2.3.7 Caracterización in silico y análisis filogenéticos de las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	48
2.3.8 Búsqueda de dominios y patrones asociados a peroxigenasas aromáticas .....	48
2.3.9 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas peroxigenasas aromáticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	48
2.4 Identificación de los genes que codifican para las lacasas y peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	49
CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS .....	50
3.1 Aislamiento e identificación molecular de hongos aislados de la cantera de Pungarayacu ....	50
3.2 Caracterización de genes y proteínas asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas) .....	55
3.2.1 Caracterización in silico de las lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	55
3.2.2 Búsqueda de dominios y patrones asociados a lacasas .....	58
3.2.3 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas lacasas de <i>C. hoffmannii</i> .....	64
3.3 Caracterización in silico y análisis filogenéticos de las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	67
3.3.1 Búsqueda de dominios y patrones asociados a peroxigenasas aromáticas .....	69
3.3.2 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas peroxigenasas	

aromáticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	73
3.4 Identificación de los genes que codifican para lasproteínas lacasas y peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. Hoffmannii</i> .....	77
<b>CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>81</b>
4.1 Aislamiento e identificación molecular de hongos aislados de la cantera de Pungarayacu.....	81
4.2 Caracterización de genes y proteínas asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas).....	86
4.2.1 Caracterización in silico de las lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	86
4.2.2 Búsqueda de dominios y patrones asociados a lacasas.....	88
4.2.3 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas lacasas .....	91
4.2.4 Caracterización in silico y análisis filogenéticos de las peroxigenasasaromáticas hipotéticas .....	92
4.2.5 Búsqueda de dominios y patrones asociados a peroxigenasas aromáticas .....	93
4.2.6 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticasperoxigenasas aromáticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	95
4.3 Identificación de los genes que codifican para las proteínas lacasas y peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. Hoffmannii</i> .....	96
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>98</b>
5.1 <i>Conclusiones</i> .....	98
5.2 <i>Recomendaciones</i> .....	99
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>100</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>117</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción de la composición del petróleo.....	5
Tabla 2. Resumen de las principales técnicas asociadas a cada tipo de tratamiento .....	11
Tabla 3. Principales ventajas y desventajas de cada tipo de tratamiento .....	12
Tabla 4. Ventajas de emplear bacterias y hongos en procesos de biorremediación .....	14
Tabla 5. Bacterias empleadas en estudios de biorremediación de petróleo. ....	15
Tabla 6. Resumen de géneros de hongos aislados de distintas muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos.....	17
Tabla 7. Diversidad fúngica asociada a fuentes de asfalto natural.....	20
Tabla 8. Resultados reportados sobre hongos capaces de transformar o mineralizar asfaltenos.....	22
Tabla 9. Resumen de las principales reacciones asociadas al SEDL. ....	25
Tabla 10. Peroxigenasas aromáticas purificadas y caracterizadas.....	29
Tabla 11. Identificación por homología de las cepas aislada con base en la información disponible en NCBI.....	53
Tabla 12. Potencial biotecnológico de las cepas aisladas. ....	54
Tabla 13. Características de lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> . ....	56
Tabla 15. Búsqueda de dominios multicobre oxidasa en lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> . ....	61
Tabla 16. Evaluación de la similitud topológica entra las estructuras de las lacasas de <i>C. hoffmannii</i> y <i>T. versicolor</i> . ....	67
Tabla 17. Características de peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> . ....	67
Tabla 18. Predicción de puentes disulfuro en las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	68
Tabla 19. Resultados de la búsqueda de dominios proteicos en POAs de <i>C. hoffmannii</i> con la base de datos de Pfam. ....	71
Tabla 20. Evaluación de la similitud topológica entra las estructuras de las POAs hipotéticas de <i>C.</i>	

<i>hoffmannii</i> con la enzima de <i>A. aegerita</i> y <i>Leptoxylum fumago</i> . .....	77
Tabla 21. Características de los genes que codifican las lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .....	78
Tabla 22. Características de los genes que codifican POAs hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> . .....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción de la composición del petróleo.....	1
Figura 2. Resumen de la clasificación del petróleo según su fracción SARA.....	2
Figura 3. Representación de los dos puntos de vista sobre la estructura molecular de los asfaltenos. a) “modelo isla” y b) “modelo archipiélago” .....	4
Figura 5. Clasificación de las tecnologías de remediación .....	10
Figura 6. Mecanismos fúngicos enzimáticos para la transformación de contaminantes recalcitrantes.....	16
Figura 7. Comparación de las dos estructuras hipotéticas de asfaltenos y la de lignina; a) “modelo isla”, b) “modelo archipiélago”, c) – d) lignina.....	25
Figura 8. Ciclo catalítico de las enzimas cloroperoxidasas.....	27
Figura 9. Reacciones catalizadas por la enzima AaeAPO .....	31
Figura 10. Ciclo catalítico de la enzima manganeso peroxidasa .....	32
Figura 11. Representación de los centros de cobre presentes en enzimas lacasas fúngicas .....	35
Figura 12. Referencia Geoespacial de la Cantera de Pungarayacu .....	40
Figura 13. Puntos de muestreo localizados en la Cantera de Pungarayacu. ....	41
Figura 14. Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias de la región ITS.....	52
Figura 15. Árbol filogenético generado con secuencias de aminoácidos de distintas oxidasas multicobre. ....	60
Figura 16. Búsqueda de motivos conservados presentes en lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> . .....	63

Figura 17. Logotipo de las secuencias firmas de lacasas (L1-L2-L3-L4) proveniente del alineamiento múltiple de lacasas hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> .	64
Figura 18. Comparación de estructura de proteínas tridimensionales y sitio activo	66
Figura 19. Árbol filogenético con secuencias de aminoácidos de distintas peroxigenasas aromáticas, cloroperoxidasas y proteínas del citocromo P450. s.	70
Figura 20. Alineación múltiple de POAs hipotéticas de <i>C. hoffmannii</i> con secuencias de consenso.	72
Figura 21. Estructura tridimensional de las POAs de <i>C. hoffmannii</i> .	74
Figura 22. Solapamiento de la estructura tridimensional de la POAs hipotética con la POA modelo de <i>Agrocybe aegerita</i>	76
Figura 23. Distribución de exones e intrones en el gen que codifica a la lacasa hipotética Lac3 (AUS45857.1) de <i>C. hoffmannii</i> .	79

## ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla 23. Lista de herramientas bioinformáticas empleados para la caracterización molecular de las hipotéticas lacasas y peroxigenasas aromáticas.	117
Tabla 24. Listado de proteínas reportadas para <i>Coniochaeta hoffmannii</i> en la base de datos NCBI.	119
Tabla 25. Criterios empleados para la selección de posible función lacasa en proteínas de <i>Coniochaeta hoffmannii</i> .	121
Tabla 26. Patrones de motivos específicos de sub-subfamilias y sub-superfamilias de POAs	122
Figura 24. Validación del modelo tridimensional correspondiente a la enzima Lac3.	123
Figura 25. Validación del modelo tridimensional correspondiente a la enzima POA1.	124
Figura 26. Validación del modelo tridimensional correspondiente a la enzima POA2.	125

## RESUMEN

Los hongos presentan un gran potencial estructural, fisiológico y enzimático que los convierte en organismos promisorios para ser empleados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo no convencionales, tales como los que se encuentran depositados en la Amazonía ecuatoriana. Debido a que existen pocas investigaciones sobre procesos de biotransformación y/o mineralización microbiológica de asfaltenos, así como a los continuos derrames de crudos recalcitrantes en esta región megadiversa del planeta tierra con alto impacto socio ambiental, el presente estudio tuvo como objetivo aislar y caracterizar hongos cultivables con alto potencial hidrocarbonoclástico provenientes de muestras de asfalto aflorante de la cantera de Pungarayacu en la Provincia de Napo, Ecuador. Se aislaron e identificaron molecularmente 6 cepas fúngicas mediante amplificación por PCR y secuenciación de la región ITS2 pertenecientes a los siguientes géneros y especies: *Fusarium croci*, *Coniochaeta hoffmannii*, *Xenoacremonium falcatum*, *Trichoderma yunnanense*, *Penicillium amphiboloria* y *Neocosmospora rubicola*. Una vez identificadas las cepas aisladas, se procedió a realizar un estudio de minería de genomas (Genome Mining) para identificar posibles genes y proteínas asociados a procesos de biorremediación en el genoma del hongo levaduriforme *Coniochaeta hoffmannii*, centrandos los estudios en lacasas y peroxigenasas aromáticas. Los resultados mostraron que las enzimas hipotéticas Lac3, POA1 y POA2 poseen características esenciales para ser consideradas como catalizadores biológicos en procesos de micoremediación ambiental. Los resultados proporcionados en el presente estudio brindan una base sólida para continuar explorando el potencial de cepas de hongos aislados de afloramientos naturales de asfalto en la Amazonía ecuatoriana para la biorremediación de desechos petrolizados y la restauración de ecosistemas impactados

## ABSTRACT

Fungi have great morphological, physiological, and enzymatic potential that makes them promising organisms to be used in bioremediation processes of unconventional hydrocarbon contaminated soils, such as those found in the Ecuadorian Amazon. Because there is little research on biotransformation and/or microbiological mineralization of asphaltenes, as well as the continuous spills of recalcitrant crude oils in this mega-diverse region of planet earth with high socio-environmental impact. The present study aimed to isolate and characterize cultivable fungi with high hydrocarbonoclastic potential from asphalt samples from the Pungarayacu pit in the Napo Province, Ecuador. In total 6 fungal strains, were isolated and molecularly identified by PCR amplification and sequencing of the ITS2 region belonging to the following genera and species: *Fusarium croci*, *Coniochaeta hoffmannii*, *Xenoacremonium falcatum*, *Trichoderma yunnanense*, *Penicillium amphiboloria* and, *Neocosmospora rubicola*. Once the isolated strains had been identified, a Genome Mining study was carried out to identify possible genes and proteins associated with bioremediation processes in the yeast fungus genome *Coniochaeta hoffmannii* focusing the studies on laccase and aromatic peroxygenases. The results showed that the hypothetical enzymes Lac3, POA1, and POA2 possess essential characteristics to be considered as biological catalysts in environmental mycoremediation processes. The results showed in the present study provide a solid foundation to continue exploring the potential of indigenous fungal strains isolated from natural asphalt outcrops in the Ecuadorian Amazon for the bioremediation of oil-polluted soils and the restoration of impacted natural ecosystems.

# CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 El petróleo

#### 1.1.1.1 Características

El petróleo se encuentra entre los recursos naturales con mayor importancia en el mundo, tanto así que en muchos países es conocido como el “oro negro” [1]. Etimológicamente, la palabra petróleo proviene de <petro> que significa roca y <oleum>aceite; y en conjunto, aceite de roca. El petróleo es una fuente de energía no renovable destacada por ser un líquido viscoso, inflamable y espeso que se produce naturalmente en depósitos bajo la superficie de la tierra. Además, se caracteriza por contener cantidades variables de compuestos gaseosos, líquidos y sólidos con heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre, así como cantidades mínimas de constituyentes metálicos donde sus concentraciones dependen del lugar y condiciones de formación (Figura 1) [2,3]

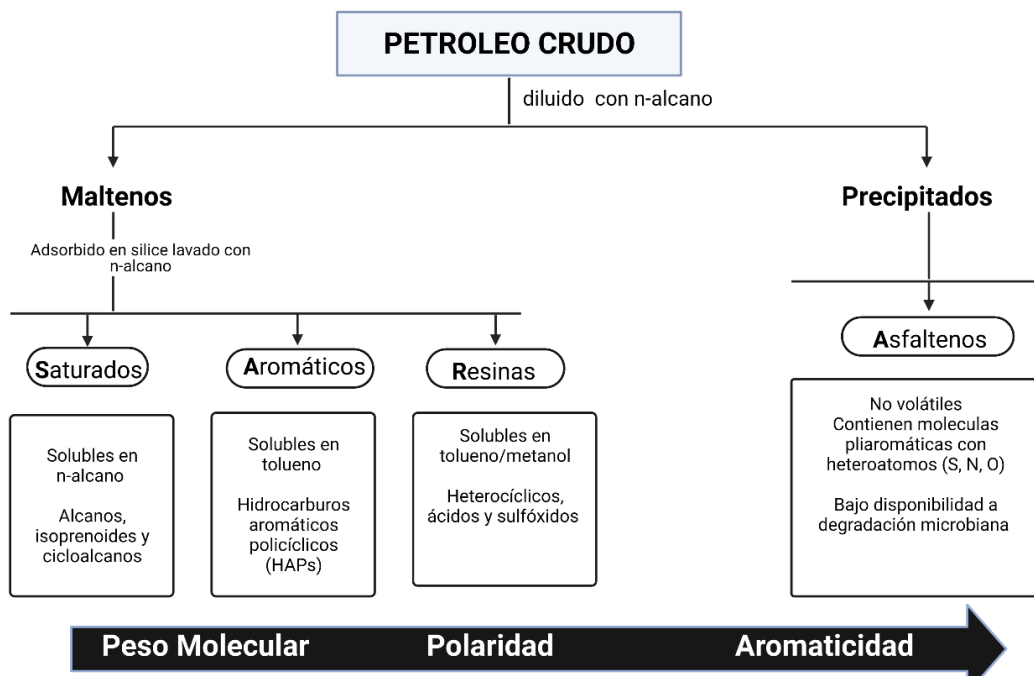


**Figura 1.** Descripción de la composición del petróleo. [2,4]. El petróleo posee una composición muy variada representada en su mayoría por hidrocarburos de cadenas cortas y largas, compuestos con heteroátomos y moléculas muy complejas que no poseen estructuras moleculares definidas, como es el caso de los asfaltenos.

Esta variabilidad de compuestos presentes en el petróleo hace que sea un recurso con propiedades físicas y químicas muy diversas. En cuanto a su color, este varía según la luz: mientras más pesados sea el petróleo, el color que refleja tiende a ser más oscuro, lo que, a su vez, se relaciona con la cantidad de material asfáltico que presenta. El olor del petróleo depende de igual forma de su composición y se puede clasificar como crudos dulces cuando contiene bajas concentraciones de sulfuro de hidrógeno o dióxido de carbono y cuando está a altas concentraciones, estos se clasifican como crudos agrios [1,3].

### 1.1.1.2 Clasificación

Existen varios criterios para la clasificación del petróleo, uno de esos es de acuerdo a su composición SARA (Figura 2). El cual consiste en separar al petróleo en 4 fracciones que están representadas por sus siglas: **Saturados**, **Aromáticos**, **Resinas** y **Asfaltenos**. Se debe mencionar que según la proporción de estas fracciones en la mezcla, la viscosidad y densidad se verán afectada [1,2].



**Figura 2.** Resumen de la clasificación del petróleo según su fracción SARA [1–3]. El petróleo puede separarse en cuatro grandes fracciones de acuerdo a su solubilidad, siendo la única fracción sólida la de los

asfaltenos. Como indica la flecha inferior en negro, esta fracción se caracteriza por tener un alto peso molecular, polaridad y aromaticidad, los cuales dificultan su biodisponibilidad para la degradación mediada por microorganismos.

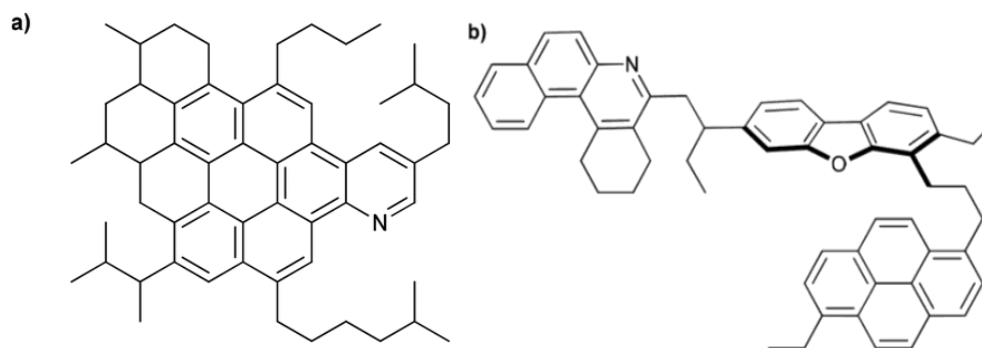
La fracción de saturados está constituida por hidrocarburos con enlaces simples que se clasifican según su estructura química: alcanos, isoprenoides y cicloalcanos. Los alcanos poseen una fórmula general  $C_nH_{2n+2}$ ; donde n puede ir de 1 hasta 60. Los alcanos son considerados como los componentes con mayor valor agregado del petróleo. Se ha descrito que la degradación de la fracción de saturados por hongos ocurre principalmente en alcanos lineales (n-alcanos), seguido por los alcanos de mayor peso molecular y luego los ramificados [5].

La fracción de aromáticos está conformada por uno o varios anillos de seis átomos de carbono donde el compuesto base es el benceno [1]. Muchos de estos compuestos forman series homólogas de hidrocarburos aromáticos conocidos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que consisten en dos o más anillos de benceno fusionados y disponibles en diferentes arreglos moleculares. Cabe destacar, que muchos de los HAPs son resistentes a las diferentes técnicas convencionales de biodegradación, por lo que pueden presentarse en altas concentraciones en el suelo, a tal punto que llegan a ser tóxicos tanto para el ambiente como para la salud humana. En cuanto a su biodisponibilidad, la tasa de degradación microbiana es inversamente proporcional al número de anillos de benceno en la molécula [1], lo que implica que a mayor complejidad estructural exista menos microorganismos capaces de transformar o degradar estas fracciones. Por esta razón, los esfuerzos actuales van enfocados en la búsqueda de microorganismos capaces de tolerar y degradar estos compuestos con fines de saneamiento ambiental [5].

La fracción de resinas se compone por moléculas complejas conformadas por compuestos heterocíclicos, ácidos y sulfóxidos que junto con los asfaltenos, constituyen las fracciones más abundantes en el crudo no convencional [3]. La fracción de asfaltenos involucra compuestos no volátiles con moléculas poliaromáticas que contienen heteroátomos (S, N, O) y metales pesados como vanadio y níquel. En cuanto a su estructura, existen dos teorías de la distribución molecular de los asfaltenos [6] (Figura 3): a) la estructura con un núcleo poliaromático rodeado de cadena



alifáticas conocido como modelo “isla” y b) el modelo “archipiélago” donde se representa como varios grupos aromáticos interconectados por puentes alifáticos o polares [7]. Esta complejidad estructural provoca una resistencia en la biodegradación de asfaltenos, lo que resulta en la acumulación de estos compuestos en ecosistemas contaminados con derrames de petróleo pesado y extra pesado, implicando grandes riesgos para la naturaleza y la salud humana [8].



**Figura 3.** Representación de los dos puntos de vista sobre la estructura molecular de los asfaltenos. a) “modelo isla” y b) “modelo archipiélago” [7].

Es importante mencionar que los asfaltenos presentan una tendencia a formar agregados que provocan una alta viscosidad [6], que para aceites pesado y extra pesados pueden variar de 20 cP (centipoise) a más de 1,000000 cP [9]. Debido a esta alta viscosidad, el transporte del crudo no convencional y el taponamiento de los equipos se han convertido en un problema constante para la industria hidrocarburífera, considerando a los asfaltenos como la fracción menos deseable desde el punto de vista productivo.

En cuanto a la eficiencia en procesos de biorremediación de asfaltenos, dada a la complejidad estructural que tiene estos compuestos se encuentran poco biodisponibles a la degradación microbiana [5]. Por ende, es necesario realizar más estudios sobre rutas catabólicas implicadas en

procesos de transformación y/o eliminación de asfaltenos en comparación con otras fracciones de petróleo [10].

En términos generales, el crudo no convencional corresponde a aquellos aceites que requieren de nuevas técnicas de obtención, producción y tratamiento. De manera general, el crudo se clasifica en: petróleo pesado, extra pesado, arena de petróleo (betún) y petróleo de esquisto bituminoso (querógeno) (Tabla 1). En este caso se prestará especial atención al petróleo extra pesado y pesado, ya que se estima que constituyen el 70% de las reservas mundiales de petróleo [11]. Además, se ha identificado que una de las principales dificultades que actualmente afronta la industria petrolera es el agotamiento de los yacimientos de petróleo convencional, presentándose un declive en su producción global [11]. Esto ha provocado que la dinámica cambie y se termine la era del petróleo relativamente homogéneo y de fácil acceso. Por lo que las nuevas tendencias apuntan a la explotación de yacimientos de crudo no convencional que se encuentran principalmente distribuidos en Norteamérica, Europa del Este, Eurasia y América Latina [11].

**Tabla 1.** Clasificación del petróleo según su gravedad °API [1,2,7].

Crudo	Escala °API	Densidad	Descripción
Extrapesado	<10°	1,00 g/cm <sup>3</sup>	Baja fluidez. Dificultad en su transporte y extracción.
Pesado	10-21,9°	1,00 – 0,92 g/cm <sup>3</sup>	Ideal para combustibles y derivados. Dificultad en su extracción.

			Ideal para combustibles y derivados.
Mediano	22-29,9°	0,92 – 0,87 g/cm <sup>3</sup>	Fácil extracción y transporte.
			Ideal para combustibles y derivados.
Ligero	30-40°	0,87 – 0,83 g/cm <sup>3</sup>	Fácil extracción y transporte.

---

### *1.1.2 Impacto ambiental de la industria petrolera*

Uno de las problemáticas más grandes que se afronta a nivel mundial es la prevención y el control de los impactos generados por la actividad petrolera. Pues muchos pasivos ambientales asociados a esta industria están siendo liberados directamente al ambiente, afectando así, a la flora, fauna, composición de comunidades microbianas autóctonas y salud de las personas que habitan en zonas aledañas a yacimientos petroleros [12].

Los principales contaminantes asociados a la industria petrolera son: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos orgánicos volátiles, metales y metaloides, los cuales son generados en distintas etapas de producción y refinación del petróleo [13,14]. En el caso de suelos contaminados con petróleo, los HAPs de alto peso molecula son los contaminantes más recurrentes; los cuales, según las circunstancias y el modo de exposición, pueden involucrar efectos tóxicos, genotóxicos, inmunotóxicos o actuar como agentes de alteración hormonal. Además de que los HAPs de alto peso molecular son mucho más persistentes en el medio ambiente que los de bajo peso molecular, considerándolos así como compuestos que necesitan de un mayor control ambiental [15–17].

#### *1.1.2.1 Impacto de la explotación petrolera en la Amazonía ecuatoriana*

El aprovechamiento del petróleo en Ecuador se remonta al año 1911, cuando empezó a posicionarse como un país exportador de crudo liviano de entre 30-40 °API, extraídos de alrededor de 1300 pozos disponibles en la península de Santa Elena [18]. Desde ese entonces y hasta la actualidad la exportación de petróleo es la principal fuente de divisas en el Ecuador.

Actualmente gran parte de los yacimientos petroleros en Ecuador se encuentran situados en la región Amazónica, el cual se caracteriza por ser el territorio con mayor biodiversidad en relación a su superficie del mundo [19]. En esta región se localiza una gran cantidad de áreas protegidas

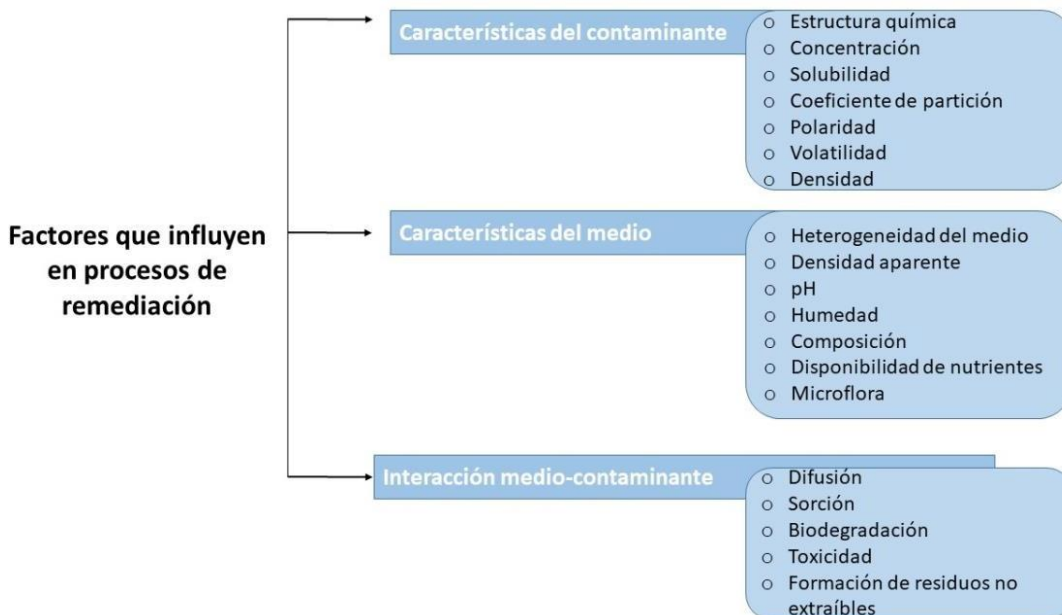
que ocupan alrededor de 3'051.487,80 hectárea, correspondientes al 26,17% de la región [20]. Las cuales se caracteriza por ser zonas altamente sensibles a las distintas actividades antropogénicas. Paradójicamente, al mismo tiempo la Amazonia ecuatoriana representa una de las zonas con mayor actividad petrolera en Ecuador, en la cual a lo largo de la historia se han generado distintos pasivos ambientales que no solo han afectado a la flora y fauna endémica, sino que han afectado la calidad de vida de las distintas nacionalidades indígenas que habitan la zona y que son consideradas como los guardianes de su biodiversidad [21–23].

Uno de los mayores accidentes ambientales ocasionados en la región Amazónica ecuatoriana se le adjudica a la empresa Chevron-Texaco, la cual operó oficialmente en el territorio durante 30 años, perforando 356 pozos y generando al menos 1000 piscinas abiertas con un área de 75 x 70 m. Lo que sucedió con estas piscinas es que al situarse en un ecosistema con altas precipitaciones como es la Amazonia, se desbordaron rápidamente y contaminaron el suelo de chacras indígenas, fincas de campesinos y cuerpos de agua, que hasta la actualidad aún no han sido correctamente remediadas [23,24]. Pero lamentablemente este no es el único caso de contaminación con hidrocarburos en la región. Para el primer semestre del año 2020, en medio de la selva tropical más grande del mundo se produjo el mayor derrame de petróleo en los últimos 15 años, propagándose según las empresas que administran los oleoductos al menos 15.000 barriles que comprometieron directamente a más de 2.000 familias indígenas y el acceso de agua potable a 120.000 personas de la región [25].

A pesar de que el Estado conoce muy bien los diferentes problemas ambientales que se han generado en esta región del país, hasta la actualidad no se ha detallado de forma precisa los efectos que han tenido estas acciones sobre las comunidades locales. Pues únicamente se ha documentado dos trabajos realizados por San Sebastián [24,26] donde se sugiere que en las comunidades aledañas a territorios petroleros existe una alta prevalencia de enfermedades como el cáncer, irritación de ojos y garganta, infecciones en la piel, defectos de nacimiento, gastritis y otras enfermedades que pudieran relacionarse con la presencia de concentraciones altas de distintos xenobióticos en el suelo y agua.

### 1.1.3 Tecnologías de remediación para suelos contaminados con petróleo

La contaminación de suelos asociados a la liberación de pasivos ambientales relacionados con el petróleo y sus derivados es una problemática actual y futura que se ha venido incrementando con el tiempo, por lo que se han desarrollado varias técnicas de recuperación de suelos contaminados con petróleo. Sin embargo, el tipo de proceso de remediación a emplear dependerá de tres factores principales: características del contaminante, características del medio e interacciones entre el contaminante y el medio [27] (Figura 4).



**Figura 4.** Principales factores que intervienen en las técnicas en remediación (Modificado de [27]). Para las estrategias de remediación, uno de los primeros pasos es analizar son los factores químicos, físico y biológicos presentes en la zona a remediar.

Las tecnologías de remediación de suelos son aquellas metodologías que tienen por propósito reducir la concentración, movilidad o toxicidad del contaminante presente en la matriz del suelo a través de variaciones en su composición. Para cumplir con este objetivose dispone de una gran

variedad de técnicas de remediación que como ya se mencionó, dependerán de las características que presente el contaminante y la zona a remediar [28]. En cuanto a las tecnologías disponibles existen varios criterios de clasificación que dependerán de: a) el lugar donde se ejecute la remediación, b) el objetivo que se quiera cumplir con el proceso de remediación, c) el tipo de tratamiento y d) el grado de desarrollo que se desee implementar (Figura 5) [27]. De acuerdo al lugar donde se ejecuta la remediación, se dispone de tratamientos *in situ* y *ex situ*. Cuando las tecnologías de remediación se aplican directo al sitio a recuperar, se habla de tratamientos *in situ*. Por otra parte, cuando se extrae el contaminante del sitio afectado para su posterior tratamiento se trata de técnicas *ex situ* [29].

En cuanto a la clasificación según el tipo de tratamiento, se dispone de tratamientos físico-químicos donde a través de interacciones mecánicas y con distintos solventes se logra la destrucción, contención o reducción de los contaminantes en la zona afectada [30]. También hay tratamientos térmicos que emplean los diferentes puntos de fusión de los contaminantes para retirarlos del medio. Por último, se dispone de técnicas biológicas que emplean sistemas propios de la naturaleza para degradar y/o transformar distintos compuestos en versiones inocuas para el medio ambiente [31].



**Figura 5.** Clasificación de las tecnologías de remediación (Modificado de [30])

En las tablas 2 y 3 se resume la información principal acerca de las técnicas de remediación disponibles de acuerdo al tipo de tratamiento, así como también sus ventajas y desventajas a considerar cuando se aplican en campo.

**Tabla 2.** Resumen de las principales técnicas asociadas a cada tipo de tratamiento (Modificado de [30]).

Tratamientos Físico-químicos	Tratamientos térmicos	Tratamientos biológicos
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lavado de suelos</li> <li>○ Oxidación UV</li> <li>○ Sellado de suelos</li> <li>○ Extracción de agua</li> <li>○ Extracción de aire</li> <li>○ Estabilización Físico química</li> <li>○ Inyección de aire comprimido</li> <li>○ Flushing</li> <li>○ Electrocinética</li> <li>○ Barreras permeables activas</li> <li>○ Barreras hidráulicas</li> <li>○ Barreras físicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Calentamiento por conducción térmica</li> <li>○ Calentamiento por radiofrecuencia</li> <li>○ Calentamiento por resistencia térmica</li> <li>○ Desorción térmica</li> <li>○ Incineración</li> <li>○ Inyección de agua o aire caliente</li> <li>○ Inyección de vapor</li> <li>○ Pirolisis</li> <li>○ Vitriificación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Bioaumentación</li> <li>○ Biodegradación asistida</li> <li>○ Compostaje</li> <li>○ Bioventing</li> <li>○ Landfarming</li> <li>○ Lodos biológicos</li> <li>○ Pilas biológicas</li> </ul>



**Tabla 3.** Principales ventajas y desventajas de cada tipo de tratamiento (Modificado de [30,32]).

	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Tratamientos Físico-químicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Buena relación costo beneficio</li> <li>- Se requiere de post tratamientos</li> <li>- No necesita equipos sofisticados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tiempo de tratamiento lento</li> <li>- Producción de intermediarios tóxicos</li> <li>- Pérdida de viabilidad del suelo</li> <li>- Su aplicación dependerá de la zona a remediar</li> </ul>
<b>Tratamientos térmicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resultados en poco tiempo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Se necesitan sistemas de recuperación integrados al proceso</li> <li>- Implica tecnologías costosas</li> </ul>
<b>Tratamientos biológicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No se generan residuos tóxicos</li> <li>- Tecnologías poco invasivas</li> <li>- Aceptación pública</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mano de obra necesaria</li> <li>- Mayor tiempo de tratamientos</li> </ul>

### *1.1.3.1 Tratamientos biológicos*

Las tecnologías de biorremediación consisten en emplear organismos vivos, sobre todo microorganismos (hongos, bacterias y/o levaduras) para degradar los contaminantes en versiones inocuas o menos tóxicas. Los organismos adecuados para este tipo de tecnología son bacterias, hongos o plantas, ya que presentan la capacidad fisiológica de degradar, desintoxicar o convertir los compuestos en elementos menos contaminantes que luego se puedan integrar a procesos geoquímicos. Es importante mencionar que dichos organismos pueden estar presentes en el sitio de análisis o pueden ser introducidos desde otros lugares [33,34].

### *1.1.3.2 Microorganismos involucrados en procesos de biorremediación*

#### *1.1.3.2.1 Bacterias*

Las bacterias son los organismos más abundantes en el suelo. Debido a sus distintas ventajas (Tabla 4), estos microorganismos se han convertido en la opción más común cuando se diseñan procesos de biorremediación [35]. Algunas cepas han sido identificadas como degradadoras primarias y otras especies crecen en base a compuestos resultantes de la primera degradación parcial. Los géneros de bacterias comúnmente aislados de suelo son: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Flavobacterium* [36].

En la Tabla 5 se resumen varios trabajos reportados en los 3 últimos años acerca del uso de bacterias en la biorremediación de diferentes contaminantes presentes en el suelo.

**Tabla 4.** Ventajas de emplear bacterias y hongos en procesos de biorremediación [37,38].

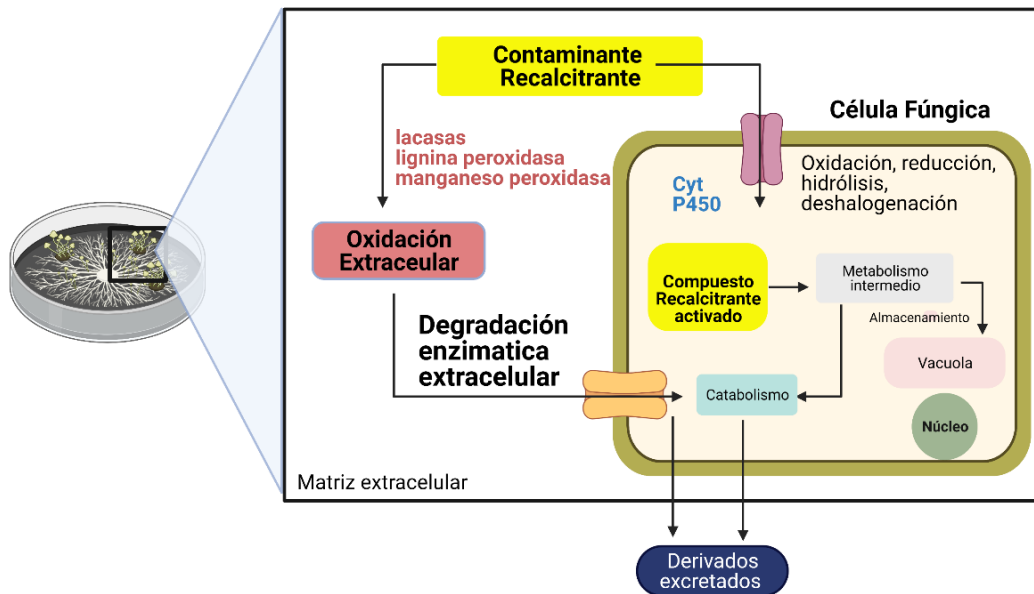
<b>Bacterias</b>	<b>Hongos</b>
Crecimiento exponencial	Desarrollan una red de hifas conocida como micelio que es capaz de penetrar superficies inaccesibles para las bacterias
Plasticidad genética	Utilizan los subproductos generados por la degradación de contaminantes, para sobrevivir sinninguna necesidad adicional de nutrición
Organismos más abundantes en el suelo	Secretan varias enzimas extracelulares altamente inespecíficas que se encargan de la descomposiciónde una amplia gama de contaminantes

**Tabla 5.** Bacterias empleadas en estudios de biorremediación de petróleo.

Especie	Contaminante	Eficiencia de remoción	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Petróleo crudo	60%	[39]
<hr/>			
<i>Citrobacter sedlakii</i> , <i>Entrobacter hormeachei</i> , <i>Entrobacter cloacae</i>	Petróleo crudo y gasóleo	5- 69 %	[40]
<hr/>			
<i>Bacillus algicola</i> , <i>Rhodococcus soli</i> , <i>Isoptericola chiayiensis</i> , <i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	Petróleo crudo	Emulsificación de hidrocarburos (hasta 65%)	[37]
<hr/>			
<i>Corynebacterium aurimucosum</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Microbacterium hydrocarbonoxydans</i>	Petróleo crudo	69 %	[38]
<hr/>			
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i> , <i>Pseudomonas</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	47,9 - 81,4 %	[41]
<hr/>			
<i>Streptomyces parvus</i>	Petróleo crudo	82 %	[42]

### 1.1.3.2.2 Hongos

Dentro de las opciones de tratamiento de suelos contaminados con crudo pesado y extrapesado para zonas vulnerables como el territorio amazónico, se encuentra lamicroremediación, técnica que involucra específicamente el uso de hongos para biotransformar, biodegradar o bioadsorber los contaminantes presentes en el ambiente(Figura 6) [43].



**Figura 6.** Mecanismos fúngicos enzimáticos para la transformación de contaminantes recalcitrantes. Una de las características de los hongos es que poseen distintos mecanismos enzimáticos tanto intracelulares como extracelulares que pueden aplicarse en la bioremediación de compuestos recalcitrantes. (Modificado de [44]). Creado con BioRender.com.

Los hongos son microorganismos claves en la dinámica de los ecosistemas, ya que contribuyen en procesos de descomposición, interacciones simbióticas y recirculación de nutrientes. Además, debido a sus eficientes y diversos complejos enzimáticos en los últimos años las investigaciones se han centrado en diferentes aplicaciones en el área de la biorremediación (Tabla 4). Existen varios estudios centrados en el aislamiento e identificación específicamente de hongos provenientes de suelos contaminados con hidrocarburos (Tabla 6). Este es el caso del primer meta-análisis realizado

por Pernía y colaboradores, donde se determinó que los sustratos con la mayor diversidad de hongos se encuentran en suelos impactados con crudo y asfalto natural [5].

**Tabla 6.** Resumen de géneros de hongos aislados de distintas muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos [5,45].

Microorganismos aislados	Medio contaminado
<i>Aspergillus spp</i> y <i>Penicillium spp.</i>	Muestras de suelos desérticos contaminados en Kuwait
<i>Aspergillus terreus</i> y <i>Fusarium solani</i>	Suelo contaminado con hidrocarburos de forma natural
<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Cordyceps sinensis</i> , <i>Gibberella fujikoroii</i> , <i>Hypocrea lixii</i> , <i>Penicillium decumbens</i> , <i>Pleospora herbarum</i> , <i>Sphaerodes retispora</i> y <i>Cochliobolus lunatus</i>	Suelo contaminado con hidrocarburos de forma natural en el Golfo de México
<i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Neosartorya</i> , <i>Pseudallescheria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Pestalotiopsis</i> , <i>Phoma</i> y <i>Paecilomyces</i>	Lagos naturales de asfalto con presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), tales como naftaleno, dibenzotiofeno, fenantreno y pireno.
<i>Penicillium spp</i> y <i>Cunninghamella</i>	Tanques de almacenamiento de crudo.
<i>Hormoconis resinae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium spp.</i>	De una refinería y de los sistemas de distribución de diesel

<i>Alternaria, Aspergillus, Chrysosporium, Cladosporium, Fusarium, Penicillium spp., Phialophora</i> y las levaduras <i>Candida</i> y <i>Rhodotorula</i>	Muestras de gasolina
<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium, Rhizopus</i>	Suelo contaminado con kerosene
<i>Aspergillus fumigatus, A. oryzae, A. wentii, A. flavus, A. niger, Penicillium notatum, Rhizopus stolonifer, Rhodotorula sp.</i> y <i>Trichoderma spp.</i>	Suelo contaminado con Bitumen
<i>Rhodotorula mucilaginosa, Wickerhamia sp.</i> y <i>Cladosporium cladosporioides</i>	Muestras de nafta

#### 1.1.4 Hongos extremófilos hidrocarbonoclasticos como una alternativa viable para la biorremediación de crudos pesados y extra pesados

Dada la ventaja estructural y de producción enzimática extracelular que presentan los hongos, en el presente trabajo de investigación se resalta la importancia y eficacia de los hongos extremófilos hidrocarbonoclasticos (HEH) para la degradación biológica de crudos pesados y extra pesados. El término HEH, hace referencia a un selecto grupo de hongos cultivables capaces de emplear hidrocarburos como única fuente de carbono y energía y que a su vez viven de manera óptima bajo distintas condiciones ambientales extremas [46]. Esta capacidad para sobrevivir en entornos extremos ha permitido desarrollar diversas aplicaciones en varias industrias ya que, bajo estas condiciones se producen enzimas extremófilas con propiedades únicas como la tolerancia a la temperatura, pH, acidez, salinidad, toxicidad, entre otras [46]. Por lo que estas enzimas están ganando importancia en el tratamiento competente de diversos contaminantes, puesto que pueden llegar a tener una función equivalente o mejor que los tratamientos químicos [47]. Es importante mencionar que muchos de los HEH son organismos con propiedades poliextremófilas, es decir, logran sobrevivir bajo varias condiciones ambientales extremas presentes en un mismo hábitat [46] convirtiéndolos en candidatos prometedores para la bioconversión de contaminantes derivados de industrias como las alimenticia, textil, petrolera, etc.

Como se mencionó, dadas las particularidades que presentan los HEH, estos se han convertido en organismos potenciales para el tratamiento de pasivos ambientales generados por la industria hidrocarburífera. Pues además de vivir óptimamente en condiciones poliextremófilas, estos son capaces de degradar / transformar el petróleo y sus derivados. Estos microorganismos se pueden aislar de suelos, sedimentos, fluidos, vapores o agua impregnados con el mismo crudo que se desea tratar. Por lo tanto, emplear biocatalizadores que provengan de HEH es un área con mucho potencial y que aún necesita de investigación, especialmente centrada en el mantenimiento y la reproducción de estos hongos en ausencia de una etapa sexual para lograr así su producción a gran escala sin perder sus características hidrocarbonoclasticas y poliextremófilas originales [46].

Dado que, las nuevas tendencias en el mercado internacional del petróleo cada año apuntan a la explotación de nuevas reservas de crudo pesado y extra pesado (no convencional), la generación de desechos con mayor peso molecular, toxicidad y baja biodegradabilidad será más recurrentes [11]. Por ello, se genera la necesidad de crear tecnologías sostenibles con el ambiente capaces de degradar o transformar fracciones de alto peso molecular como los asfaltenos, sobre todo si consideramos que una de las zonas más afectadas con la exploración de crudo no convencional en Ecuador es la región Amazónica. A pesar del gran potencial de la micorremediación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, como se refleja en la Tabla 7, existe muy poca información dirigida específicamente al aislamiento de hongos provenientes de fuentes de asfalto natural. Además, esta información resulta solamente de dos estudios centradas en la diversidad fúngica del lago de asfalto de Guanoco, ubicado en el estado de Sucre en Venezuela [48]. De estos trabajos se identifica al Phylum Ascomycetes como el grupo más aislado de ambientes con una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, con una alta concentración de asfaltenos y contaminantes tóxicos como metales pesados y azufre [5,48,49].

Esto coincide con el primer meta-análisis realizado por Pernia y colaboradores sobre la diversidad fúngica aislada de ambientes contaminados con crudo y sus derivados [5]. Donde, con base en una revisión detallada de información disponible en el periodo de 1900 a 2012 (112 años de literatura científica), se estimó que del total de hongos reportados como aislados de crudo, sus derivados y



sustratos impactados con hidrocarburos, el 83% pertenecen al Phylum Ascomycetos, 10% al Phylum Zygomycetes, 6% al Phylum Glomeromicetes y 1% al Phylum Basidiomicetes [5]. Además de esta información, en la Tabla 8 se resumen los resultados disponibles a nivel del laboratorio específicamente sobre la biotransformación de asfaltenos, lo que refleja una necesidad en la experimentación con HEH para la degradación de estas fracciones tan problemáticas, sobre todo con ecosistemas microbianos poco estudiados como los de la Amazonía ecuatoriana.

**Tabla 7.** Diversidad fúngica asociada a fuentes de asfalto natural [5].

Phylum	Especie	Lugar de aislamiento	Referencia
Ascomycetos	<i>Aspergillus aureolus</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomycetos	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomycetos	<i>Aspergillus terreus</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomycetos	<i>Byssochlamys nivea</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomycetos	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomycetos	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomycetos	<i>Eupenicillium limosum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomycetos	<i>Fennellia nivea</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]

Ascomicetos	<i>Fusarium proliferatum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Fusarium solani</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Fusarium venenatum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Neosartorya spinosa</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Paecilomyces sp.</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Penicillium sp</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Penicillium aculeatum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomicetos	<i>Penicillium indonesiae</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomicetos	<i>Penicillium marneffeii</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomicetos	<i>Penicillium oxalicum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomicetos	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[49]
Ascomicetos	<i>Pestalotiopsis palmarum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]

Ascomicetos	<i>Phoma glomerata</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Pseudallescheria angusta</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Basidiomycota	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Trichoderma inhamatum</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]
Ascomicetos	<i>Trichoderma viride</i>	Lago de Asfalto de Guanoco, Venezuela	[48]

**Tabla 8.** Resultados reportados sobre hongos capaces de transformar o mineralizar asfaltenos.

<b>Géneros/Especies</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>Emericella nidulans</i> , <i>Graphium putredinis</i> , <i>Eupenicillium javanicum</i> y <i>Aspergillus flavipes</i> .	Degradación de asfaltenos en un rango de 15 a 40%	[50]
<i>Trichoderma</i> (AB2)	Incorporación de oxígeno dentro de las moléculas de asfaltenos, haciéndolos más solubles	[51]
<i>Panus triguinus</i>	Degradación de asfaltenos de pesos moleculares comprendidos entre 400 y 300 kDa	[52]

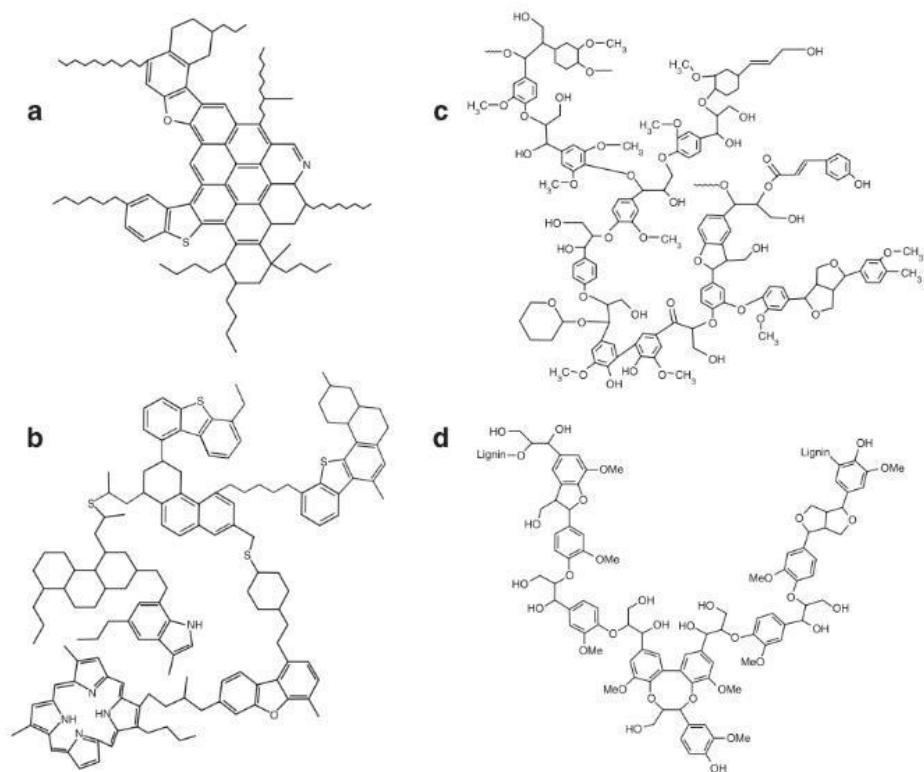
<i>Cunninghamella</i> sp., <i>Fusarium</i> sp. y <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Degradación de asfaltenos en un 9.98%	[53]
<i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Fusarium decemcellulare</i> , <i>Candida palmioleophila</i> y <i>Pichia guillermomdii</i> .	Degradación de asfaltenos en un rango de 10-15%	[54]
<i>Neosartorya fischeri</i>	Mineralización asfaltenos en un 13.2 %	[55]
<i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Emericella</i> , <i>Eupenicillium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Graphium</i> , <i>Neosartorya</i> , <i>Paecilomyces</i>	Degradación de las fracciones deasfaltenos en un rango de 10– 40%	[5]

### 1.1.5 Principales complejos enzimáticos de origen fúngico asociados a procesos de micorremediación.

La principal razón por la cual los hongos son microorganismos capaces de tolerar y degradar una amplia gama de compuestos contaminantes se debe a que producen varias enzimas inespecíficas, mismas que catalizan distintas reacciones de oxidación [46]. La primera evidencia de transformación de asfaltenos se dio por la enzima cloroperoxidasa, aislada del hongo *Caldariomyces (Leptoxyphium) fumago*, la cual degrada las petroporfirinas atrapadas en las moléculas de asfaltenos en presencia de peróxido de hidrógeno, provocando que el vanadio y el níquel se encontraran como especies solubles después de la transformación enzimática [56]. Otras proteínas como el Citocromo C doblemente modificado (PEG-Cyt-Met) han demostrado la capacidad de oxidar fracciones ricas en petroporfirinas de asfaltenos, eliminando hasta el 95% del vanadio y el 74% del níquel [57].

Otro biocatalizador encargado de degradar o transformar los asfaltenos es el sistema enzimático de degradación de lignina (SEDL) [53,55]. El SEDL comprende enzimas extracelulares implicadas en la degradación de la biomasa vegetal a través de la fragmentación de lignina, el cual es un polímero complejo con unidades de fenilpropano, unidos por enlaces éter o carbono-carbono (Figura 10 c-d). Estos enlaces convierten a la lignina en un polímero recalcitrante que forma una extensa red dentro de la pared celular de muchas plantas [58]. Los principales microorganismos especializados en su degradación son los hongos de podredumbre blanca, ya que son los principales productores del SEDL [58]. Sin embargo, este sistema no solo se asocia a enzimas que cumplen un rol en la degradación de lignina, sino también en la de varios contaminantes recalcitrantes como los asfaltenos [47]. El SEDL incluye exoenzimas oxidativas como: lacasas (LAC, EC 1.10.3.2), peroxidasas de lignina (LiP, EC 1.11.1.14) y peroxidasas de manganeso (MnP, E.C. 1.11.1.13). Éstas son enzimas altamente inespecíficas con un gran potencial redox que permiten la oxidación de una amplia gama de hidrocarburos aromáticos y otros contaminantes en dióxido de carbono y agua [60]. La principal razón por la cual estas enzimas logran oxidar moléculas complejas como los asfaltenos se centra en una similitud estructural, debido a que la lignina corresponde a un heteropolímero irregular de alto peso molecular muy similar a las moléculas de asfaltenos encontradas en crudos no convencionales [46,56,61] (Figura 7).

La degradación o mejoramiento de crudo pesado y extra pesado por parte del SEDL, involucra tres reacciones principales: 1.- reacciones biológicas de desaromatización que permiten transformar compuestos de alto peso molecular en versiones más solubles; 2- biodesulfuración; y 3- desmetalización de metales pesados (Tabla 9) [46]. Todas estas reacciones generan una reducción en la viscosidad y un aumento en la biodisponibilidad para la degradación por otros microorganismos, ya que se genera una oxidación parcial de los puentes alifáticos (sulfuros, ésteres y éteres), resinas y moléculas aromáticas, que conducen a la reducción de la aromaticidad total de crudos pesados y extra pesado facilitando su metabolización [61]. Sin embargo, la efectividad de estas reacciones va a depender de la estructura química, la concentración y las propiedades físicas del hidrocarburo [46]. Considerando esto, es importante centrar esfuerzos en el estudio y aplicación a gran escala de este SEDL, el cual puede generar grandes ventajas en el tratamiento de sitios contaminados con asfaltenos.



**Figura 7.** Comparación de las dos estructuras hipotéticas de asfaltenos y la de lignina; a) “modelo isla”, b) “modelo archipiélago”, c) – d) lignina [41].

**Tabla 9.** Resumen de las principales reacciones asociadas al SEDL.

Reacción	Definición	Función	Referencia
Desaromatización	Oxidación de uno o más anillos de sustratos aromáticos presentes en el petróleo crudo. A diferencia de la catálisis química, la desaromatización	Oxidar los compuestos aromáticos de moléculas con un alto peso molecular. Modificando sus interacciones e induciendo a un reordenamiento que	[59]

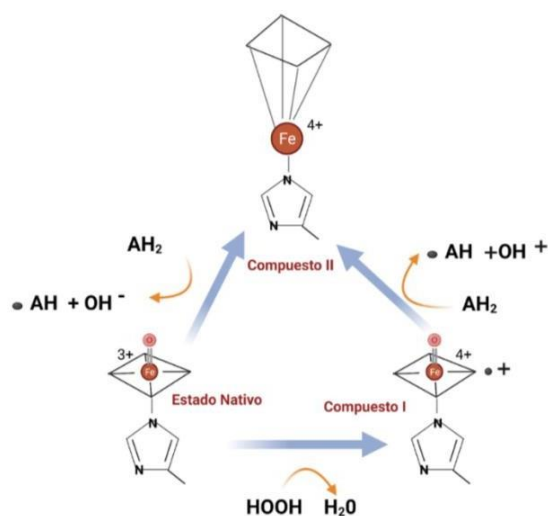
	biológica es más específica al sustrato y ocurre a temperatura y presión ambiental.	permita liberar moléculas más pequeñas
Biodesulfuración	Procesos que emplea microorganismos como biocatalizadores para eliminar el azufre de los combustibles fósiles	Obtener azufre nutricional a partir de moléculas heterocíclicas, sin causar pérdida oxidativa de carbono del propio combustible, reduciendo el azufre a niveles muy bajos [60]
Desmetalización	Liberación de metales pesados mediante la oxidación de anillos porfirínicos.	Eliminación de metales pesados como vanadio y níquel que se encuentran exclusivamente en la fracción de resina y asfaltenos del petróleo crudo [59]

#### 1.1.5.1 Cloroperoxidasa

Las cloroperoxidasas (CPO) (EC 1.11.1.10) pertenece a la familia de proteína hemo-tiolato peroxidasas que catalizan reacciones de óxido-reducción empleando peróxido de hidrógeno como agente oxidante [61,62]. Las CPO son consideradas como enzimas versátiles ya que involucran tres principales actividades catalíticas: halogenasa (cloración, bromación y yodación), peroxidasa y peroxigenasa con una baja especificidad al sustrato [63].

Esta familia de enzimas es representada por la CPO de *Caldariomyces (Leptoxyphium) fumago* la

cual es una proteína monomérica con peso molecular de 42 kDa. Debido a sus singularidades estructurales y enzimáticas se considera como un híbrido entre las enzimas peroxidasas y citocromos P<sub>450</sub> [64]. De forma general posee una estructura con ocho segmentos helicoidales que incluyen un ion de Mg<sup>+2</sup> que se encuentra cerca del grupo hemo, los cuales forman el centro activo de la proteína [61]. El mecanismo de reacción de las enzimas CPO como se muestra en la Figura 8, involucra una reacción entre el grupo hemo y el peróxido de hidrógeno que forman un radical catiónico de porfirina de oxohierro (IV) llamado también compuesto I de las peroxidasas. Luego el peróxido de hidrógeno reducido reacciona con el compuesto I produciéndose un radical (AH•) y el compuesto II (enzima reducida). A continuación los radicales (AH•) pueden reaccionar con el oxígeno disuelto formando compuestos cetónicos o reaccionar entre ellos para formar dímeros, trímeros o polímeros [65,66].



**Figura 8.** Ciclo catalítico de las enzimas cloroperoxidasas (Modificado de [67], creado con BioRender.com).

A través de este ciclo catalítico, las cloroperoxidasas logran oxidar compuestos azufrados, HPAs, colorantes, etc [65]. En el trabajo de Ayala se demostró el potencial de estas enzimas en procesos de biodesulfuración [68]. Los resultados mostraron que la CPO de *L. fumago* fue capaz de oxidar los compuestos aromáticos azufrados presentes en muestras de diésel primario. De igual forma, se ha estudiado el uso de la enzima CPO para la degradación de tintes orgánicos sintéticos, demostrando una eficiencia del 93% en el caso del colorante azoico de color amarillo [69,70]. Esta enzima también mostró resultados prometedores para el tratamiento de aguas residuales que



contiene sulfonamidas, ya que se logró degradar el 98% del compuesto sulfametoxazol en condiciones ambientales [67]. En el trabajo realizado por Fedorak y colaboradores también se señaló que una enzima extracelular como la CPO puede alterar las fracciones de asfaltenos, reduciendo en un 20% el Ni y V totales de esta fracción [56]. Dada la gran variedad de reacciones que se asocian a enzimas CPO y su baja especificidad al sustrato, se consideran como proteínas con un enorme potencial para ser empleadas como catalizadores en la industria. Por lo que existen varios trabajos que se han enfocado en mejorar su producción y estabilidad a través de modificaciones químicas o producción de proteínas recombinantes [69–71].

#### 1.1.5.2 Peroxigenasas Aromáticas.

Las peroxigenasas aromáticas (POAs) también conocidas por peroxigenasas inespecíficas, son enzimas oxidoreductasas pertenecientes a la familia de proteínas hemo- tiolato, por lo que guardan una estrecha relación con enzimas CPO. Ambas comparten el motivo altamente conservado en su estructura proteica primaria PCP (Prolina-Cisteína-Prolina), el cual es necesario para sus actividades catalíticas ya que actúa como ligando proximal del grupo hemo [72]. La primera enzima POA fue descubierta en 2004 en el hongo del álamo negro *Agrocybe aegerita* (*AaePOA*), esta enzima es una glicoproteína de 45- 46 kDa formada por 10 hélices  $\alpha$  y 5 hojas  $\beta$  cortas [73,74]. En la actualidad se han logrado purificar y caracterizar 9 POAs provenientes de distintas especies fúngicas (Tabla 10) [74,75]. Se ha determinado que estas enzimas muestran una versatilidad catalítica con más de 300 sustratos, tales como: naftaleno, tolueno, etilbenceno, alcanos, alquenos y ácidos grasos saturados e insaturados [76–78]. Además, presentan enantioselectividad en la hidroxilación de alcanos mucho mayor que la oxigenasa P<sub>450</sub> [75,79].

**Tabla 10.** Peroxigenasas aromaticas purificadas y caracterizadas (Tomado de [75] ).

Organismo	Enzima	Genes	Masa (kDa)	Punto Isoelectrico
<i>Agrocybe aegerita</i>	<i>AaeUPO</i>	18	45-46	4.9-6.1
<i>Agrocybe aegerita</i>	<i>rAaeUPO</i>	1	51-52	5.5
<i>Chaetomium globosum</i>	<i>CglUPO</i>	4	36	5.6
<i>Coprinellus radians</i>	<i>CraUPO</i>	2	43-45	3.8-4.2
<i>Coprinopsis cinerea</i>	<i>rCciUPO</i>	1	44	5.1-7.6
<i>Coprinopsis verticillata</i>	<i>CveUPO</i>	2	42	4.5-5.2
<i>Marasmius rotula</i>	<i>MroUPO</i>	1-6	32 (dímero 64)	5-5.3
<i>Marasmius wettsteinii</i>	<i>MweUPO</i>	1-4	62 (dímero)	5.1
<i>Psathyrella aberdarensis</i>	<i>PabUPO</i>	3	40-41	3.8-4.2

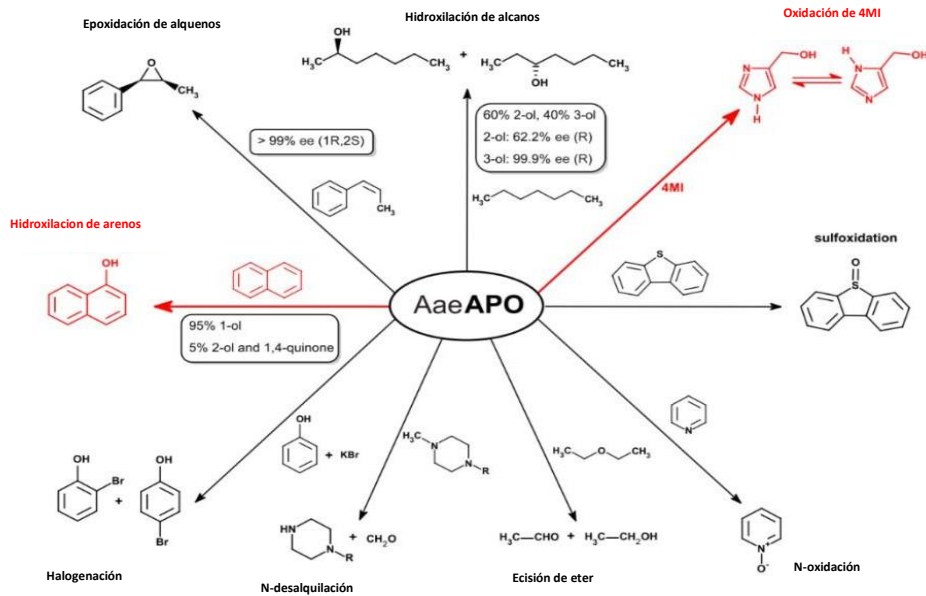
Las POAs pueden clasificarse en dos familias en función de su peso molecular y punto isoeléctrico (pI): i) grupo I de POAs cortas que a su vez se dividen en dos subfamilias y ii) grupo II de POAs largas. El grupo I incluye la subfamilia I.1 que se caracteriza por ser proteínas sin péptidos señal, con una masa molecular promedio de 31.9 kDa y un pI promedio de 7.3. La subfamilia I.2 también

carecen de péptidos señales y presentan una masa molecular alrededor de 29 kDa y un pI promedio de 6.4. Por otro lado, el grupo II que corresponde a las POAs largas, presentan una masa molecular promedio de 44.4 kDa y un pI de 5.8. Se debe mencionar que este último grupo se encuentra distribuido únicamente en hongos Ascomicetos y Basidiomicetos [75,80].

Una de las principales características de las POAs en general es que catalizan una gran variedad de reacciones como epoxidación, desalquilación, hidroxilación, oxidaciones de uno y dos electrones y oxidación de compuestos aromáticos y heterocíclicos, haluros inorgánicos y heteroátomos orgánicos (Figura 9) [75]. Esto es posible gracias a que las POAs combinan actividades catalíticas de enzimas peroxidasa y monooxigenasa intracelulares del citocromo P<sub>450</sub>. Sin embargo, a diferencia de enzimas citocromo P<sub>450</sub> que necesitan un donador de electrones y una fuente de poder reductor, las POA únicamente requieren de peróxido de hidrogeno para su actividad enzimática [80].

En cuanto a condiciones de temperatura, las POAs presentan alta estabilidad a temperaturas bajas entre 4-20 °C, por lo que estas pueden ser conservadas en dichas condiciones por mucho tiempo sin perder significativamente su actividad biológica. Además, se conoce que las POAs se excretan luego de los 6 días de inoculación de micelio, generalmente en la fase de producción de metabolitos secundarios. Por lo que su producción coincide con la de otras enzimas como las lacasas [76,81].

En general estas enzimas muestran varias ventajas que permiten considerarlas como biocatalizadores ideales, ya que: muestran una alta especificidad y actividad catalítica, emplean cofactores económicos como ion Mg<sup>+2</sup> y peróxidos de hidrógeno, tienen estabilidad estructural y un alto grado de glicosilación que favorece su solubilidad en agua [82]. Con respecto a sus aplicaciones, las enzimas POAs han sido empleadas como biosensores de naftaleno y nitrofenol mediante su inmovilización en nanopartículas de oro [83]. También se ha reportado que pueden modificar exitosamente las propiedades químicas de HAPs de bajo peso molecular, reduciendo sus efectos ecotoxicológicos a través de la solubilización de los alcoholes y quinonas presentes en la estructura de los HAPs [72].



**Figura 9.** Reacciones catalizadas por la enzima AaeAPO (Tomado de [75]).

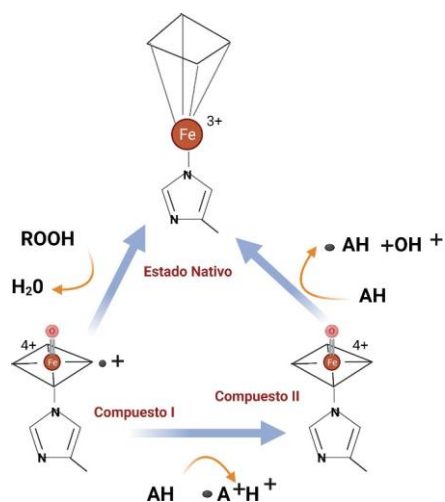
No obstante, a pesar del gran potencial que muestran estas enzimas, se reconocen varias desventajas como inhibición del rendimiento catalítico por la mezcla de los subproductos de la oxigenación y oxidación [84]. Carencia de un sistema de anotación adecuado en la base de datos, pues se han reconocido alrededor de 1000 secuencias de POA clasificadas como enzimas hipotéticas [72]. Además, hasta el momento se desconoce las circunstancias en las que se inducen y expresan las POAs fúngicas en condiciones naturales [75].

### 1.1.5.3 Manganese Peroxidasa

La enzima manganeso peroxidasa (MnP, EC 1.11.1.13) es una hemoproteína que presenta una alta afinidad por el  $Mn^{+2}$  como donante de electrones. Fue descrita por primera vez en el hongo *Phanerochaete chrysosporium* y posteriormente ha sido aislada de varios hongos de podredumbre blanca [85,86]. Su ciclo catalítico (Figura 10) empieza con la reacción entre el peróxido de hidrógeno y la proteína nativa, formándose el compuesto I que corresponde al radical catiónico  $[Fe(IV)=O^+]$ . Después se da una reacción de reducción mediada por el  $Mn^{+2}$  como electrón donador que resulta en la formación del compuesto II y  $Mn^{+3}$ . Por último, el compuesto II es reducido

obteniéndose nuevamente la proteína nativa, otro ion oxidado de  $Mn^{+3}$  y la liberación de agua [85,87,88]. Por lo tanto, esta enzima requiere necesariamente los iones  $Mn^{+2}$  para completar su ciclo catalítico. El  $Mn^{+3}$  formado actúa como un mediador Redox de baja masa molecular y altamente reactivo, que puede catalizar la oxidación de sustratos fenólicos a través de la oxidación de un electrón del sustrato, lo que provoca el reordenamiento, rompimiento de enlaces y degradación no enzimática de los compuestos fenólicos [89]. Es importante mencionar que esta enzima no es capaz de oxidar compuestos no fenólicos por cuenta propia, por lo que se necesita añadir otros compuestos como derivados de tioles o lípidos insaturados [90]. La actividad de la MnP puede ser estimulada por la presencia de sulfato de cobre, lactato, pH menor a 7.5, entre otros [87]. Tal es el caso de la MnP de *Irpex lacteus* que al añadir Tween 80 al cultivo sumergido aumentó los niveles de MnP 260 veces, provocando una decoloración más eficiente del tinte azoico naranja 16 [91].

En cuanto al potencial que presenta esta clase de enzimas, se destaca la decoloración de tintes industriales. Así pues, en el trabajo [92] se reporta el potencial de la MnP aislada del hongo de pudrición blanca *Cerrena unicolor* BBP6 en la industria textil. La razón principal se debe a que es capaz de decolorar competentemente varios tintes, incluido el rojo Congo (53,9% en 12 h), naranja de metilo (77,6% en 12 h), azul brillante Remazol R (81,0% en 5 h), azul de bromofenol (62,2% en 12 h) y violeta cristal (80,9% en 12 h) [92]. Asimismo, se ha reportado el potencial de la MnP de *Trametes villosa* para la deslignificación de la biomasa lignocelulósica (bagazo de caña de azúcar 0,06 % y fibra desisal 0,39 %) para su aplicación en el proceso de producción de biocombustibles (biogás, biodiesel) [93].



**Figura 10.** Ciclo catalítico de la enzima manganeso peroxidasa (Modificado de [88]). Creado con

#### 1.1.5.4 *Lignina Peroxidasa*

La ligninasa o lignina peroxidasa (LiP EC 1.11.1.14) es una glicoproteína extracelular, de naturaleza helicoidal con pesos moleculares entre 40-68 kDa. Principalmente cataliza la ruptura del enlace  $C^{\alpha}-C^{\beta}$  de las cadenas laterales propilo de la molécula de lignina, la cuales una reacción dependiente de peróxido de hidrógeno [94]. La LiP se caracteriza porque es capaz de oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos debido a su alto potencial de óxido- reducción [94]. Esto mediante la oxidación de un electrón del anillo aromático que provoca la formación de radicales catiónicos inestables que sufren reordenamientos, rompimientos de enlaces y descarboxilaciones [95].

El ciclo catalítico de la LiP es similar al de la enzima MnP (Figura 10), obteniendo como producto final un compuesto fenólico oxidado y agua [95]. En muchos casos, para completar el ciclo catalítico, es necesario añadir mediadores redox como: cobre, manganeso, ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)), 2,6 dimetoxifenol e intermediarios formados en la degradación de lignina como el alcohol veratrílico [96]. La LiP al igual que la MnP presenta una alta capacidad de decoloración de tintes azoicos. La enzima purificada de *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 mostró una tasa de decoloración del 98% y 96% para rojo y naranja de metilo respectivamente [97]. De igual forma la LiP proveniente del hongo *Ganoderma lucidum* e inmovilizada en perlas de alginato de Calcio es capaz de decolorar tintes reactivos con una eficiencia de hasta el 93% [96].

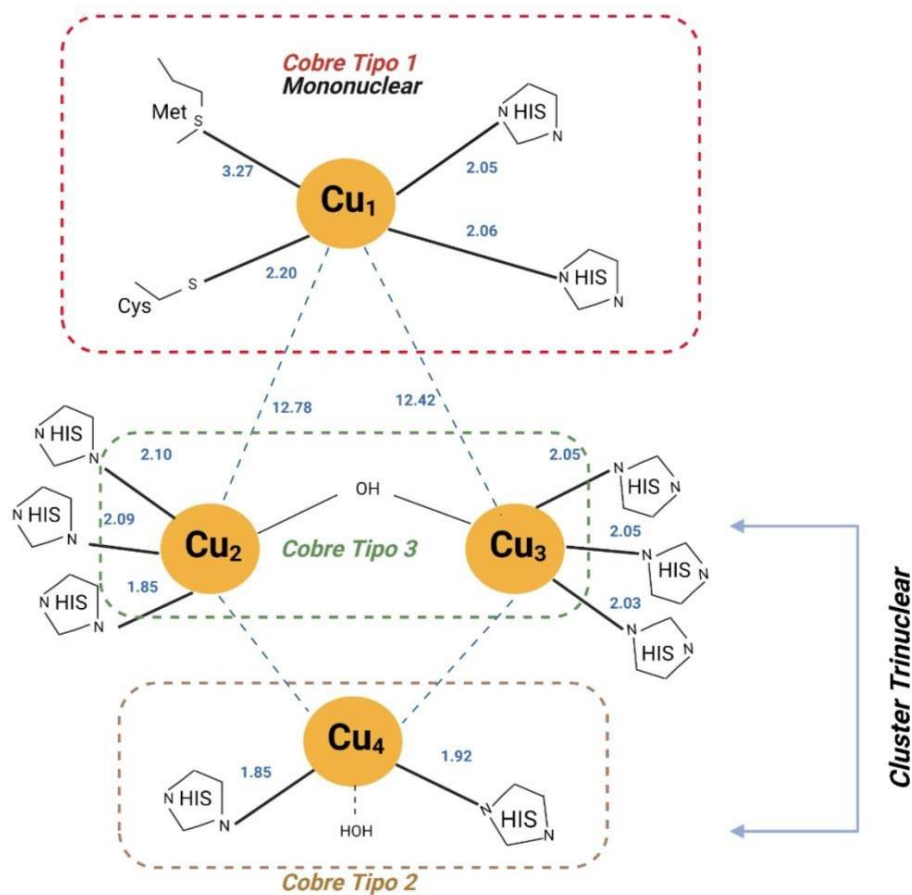
#### 1.1.5.5. *Lacasa*

Las lacasas (bencenodiol: oxidorreductasa de oxígeno, EC 1.10.3.2) son glicoproteínas diméricas o tetraméricas que pertenecen a la familia de enzimas polifenol oxidasas [98–100]. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se han logrado aislar lacasas provenientes de plantas, insectos, hongos y bacterias. Por lo tanto, se asocian a una gran variedad de funciones tanto fisiológicas como patológicas, las cuales se dividen en tres categorías: ii) reticulación de

monómeros, ii) degradación de polímeros y iii) ruptura de compuestos aromáticos [99].

En el caso de lacasas de origen fúngico, se ha determinado una alta actividad de esta enzima en hongos Basidiomicetos asociados a la degradación de madera, lo que sugiere que la principal función de las lacasas es la despolimerización de los componentes de la pared celular de los árboles, como la lignina [101]. No obstante, esta función no se realiza de forma independiente ya que involucra la acción sinérgica de otras enzimas como la LiP y MnP.

Las lacasas pertenecen al grupo de oxidasas multicobre que poseen una unidad funcional compuesta por cuatro centros de cobre: el centro de cobre tipo 1 “azules” (T1), centro de cobre tipo 2 “no azules” (T2) y el centro que contiene dos cobres acoplados (T3). El centro de cobre tipo 1 interacciona con dos ligandos histidinas, una cisteína y un aminoácido hidrofóbico que puede ser metionina, leucina o fenilalanina. Este centro muestra una banda de absorción electrónica intensa cerca de 600 nm que es responsable de su color azul. El cobre tipo 2 presenta bajos espectros de absorción y emplea dos histidinas y agua como ligandos. El centro de cobre tipo 3 presenta dos iones de cobre que forman un sitio binuclear que se coordina con tres histidinas y un puente hidroxilo, que mantiene el fuerte acoplamiento entre los átomos de cobre [102–104] (Figura 11). Estos centros se distribuyen en tres dominios tipo cupredoxina que se encuentran ubicados secuencialmente en la estructura tridimensional de las lacasas. El centro tipo 1 está ubicado en el dominio 3 y el clúster trinuclear (T2/T3) se distribuye entre los dominios 1 y 3 [105].



**Figura 11.** Representación de los centros de cobre presentes en enzimas lacasas fúngicas.

(Modificado de [102], creado con BioRender.com)

En cuanto a los mecanismos de acción de las lacasas, a diferencia de las enzimas LiP y MnP consumen oxígeno en lugar de peróxido de hidrógeno. Las lacasas dependen de la actividad de los centros de cobre para llevar a cabo su función catalítica, la cual empieza con la oxidación de los sustratos en el centro T1 transformándolos en radicales libres. Luego los electrones se transfieren internamente a través de la vía Cys-His hacia al clúster trinuclear T2/T3 donde al recibir cuatro electrones los donan al oxígeno molecular para formar una molécula de agua [105–107]. Algunos autores sugieren que si las enzimas no presentan el centro T1 no pueden considerarse como lacasas verdaderas ya que la transferencia de electrones desde el sustrato al sitio de cobre 1 es el paso que determina la velocidad de reacción de estas enzimas [101]. Además, se ha determinado que la bolsa de unión al sustrato formada por el centro tipo 1 sobresale en la estructura tridimensional, de tal forma que



favorece las interacciones intermoleculares con distintos sustratos fenólicos. Por el contrario, el clúster trinuclear (T1/T2) forma una bolsa que parece restringir el acceso de otros agentes oxidantes diferentes al oxígeno. Es importante mencionar que se puede extender la actividad catalítica de las lacasas a sustratos no fenólicos de lignina, adicionando un mediador como el ABTS [106–108]. Al añadir sistemas mediadores de lacasas se ha logrado la oxidación de grupos metilo aromáticos, alcoholes bencílicos [109], hidrocarburos aromáticos policíclicos [109–111] y tintes textiles [112].

Esta enzima se destaca como un catalizador prometedor ya que presentan una alta actividad catalítica y amplia inespecificidad de sustrato, que la ha convertido en una de las enzimas más estudiadas desde finales del siglo XIX por su enorme potencial biotecnológico. Algunas aplicaciones industriales que se destacan son: la des-lignificación de residuos agrícolas, bio-blanqueamiento de pulpa, blanqueamiento de algodón, aditivos en detergentes, biorremediación de una gran variedad de contaminantes ambientales, prevención de decoloración del vino, biosensores, aplicaciones médicas como la síntesis de medicamentos complejos a través de oxidación fenólica, entre otras [102,103]. Es necesario mencionar que muchas veces su aplicación a nivel industrial se ve afectada por inestabilidades estructurales y altos costos en el aislamiento y purificación de las proteínas nativas. No obstante, estas dificultades pueden superarse a través de la inmovilización de las lacasas en distintos sustratos y su producción heteróloga en otros organismos como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Trichoderma atroviride*, etc [113–115]

## 1.2 Planteamiento del problema

Ecuador es uno de los principales productores de petróleo en América Latina y es conocido como el país con la mayor diversidad biológica en relación a su área territorial. La región amazónica ecuatoriana está ubicada al oriente del país y abarca una extensión de 120.000km<sup>2</sup>, cerca del 50% del territorio nacional. Actualmente, constituye una de las reservas de hidrocarburos más importantes de Ecuador y el principal eje impulsor del desarrollo endógeno del país [116]. No obstante, a pesar del loable esfuerzo realizado por el gobierno ecuatoriano para lograr el saneamiento de pasivos ambientales asociados a la industria petrolera, es evidente que la expansión de los proyectos hidrocarburíferos en la región ha traído como consecuencia la generación de una cantidad importante de desechos petrolizados tóxicos y de difícil manejo que han causado un gran impacto ambiental en la región, incluyendo la grave e invaluable afectación del bienestar y la salud de las comunidades indígenas originarias [24,27,117].

Los derrames de petróleo liberan al ambiente enormes cantidades de contaminantes orgánicos con alto contenido de compuestos polares que no solo impactan la capa superficial y la estructura del suelo, sino que también conducen a una pérdida de materia orgánica y nutrientes, así como el riesgo de lixiviarse hasta aguas subterráneas generando un mayor daño [118]. Si bien es cierto que la toxicidad de los hidrocarburos es atenuada en el ambiente mediante la degradación química o física, en muchos casos éstos siguen siendo una fuente de contaminación constante, pudiendo permanecer en los ecosistemas por largo tiempo, sobre todo si se trata de compuestos recalcitrantes como los crudos pesados y extrapesados (10-22 °API y <10°API, respectivamente) de la cuenca oriental del Ecuador. Dichos crudos poseen una baja biodisponibilidad y susceptibilidad a ser degradados microbiológicamente por sus altos contenidos de asfaltenos, la fracción de mayor polaridad y peso molecular que involucra constituyentes no volátiles formados por moléculas poliaromáticas que contienen altas concentraciones de heteroátomos (S, N, O) y metales pesados (V y Ni) [5,119].

### 1.3 Justificación

Los hongos presentan un gran potencial morfológico, fisiológico y enzimático que los convierte en organismos promisorios para ser empleados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos recalcitrantes. Entre ellos, destacan los hongos ligninolíticos que poseen un poderoso sistema enzimático de degradación de lignina (SEDL) constituido por una amplia gama de oxidorreductasas e hidroxilasas (Ej. lacasas) y peroxidasas ligninolíticas (Ej. lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil, entre otras). Además de degradar la lignina, estas enzimas son capaces de catalizar la oxidación de una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs), pesticidas y colorantes [5,41]. Así mismo, se ha reportado la primera evidencia sobre la mineralización de asfaltenos mediada por hongos [55].

Dado que existen pocas investigaciones realizadas a nivel mundial sobre procesos de biotransformación y/o mineralización microbiológica de asfaltenos en comparación con otras fracciones más livianas que constituyen el petróleo, el presente trabajo representa la primera aproximación sobre el aislamiento e identificación molecular de especies fúngicas asociadas a emanaciones naturales de asfalto encontradas en la Amazonía ecuatoriana. En este caso, se trata de la Cantera de Pungarayacu ubicada en la provincia de Napo, Ecuador. La cual está formada por areniscas bituminosas donde se espera estén presentes hongos con alto potencial para ser empleados como biocatalizadores promisorios para futuros procesos de micoremediación de pasivos ambientales generados por la actividad petrolera en la Amazonía ecuatoriana.

## 1.4 Objetivos

### *1.4.1 Objetivo General*

- Identificar los hongos cultivables presentes en muestras de asfalto provenientes de la cantera de Pungarayacu en la Provincia de Napo, Ecuador, y su posible potencial hidrocarbonoclástico.

### *1.4.2 Objetivos específicos*

- Aislar hongos cultivables de muestras de asfalto provenientes de la cantera de Pungarayacu.
- Identificar molecularmente los hongos aislados en la cantera de Pungarayacu.
- Caracterizar funcionalmente genes y proteínas asociadas a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas) empleando herramientas bioinformáticas.

## CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1 Aislamiento de hongos de muestras de asfalto provenientes de la cantera de Pungarayacu.

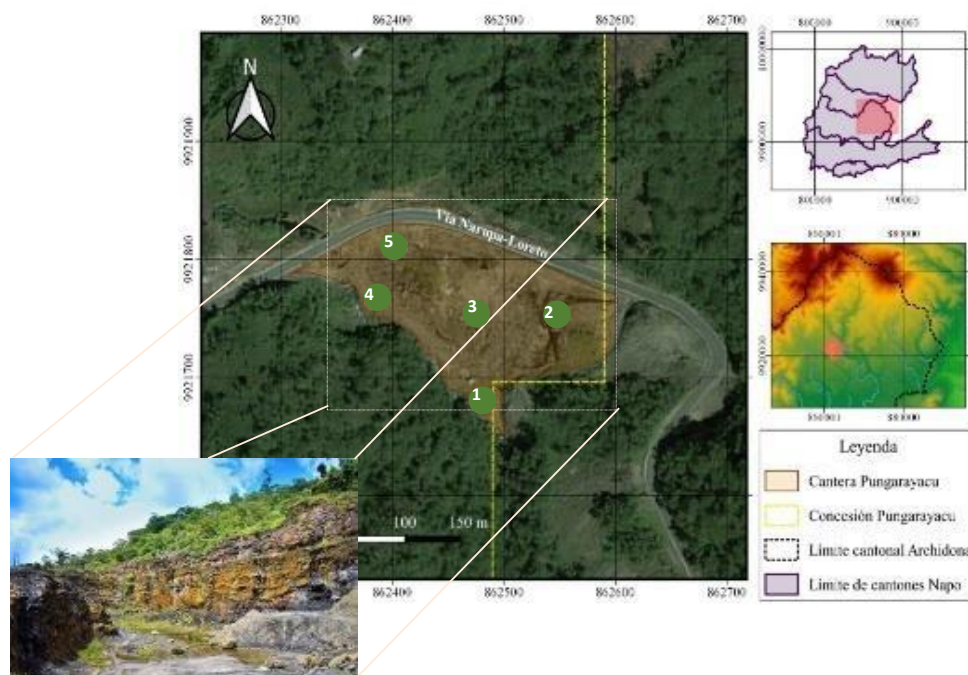
### 2.1.1 Sitio de muestreo y georreferencia.

Se seleccionó la Cantera de Pungarayacu como área de estudio, la cual es una zona de aproximadamente 2,6 Ha de extensión formada por rocas areniscas impregnadas con bitumen (hidrocarburo) donde en trabajos anteriores se ha identificado un alto contenido de S, Ni y V [120]. Se encuentra ubicada dentro el Campo Pungarayacu (Bloque 20) de la Cuenca Oriental del Ecuador (Coordenadas Geográficas: Sur 00°; Norte 1°; Oeste 77°; Este 77°) (Figura 12).



**Figura 12.** Referencia Geoespacial de la Cantera de Pungarayacu. Coordenas (Sur 00°; Norte 1°; Oeste 77°; Este 77°).

Para la toma de muestras se seleccionaron al azar cinco (5) puntos dentro de la cantera donde se tomaron muestras de asfalto aflorante de la roca arenisca (Figura 13), las cuales fueron trasladadas al laboratorio en neveras refrigeradas y almacenadas a 4 °C para su posterior procesamiento.



**Figura 13.** Puntos de muestreo localizados en la Cantera de Pungarayacu. Se indica los 5 puntos de muestreo tomados al azar dentro de la cantera y ubicados en las siguientes coordenadas con una proyección WGS84-UTM17s: 1. (x: 862484,49 y: 9921679,96), 2. (x: 862543,67 y: 9921745,26), 3. (x: 862476,33 y: 9921746,28), 4. (x: 862388,58 y: 9921762,6), 5. (x: 862395,72 y: 9921815,66)

### 2.1.2 Extracción de asfaltenos

Para la precipitación de asfaltenos se siguió la metodología propuesta por [121] con modificaciones. Se tomó una muestra compuesta de 25 g de asfalto proveniente de la Cantera de Pungarayacu y se mezcló con 1000 ml de hexano el cual actuó como solvente de precipitación. Esta mezcla se dejó en agitación constante durante 6 horas y luego de esto se dejó reposar durante 24 horas para lograr una buena sedimentación de los asfaltenos. Los agregados sólidos de resinas-asfaltenos fueron recuperados por precipitación al vacío en un embudo Buchner con un filtro

Whatman® Schleicher & Schuell de 110 mm de diámetro. La filtración se repitió hasta obtener un solvente claro. Posteriormente, los sólidos obtenidos fueron sometidos a extracción Soxhlet durante 86 horas, donde se separó únicamente la fracción de asfaltenos. Estos sólidos resultantes se dejaron secar en una cabina de vapores a temperatura ambiente y se pesaron, obteniendo 40 gramos de asfaltenos.

### *2.1.3 Aislamiento de hongos a partir de muestras de asfalto*

El aislamiento se llevó a cabo a partir de una suspensión de  $10 \pm 2$  g de asfalto en matraces con 100 mL de medio definido Czapek sin fuente de carbono [122]. Los matraces se incubaron a 25 °C y 250 rpm durante 5 días y posterior a esto se realizaron diluciones seriadas de  $1:10^{-3}$ ;  $1:10^{-4}$  y  $1:10^{-5}$  que se sembraron por duplicado en 4 medios de cultivo:

1) Medio Czapek suplementado con asfaltenos (0,4 mg/mL) como única fuente de carbono y energía; 2) Medio Czapek con su fuente estándar de carbono (sacarosa, 0,03 mg/mL); 3) Medio Czapek sin fuente de carbono como control y 4) Medio Rosa Bengala como medio de enriquecimiento. Todas las placas de Petri se incubaron a 25 °C durante 7 días y posteriormente se discriminaron las colonias crecidas según su morfotipo hasta obtener cultivos axénicos de las mismas. Una vez aislado cada cepa se procedió a depositarlas en el Banco de Microorganismos Ikiam, donde sus esporas se conservaron en glicerol 50% (v/v) y se mantuvieron a -80 °C.

## 2.2 Identificación molecular de hongos aislados en la cantera de Pungarayacu.

### *2.2.1 Extracción de ADN genómico*

Para la identificación molecular se inocularon las esporas de cada aislado (6) en medio MPPY (Maltose potato peptone yeast) según la metodología propuesta por [123] y [117] con modificaciones. Luego fueron incubadas en un agitador orbital a 30°C y 250 rpm durante 48 h. El micelio se recuperó por filtración utilizando una red de nylon de 25  $\mu$ m, el micelio filtrado se lavó con

NaCl al 0.9% (P/V) autoclavado, se retiró su exceso de humedad y se liofilizó el material durante 48 horas para luego almacenarlo a -80°C dentro de cajas Petri correctamente etiquetadas y selladas. Luego se pesaron 100-300 mg del micelio liofilizado en un mortero donde se lo pulverizó con nitrógeno líquido y se añadió 1 mL de tampón de rotura (Tris-HCl 0,18 M; EDTA 10 mM, SDS 1 %, pH 8,2.), se homogenizó con un vórtex por 30 segundos, se añadió 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó las muestras a 55 °C durante 45 minutos con una homogenización cada 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos y se transfirió 600 µl del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf donde se añadió cloroformo en una proporción 1:1, se mezcló por inversión, se volvió a centrifugar y el sobrenadante se transfirió gentilmente a un tubo nuevo. Posteriormente, se realizó una incubación a 37 °C por 45 minutos con Rnase (Ribonuclease A), luego se añadió fenol en proporción 1:1 y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos para tomar nuevamente el sobrenadante y transferirlo a otro tubo nuevo. Seguidamente se adicionó fenol/CIA (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1) en proporción 1:1 y se repitió este procedimiento hasta que la interface quedara limpia. El ADN genómico fue precipitado con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5.2) para luego conservarlo durante toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm por 5 minutos, se realizó un lavado con ETOH al 70%, se dejó secar las muestras hasta la evaporización total del alcohol y, por último, el ADN se resuspendió en buffer Tris-EDTA (TE) para su posterior uso [176].

A continuación, se evaluó la cantidad y calidad del material extraído empleando el equipo *Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*, donde se cuantificó las concentraciones de ADN, ARN, proteínas y compuestos fenólicos, con el objetivo de identificar posibles impurezas en las muestras de ADN genómico. Se aceptaron concentraciones de ácidos nucleicos superiores a 25 ng/µl y razones de pureza de A 260/280 y A 260/230 de 1.8 a 2.2. Los cuales de acuerdo al manual del equipo son ratios de pureza aceptados para ADN.



### 2.2.2 Amplificación de la región ITS

Se amplificó por PCR la región ITS (Internal Transcribed Spacer) utilizando los oligonucleótidos: ITS 1F (5'...CTTGGT CAT TTA GAG GAA GT...3') e ITS 4R (5'...TCC GCT TAT TGA TAT GC...3') según la metodología descrita por [177] y [178], respectivamente. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l y la mezcla estuvo compuesta por: 5  $\mu$ l de solución amortiguadora (TBE 1X), 1.5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (1,5 mM), 0,5  $\mu$ l de dNTPs (0,2 mM), 0,2  $\mu$ l de Taq polimerasa (0,2  $\mu$ l<sup>-1</sup>), 0,3  $\mu$ l de cada uno de los iniciadores ITS1F e ITS4R (0,125  $\mu$ M) y 15,2  $\mu$ l de agua ultrapura estéril. La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* de la marca ThermoFisher empleando una fase inicial de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos seguida por 30 ciclos de amplificación con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineación a 56 °C por 1 minuto, extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Una vez comprobada la amplificación por PCR de la región ITS, tal como se indica en el apartado de Materiales y Métodos, se contrató el servicio de PCR + Sanger sequencing de GENWIZ® para la identificación molecular de las cepas fúngicas aisladas (<https://www.genewiz.com/>). Este servicio emplea primers propios que flanquean la región ITS1 e ITS2 del ARNr para la amplificación por PCR y secuenciación por el método Sanger. Los datos provistos por GENEWIZ® fueron las secuencias originales con sus respectivos cromatogramas. Es importante mencionar que las muestras de ADN fueron enviadas al exterior con el aval del Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos otorgado por el Ministerio del Ambiente y Agua con el código único de proceso MAAE-CMARG-2020-017.

### 2.2.4 Construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias de ADN que fueron proporcionadas por el servicio de GENWIZ® se editaron y ensamblaron. Posteriormente, de manera individual cada una de las secuencias se compararon con las secuencias de ADN disponibles en la base de datos de NCBI, empleando el servicio web BLASTN (base de datos: región espaciadora transcrita interna (ITS) del tipo hongos y material de referencia)

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Las secuencias ITS obtenidas en esta búsqueda se alinearon empleando el software MUSCLE [124] y para la eliminación automática de regiones mal alineadas se usó la herramienta trimAL (<http://phylemon.bioinfo.cipf.es/alignment.html>). Por último la historia evolutiva se concluyó utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei [125]. El árbol de consenso bootstrap inferido de 2000 réplicas se tomó para representar la historia evolutiva de las especies analizadas [126] y los análisis evolutivos se realizaron en el programa MEGA X [127].

2.3 Caracterización funcional de genes y proteínas asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas).

#### *2.3.1 Análisis del potencial biotecnológico de las cepas aisladas.*

Una vez realizada la identificación molecular, se generó una búsqueda de toda la información disponible en la base de datos de NCBI y MycoBank Database (<https://www.mycobank.org/>). Por lo que para las 6 especies identificadas se realizó una búsqueda de genomas secuenciados, genes y proteínas con potencial en el área biorremediación, como por ejemplo las enzimas asociadas al SEDL. Al terminar esta búsqueda, se seleccionaron los organismos que contaban con la información necesaria para posteriores análisis.

#### *2.3.2 Identificación y selección de proteínas asociadas a procesos de micorremediación*

Todas las secuencias de ADN y proteínas que se obtuvieron a través de la búsqueda en bases de datos y que fueron utilizadas en este estudio, provienen únicamente de la especie *Coniochaeta hoffmannii* CBS 245.38 (número de acceso de GenBank MG491499) [128]. Esto se debe a que *C. hoffmannii* es la única especie de la cual se dispone su genoma totalmente secuenciado y publicado.

Por lo tanto, las secuencias polipeptídicas reportadas para *C. hoffmannii*, que se encuentran reportadas en NCBI (37 proteínas) (Tabla 24 Anexos), por lo que se analizaron individualmente realizando alineamientos de secuencias de tipo local con la herramienta BLASTp (parámetros por defecto) y modelamientos de su estructura tridimensional en el programa SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) para inferir relaciones estructura-función. Por lo tanto, de las 37 proteínas obtenidas de *C. hoffmannii* se seleccionaron para este estudio 7 multicobre oxidasa y 2 peroxidasa de hemetiolato (Tabla 24 Anexos), las cuales fueron descargadas en formato FASTA. Estas proteínas fueron escogidas debido al potencial que presentan en estrategias de biorremediación de crudos no convencionales.

### 2.3.3 Caracterización *in silico* de las lacasas hipotéticas

Para el estudio de las multicobre oxidasa mencionadas, se inició realizando evaluaciones de varias de sus características estructurales a través de los programas en línea del Center for Biological Sequence Analysis (CBS) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) (Tabla 23 Anexos). El programa SignalP Versión 4.0 se utilizó para determinar la presencia de péptidas señales para los sitios de secreción, mientras que NetNGlyc 1.0 se usó para determinar los sitios de N-glicosilación. La localización subcelular de las proteínas fue determinada por DeepLoc 1-0 [129] y TMHMM2.0. Los puntos isoeléctricos y pesos moleculares fueron analizados por ExPASy - Compute pI / Mw Tool y la predicción de puentes disulfuro se realizó con la herramienta DiANNA 1.1 [130].

### 2.3.4 Construcción de árboles filogenéticos

Posteriormente, para identificar aquellas multicobre oxidasa que presentan mayor probabilidad de tener actividad lacasa, se realizó un análisis filogenético para buscar sus relaciones con otras multicobre oxidasa provenientes de distintos orígenes. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei [131]. El árbol de consenso bootstrap inferido de 2000 réplicas se tomó para representar la historia evolutiva [126]. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X [127].

### 2.3.5 Búsqueda de dominios y patrones asociados a lacasas

Aquellas multicobre oxidasas que mostraron una relación filogenética con otras lacasas de origen fúngico fueron evaluadas bajo varios criterios de selección; primero se examinó con las herramientas web InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) y Pfam la presencia de dominios Cu-oxidasa, Cu-oxidasa2 y Cu-oxidasa3 (Pfam: PF00394, PF07731 y PF07732), la existencia de por lo menos dos de estos dominios catalíticos en las enzimas fue empleado como un criterio de selección para los siguientes análisis. El segundo criterio fue la presencia de los motivos firma L1-L4, que se reportan como patrones característicos de las enzimas multicobre oxidasa [132], para esto se realizó una alineación múltiple de las 7 proteínas con el programa MUSCLE y con el programa Jalview 2.11.1.0 [188] se identificaron estas secuencias de consenso. Además, se buscó la presencia de la secuencia conservada DSG [LIV] en la región C-terminal [133,134], la Tabla 25 en la sección de Anexos resume los motivos utilizados para esta búsqueda.

### 2.3.6 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de las lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

Con el objetivo de proporcionar más información sobre la posible función de aquellas proteínas que cumplieron los criterios de selección mencionados, se predijo *in silico* su estructura tridimensional con la herramienta SWISS-MODEL utilizando como templatado para la predicción del modelo la lacasa-1 de *Melanocarpus albomyces* (PDB: 1gw0.1) con una resolución de 2,4 Å y con un 70,71 % de identidad. La calidad estereoquímica de la estructura de las proteínas fue evaluada con PROCHECK y PROSA, y la visualización y análisis de los modelos se realizó en PyMOL. Por último, se realizó una comparación entre la estructura tridimensional de lacasa de *Trametes versicolor* (PDB: 1kya) y el modelo tridimensional obtenido para la enzima Lac3 de *C. hoffmannii* empleando el algoritmo TM-align [135]. Este algoritmo se usó para calcular la puntuación TM entre dichas estructuras, con el objetivo de conocer cuando similares son estas dos estructuras.

### 2.3.7 Caracterización *in silico* y análisis filogenéticos de las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. hoffmannii*

De igual forma que para el análisis de las multicobre oxidasas de *C. hoffmannii*, se analizó las características estructurales de las peroxidasa de hemetiolato con los mismos programas bioinformáticos mencionados anteriormente (Tabla 23 Anexos). De igual forma se identificó aquellas peroxidasa de hemetiolato que presentan mayor relación por homología con peroxigenasas aromáticas (POAs) ya reportadas, esto a través de un análisis filogenético donde la historia evolutiva se infirió bajo los mismos parámetros ya empleados para el estudio de lacasas.

### 2.3.8 Búsqueda de dominios y patrones asociados a peroxigenasas aromáticas

Con el servidor Pfam se realizó una búsqueda de dominios asociados a proteínas hemo- tiolato, luego se realizó un alineamiento múltiple con estas proteínas hipotéticas para la exploración de motivos conservados responsables de las actividades catalíticas de POAs y cloroperoxidasas (patrones: -PCP-EGD-R-E y -PCP-EHD-E, respectivamente) [74,80]. Además, también se investigó la presencia de otros motivos presentes en distintas subfamilias de POAs [136].

### 2.3.9 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas peroxigenasas aromáticas de *C. hoffmannii*

Para el análisis de sus características estructurales y su modelamiento tridimensional por homología se emplearon las mismas herramientas utilizadas para las multicobre oxidasas de *C. hoffmannii*, pero esta vez empleando como plantilla para el modelo tridimensional la peroxigenasa aromática de *Agrocybe aegerita* (PDB: 2yp1.1A) con una resolución de 2,31Å y un 26,73 % de identidad. De igual forma, se realizó una comparación entre la estructura tridimensional de POA de *Agrocybe aegerita* (PDB: 2yp1.1A) y el modelo tridimensional obtenido para las dos enzimas POAs de *C. hoffmannii* empleando el algoritmo TM-align [135].

## 2.4 Identificación de los genes que codifican para las lacasas y peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

Para obtener las regiones de ADN que posiblemente codifiquen las lacasas y POAs de esta investigación, se tomó sus secuencias aminoacídicas y se efectuó un TBLASTN con la base de datos Contigs de escopeta de genoma completo (wgs) especificando a *C. hoffmannii* como organismo de búsqueda. Las distintas secuencias genómicas resultantes fueron analizadas con el software AUGUSTUS [137] (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) el cual se usó para especificar la posición de exones e intrones en las secuencias que codifican las proteínas de estudio. Todas las secuencias de ADN fueron visualizadas y traducidas nuevamente en el software SnapGene Viewer (<http://www.snapgene.com/>).

## CAPITULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

### 3.1 Aislamiento e identificación molecular de hongos aislados de la cantera de Pungarayacu

A partir de muestras de asfalto aflorante provenientes de la Cantera de Pungarayacu, se logró aislar 5 hongos filamentosos y un hongo levaduriforme. Esto se realizó con el objetivo de identificar hongos cultivables asociados a emanaciones naturales de asfalto.

Los hongos aislados fueron identificados molecularmente a través de amplificación por PCR y secuenciación de la región ITS. Los resultados del secuenciamiento de ADN fueron comparados con la Base de Datos GenBank (NCBI) donde todas las relaciones establecidas por homología se encontraron en un rango de identidad y cobertura del 91 al 100%. No obstante, con el objetivo de corroborar la información obtenida GenBank, se realizó un árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud con los 7 mejores resultados de GenBank encontrados para cada aislado. Es así, como se obtuvo la información a nivel de especie de algunas de las secuencias de ADN (Figura 14-Tabla 11). Logrando identificar que todos los aislados correspondieron al Phylum Ascomycota distribuidos en 4 familias pertenecientes a: Nectriaceae, Hypocreaceae, Coniochaetaceae y Aspergillaceae.

Los primeros análisis obtenidos mediante BLASTN mostraron que, para el caso de la cepa D, existe un alto porcentaje de identidad (98,93%) con la especie *Xenoacremonium falcatum* (datos no mostrados). Sin embargo, el árbol filogenético (Figura 14) infirió que existe una clara diferencia evolutiva entre estas secuencias de ADN. Una de las razones por las cuales esta cepa no forma un clado específico con *X. falcatum*, es que pudiera tratarse de una nueva especie del género *Xenoacremonium*. No obstante, esta hipótesis debe ser comprobada mediante estudios de taxonomía clásica y secuenciación de otras secuencias de ADN o genes (códigos de barra) utilizados para la investigación filogenética en hongos, tales como el 18S, 5.8S, 28S, el factor de

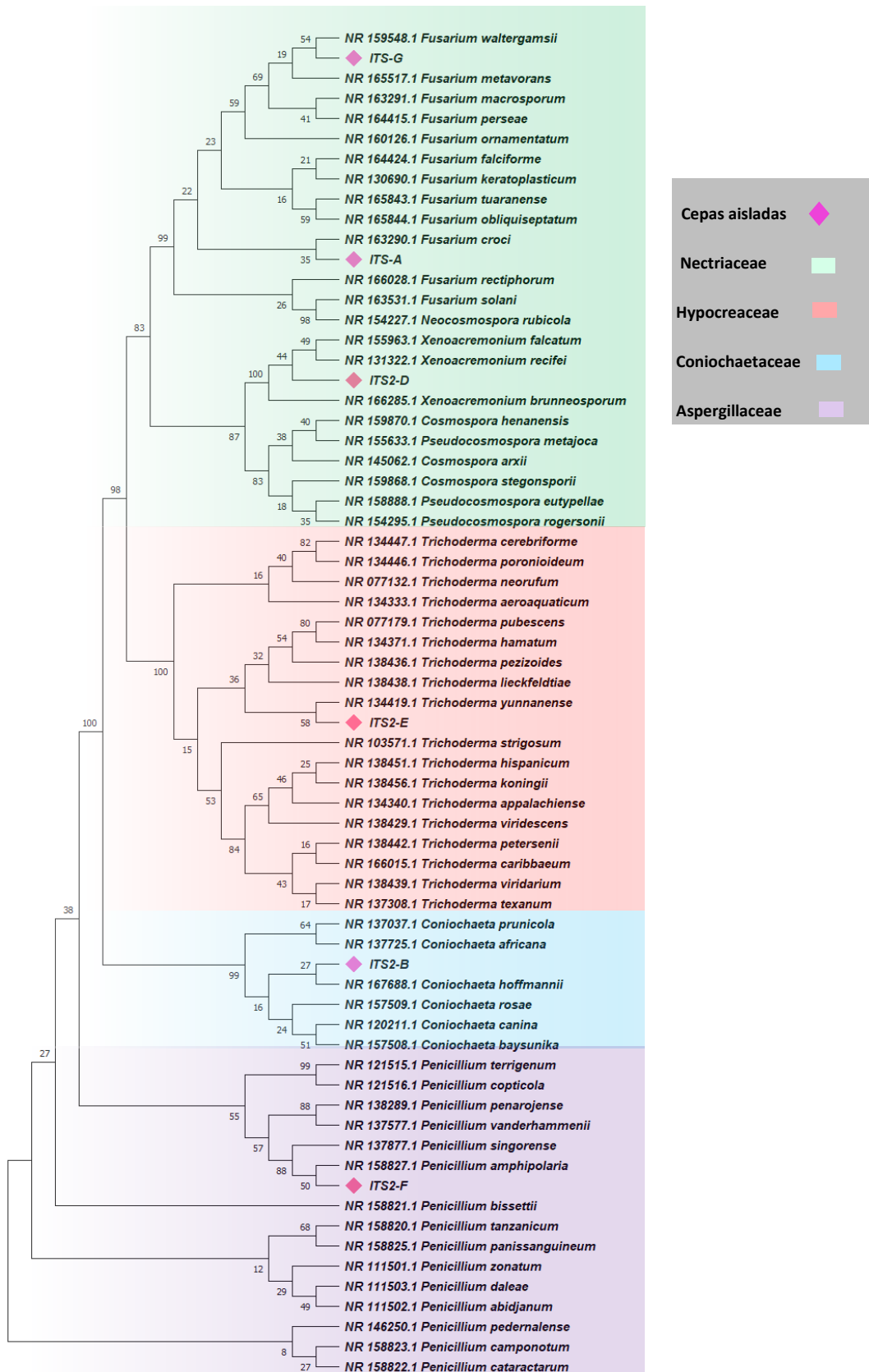
traducción 1- $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulina, la actina, ARN polimerasa II (RPB1 y RPB2) y la proteína de mantenimiento de minicromosomas (MCM7) 139.

En el caso de la cepa G, se indica un alto porcentaje de identidad (99%) con la especie *Neocosmospora rubicola*. Sin embargo, al corroborar esta información con los resultados obtenidos en el árbol filogenético, se observa que estas dos secuencias se encuentran distantes entre sí sugiriendo que la cepa G en realidad comparte ancestros en común con la especie *Fusarium waltergamsii*.

Por otra parte, cabe mencionar que la cepa B presentó un porcentaje de identidad de 91,75% con *Coniochaeta hoffmannii*, el cual no permite inferir relaciones evolutivas a nivel de especie con esta cepa sino solamente a nivel de género. No obstante, con el fin de darle continuidad al desarrollo de esta investigación, se asumió que la cepa B aislada de muestras de asfalto de la cantera de Pungarayacu es una especie cercana de *Coniochaeta hoffmannii*. Esto, debido a que *C. hoffmannii* es la única especie de la cual se dispone su genoma totalmente secuenciado, anotado y publicado en el GenBank.

De igual manera que se debe hacer con la cepa, D identificada molecularmente a nivel de género como *Xenoacremonium* sp., para la cepa B también se hace necesario determinar su correcta identificación a nivel de especie empleando otros códigos de barra (Barcoding) y una detallada clasificación taxonómica. Es importante mencionar que en esta investigación se tenía previsto realizar estos análisis moleculares y taxonómicos. Sin embargo, las actividades se cancelaron debido a que, en el mes de marzo del año 2020 Ecuador entró en estado de emergencia sanitaria a causa de la Pandemia COVID-19. Hasta la fecha, aún no se ha restaurado el mencionado estado de emergencia y no se ha podido tener acceso a los laboratorios de Ikiam.





**Figura 14.** Árbol filogenético obtenido a partir de secuencias de la región ITS. Las secuencias de las cepas aisladas en este estudio se señalan en rombos rosados. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo basado en la matriz JTT [125].

**Tabla 11.** Identificación por homología de las cepas aislada con base en la información disponible en NCBI.

Cepa	ID BMO-Ikiam <sup>1</sup>	Especie por Homología	Longitud (pb)	Cobertura (%)	E-value	Similitud (%)	Número Acceso	Ref.
A	BM-01	<i>Fusarium croci</i>	581	99	0.0	97,2 4	NR_163531. 1	[138]
B	BM-02	<i>Coniochaeta hoffmannii</i>	599	100	0.0	91,7 5	NR_167688. 1	[128]
D	BM-04	<i>Xenoacremonium sp.</i>	572	98	0.0	98.9 3	NR_155963. 1	
E	BM-05	<i>Trichoderma yunnanense</i>	573	100	0.0	100	NR_134419. 1	[139]
F	BM-06	<i>Penicillium amphiboloria</i>	591	96	0.0	100	NR_158827. 1	[140]
G	BM-07	<i>Fusarium waltergamsii</i>	573	83	0.0	99,7 9	NR_159548. 1	[141]

1. Banco de microorganismos Ikiam.

El análisis realizado sobre artículos científicos y genomas secuenciados, demostró que existe una escasa información sobre los microorganismos aislados en este estudio. Las únicas especies que disponen de reportes científicos sobre su potencial biotecnológico son: *Coniochaeta hoffmannii*, *Trichoderma yunnanense* y *Penicillium amphiboloria*. Además, el único genoma disponible corresponde al hongo levaduriforme *Coniochaeta (Lecythophora) hoffmannii* [128] (Tabla 12).

**Tabla 12.** Potencial biotecnológico de las cepas aisladas.

Cepa	Genoma	Aplicaciones biotecnológicas reportadas	Área de aplicación	Ref.
<i>Fusarium croci</i>	N/A	N/A	N/A	[138]
<b><i>Coniochaeta hoffmannii</i></b>	NXFW00000000.1	Bioconversión de lignina	Industria de papel y biocombustibles.	[142]
		Control biológico de <i>Ophiostoma crassivaginatium</i>	Seguridad Alimentaria.	[143]
<i>Xenoacremonium</i>	N/A	N/A	N/A	
<i>Trichoderma yunnanense</i>	N/A	Control biológico de <i>Phytophthora capsic</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Seguridad Alimentaria	[144]

<i>Penicillium amphiboloria</i>	N/A	Producción de inulinasas	Industria alimenticia y producción de bioetanol	[145]
<i>Fusarium waltergamsii</i>	N/A	N/A	N/A	[146]

---

### 3.2 Caracterización de genes y proteínas asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas).

#### 3.2.1 Caracterización *in silico* de las lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

Para el caso de las 7 multicobre oxidasas de *C. hoffmannii* (AUS45867.1, AUS45860.1, AUS45857.1, AUS45849.1, AUS45848.1, AUS45844.1, AUS45838.1) se comenzó realizando una caracterización de estas proteínas empleando varias herramientas bioinformáticas indicadas en la sección de procedimientos (Tabla 23 Anexos). La longitud de las proteínas lacasas varió entre los 559 a 726 aminoácidos, identificando que las enzimas Lac2, Lac4 y Lac6 presentaron los mayores tamaños. En cuanto al punto isoeléctrico, todos poseen  $pI$  ácidos donde el mayor valor se registra para la enzima Lac3 con un  $pI$  6.08 (Tabla 13). En cuanto a la localización sub-celular de las dos lacasas hipotéticas (Lac2 y Lac6) de *C. hoffmannii*, se predicen como enzimas intracelulares por lo que pudieran presentar características diferentes a las demás. Las enzimas que se predicen como enzimas extracelulares mostraron péptidos señales con una longitud de 18-20 aminoácidos, los cuales se señalan en la Figura 16. Además, se predijo de 4 a 10 N-glicosilaciones en las lacasas hipotéticas. Cabe mencionar que para el caso de enzimas intracelulares no es posible un proceso de glicosilación, pero hay que recordar que esta información solo refleja la probabilidad de que esto suceda (Tabla 13).

La identificación de la posición del ligando axial en la estructura primaria de enzimas lacasa permite clasificarlas según su potencial de óxido-reducción, el cual se asocia con la energía requerida para remover un electrón del agente reductor [147,148]. Las lacasas hipotéticas Lac2, Lac5 y Lac7 podrían clasificarse como lacasas Clase 1 y deberían poseer un potencial de reducción alto. Mientras que las enzimas Lac1, Lac3, Lac4 y Lac6, al pertenecer a la Clase 2, tendrían un potencial de reducción mucho menor (Tabla 13). Otras características que se analizaron en las 7 multicobre oxidasa fue la presencia de puentes disulfuro (Tabla 14). Los resultados mostraron que la enzima Lac3 (AUS45857.1) de *C. hoffmannii* es la proteína con más puentes disulfuro. Por el contrario, para la Lac6 (AUS45844.1) el programa no predijo la presencia de estos enlaces covalentes.

**Tabla 13.** Características de lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

#	ProteínaID	Longitud (aa)	Peso Molecular (kDa) <sup>a</sup>	pI teórico (a)	LS <sup>1</sup> <sub>b</sub>	Péptido Señal <sup>d</sup>	Regiones transmembrana <sup>e</sup>	N-Glicosilaciones <sup>c</sup>	Presencia de puentes disulfuro <sup>f</sup>	Clases de lacasa <sup>3</sup>
Lac 1	AUS45867.1	559	61.67	5.96	E	SI	N/A	4-N	Si	Clase 1
Lac 2	AUS45860.1	726	79.75	5.57	T	NO	SI	8-N <sup>(2)</sup>	Si	Clase 1
Lac3	AUS45857.1	598	65.40	6.08	E	SI	N/A	10-N	Si	Clase 2
Lac 4	AUS45849.1	671	73.99	4.77	E	SI	N/A	11-N	Si	Clase 2
Lac 5	AUS45848.1	600	64.61	4.86	E	SI	N/A	5-N	Si	Clase 1
Lac 6	AUS45844.1	661	72.41	5.37	T	No	SI	10-N <sup>(2)</sup>	No	Clase 2
Lac 7	AUS45838.1	591	65.17	5.34	E	Si	N/A	6-N	Si	Clase 1

1. Localización subcelular de consenso: E, extracelular; T, transmembrana; I, intracelular
  2. Es poco probable que las proteínas sin péptidos señal estén expuestas la maquinaria de N-glicosilación y, por lo tanto, no pueden estar glicosiladas (in vivo) sin embargo contienen motivos potenciales
  3. La clase a la que pertenecen las lacasas se determinó analizando la estructura primaria de cada proteína. Donde el décimo aminoácido después de la cisteína conservada indica la clase de lacasa a la que pertenecen: si el aminoácido corresponde a una Met (clase 1), Leu (clase 2) y Phe (clase 3).
- a) ExPASy - Compute pI / Mw Tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))
- b) DeppLoc 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>).
- c) NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)
- d) SignalP Versión 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
- e) TMHMM2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)
- f) DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)

**Tabla 14.** Predicción de puentes disulfuro en las lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*

	ID	Posición de la cisteína (pb)	Distancia (pb)	Puente disulfuro <sup>1</sup>	Puntaje (s)
Lac 1	AUS45867.1	4-507	503	MLVCGVLSV-DHLNNCRLMNI	0,62
		299 - 705	406	QHTYDCTVNST-KPMMLCFPIAK	0.69
Lac 2	AUS45860.1	314 - 705	391	SRSDSCTGGVL-KPMMLCFPIAK	0.74
		407 - 705	298	TLPQTCFVPYC-KPMMLCFPIAK	0.66
		469 - 705	236	PLWEGCDDMPF-KPMMLCFPIAK	0.99
		37 - 143	106	ARASTCNTPSN-NGVTECPIPPK	0.99
Lac 3	AUS45857.1	37 - 361	324	ARASTCNTPSN-PVDTLCYDNID	0.99
		37 - 533	496	ARASTCNTPSN-AWLMHCHIAWH	0.99

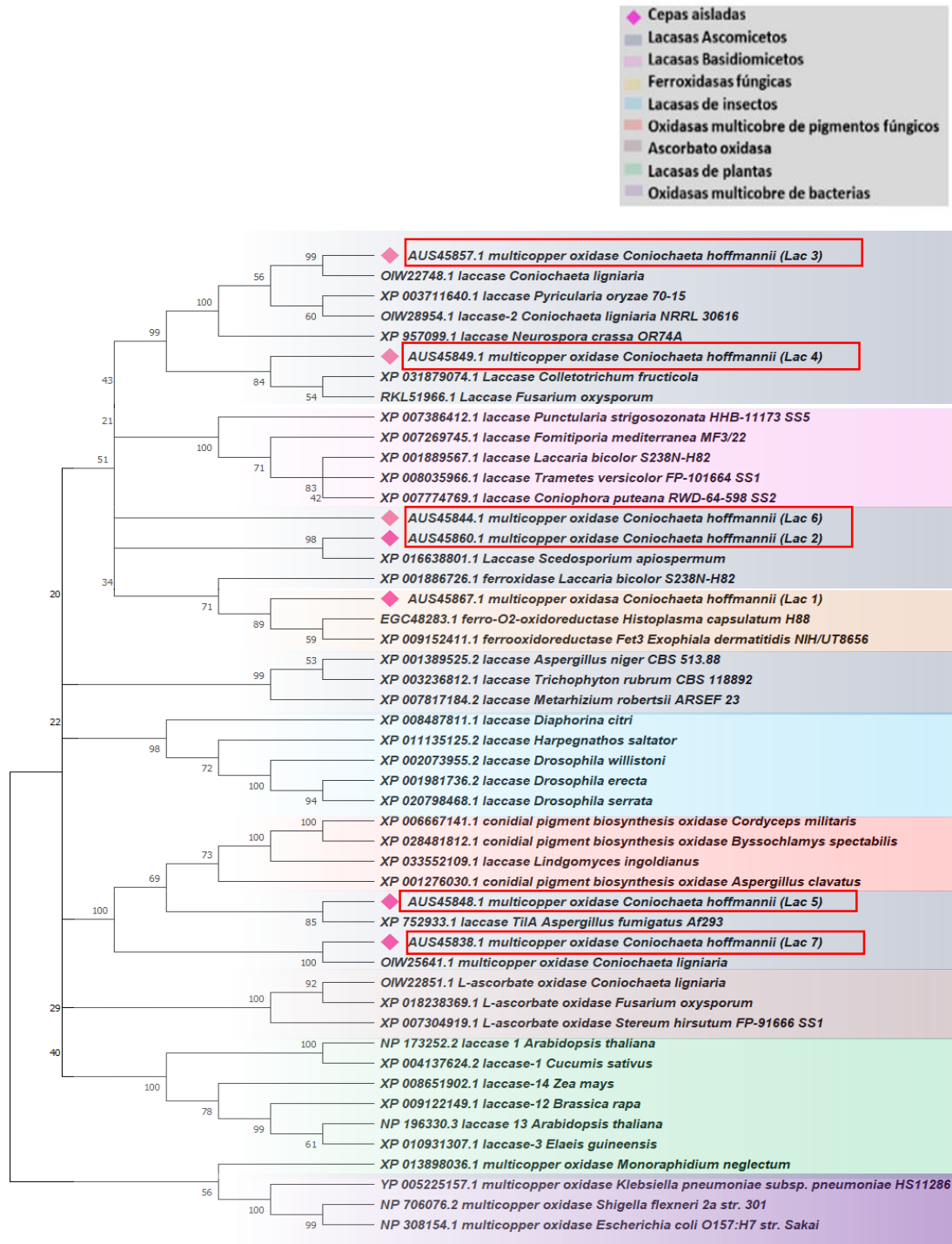
		143 - 327	184	NGVTECPIPPK-PPNGFCGTSNN	0,83
		361 - 533	172	PVDTLCYDNID-AWLMHCHIAWH	0,99
Lac 4	AUS45849.1	153 - 431	278	PKIEACWGDTL-LSNEPCDKTCA	0,73
		385 - 435	50	HPADGCNTFRT-PCDKTCADVMTM	0,99
		431 - 435	4	LSNEPCDKTCA-PCDKTCADVMTM	0,71
Lac 5	AUS45848.1	210-556	346	KGSSICLSQAE-AYLLHCHIQDH	0,99
		263 - 369	106	GVFAGCHPSTG-SNAKNCSAPVN	0,94
Lac 6	AUS45844.1	N/A	N/A	N/A	N/A
Lac 7	AUS458381	16 - 193	177	AALVACTRHFD-GMETPCFDSIL	0,64
		193 - 591	398	GMETPCFDSIL-YSSPRC	0,65
		238 - 265	27	LTDKSLPPEV-DFFYGCNATRG	0,61
		238 - 591	353	LTDKSLPPEV-YSSPRC	0,99

### 3.2.2 Búsqueda de dominios y patrones asociados a lacasas

Una vez conocidas las características principales de las multicobre oxidasas de *C. hoffmannii*, se aplicaron varios criterios de selección para determinar si efectivamente estas enzimas presentan características típicas de proteínas lacasas. El primer criterio fue la comparación con otras multicobre oxidasas (EC 1.10.3.2) a través de análisis filogenéticos para conocer la relación evolutiva de estas proteínas con otros miembros de las oxidasas.

Con el objetivo de generar conclusiones de las proteínas basadas en sus relaciones evolutivas, en la Figura 15 se muestran multicobre oxidasas de distintos orígenes reportadas en el trabajo de [98]. En total, se analizaron 27 secuencias de hongos, 5 de insectos, 7 de plantas y 3 de bacterias, obteniendo como resultado que 6 de las secuencias polipeptídicas de *C. hoffmannii* (AUS45860.1, AUS45857.1, AUS45849.1, AUS45848.1, AUS45844.1, AUS45838.1) comparten ancestros en común con otras lacasas de hongos Ascomycetos. Por el contrario, la enzima Lac1 (AUS45867.1) se agrupó junto otras ferroxidasas (ferro- oxidoreductasas) fúngicas y por esta razón esta enzima hipotética fue descartada para los siguientes análisis.





**Figura 15.** Árbol filogenético generado con secuencias de aminoácidos de distintas oxidasas multicobre. Las lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii* se indican con rombos rosados y las secuencias encerradas en rojo representan las lacasas que continuaron siendo analizadas.

El segundo criterio de evaluación para la identificación de una posible actividad lacasa en las proteínas hipotéticas estudiadas de *C. hoffmannii* fue la presencia de los dominios Cu- oxidasa (dominios PFAM: PF00394, PF07731 y PF07732). De acuerdo a la información resumida en la Tabla 15, los tres dominios Cu-oxidasa están presentes en todas las secuencias. Primero, se procedió a identificar el dominio Cu oxidasa 3 en el extremo N- terminal, posteriormente, los dominios Cu-oxidasa y Cu-oxidasa 2 cerca del extremo C- terminal.

**Tabla 15.** Búsqueda de dominios multicobre oxidasa en lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

#	Proteína ID	Dominios	Posición		Bits	E-value
			Inicial	Final		
Lac 2	AUS45860.1	Cu-oxidasa3	125	239	153.0	3.2e-45
		Cu-oxidasa	248	401	81.7	6.2e-23
		Cu-oxidasa 2	563	659	124.0	3.5e-36
Lac3	AUS45857.1	Cu-oxidasa3	82	188	115.0	1.8e-33
		Cu-oxidasa	198	304	118.6	2.8e-34
		Cu-oxidasa 2	411	550	134.5	2.0e-39
Lac 4	AUS45849.1	Cu-oxidasa3	132	238	123.5	4.3e-36
		Cu-oxidasa	248	380	98.9	3.1e-28
		Cu-oxidasa 2	540	619	66.0	2.7e-18

		Cu-oxidasa3	28	140	123.7	3.8e-36
		Cu-oxidasa	194	366	54.7	1.3e-14
Lac 5	AUS45848.1	Cu-oxidasa 2	449	573	86.6	1.2e-24
		Cu-oxidasa3	131	245	145.4	7.2e-43
		Cu-oxidasa	257	422	119.2	1.8e-34
Lac 6	AUS45844.1	Cu-oxidasa 2	529	638	106.1	1.1e-30
		Cu-oxidasa3	24	137	132.2	8.8e-39
		Cu-oxidasa	165	353	54.9	1.1e-14
Lac 7	AUS45838.1	Cu-oxidasa 2	453	572	100.2	7.4e-29

---

El tercer y último criterio de selección fue la presencia de las secuencias firma L1-L4 (Tabla 25 Anexos), ya que con este criterio se puede discriminar si las multicobre oxidasa de *C. hoffmannii* muestran las características básicas para poder ser consideradas como lacasas hipotéticas (Figura 16). La composición de los motivos L1-L4 en *C. hoffmannii* es muy variada, ya que de acuerdo a la representación gráfica generada a través del alineamiento múltiple de las secuencias firma (Figura 17), en L1 se conservan 7/24 aminoácidos (29%), L2 7/22 aminoácidos (31%), L3 4/8 aminoácidos (50%) y L4 6/23 (26%) aminoácidos. Por lo tanto, el motivo L4 es el menos conservado entre las secuencias polipeptídicas de *C. hoffmannii*.

En este estudio, además de reconocer los patrones L1-L4, se incluyó la identificación de la región C-terminal, ya que el rol que cumple esta región en las lacasas de Ascomycetos y Basidiomicetos ha sido ampliamente reportado. En el caso de las secuencias de este estudio (Figura 16), solo las proteínas Lac3 (AUS45857.1) y Lac4 (AUS45849.1) presentaron la región C-terminal que caracteriza a las lacasas (Tabla 26 Anexos).

```

AUS45860.1/ 1 -----MASQLEI SEPEDGSP I QPSKSAFVMSNRRRMI L I SVL - -LVAFIFPI I LVLALTV-PSATASNKAARNG I LSYARLAPSRL -LPG-----LDDPTIPT---IP 92
AUS45857.1/ 1 -----MKFF- -PVSI VALFTFFSSIAWK AAPSFFKELDARAS-----TCN--TP 40
AUS45849.1/ 1 -----MGFFKVVVTF I WELTSLTPGSLNPFSDYDGGDQPF LPFGHDPSPGPNPKPGTARLTFPVVDG I TSTVMCEYNLDP A WPEPCN -TP 84
AUS45848.1/ 1 -----MLSLLVAVCFI-----ACC--SY 16
AUS45844.1/ 1 MSQRHEDKSGHSGMQSSVPDTGSPFTEAKRS-----RTTLLI VGT- -IAVIVIALTLGLGLGL-GLRKHGASVSP TSPSSPFVPTGTLPG-----NGGSSAASG--LL 98
AUS45838.1/ 1 MSP-MLWMLWQAALV-----ACT--17

AUS45860.1/ 93 SD-- -KLVNT--EELSLNTSFVSS-TP--TVREYQFNI SQAYAA--PDGFRKL-MI LVNGQSPGL I EANAGDTRVRLVHNQLGNMSTSI IHWG I DQKNTVMMDGVTVGVTQCA I PP-GESFTYEFQLV 209
AUS45857.1/ 41 SNRACWT-----TGFDINTDYENTNT-PTTGVTRNYALT I TEVDNWTGPDGVVVKPKVMLVNG-----PTIFADWGDVRNI I TVTNLRLTNGTS I IHWGLRQFQSNLQDGGANGVTECP I ARPKGGSKVYSFMA- 158
AUS45849.1/ 85 ENRLCWLQNKQTGENY I TDYENTSLVPPG I VREFSLDWDVDTLLN--ADGFDRR- AQT YDGOVYGPQK I EACWGDTR I I NVTNKIMAGMGTTV I HWGVROLNTSNMDGVF I TQCP I AR-NHSFVYEFRM- 208
AUS45848.1/ 17 ASKTVY-----FSLTLTWEPAA-----PDGFRN- I IKMNGQFPQPELVVDQGDVEFLVWNNMA-NKTSVHFHG I EQNITPWSDDGVSGLTQRP I PP-GETFLYRMTA- 111
AUS45844.1/ 99 EE-- -WRLNP--ESYVLDTSMNWNA-AS--TTRYYNLVI SEGGQW--PDGVVRD-MLF I NGKFPGL I EVNRGDRLVVWVWNNLSKNSTTI I HWGLFQNGTIPFDGTAQVTOCG I PP-GRSLLYNYFTID 215
AUS45838.1/ 18 -----RHFDLTLTWEKAA-----PDG IQRD-MFK I NGQFPGLTELENGDDVVVVKV-NNLSPHNTM I HWG I EMLGTFWSDGVVGLTQNH I QP-GCKFTYRWKA- 108

AUS45860.1/ 210 DORGTFWYHAHTIMQYTDGLFGP I I I H-----DPDEHT--PEADDDQ I -LF I GDHYHKSSVLRASYLQSSSPWSPSPVPGVEPLPDNFLLNGQHTYDCTV-----301
AUS45857.1/ 159 TQYGTSWYHSHFSAQYGNQVYGT I Q I N-----GPASLP-----YDVLGVFPI TDYVYQADDLVEF-----TKNNG--APASDN I L I NGTNVHP-----236
AUS45849.1/ 209 YQYGLSWYHSYSLQYADGLAGP I L I Y-----GSSDT-- -WDLTPDP I MI ADWVHGSADFDEFANEK-----SLSRGLAK--TDS I VVNG I GNDP-----288
AUS45848.1/ 112 DEYGSYFYHAHEFSQ I VDGLFGP I YVRPAPGVTFFSL I STDPDELAALQKAE LNTRP I QFNTWHLTSSER I EYV-----ALNSGLDTFCANSML I NGKGS I CLS-- -OAE I NAN I SPVVVQLAG 230
AUS45844.1/ 216 NQFST I WYHSHYGTQYLDGVLGPLVWH-----APEADARK I YQDERV-AL I QDWYHDFSTVNLGNL I V-----VPDNSESEPLPDNGL I NGNFYFNCSL-----303
AUS45838.1/ 109 TGHGSFYHAHTQSQVNDGLYGA I L I VHPAGDKASSYEL I ANGSRLSA I KKAKEHR I PLLSDWRHVTSMDWEAS-----SQTGMETPCFDS I LVNKGKGVQCSSKDEQSK I L SDEQKA I LGL I PG 230

AUS45860.1/ 302 -----NSTWPAASRSDSCTG-----GVL S V I HVK-- -PNATATRL-RL I NHSTFFSFWFS I DNHTLTT I E I DGVVEVPI PDQRVY I NVGQRYSVLVPSL--PAGGGEGGSYTMRA 401
AUS45857.1/ 237 -----TTGV-----GKYANVTLT--PG-KRHRRL-RI I NTSVENHFQVSLVNHSMTV I AADMVFNAYITTD-LFLVGQRYDVT I-----DASKAYQYDVT I-----236
AUS45849.1/ 289 -----FNTTRV-----KQYSVTPFE-- -PK-KRHRRL-RL I NASAGTSYVFS I DGHS LTV I AADFVSVKPFVTKS-LV I G I GORYTVVVTGLDDPLAGGSGNKYWI RT 379
AUS45848.1/ 231 MDYS I GCLPAP I--ASAGFPFN I SGLPDGVFAGCHPSTGDEVLVVD--PADNYARF-DLHA I GGLAN- I FS I DEHSLPVTVA I DGRWVTPTTADA- I LMNSGQRYSVV I-----KLDKPPASNYTFRS 346
AUS45844.1/ 304 -----YSSDSGRTCFDN-----NTYS I FTLD-- -PN-TRTRV-RL I NTGFAEFQLSVNDHSLV I ETDGTLVNPYSVHR-LP I HVAQRYSVVLT-- -TNQSTSNYWLRA 395
AUS45838.1/ 231 AELTDKSLPPEV I AAFAPSPDFGA I PKDFFYGCNATRGSTE I I S L TQENPEDETWMFDL I GAFASATAGVS I DHEL I MYV I AADGND I EPRAVHS-LL I NGERYTVL I-----HLQPK-KYNLVR 352

AUS45860.1/ 402 TLPQTCFVPCPYLSSGLQS-- I GYEA-VGLFSY--PSSPSSSPN I LGSRGNTNTPYGAATNPFGRPLWEGCDDMPFSTPVLRSR--PA-----VNVS-GDNS-----HEVTRF-- -QQVGEVNR I F I 511
AUS45857.1/ 320 TLPNPP-----FCGTSNN--Q-FPA--AVFHY--AGA-SGGLPTARGT-----PPVD-----TLCYDN I D--LVPVVSRTASPG-----NFNPSPNNS-----LPVHLDTT-- -GSPLEFWQ I 404
AUS45849.1/ 380 HPADGDCNTRFGVNSQSSPAE I -FD I RTAY I QYSTATG-GSAPPSVQLSN-----EPC-D-----KTCADVTMR-LEPVVEW-T I PS-----TPLNN I TESRFLPAFQSANDELGEAGNYTHMML 486
AUS45848.1/ 347 VSGD I A-----Q I -M-QST--GVLAY--SNAKNC SAPVNS-----PSVT-----LGGT NATADTVF LDET K-AKPF-----PPVA-PSME-----VDDTFL LHYVDNAGASWRWK I 428
AUS45844.1/ 396 AMNTFC-----FTGDNPV--L-DPTTLAVVSY--SGN-NT I APAANS I -DWKDAY-D-----VVCEDLDPSTLPVSRVSRVPPPA-----TTL-----YRVDFSG I G-AYQLDYAKV 484
AUS45838.1/ 353 SVAAS-----Q I -L-WGT--A I VDFKMQGQPSQSDSPV-----PY I N-----EVGSNTTSGV I FFDV D N-TKPY-----PPQP-IPET-----VDATYKMTML I GSEA I YWAL 435

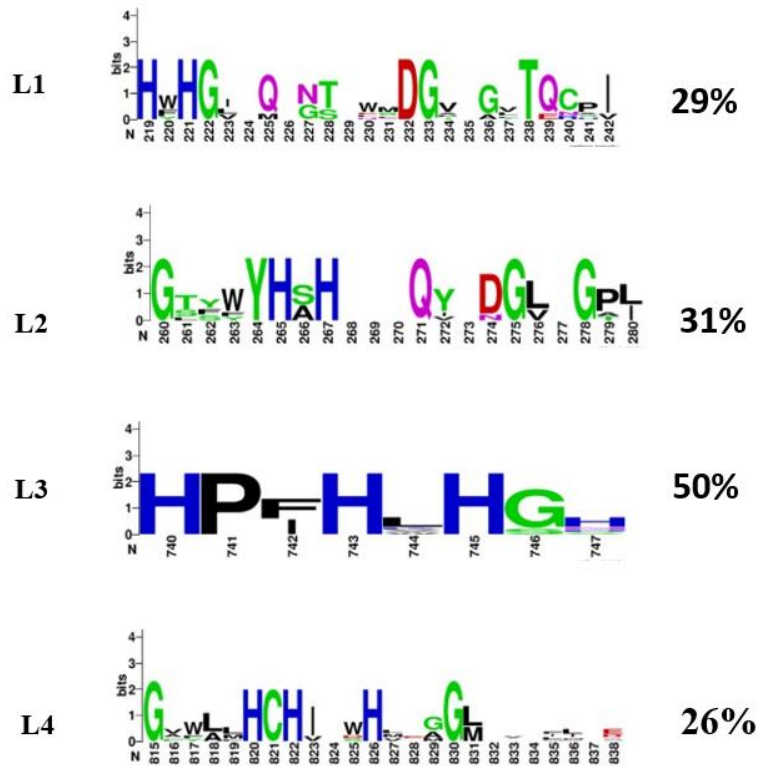
AUS45860.1/ 512 NRTSWSPFRDDAT I--WKTAVDEGFDVAAGGGSYSNFG--LRLDQQ I L--LLLPDRDMG-VQVA I NSR--DMM-----EHPFH L HGHSFQ I VA-- -WPGP-----EFEGGANRATTWNLD--N 609
AUS45857.1/ 405 NGSSI I NV D-----WNKPV--LQYV I EN--NTS--YPPSENI I -SVP-SNNQWSYWL I EN--VDAVFSLP I HPFH L HGHD I FLVLRSPVYASPAFPQTRYKFDPA I D--LALLKGN--N 502
AUS45849.1/ 487 R--LPPDVEQAAGREFHFRPLW--LDFG-KPTLLDPAGAI--ADRNYYVNYTYP-TNEGY I FMV I DAREFLPLNDSTVFPVA I P I HWGSDVA I LG--QNTT-----AFDPLTS-PGFTALD--N 594
AUS45848.1/ 429 GNEFPI I NLGTT-----ATP-----LLFDPT-----VFS--NKPN--L--T I SNKNGSWDVL I QPL-----AP I--SPA I HKHSNKFFVVG--AGTGVWNYSSVAEAAEVLPPGTFNFV--D 521
AUS45844.1/ 485 NGTWPAMGNNTTL-----IEAVDG-LGGADGDRFG I TGQVGAFEANQVY--GVSNSVVDV L I YSL--DEG-----SHPFH L HGHFQ I WLQ--TSGSGLDWK--NYYSE I M-PSKADAV-GN 590
AUS45838.1/ 436 NQTLFPSTTED-----QTP-----LLFAPEP-----NRQDNHT I--T I P-SNNSWDY I MLVLP--GSG--PT I P I HWHGRHFVYLG--RGVGNFTWDTVEEASKAM-PGALNLV--D 525

AUS45860.1/ 610 PMRRD-----VTVPAQ-SHVY I RFVADNPGVWALHCHVGVWIMEGG I FVYTLLE I RPPDLRGLVAGMD--ERERSVGRGEEAEPA S LTLAPRFHAVTSSKPMMLCFP I AKDFD I L--KNATPVRLQKY- 726
AUS45857.1/ 503 PVRRDV-----AMLPK-GWL I AFKTDNPGAWLMHCH I AWVHSGG I SVDFLEGVSTLRNNLPPADKAA-FADNCNKWRA YFPAQDPFPK-----I DSG I-----KRDEGYL 597
AUS45849.1/ 595 PPRRDV-----V I VPAG-GWVAFAFRPDNPGG-----R VAGLALQMI VGGDD I LD-ALGQDA I DEIREECKWEEEDVAKGG I LPO-----D SG I-----671
AUS45848.1/ 522 PP I RDTFSTLAT I GEP-GWL VLYRQSVNPGAYLLHCH I QDHL YGGVMA I ALLDGVDFEPE-VPGEY-----LCNGFRGCAA-----KPGGK-----600
AUS45844.1/ 591 ALRRD-----LTIKPY-AWAL I RFVADNPGLWALHCH I AWVHMEAGLLMQFMSRADVLRKTS I PQD-----VRALCEQHAGY-----661
AUS45838.1/ 526 PPLRDTF-----ATLGAPDSWL V I RRRSDNPGVWLMHCH I QSHLGGG I VSY I QDGVGDLPE-VPGEY-----SSPRC-----591

AUS45860.1/ -
AUS45857.1/ 598 Y
AUS45849.1/ -
AUS45848.1/ -
AUS45844.1/ -
AUS45838.1/ -

```

**Figura 16.** Búsqueda de motivos conservados presentes en las zonas hipotéticas de *C. hoffmannii*. El número de acceso a cada secuencia se indica a la izquierda de la alineación. Los péptidos señales se indican en rojo. Los residuos conservados implicados en la unión del cobre se indican en rectángulos celestes y los números sobre ellos señalan el tipo de Cu al que se unen. Las regiones firmas de proteínas lacasas se resaltan en: L1 (verde oscuro), L2 (morado), L3 (café) y L4 (rosado). Los aminoácidos limitados en el rectángulo negro permiten clasificar las lacasas como clase 1 (Met), clase 2 (Leu) o clase 3 (Phe). Los extremos C-terminales conservados se encuentran destacados en gris. El recuadro naranja señala la enzima que cumple con todos los parámetros analizado



**Figura 17.** Logotipo de las secuencias firmas de lacasas (L1-L2-L3-L4) proveniente del alineamiento múltiple de lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*. Los logotipos fueron generados usando WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

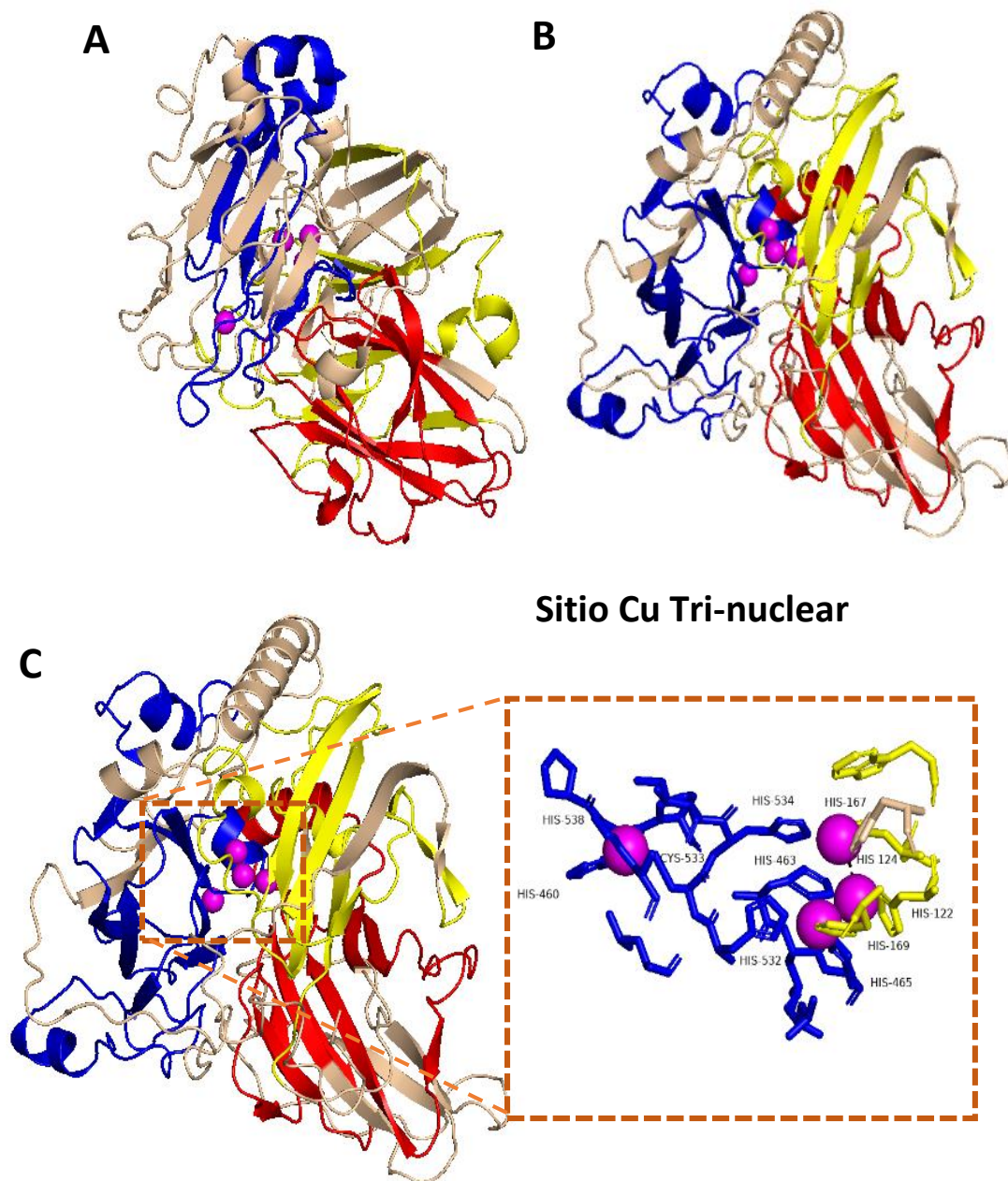
### 3.2.3 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas lacasas de *C. hoffmannii*.

Una vez terminado todos los análisis en cuanto a la estructura primaria de las secuencias polipeptídicas de *C. hoffmannii*, se escogió las enzimas que cumplieran con todos los criterios de selección previamente explicados. Por lo tanto, Lac3 (AUS45857.1) fue la única proteína de *C. hoffmannii* que presentó todos los dominios Cu-oxidasa, las secuencias firma L1-L4, los aminoácidos conservados que interactúan con los cobres 1-3 y la región C- terminal. Por todo ello, se realizó un modelamiento por homología de su estructura tridimensional, el modelo obtenido en SWISS-MODEL tuvo una puntuación GMQE de 0,86 que al ser un valor cercano a 1 indica un modelo confiable y una puntuación Z QMEAN de 0,20 que al ser cercano a 0 muestra

correspondencia entre la estructura del modelo y la estructura de otras proteínas nativas pertenecientes a la misma familia. La validación del modelo tridimensional de Lac3 fue realizado con PROCHECK y ProSa (Figura 24 Anexos), el análisis con PROCHECK indicó que solo el 0,2 % de los residuos se encuentran en regiones desfavorables dentro del gráfico de Ramachandran y estos residuos no se encuentran asociados al sitio activo de la Lac3. De igual forma, en ProSA se obtuvieron valores favorables con puntajes z de -8,29. Estos resultados permiten concluir que el modelo tridimensional de Lac3 visualizado en Pymol (Figura 18) presenta rangos de puntuación que se encuentran típicamente en proteínas nativas.

En la Figura 18 A se representa la estructura tridimensional de la lacasa de *Trametes versicolor* (PDB: 1kya), la cual es una enzima ampliamente estudiada y caracterizada. Mientras que, en la Figura 18 B, se representa el modelo tridimensional de Lac3 (AUS45857.1). Al reconocer y comparar estas dos estructuras se determina que ambas son cuproproteínas que comparten una estructura central común, donde se identifica los 3 dominios cupredoxina y un plegamiento tipo  $\beta$ -barril formado por alrededor de 7 hojas  $\beta$  antiparalelas que forman un plegamiento característico en esta clase de enzimas [103,149]. Además, en la Figura 18 C se identifica todos los aminoácidos que interactúan con los átomos de cobre y que son indispensable para la actividad catalítica de enzimas lacasas.

Además, bajo la premisa de que las secuencias de proteínas similares tienden a tener un pliegue similar y, a su vez, funciones biológicas parecidas, se realizó la superposición de la estructura tridimensional de *T. versicolor* (PDB: 1kya) con la enzima Lac3 de *C. hoffmannii* (Tabla 16). Los resultados permitieron obtener una puntuación TM de 0,80 el cual es un valor aceptable ya que se conoce que puntuaciones menores a 0,17 corresponden a proteínas no relacionadas, mientras que una puntuación superior a 0,5 indica proteínas semejantes [150].



**Figura 18.** Comparación de estructura de proteínas tridimensionales y sitio activo.

A: Estructura tridimensional de la lacasa de *Trametes versicolor* (PDB: 1kya). B: Estructura tridimensional de la Lac3 (AUS45857.1). Se representan los dominios multicobre oxidasa presentes en la proteína: Cu-oxidasa 3 (amarillo), Cu-oxidasa (rojo), Cu-oxidasa 2 (azul). C: Sitio activo de la proteína Lac3 señalando los residuos que interactúan con los ligandos de cobre.

**Tabla 16.** Evaluación de la similitud topológica entre las estructuras de las lacasas de *C. hoffmannii* y *T. versicolor*.

Proteína A	Proteína B	Puntaje-TM <sup>1</sup>
Lac3 (AUS45857.1)	Lacasa de <i>T. versicolor</i> (PDB: 1kya)	0,80748

1. TM-align (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align>)

### 3.3 Caracterización in silico y análisis filogenéticos de las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

Para el estudio de las dos peroxidasas de hemetiolato de *C. hoffmannii*, se comenzó identificando algunas de sus características (Tabla 17). Las peroxidasas de este estudio corresponden a proteínas con una longitud entre 440 a 478 aminoácidos, los puntos isoeléctricos predichos para las dos POAs hipotéticas varían, ya que la POA1 tiene un pI ácido y la POA2 un pI neutro.

En cuanto a la presencia de puentes disulfuro, los puntajes obtenidos indican una baja probabilidad de presencia de estos enlaces covalentes (Tabla 18).

**Tabla 17.** Características de peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

#	Proteína ID	Longitud (aa)	pI teórico <sup>a</sup>	Peso		Peptido Señal <sup>d</sup>	N-glicosilaciones	Presencia de puentes disulfuro <sup>e</sup>
				Molecular (kDa) <sup>(a)</sup>	LS1 b			
POA1	AUS45861.1	478	7.05	50.87	E	Si	2-N	Si
POA2	AUS45850.1	440	4.97	47.89	E	Si	2-N	Si



1. Localización subcelular de consenso: E, extracelular; T, transmembrana; I, intracelular
  - a) ExPASy - Compute pI / Mw Tool ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))
  - b) DeepLoc 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/>).
  - c) NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)
  - d) SignalP Versión 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
  - e) DiANNA 1.1 (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)

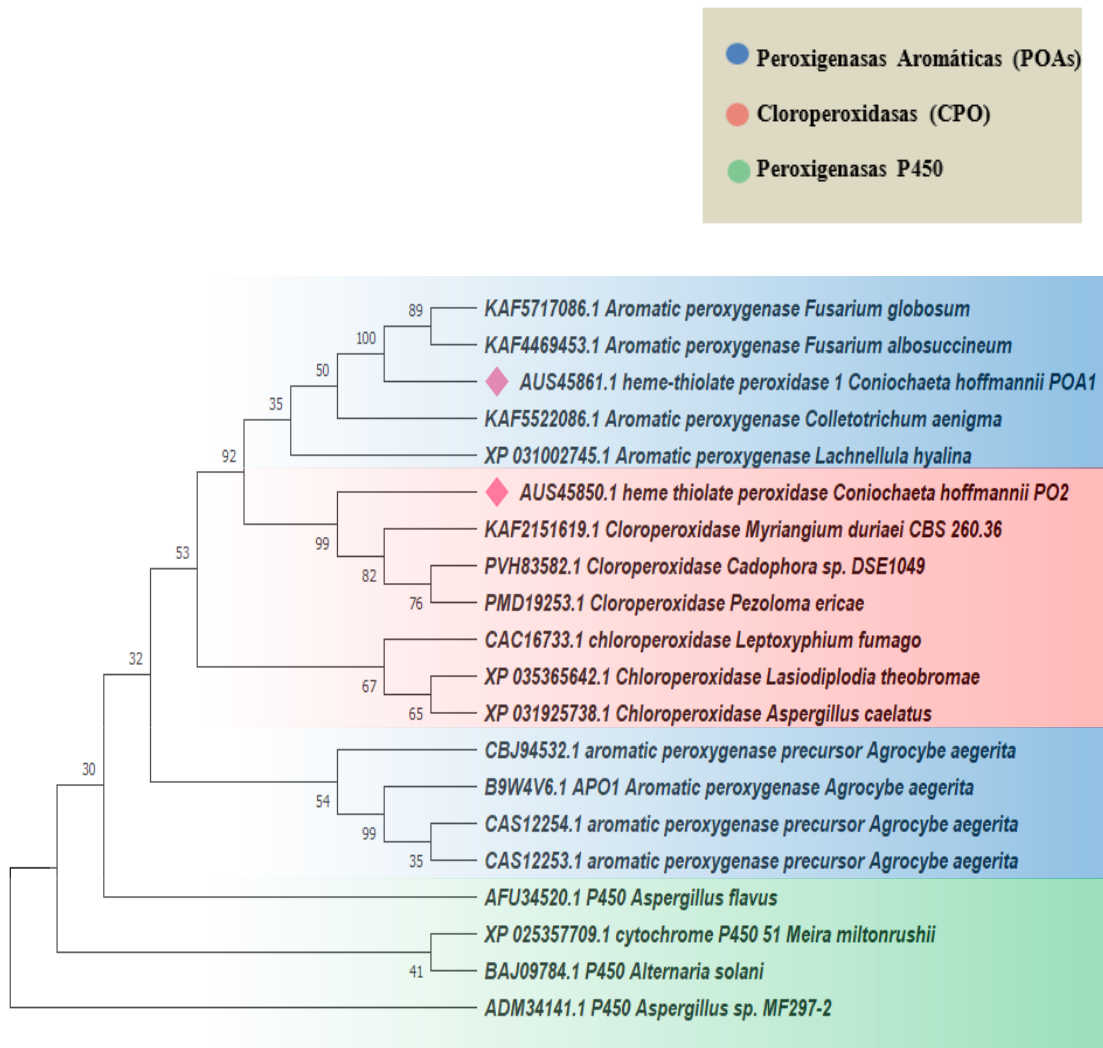
**Tabla 18.** Predicción de puentes disulfuro en las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

#	ID	Posición de la cisteína (pb)	Distancia (pb)	Puente disulfuro	Puntaje (s)
POA1	AUS45861.1	3-436	433	MRCSSLVA – YKALGCTVNF	0,01
		117-395	278	DQRGPCPLNT – PQAFSCFLYNA	0,01
POA2	AUS45850.1	9-435	426	LVALICLPLWV – FTNLGCSIPLT	0,03
		128-393	265	DIRGPCPLNA - PAGYTCLLYQF	0,02

1. El programa utilizado para la predicción de puentes disulfuro fue DiANNA 1.1 web server (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>)

### 3.3.1 Búsqueda de dominios y patrones asociados a peroxigenasas aromáticas

Con el objetivo de buscar relaciones evolutivas con otras POAs se generó un árbol filogenético basado en las secuencias de aminoácidos de distintas peroxidasas reportadas en la literatura científica (Ej. POAs, cloroperoxidasas, peroxigenasa P<sub>450</sub>) (Figura 19). El análisis filogenético indicó que la POA1 se agrupa en el mismo clúster con otras POAs reportadas en distintas especies fúngicas, mientras, que la enzima POA2 pareciera compartir mayor relación evolutiva con enzimas cloroperoxidasas (CPO). Es importante indicar que previo a la construcción del árbol filogenético, las secuencias de aminoácidos de las dos POAs hipotéticas de *C. hoffmannii* fueron alineadas de forma local con la herramienta BLASTp obteniendo relaciones de homología con distintas proteínas identificadas como hipotéticas (datos no mostrados). Esto es muy común pues a pesar de que muchas de estas enzimas se encuentran reconocidas en el genoma de varios hongos (Tabla 10), éstas carecen de una clasificación y anotación adecuadas para su análisis sistemático [138]. Por esta razón, se procedió directamente a tomar 20 secuencias de aminoácidos pertenecientes a la familia de proteínas peroxidasas y buscar relaciones evolutivas cercanas con las enzimas de este estudio. Además, se tomaron secuencias polipeptídicas aisladas del organismo modelo *Agrocybe aegerita*, ya que fue la primera POA caracterizada y considerada como una POA verdadera [151].



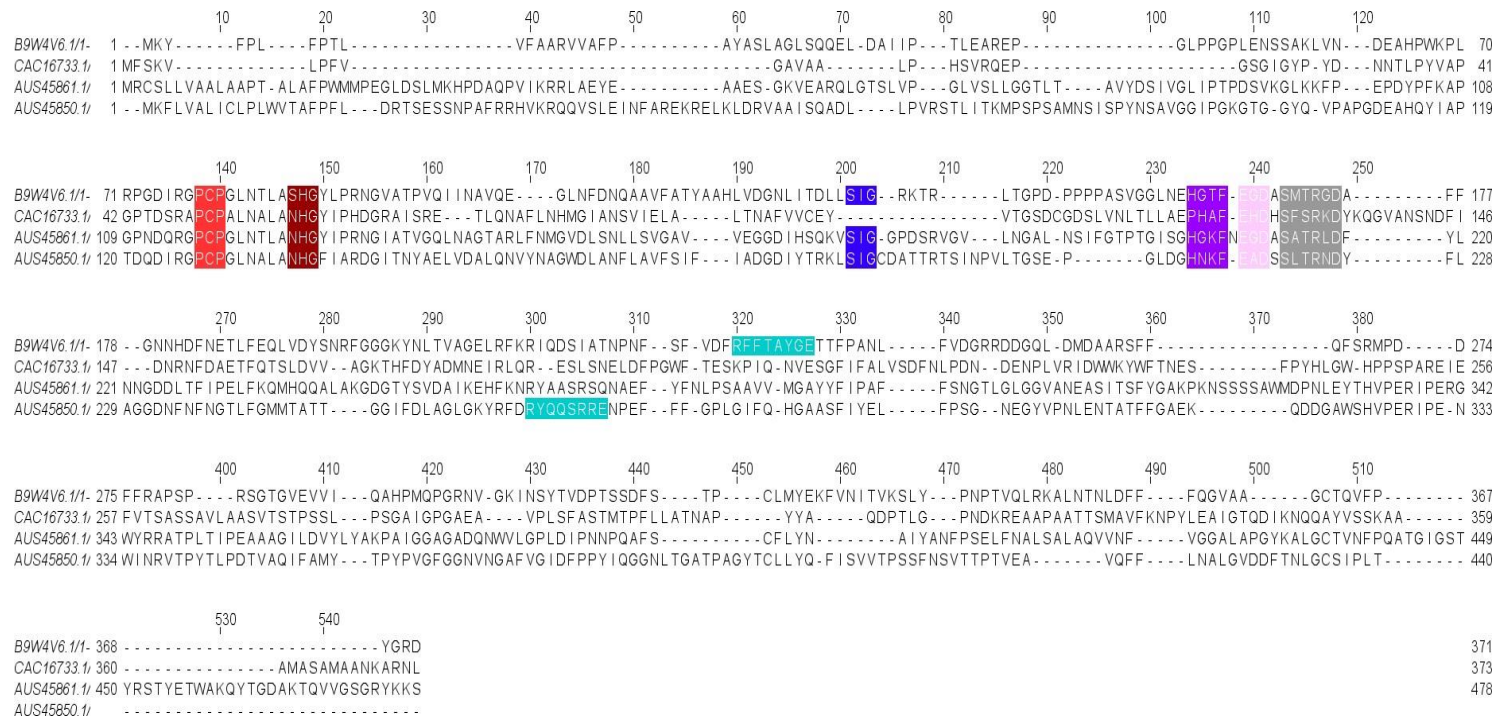
**Figura 19.** Árbol filogenético con secuencias de aminoácidos de distintas peroxigenasas aromáticas, cloroperoxidasas y proteínas del citocromo P450. Las peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. hoffmannii* se señalan con rombos rosados.

Posteriormente, se procedió a emplear la herramienta Pfam para la búsqueda de dominios proteicos presentes en las 2 POAs hipotéticas de *C. hoffmannii*. Donde se obtuvo que las dos proteínas presentan un dominio peroxidasa 2, el cual es típico para enzimas de la familia peroxidasa (EC 1.11) a la cual pertenecen estas enzimas (Tabla 19).

**Tabla 19.** Resultados de la búsqueda de dominios proteicos en POAs de *C. hoffmannii* con la base de datos de Pfam.

#	Proteína ID	Dominios	Posición Inicial	Posición	Bits	E-value
1	AUS45861.1	Peroxidasa 2	104	347	152.2	2.3e-44
2	AUS45850.1	Peroxidasa 2	114	337	163.4	8.2e-48

Con el objetivo de reconocer si efectivamente las proteínas de *C. hoffmannii* de este estudio presentan características asociadas a POAs, se analizaron sus estructuras primarias en búsqueda de motivos conservados que permitan diferenciarlas entre POAs y CPO. En el alineamiento múltiple que se muestra en la Figura 20 se incluye la POA de *A. aegerita* (B9W4V6.1), la CPO de *Leptoxyphium fumago* (CAC16733.1) y las dos POAs hipotéticas de *C. hoffmannii* (AUS45861.1-AUS45850.1). Entre estas secuencias, el primer motivo conservado que se identificó fue el patrón Prolina-Cisteína-Prolina (PCP), el cual se identificó tanto en enzimas POAs y CPOs. El segundo motivo conservado es clave para la diferenciación entre CPO y POAs el cual, para el caso de las POAs, corresponde al patrón Ácido glutámico-Glicina-Ácido aspártico (E-G-D) y para enzimas CPO se presenta con los aminoácidos Ácido glutámico-Histidina-Ácido aspártico (E-H-D).



**Figura 20.** Alineación múltiple de POAS hipotéticas de *C. hoffmannii* con secuencias de consenso.

La alineación se construyó con el programa MUSCLE. El número de acceso a cada secuencia se indica a la izquierda de la alineación; AUS45861.1 y AUS45850.1 corresponden a peroxidasa de hemetiolato de *C. hoffmannii* y las secuencias consenso B9W4V6.1 y CAC16733.1 a la peroxigenasa aromática de *Agrocybe aegerita* y la cloroperoxidasa de *Leptoxyphium fumago* respectivamente. Las zonas resaltadas muestran los motivos conservados responsables de las actividades catalíticas de las distintas subfamilias de peroxigenasas inespecíficas (peroxigenasas aromáticas) y cloroperoxidasas.

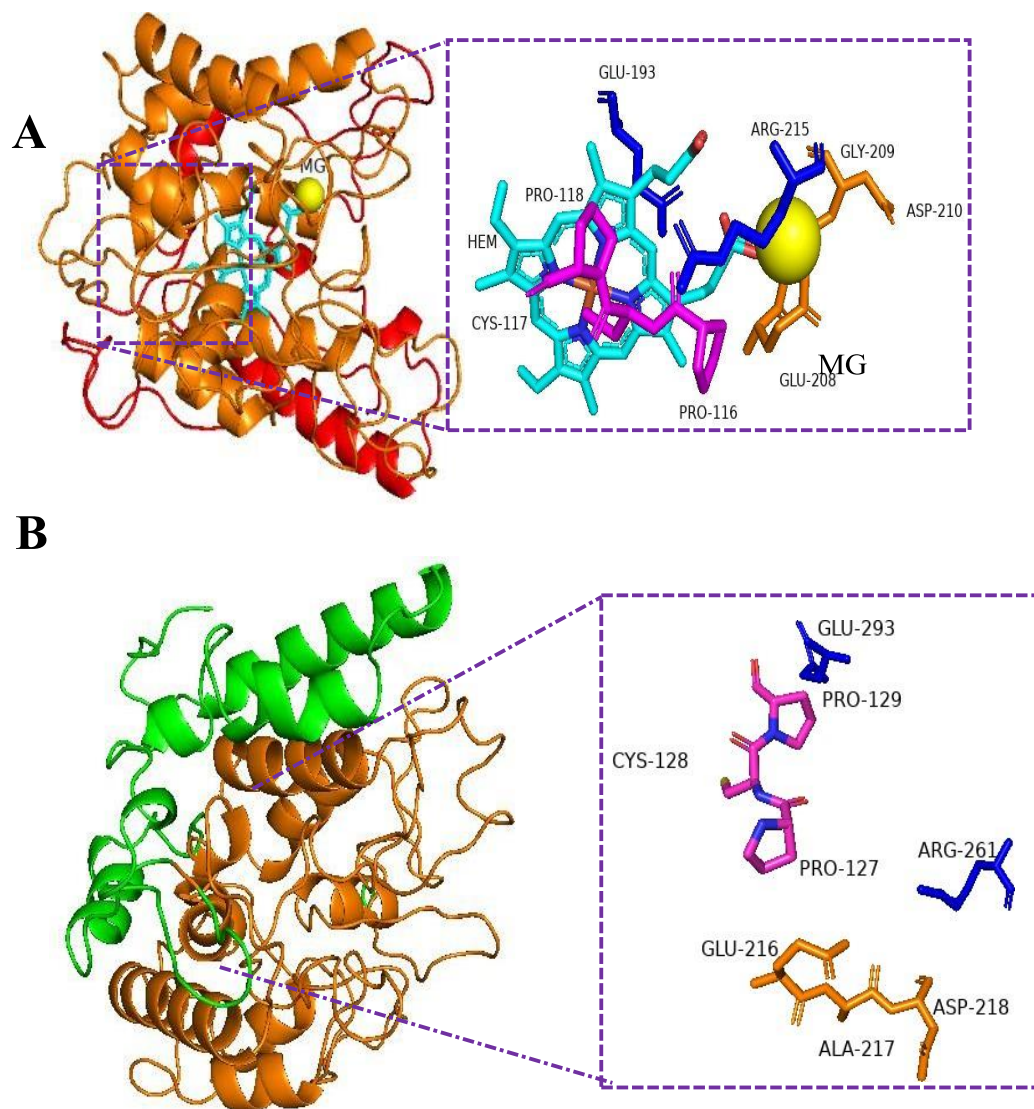
### 3.3.2 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas peroxidasas aromáticas de *C. hoffmannii*.

Una vez que se determinó que las dos peroxidasas de hemetiolato presentan motivos conservados característicos de las POA, el siguiente paso que se realizó fue el modelamiento de sus estructuras tridimensionales. En este caso, las dos enzimas fueron modeladas usando como templado la POA de *A. aegerita* (PDB: 2yp1.1A) con una resolución de 2,31 Å. El modelo 3D de la enzima hipotética POA1 obtenido en SWISS-MODEL obtuvo una puntuación GMQE de 0,46 y una puntuación Z QMEAN de -6,61. Mientras que para el modelo obtenido para la enzima POA2 se obtuvieron valores de GMQE 0,45 Y QMEAN > -6,67. En ambos casos, no se logró obtener modelos adecuados para las dos enzimas objeto de estudio. Esto indica una incertidumbre del modelo, que pudiera darse ya que las dos POAs de *C. hoffmannii* no presentan estructuras relacionadas con la base de datos de estructuras experimentales.

Para validar estos modelos, se llevaron a cabo análisis con los programas Procheck y Prosa (Figura 25-26 Anexos). En el caso del modelo de la POA1, se estima que solo el 1,2 % de los residuos se encuentran en regiones desfavorables y ninguno se relaciona con los motivos conservados esenciales para la actividad catalítica de estas enzimas. De igual forma, con el programa Prosa, se obtuvo un valor favorable de z de -5,27, el cual se localizó dentro del rango de puntuaciones que se encuentra típicamente para proteínas nativas de tamaño similar. Para el modelo 3D de la POA2 únicamente el 1,1% de los aminoácidos se encuentran en regiones desfavorables y el valor de z de -4.4 se agrupa en rangos típicos para otras proteínas. Por lo tanto, se tomaron como válidos los modelos y se analizaron a detalle en el programa PyMol.

En la Figura 21 A se observa la estructura tridimensional de la POA1 (AUS45861.1), en color naranja se señala el dominio peroxidasa 2 (Tabla 19) y el sitio activo con los cofactores ion  $Mg^{+2}$  el cual se encuentra cerca del grupo hemo. En la Figura 21 B se identifica la estructura tridimensional de la enzima POA2 (AUS45850.1) señalando el dominio peroxidasa 2 en naranja. A diferencia de la POA1 el modelo que se obtuvo no presentaba el cofactor  $Mg^{+2}$  y el grupo hemo. Sin embargo, al analizar

la estructura primaria y terciaria se logró encontrar los mismos aminoácidos asociados a la unión del hemo proximal (motivo PCP) y el sitio de unión distal para ion magnesio (EG/AD).



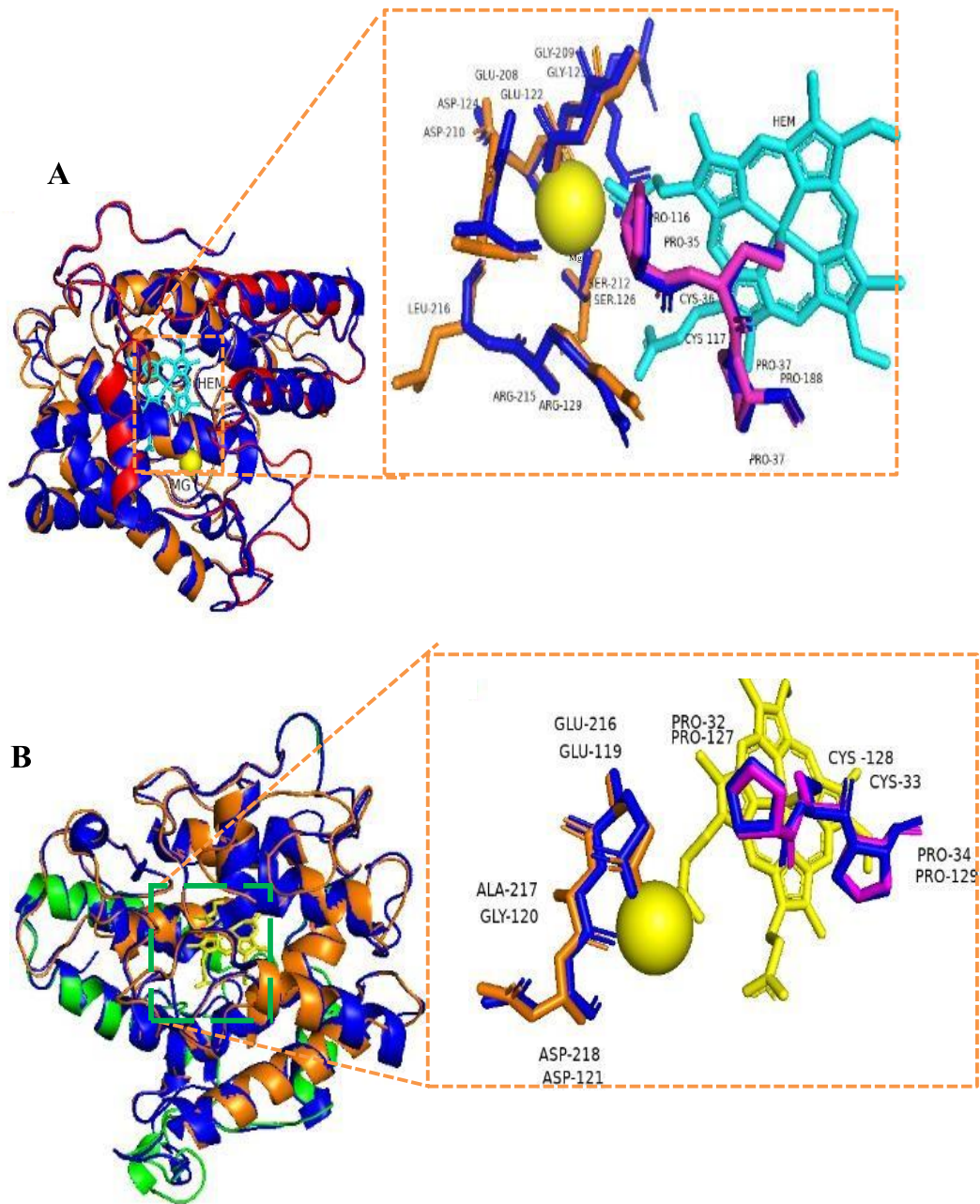
**Figura 21.** Estructura tridimensional de las POAs de *C. hoffmannii*.

A: Arreglo tridimensional de POA 1 (AUS45861.1), en color naranja se indica el dominio Peroxidasa 2 (PF01328) y el recuadro indica el sitio activo con magnesio y un grupo hemo como ligados. B: Estructura tridimensional de POA 2 (AUS45850.1), en color naranja se indica el dominio Peroxidasa 2 (PF01328).

Por último, con la finalidad de visualizar la similitud estructural con proteínas ya caracterizadas, se sobrepusieron las dos estructuras obtenidas por homología de *C. hoffmannii* con la estructura tridimensional modelo de *A. aegerita* (PDB: 2yp1.1A). En la Figura 22 A, se muestra el solapamiento con la POA1 (AUS45861.1) (en rojo y dominio peroxidasa 2 en naranja) se puede observar que en el sitio activo se identifican los aminoácidos conservados (PCP-EG/AD) en disposiciones espaciales similares. La similitud entre estas dos estructuras se corroboró calculando su puntaje TM que fue de 0,88, el cual al ser mayor a 0,5 indica que la POA1 y la POA de *A. aegerita* son estructuras homologas que pudieran presentar funciones similares (Tabla 20).

Adicionalmente para corroborar que efectivamente esta enzima no se relaciona con la CPO de *L. fumago* se calculó también su puntuación TM que fue 0,49 y que indicó que estas dos enzimas no pudieran considerarse como semejantes (Tabla 20). De igual forma en la Figura 22 B se muestra el solapamiento de la enzima hipotética POA2 y la POA de *A. aegerita* (PDB: 2yp1.1A). Esta imagen nos ayuda a corroborar lo mencionado anteriormente ya que al visualizar los ligandos provenientes del modelo 2yp1.1A es más sencillo identificar que la enzima POA2 efectivamente muestra los aminoácidos que interactúan con el ion magnesio y el grupo hemo. Además, los motivos conservados en los dos modelos se visualizan en una disposición espacial similar.





**Figura 22.** Solapamiento de la estructura tridimensional de la POAs hipotética con la POA modelo de *Agroclybe aegerita*.

A: Sobreposición entre las enzimas POA1 (AUS45861.1) (rojo) y su dominio peroxidasa 2 (naranja) con la peroxigenasa aromática de *A. aegerita* (PDB: 2yp1.1A) (azul). B: Sobreposición de la enzima hipotética POA2 (AUS45850.1) (verde) y su dominio Peroxidasa 2 (naranja) con la peroxigenasa aromática de *A. aegerita* (azul) (PDB: 2yp1.1A).

**Tabla 20.** Evaluación de la similitud topológica entre las estructuras de las POAs hipotéticas de *C. hoffmannii* con la enzima de *A. aegerita* y *Leptoxyphium fumago*.

Proteína A	Proteína B	Puntaje-TM <sup>1</sup>
POA 1 (AUS45861.1)	POA <i>A. aegerita</i> (PDB: 2yp1.1A)	0.88133
POA 1 (AUS45861.1)	CPO <i>L. fumago</i> (PDB: 2CPO)	0.49146
POA2 (AUS45850.1)	POA <i>A. aegerita</i> (PDB: 2yp1.1A)	0.88450
POA2 (AUS45850.1)	CPO <i>L. fumago</i> (PDB: 2CPO)	0.53114

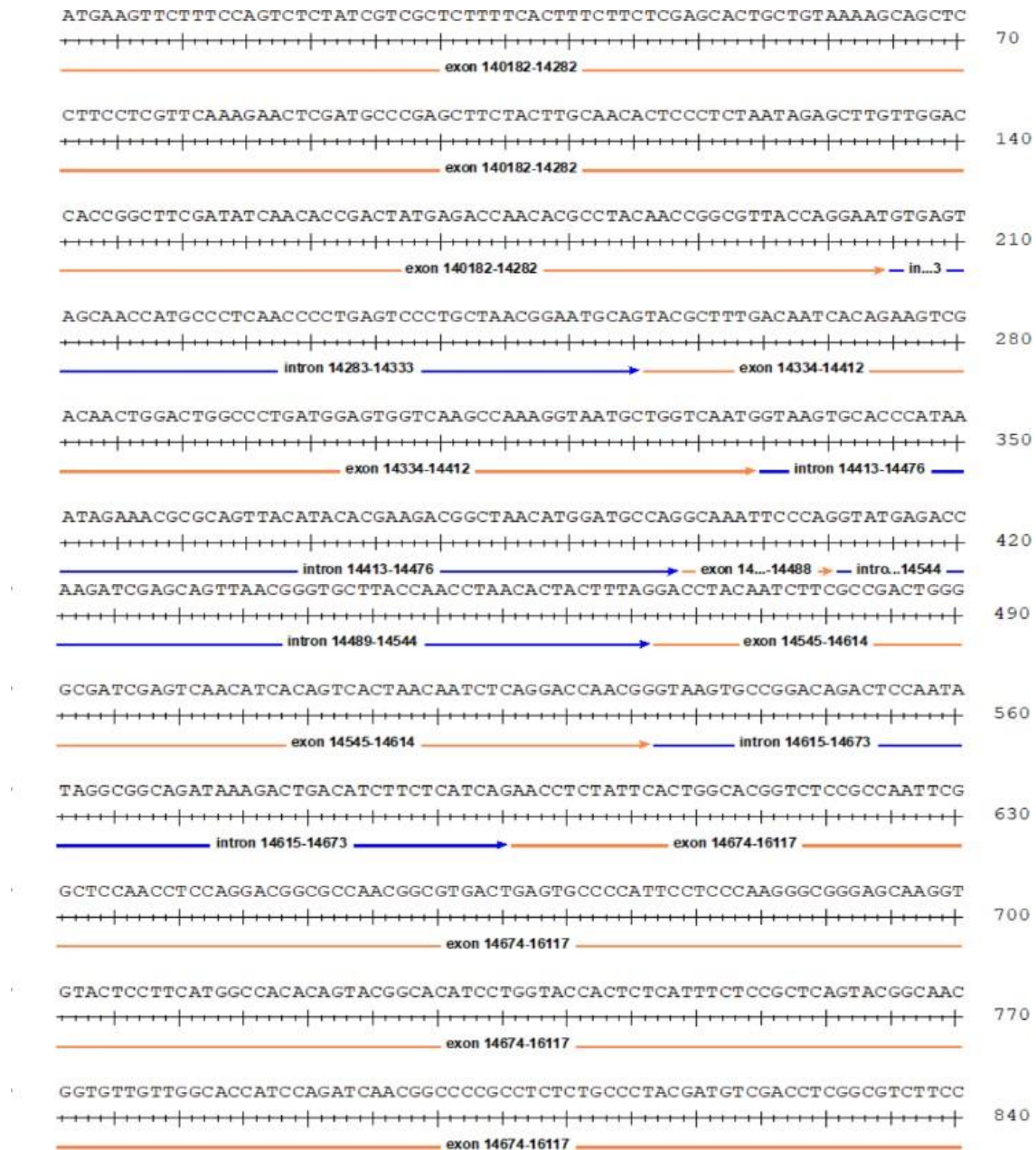
1. TM-align (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align>)

### 3.4 Identificación de los genes que codifican para las proteínas lacasas y peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. Hoffmannii*.

Una vez que se caracterizó a fondo las proteínas hipotéticas de este estudio, se procedió a analizar los genes que codifican para las 6 lacasas y las 2 POAs en *C. hoffmannii*. Esto, con el objetivo de reconocer características como la longitud del gen, contenido de G+C y posición de las secuencias codificantes y no codificantes (exones e intrones). Dicha información será de gran utilidad en futuros proyectos enfocados en la sobre-expresión heteróloga de estas proteínas para aplicaciones en procesos de micorremediación.

**Tabla 21.** Características de los genes que codifican las lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

#	Proteína ID	Longitud (pb)	Dirección en el genoma	Número de intrones	Contenido G+C (%)
Lac2	AUS45860.1	2178	Forward	3	61
Lac3	AUS45857.1	1809	Forward	4	61
Lac4	AUS45849.1	2016	Reverse	5	62
Lac5	AUS45848.1	1803	Forward	2	60
Lac6	AUS45844.1	1986	Reverse	5	55
Lac7	AUS45838.1	1776	Forward	2	55



**Figura 23.** Distribución de exones e intrones en el gen que codifica a la lacasa hipotética Lac3 (AUS45857.1) de *C. hoffmannii*. Las líneas naranjas representan los exones y líneas azules intrones

**Tabla 22.** Características de los genes que codifican POAs hipotéticas de *C. hoffmannii*.

#	Proteína ID	Longitud (pb)	Dirección en el genoma	Número de intrones	Contenido G+C (%)
1	AUS45861.1	1437	Reverse	3	63
2	AUS45850.1	1320	Forward	5	53

## CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento e identificación molecular de hongos aislados de la cantera de Pungarayacu

La zona de estudio de este trabajo de investigación fue la cantera de Pungarayacu ubicada en la Provincia de Napo en Ecuador. Esta cantera presenta una estructura de minería a campo abierto formada por roca arenisca impregnada con bitumen. Desde hace más de 60 años y hasta la actualidad, de este lugar, se obtiene material asfáltico para utilizarlo en la construcción de las carreteras del sector. El asfalto natural que aflora de las rocas presenta varias características que son de provecho para los objetivos de esta investigación. Pues se trata de crudo no convencional del tipo extrapesado con una densidad API de 5.5 que contiene 40 % de compuestos aromáticos, 32.50 % de naftenos y 26.71% de parafinas. Además, posee 38.30 ppm de vanadio, 243 ppm de níquel y 3.29 % de azufre [120]. Lo que implica que los hongos capaces de sobrevivir bajo estas condiciones deberían poseer un sistema enzimático robusto que les permita catabolizar moléculas complejas como los asfaltenos que se encuentran en grandes concentraciones en crudos extrapesados. Así mismo, que permita catabolizar heteroátomos como el azufre y metales pesados. La importancia de investigar complejos enzimáticos de origen fúngico asociados a la degradación de asfaltenos radica en el hecho de que el mercado de la explotación de crudos no convencionales ha aumentado en los últimos años. Lo que implica que fracciones recalcitrantes como los asfaltenos pudieran encontrarse en mayor proporción en suelos contaminados por la industria petrolera en zonas de alta fragilidad y diversidad biológica, como la región Amazónica. Por lo tanto, existe la creciente necesidad de desarrollar proyectos de investigación centrados en la micorremediación de suelos contaminados con crudos recalcitrantes en la Amazonia ecuatoriana, contribuir a la restauración ambiental y a la dignificación de las comunidades indígenas establecidas en las zonas impactadas.

Con base en esta premisa, y con el objetivo de aislar hongos extremófilos hidrocarbonoclasticos, se tomaron muestras de asfalto natural de la Cantera de Pungarayacu y se aislaron 6 cepas fúngicas que se encuentran filogenéticamente relacionadas con especies recientemente reportadas en el GenBank del NCBI.

Como se mencionó anteriormente, la cepa B presentó un porcentaje de identidad bajo con la especie *C. hoffmannii*, que no permite concluir relaciones filogenéticas a nivel de especie. Sin embargo, considerando la relación evolutiva obtenida en la Figura 14 y dado que *C. hoffmannii* es el único organismo del cual se disponía su genoma, se decidió continuar el presente trabajo de investigación asumiendo que la cepa B aislada de muestras de asfalto de la cantera de Pungarayacu corresponde a la especie *C. hoffmannii*.

De acuerdo con la filogenia obtenida (Figura 14), todas las cepas fueron clasificadas dentro del filo Ascomycetos y distribuidas en cuatro familias. Se identifica a la familia Nectriaceae con las especies *Fusarium croci* y *Fusarium waltergamsii* y *Xenoacremonium* sp.

La cepa *F. croci*, antes denominada como *Neocosmospora croci* [152], es un hongo aislado por primera vez en Italia en el año 2018, proveniente de muestras de ramas y troncos de la especie *Citrus sinensis* que presentaban signos de infección fúngica [138]. Este primer reporte que describe a *F. croci* como una nueva especie es el único trabajo que se ha publicado hasta la actualidad, donde se menciona que esta cepa saprófita presenta grandes similitudes morfológicas con el complejo de especies de *Neocosmospora (Fusarium) solani*. No obstante, se reconoce como una especie distinta ya que presenta tasas de crecimiento lentas en medios artificiales, conidióforos reducidos y una pigmentación rojiza cuando se incubaba en PDA a 36 °C [138]. Esta es la única información que se dispone de la especie y no se han descrito estudios a nivel de caracterización enzimática o su potencial biotecnológico.

En cuanto a la especie *Fusarium waltergamsii*, también denominada *Neocosmospora gamsii* [152], es un hongo filamentoso aislado principalmente de muestras clínicas humanas y reconocido por ser uno de los muchos genotipos provenientes de pacientes con brotes de queratitis en los EE. UU [153]. El primer reporte de su aislamiento fue en el año 2018 a partir de muestras clínicas humanas de ojos y de líquido de lavado broncoalveolar. Desde un punto de vista morfológico, esta especie se caracteriza por presentar conidios esporodocarios largos, delgados y muy septados (hasta 7 septos) [153]. En el trabajo de [154] se menciona que la especie *N. gamsii* se encuentra involucrada en casos de fusariosis humana y de acuerdo a estudios de susceptibilidad fúngica, la anfotericina B tuvo una baja actividad en esta cepa (concentración mínima inhibitoria: 32 µg mL<sup>-1</sup>).

Es interesante mencionar que, aunque clásicamente los taxones de *Neocosmospora* se asocian a infecciones clínicas, existen especies como *N. petroliphila* que son patógenos humanos y vegetales [155]. Sin embargo, este tipo de investigación no se ha realizado en *N. gamsii*. Por último, en la familia Nectriaceae se incluye a la especie *Xenoacremonium* sp. que, a diferencia de las otras cepas mencionadas, esta no formó un clado específico a nivel de especie (Figura 14), lo que sugiere que podría tratarse de una nueva especie.

Otra familia identificada es la Hypocreaceae que incluye a la cepa E estrechamente relacionada con la especie *T. yunnanense* (Figura 14), la cual está representada por una única cepa aislada en China a partir de muestras de la rizosfera del tabaco [156]. En cuanto al potencial biotecnológico de esta especie (Tabla 18), en el trabajo de [144] se reporta la capacidad de inhibición de *T. yunnanense* contra dos fitopatógenos importantes como *Phytophthora capsici* y *Colletotrichum gloeosporioides*, donde se indica un porcentaje de inhibición en el crecimiento de estos fitopatógenos de un 10.39 % y 16.37 %, respectivamente. Estas características pudieran aprovecharse para generar estrategias de control biológico basadas con el objetivo de combatir infecciones en importantes cultivos comerciales como el de los pimientos, papayas, pitahaya, rosas, entre otros. De igual forma, en la investigación realizada por [149] se concluyó que los metabolitos secundarios obtenidos de *T. yunnanense* y *T. harzianum* a una concentración de 50 y 25% presentan un efecto total inhibitorio (100 %) en el crecimiento del micelio de *V. inaequalis*, el cual es un hongo que genera grandes pérdidas económicas de hasta cerca del 100 % en la producción de manzanas. Así mismo, la actividad antifúngica de *T. yunnanense* podría aprovecharse para crear alternativas sustentables para el control biológico de distintas plagas. Otra aplicación que ha sido explorada en esta especie es la producción de ácido indolacético, la cual es una clase de auxina que promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas. La especie *T. yunnanense* puede producir 7.82 µg/ml de ácido indolacético por mililitro de medio de cultivo. Esta capacidad para producir hormonas que estimulen el crecimiento de plantas es una característica propia del género *Trichoderma* y que puede ser aprovechada en el sector agrícola a través de relaciones simbióticas hongo-planta huésped [157]. Por lo tanto, la especie de *T. yunnanense* presenta un enorme potencial para el área de seguridad alimentaria que aún necesitan ser estudiada a nivel molecular y enzimático.



La tercera familia corresponde a la Aspergillaceae con la cepa F que guarda una relación filogenética con la especie *Penicillium amphipolaria*. Esta especie fue aislada en 2016 por [196] donde se presentaron 15 nuevas especies de *Penicillium* provenientes de diferentes partes del mundo. Aquí se describe que dentro de las 15 especies analizadas *P. amphipolaria* fue el único productor de fusaperazina E, fumitremorgin B y varios metabolitos relacionados no caracterizados. En cuanto a su morfología se puede distinguir fácilmente de sus parientes cercanos por su escaso crecimiento en CYA a 37 °C y su patrón complejo de ramificación de conidióforos. En cuanto a su potencial biotecnológico (Tabla 12) se ha reportado a la cepa *P. amphipolaria* KAS 2555 aislada en el año 2020 en el suelo superficial de un manglar detritus localizado en India, como un productor eficiente de enzimas inulinasas [145]. Dichas enzimas hidrolizan el polímero inulina liberando monómeros de fructosa y glucosa que pueden ser aprovechados para la elaboración de jarabes de fructosa puro, biocombustibles y fructooligosacáridos. En este mismo trabajo, se menciona que esta especie mejora su producción de inulinasas en condiciones de fermentación sólida, empleando caña de azúcar como sustrato. Por lo que en una siguiente fase de investigación debería centrarse en estrategias para la producción a gran escala de esta enzima de alto valor nutracéutico [145].

Por último, se reconoce a la familia Coniochaetaceae que incluye la cepa B filogenéticamente cercana a *Coniochaeta hoffmannii* también conocida como *Lecythophora hoffmannii*. Este hongo levaduriforme pertenece al Phylum Ascomycota y es reconocido por ser un hongo xilógafo de pudrición blanda, patógeno vegetal facultativo y en casos inusuales asociado a micosis oportunista en humanos [128,147,158]. Una de las principales características que se ha estudiado es su capacidad de metabolizar distintos compuestos aromáticos de bajo peso molecular asociados al proceso de descomposición de la madera, incluso se reconoce como uno de los pocos agentes fúngicos capaz de descomponer madera protegida con conservantes. En el trabajo de [158] se reporta nueve compuestos fenólicos metabolizados por este hongo, donde se destacan el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vanílico y la vainillina que se reconocen como metabolitos putativos de la degradación de lignina. Además, se ha descrito que las rutas metabólicas son a través del ácido protocatecuico y la protocatecuato 3,4-dioxigenasa, respectivamente. Debido a su alto potencial lignocelulolítico, *C. hoffmannii* pudiera ser aprovechada en varias industrias, tales como la de fabricación del papel y tratamiento de materia prima en el proceso de producción de bioetanol.

Es interesante destacar que *C. hoffmannii* pudiera considerarse como un agente infeccioso emergente. Pues se ha informado el primer caso de sinusitis crónica causada por esta especie en un paciente inmunodeprimido, donde este hongo fue aislado a partir de lavados senos paranasales. Una de los aspectos más importantes de mencionar es que en este estudio se reporta que *C. hoffmannii* mostró resistencia a distintos antifúngicos como: anfotericina B, flucitosina, ketoconazol y fluconazol, lo que dificulta el tratamiento de infecciones causadas por esta especie [147]. Asimismo, se ha reportado un caso de infección de *C. hoffmannii* en un hospedero canino, el cual constituyó el primer caso de osteomielitis asociado a esta especie que condujo al desarrollo de una infección sistémica en un animal en Japón [159]. De manera tal, se debería presentar mayor atención a la resistencia a los antifúngicos y el potencial peligro de infecciones causadas por esta especie.

A pesar de esto, *C. hoffmannii* ha sido mayormente descrito como un microorganismo degradador de lignocelulosa y compuestos aromáticos, pero no se le ha prestado atención al potencial que pudiera tener esta especie en distintas industrias. El único trabajo al respecto es la investigación realizada por [142], donde se sugiere el uso de *C. hoffmannii* para la producción eficiente de biodiesel (Tabla 12). Dicho estudio propone que los lípidos de los hongos pudieran reemplazar el uso de biomasa vegetal para la producción de biodiesel, pues presentan una composición de ácidos grasos similar al de los aceites vegetales. En el caso de *C. hoffmannii* luego de estandarizar varias condiciones de cultivo como: pH, temperatura, tipo de sustrato, entre otras, se obtuvo la mayor acumulación de lípidos luego de 48 h de incubación en una concentración de 52 % a pH 4 en presencia de orujo de zanahoria al 10 % y suero de queso 0.5 g/L. Este es el único informe que se centra en el potencial de *C. hoffmannii* en la industria de los biocombustibles.

Es importante mencionar que de todas las relaciones filogenéticas establecidas (Figura 14), la especie *C. hoffmannii* es la única de la cual se dispone su genoma (Tabla 12). Esta es la principal razón por la que todos los análisis *in silico* realizados se centran en esta especie. El genoma de *C. hoffmannii* fue secuenciado en el año 2018 a partir de la cepa aislada por el Instituto de Biodiversidad Fúngica Westerdijk (CBS, Utrecht, Países Bajos). El genoma se secuenció a través de la tecnología de IonTorrent y corresponde al segundo genoma disponible de este género, el cual se encuentra

depositado en GenBank con el número de acceso NXFW00000000.1. De acuerdo al borrador de la secuencia del genoma de esta especie realizado por [128], su longitud es de 30.8 Mb con 869 contigs y se predijo la presencia de 10,596 genes que codifican proteínas y 556 enzimas. No obstante, en la base de datos de NCBI solo se encuentran reportadas 37 proteínas con los números de acceso a GenBank: MG550044 a MG550081 y son estas proteínas las que se examinaron minuciosamente en los posteriores análisis.

#### 4.2 Caracterización de genes y proteínas asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas)

De acuerdo a la información disponible en NCBI se han anotado 37 proteínas provenientes de *C. hoffmannii*, muchas de ellas sin una identificación clara de la familia de proteínas a la que pertenecen (Tabla 24 Anexos). Por consiguiente, y con el objetivo de caracterizar funcionalmente genes y proteínas asociadas a procesos de micorremediación, la primera fase de esta investigación fue analizar en detalle cada una de las proteínas disponibles, considerandorelaciones de homología y modelamiento 3D para inferir relaciones estructura-función. Es así que se concluyó que, de las 37 proteínas descritas en el NCBI, 7 se asociaban a multicobre oxidasas y 2 peroxidasas de hemetiolato, siendo el resto identificadas como xilanasas y celulasas. Dado que el objetivo de este trabajo es conocer el posible potencial hidrocarbonoclástico de *C. hoffmannii*, se seleccionaron multicobre oxidasas y peroxidasas de hemetiolato como proteínas objeto de estudio. Debido a su versatilidad de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos y no fenólicos que facilita su recuperación.

##### 4.2.1 Caracterización *in silico* de las lacasas hipotéticas de *C. hoffmannii*.

Con el objetivo de caracterizar las 7 multicobre oxidasas (AUS45867.1, AUS45860.1, AUS45857.1, AUS45849.1, AUS45848.1, AUS45844.1, AUS45838.1), se emplearon varias herramientas bioinformáticas indicadas en la sección de materiales y métodos (Tabla 23), lo cuales permitieron analizar varios parámetros estructurales esenciales que caracterizan a estas proteínas.

Se identificaron 3 enzimas (Lac2, Lac4, Lac6) que presentaron tamaños entre 500 a 600 aminoácidos [103,149]. Sus pesos moleculares mostraron pesos superiores a los valores típicos que oscilan entre los 50 a 70 kDa (Tabla 13) [106], aunque lacasas con pesos mayores entre 70 a 80 kDa también han sido reportadas [109,157,160]. En cuanto al punto isoeléctrico, se observó que las proteínas de *C. hoffmannii* se encuentran en los rangos reportados para otros Ascomicetos [106,161].

La localización celular de las proteínas lacasa es uno de los aspectos que va determinar el tipo de actividad catalítica y la clase de sustratos con los que estas enzimas podrán interactuar. En este caso, dos de las enzimas de *C. hoffmannii* (AUS45860.1 y AUS45844.1) se predicen como enzimas no extracelulares (Tabla 13). A pesar de que se ha proporcionado información sobre la presencia y el potencial de lacasas intracelulares presentes en distintas especies de hongos [162,163], la mayoría de investigaciones sobre micorremediación se centran en lacasas fúngicas extracelulares. Ya que se sabe que juegan un papel importante en la degradación de compuestos hidrocarbonados, además, de que la ubicación extracelular de estas enzimas es una ventaja que pudiera aprovecharse para facilitar procesos de purificación, inmovilización y producción a gran escala [164]. Posteriormente, se identificó que las enzimas hipotéticas extracelulares presentan péptidos señales con una longitud de 18-20 aminoácidos los cuales se señalan en la Figura 16. Además, se predice de 4 a 10 N-glicosilaciones en estas lacasas hipotéticas (Tabla 19), lo que brinda una idea sobre la estabilidad catalítica que pudieran tener y su posible protección a la degradación proteolítica [103,109]. En este apartado, se reconoció que Lac1 (AUS45867.1) es la enzima extracelular con menos incidencia de glicosilaciones y probablemente con mayor vulnerabilidad a la degradación enzimática.

Por otro lado, también se clasificó las proteínas de acuerdo a la posición del ligando axial en su estructura primaria. Esta posición permite clasificar las enzimas lacasas en dos clases según su potencial de reducción, el cual se asocia con la energía requerida para remover un electrón del agente reductor [149]. La posición del ligando axial se encuentra ubicada 10 aminoácidos aguas abajo de la cisteína conservada que interactúa al cobre tipo 1 (Figura 16), el tipo de aminoácido hidrofóbico que se identifica en este lugar permite reconocer dos clases de enzimas [138,165]. Si la lacasa en esta posición tiene un aminoácido leucina (Leu) corresponde a la Clase 2 con un potencial de reducción alto de entre 700 a 800 mV, siendo típicas en los hongos Ascomicetos y Basidiomicetos [166]. Por el contrario, el potencial Redox disminuye a 500 mV cuando en esta posición se encuentra una metionina

(Met) y se categorizaron como lacasas Clase 1 [103,141]. La influencia que tiene esta posición de ligando axial en las lacasas fúngicas ha sido demostrado por [167] donde al realizar una mutación puntual en la lacasa del hongo *Trametes villosa* cambiando una Phe a Met resultó en una disminución significativa en el potencial de reducción de la proteína. Esto significaría que las lacasas hipotéticas Lac2, Lac5 y Lac7 podrían clasificarse como lacasas Clase 1 y éstas deberían poseer un potencial de reducción menor. Mientras que las enzimas Lac3, Lac4, Lac6, al ser de Clase 2, tendrían un potencial de reducción mucho mayor (Tabla 13).

Otra característica que se analizó en las 7 multicobre oxidadas fue la presencia de puentes disulfuro (Tabla 20), ya que estos forman enlaces covalentes que juegan un rol en la estabilidad estructural de las proteínas volviéndolas menos susceptibles a degradación enzimática [160]. De acuerdo a la información obtenida a través del servicio Web de DiANNA 1.1, la enzima Lac3 (AUS45857.1) de *C. hoffmannii* es la proteína con más cantidad de puentes disulfuro y con un mayor puntaje que se traduce a una alta probabilidad de la presencia de estos enlaces covalentes. En cambio, para la Lac6 (AUS45844.1) el programa no predijo la presencia de puentes disulfuro. Esta información nos brinda una idea sobre la arquitectura tridimensional de las lacasas hipotéticas de este estudio, pues debido a la fuerza de los enlaces covalente, la presencia de puentes disulfuro puede tener efectos sobre la vía de plegamiento y estructura molecular. Así mismo, la presencia de puentes disulfuro pudiera aumentar la existencia de estas enzimas en el medio extracelular [168–170].

#### 4.2.2 Búsqueda de dominios y patrones asociados a lacasas

Una vez que se determinó varias de las propiedades moleculares básicas de las 7 proteínas de *C. hoffmannii*, se emplearon distintos criterios de selección basados en características que son exclusivas para esta clase de enzimas. Esto, con el objetivo de confirmar si las 7 multicobre oxidadas pueden considerarse como lacasas hipotéticas. Es importante aclarar que el término “lacasas hipotéticas” se emplea ya que se asume su posible función empleando únicamente herramientas bioinformáticas.

El primer criterio de selección fue que las multicobre oxidasas de *C. hoffmannii* deberían presentar relaciones filogenéticas estrechas con otras lacasas fúngicas ya reportadas, pues eso indicaría que comparten ancestros en común entre ellas. Por lo cual, se construyó un árbol filogenético (Figura 15) utilizando varias secuencias aminoacídicas de diversas enzimas multicobre oxidasas (MCOs). Estas enzimas forman una familia multifacética que comprenden proteínas como: ferroxidasas (EC 1.16.3.1), ascorbato oxidasa (EC 1.10.3.3), y lacasas (EC1.10.3.2) [100,149]. Estas últimas, al ser enzimas muy versátiles, con una baja especificidad al sustrato y capaces de oxidar una amplia gama de compuestos fenólicos y no fenólicos, se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza [100,171], pudiéndose obtener lacasas provenientes de hongos, plantas, insectos, bacterias y líquenes, todas ellas con características particulares tanto en su estructura como en su actividad catalítica [172]. De tal manera, en la Figura 15 se representaron todas estas clases de enzimas, obteniendo que de las 7 proteínas de *C. hoffmannii*, 6 de ellas (Lac 2-3-4-5-6-7) se relacionan estrechamente con otras lacasas específicas de Ascomycetos, mientras que Lac1 fue la única en mostrar una relación cercana con la familia de enzimas ferroxidasas. Esta relación filogenética con otra clase de MCOs se tomó como criterio para descartar a Lac1 en los próximos análisis, pues la actividad enzimática principal de enzimas ferroxidasas se asocia a la oxidación de hierro II a hierro III, lo cual no presenta mayor ventaja en estrategias de biorremediación [98].

El segundo criterio de selección fue que las 6 secuencias polipeptídicas presentaran dominios proteicos propios de enzimas lacasas. Debido a la extensa información que se dispone sobre estas enzimas, es bien conocido que todas las lacasas sin importar su origen, estructuralmente están compuestas por tres dominios similares a cupredoxinas ordenados secuencialmente [173]. Estos tres dominios efectivamente fueron identificados en todas las lacasas hipotéticas (Tabla 15), en una ubicación secuencial donde el dominio 3 Cu-oxidasa se encontró en el extremo N-terminal, le seguía el dominio 1 Cu-oxidasa y por último el dominio 2 Cu-oxidasa en el extremo C-terminal. Es interesante reconocer que esta distribución de los dominios Cu-oxidasa es típico de lacasas de Ascomycetos [133]. De manera que todas las lacasas hipotéticas presentaron dominios específicamente relacionados con hongos Ascomycetos, por lo cual ninguna enzima se descartó para los posteriores análisis.

El tercer criterio de selección, y uno de los más importantes, fue que en la estructura primaria de las enzimas hipotéticas se encuentren todas las secuencias firma propias de enzimas lacasas. Estas secuencias firmas hacen referencias a los patrones de aminoácidos altamente conservados que sirven como ligando para los átomos de cobre y que son indispensable para mantener el plegamiento conformacional y la actividad catalítica de las lacasas [132]. Por lo tanto a través de alineamientos múltiple de cientos de lacasas se ha logrado identificar 4 secuencias firmas (L1-L4) con una longitud de 8 a 24 aminoácidos que se distribuyen a lo largo de la cadena polipeptídica (Tabla 29 Anexos) [138,166]. No obstante, estas secuencias son comunes para todas las proteínas perteneciente a la familia de multicobre oxidadas, lo que significa que su presencia no es suficiente para confirma que las enzimas corresponden específicamente a lacasas [174]. Por lo tanto, en este estudio se incluyó en la búsqueda la secuencia C-terminal (Tabla 25 Anexos), pues de acuerdo a bibliografía esta región es indispensable para la actividad catalítica de enzimas lacasas. Esto ha sido demostrado por varios autores, como el estudio realizado por [175] donde al truncar el extremo C-terminal de la lacasa LCC1 de *Trametes versicolor* obtuvieron una disminución en el potencial de reducción de la enzima. De igual forma en el trabajo de [171] se demostró que la región C-terminal de *Pleurotus ostreatus* es esencial para el rendimiento catalítico y la estabilidad de la lacasa POXA1b. Por ello, en este trabajo se considera a las secuencias firma L1-L4 y al extremo C-terminal como los patrones distintivos para la identificación de nuevas lacasas.

Por consiguiente, a partir del alineamiento múltiple de las enzimas hipotéticas de *C. hoffmannii* (Figura 16) se identificó individualmente los aminoácidos pertenecientes a los patrones L1-L4, lo que permitió reconocer que las proteínas de *C. hoffmannii* existen variaciones en los residuos de aminoácidos conservados. Esto se muestra en la Figura 17 donde el patrón conservado L4 es el que muestra mayor variabilidad de aminoácidos, mientras que la secuencia L3 es la más conservada ya que el 50% de los aminoácidos conservados se encuentran presentes en la secuencia. Estos cambios entre los aminoácidos de regiones de consenso posiblemente se deban a que cada especie sufre presiones evolutivas distintas, que resultan en modificaciones a nivel de su estructura primaria para facilitar la transferencia de electrones entre los dominios catalíticos [133]. Sin embargo, es importante mencionar que a pesar de que las secuencias L1-L4 no se encuentran exactamente representadas en las lacasas de *C. hoffmannii*, se puede identificar los diez residuos de histidina (H) y una cisteína (C) que actúan como ligandos para los átomos de cobre (Figura 16),

los cuales son clave para la funcionalidad catalítica de las enzimas. A excepción de la enzima Lac4 (AUS45849.1), donde no se encuentran los aminoácidos histidina y cisteína en la región L4 que interactúa con el cobre 1 (Figura 16), posiblemente se verá afectada la oxidación del sustrato y por lo tanto a su actividad catalítica. En cuanto a la región C-terminal, las únicas enzimas que presentan esta región son Lac3 y Lac4, lo que probablemente se traduce en que las otras cuatro enzimas presenten menor actividad catalítica y estabilidad. Esto debido a que en el trabajo de [176] se evalúa el rol que tiene el extremo C-terminal en las lacasas, evidenciándose que la ausencia de este afecta tanto el rendimiento catalítico como las propiedades de estabilidad de la enzima. Por ende, algunas lacasas a pesar de presentar todas las características esenciales, pueden ser parcialmente funcionales.

Como resumen, la lacasa que cumplió con todos los criterios de selección fue la enzima Lac3 (AUS45857.1), lo que implica que de todas las secuencias analizadas, solo una pudo ser clasificada como lacasa hipotética. Es por esto que se realizó el modelamiento tridimensional únicamente de esta proteína.

#### *4.2.3 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas lacasas*

En el modelamiento por homología de la estructura terciaria de la enzima Lac3 se identificó claramente los tres dominios tipo cupredoxina con una conformación tipo barril  $\beta$  en forma de sándwich y los átomos de cobre distribuidos en tres sitios redox (Figura 18). Se logró identificar el centro de cobre 1 involucrado con la oxidación del sustrato, como el centro más expuesto. El cual está coordinado por dos histidinas conservadas (HIS 460-538), una cisteína (CYS-533) y un aminoácido hidrofóbico (ligando axial) que no interactúa directamente con el átomo de cobre (LEU-543), pero que es responsable de su desestabilización y por ende del aumento del potencial redox de la enzima Lac3. También se identificó el sitio trinuclear de cobre (Figura 6) formado por dos cobres tipo 3 y un cobre tipo 2 coordinados por cadenas de histidinas, en este sitio trinuclear es donde se da la reducción de oxígeno molecular acompañado por la formación de agua.



Además de esto, se determinó si la enzima hipotética muestra un plegamiento similar a una lacasa verdadera como la de *T. versicolor*, pues el plegamiento global de una proteína es considerado como uno de los principales determinantes para su función. Se empleó la lacasa de *T. versicolor* como punto de referencia, ya que ha sido ampliamente estudiada para estrategias de biorremediación, pues esta enzima en condiciones *in vitro* es capaz de oxidar varios sustratos como: acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, benzo pirenoy perileno [109,110]. Por lo tanto, se calculó el puntaje TM que representa una medida de similitud entre los átomos de dos cadenas de proteínas (Tabla 16). En este caso, el valor obtenido al ser mayor a 0,5 indicó que efectivamente estas dos proteínas se puedan considerar como estructuras similares y por ende pudieran presentar actividades catalíticas análogas.

Para simplificar toda esta información podríamos decir que de las 7 multicobre oxidasas de *C. hoffmannii* disponibles en las bases de datos, la única que presentó todas las propiedades que caracterizan a las enzimas lacasas fue la enzima Lac3 (AUS45857.1). Por consiguiente, esta enzima pudiera considerarse como una candidata para sobreexpresión heteróloga. No obstante, es necesario validar toda la información obtenida con análisis experimentales. Se sabe que esta proteína analizada *in silico* (Lac3) fue identificada en el genoma de otro aislado. Por lo que no necesariamente será expresada por el microorganismo aislado de la Cantera de Pungarayacu (cepa B), ya que no fue identificado por secuenciación directa y cada aislado pasó por presiones evolutivas distintas.

#### *4.2.4 Caracterización in silico y análisis filogenéticos de las peroxigenasas aromáticas hipotéticas*

Como ya se mencionó anteriormente, las enzimas peroxigenasas aromáticas (POAs) presentan un enorme potencial en el área de la biorremediación. Ya que muestran tanto actividad peroxigenasa como peroxidasa, que involucran reacciones de hidroxilación y epoxidación aromáticas y alifáticas, sulfoxidaciones, N-oxidaciones, N-desalquilación y bromación [84]. De manera que en esta investigación se comenzó analizando varias características moleculares de estas enzimas

(Tabla 23).

La información obtenida es interesante, ya que las dos POAs hipotéticas de este estudio presentan masas moleculares y pI superiores a los rangos promedios típicos [75]. La familia de POAs más cercana pudiera ser el grupo II de POAs largas, donde se reportan masas de alrededor de 44 kDa y pI de 5.8. Por otro lado, tanto la POA1 y POA2 se predicen como enzimas extracelulares que presentan pocos sitios potenciales para N-glicosilaciones, por lo que posiblemente presenten mayor probabilidad de degradación enzimática [74].

En cuanto a la presencia de puentes disulfuro, varios trabajos concluyen que en estas enzimas se identifican dos residuos de Cisteína (Cys) importantes que forman un puente disulfuro en la región C-terminal, el cual pareciera ser clave en la estabilización de la estructura proteica [75,177]. No obstante, las predicciones realizadas en las dos POAs hipotéticas de *C. hoffmannii* indican una muy baja probabilidad de presencia de estos enlaces covalentes (Tabla 24), lo que implicaría que estas proteínas pudieran presentar una baja estabilidad estructural que afectaría a sus funciones catalíticas. Esto es algo que difiere también con las características esenciales de POAs largas, pues se conoce que esta familia en específico se diferencia por presentar este puente disulfuro en la región C-terminal [177,178]. Tal es el caso de la POA modelo de *Agrocybe aegerita* que posee este enlace covalente en la posición Cys 396-44 (C-terminal) [73].

#### 4.2.5 Búsqueda de dominios y patrones asociados a peroxidasas aromáticas

Con el objetivo de caracterizar las dos peroxidasas de hemetiolato, lo primero que se realizó fue un árbol filogenético con otras peroxidasas ya estudiadas por otros autores (Figura 19), obteniéndose que la POA1 comparte ancestros en común con otras POAs fúngicas mientras que la POA2 guarda mayor relación evolutiva con otras cloroperoxidasas. Cabe mencionar que, si bien las enzimas POAs y CPO se encuentran muy relacionadas ya que pertenecen a la misma subfamilia de proteínas hemetiolato peroxidasas, las CPO no son capaces de peroxigenar compuestos aromáticos o enlaces C-H fuertes [75]. No obstante, se continuó analizando las dos proteínas ya que se conoce que las CPO

son un pariente filogenético de esta clase de enzimas [179].

Uno de los parámetros que permite clasificar a las POAs es la presencia de motivos conservados claves para la actividad catalítica de estas enzimas. El primer motivo conservado que se identificó en el alineamiento múltiple fue el patrón Prolina- Cisteína-Prolina (PCP) (Figura 20). El cual se presentó en las cuatro secuencias, esto debido a que las POAs y CPO pertenecen a la misma familia de proteínas hemo-tiolato y este motivo se encuentra asociado a la región de unión al hemo de las peroxigenasas [73]. El segundo motivo conservado resultó ser clave para la diferenciación entre POAs y CPO es el patrón (EGD). Esta región actúa como sitio de unión distal para ion magnesio y se ha identificado que un único cambio en el tercer aminoácido del patrón por una histidina (EHD) es el diferenciador para la actividad enzimática específica de CPO [136].

Se logró identificar el patrón (EGD) únicamente en la POA de *A. aegerita* (B9W4V6.1) y la POA 1 (AUS45861.1) de *C. hoffmannii*. Por otro lado, el patrón Acido glutámico-Histidina-Acido aspártico (E-H-D) se identificó exclusivamente en la CPO de *L. fumago* (CAC16733.1) (Figura 20). Considerando la información mostrada hasta el momento, se podría decir que la POA 2 (AUS45850.1) no presenta patrones relacionados con otras POAs o CPO, pues en este segundo motivo se observa un patrón Acido glutámico-Alanina-Acido aspártico (EAD) (Figura 20). Sin embargo, gracias al trabajo de [192] donde realizó una nueva clasificación para las enzimas POAs en 5 subfamilias diferentes, se logró establecer que la POA2 de *C. hoffmannii* presenta un motivo (EAD) que pertenece exclusivamente a las POAs de la sub-subfamilia IIIa (Tabla 26 Anexos). Además, usando esta nueva clasificación, la POA1 puede ser asociada específicamente con enzimas POAs pertenecientes a la subfamilia Ia (Tabla 26 Anexos). Es importante mencionar que se han identificado también otros motivos importantes que cumplen funciones específicas (Figura 20). Tal es el caso de la secuencia NHG / SHG que actúan como residuos de unión a proteínas, el motivo S [IL] G que podría relacionarse con la especificidad a los sustratos y el motivo SXXRXD que se asocia a la formación de enlaces de H con sustratos polares que ayudan a la estabilidad estructural de las POAs [136].

#### 4.2.6 Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de hipotéticas peroxigenasas aromáticas de *C. hoffmannii*.

Los modelos tridimensionales mostrados en la Figura 21 fueron construidos con base en la POA modelo de *A. aegerita*. Se empleó esta estructura como molde porque a pesar de que la primera POA fue descrita hace 16 años [92] y que se han reportado varios genes que codifican para varias POAs en una gran variedad de organismos fúngicos [75], hasta la fecha solo se disponen de dos estructuras cristalinas de POAs bien caracterizadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB): *Marasmius rotula* (PDB ID: 5FUJ) y *Agrocybeaegerita* (PDB ID: 2YOR) siendo esta última la POA modelo para toda la química de las peroxigenasas [151].

En la Figura 21 se muestra la estructura de las dos POAs hipotéticas de *C. hoffmannii* en ambas se identifica los dos motivos conservados antes mencionados. En el sitio activo se muestra el motivo PCP donde las Cys-117 y Cys-128 de la POA1 y POA2 respectivamente actúan como el quinto ligando (ligando tiolato axial) del hierro central ( $Fe^{3+}$ ) en el anillo de porfirina. Se identifica, además el aminoácido Glu que se conoce como responsable de la cavidad distal del grupo hemo y el aminoácido Arg que se reporta como el estabilizador de carga de este tipo de proteínas, por lo que ambos aminoácidos actúan como un par catalizador ácido-base, el cual es indispensable para la formación del Compuesto-Inecesario para el ciclo catalítico de peroxidasas [77,179]. En el sitio activo de ambas proteínas hipotéticas también se identifica el motivo Glu-Gly-Asp que interactúan directamente con el cofactor  $Mg^{+2}$ .

Por último, para corroborar la similitud entre las POAs hipotéticas de *C. hoffmannii* y la POA modelo de *A. aegerita*, se realizó un solapamiento de ambas estructuras (Figura 22). Obteniendo que el sitio activo de ambas proteínas se encuentra dispuesto en conformaciones muy similares, incluso este solapamiento ayudó a demostrar que a pesar de que el modelo tridimensional de la POA2 en un principio no mostró los ligandos del grupo hemo y  $Mg^{+2}$ , si se identificó los aminoácidos esenciales para su actividad catalítica. Además de esto, se midió el puntaje TM entre las dos POAs

hipotéticas, la POA de *A. aegerita* y la CPO de *L.fumago* (Tabla 20). Donde las dos POAs hipotéticas mostraron valores de TM superiores a 0,5 al compararse con la POA de *A. aegerita*, lo que se traduce en que ambas estructuras pueden considerarse como similares y por ende con una alta probabilidad de presentar funciones análogas. Además, la puntuación menor a 0,5 obtenida en la comparación de la POA 2 con la CPO de *L. fumago* refuerza lo mencionado en párrafos anteriores, donde se menciona que a pesar de que la relación filogenética no fue clara, la estructura primaria y terciaria es semejante a la de otras POAs.

#### 4.3 Identificación de los genes que codifican para las proteínas lacasas y peroxigenasas aromáticas hipotéticas de *C. Hoffmannii*.

Con el objetivo de complementar la información obtenida en la búsqueda de lacasas y POAs, se analizaron los genes que codifican dichas proteínas. El reconocimiento de los genes (con y sin intrones) ayudará a tener una mayor comprensión de las unidades moleculares que se encuentran en *C. hoffmannii*.

Se determinó que la longitud de los genes que codifican las lacasa hipotéticas de *C. hoffmannii* varía entre 1776 y 2178 nucleótidos, mientras que el contenido de G+C está entre el 55 y 62% (Tabla 28). Además, se identificaron entre 2-5 intrones en los genes individuales que no se distribuyen de manera similar. Dado que la enzima Lac3 fue la que presentó todas las características reportadas para otras lacasas, se incluye en la Figura 23 la distribución de exones e intrones en este gen. Esta información es valiosa ya que brinda los datos necesarios para poder en el futuro diseñar plásmidos de expresión heteróloga de Lac3 en hospederos como *E. coli* o *P. pastoris* y de esta forma potenciar las aplicaciones que pudiera tener esta enzima en una gran variedad de industrias entre ellas la de biorremediación.

De la misma forma, se determinó que la longitud de los dos genes de las POAs de *C. hoffmannii* varía entre 1320 y 1437 nucleótidos, con un porcentaje de G+C de 63 y 53 %, respectivamente. En este caso se identificó 3 intrones en el gen de la POA1 y 5 intrones en el gen de POA2 (Tabla 28). Esta clase de proteínas si bien sea visto que tienen una alta promiscuidad por reacciones de

transferencia de oxígeno que le confiere una gran versatilidad enzimática, su aplicación en sistemas de expresión heteróloga aún es muy limitada. Esto se debe a que el número de proteínas que han logrado ser aisladas es bajo, el proceso de identificar nuevas POAs es una tarea lenta porque hay una carencia de información en las bases de datos y aún no hay suficiente conocimiento sobre la organización genómica de los genes POA. Por lo que un camino prometedor de investigación es poder determinar la organización de los clústeres de genes y como son sus procesos de regulación empleando tecnologías de secuenciación de próxima generación y de edición génica como CRISPR/Cas [75,179].

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

A partir de muestras de asfalto aflorante provenientes de la cantera de Pungarayacu ubicada en la provincia de Napo-Ecuador se logró identificar 5 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme que presentaron una relación filogenética con las especies: *Fusarium croci*, *Coniochaeta hoffmannii*, *Trichoderma yunnanense*, *Penicillium amphiboloria* y *Fusarium waltergamsii*. Ya que existe escasa información bibliográfica relacionada con el potencial biotecnológico de las 6 cepas aisladas, reconocemos una enorme oportunidad como Grupo de Investigación para trabajar en la caracterización bioquímica, molecular y enzimática de todas estas especies poco estudiadas que han sido aisladas de una de las regiones con mayor diversidad biológica del planeta.

En cuanto a la caracterización funcional *in silico* de genes y proteínas hipotéticas de *C. hoffmannii* asociados a procesos de micorremediación (lacasas y peroxigenasas aromáticas). La enzima hipotética Lac3 presentó todas las características que presentan las lacasas verdaderas; secuencias firmas L1-L4, tres dominios Pfam, presencia del extremo C-terminal y una estructura tridimensional similar a estructuras de lacasas ya conocidas. Además, dado que esta enzima se identifica como una lacasa de alto potencial Redox, esta pudiera considerarse en distintas aplicaciones biotecnológicas como lo es la micoremediación de crudos recalcitrantes.

La información expuesta en esta investigación contribuye a la exploración de nuevas cepas fúngicas asociadas a ambientes extremos como las emanaciones naturales de asfalto que se encuentran en la cantera de Pungarayacu. Además, brinda una base sólida sobre el potencial que pueden tener los microorganismos aislados de este tipo de hábitats en estrategias de micorremediación o de su aplicación en otras industrias de base biotecnológica, como en el sector de la biomedicina, la bioenergía, la agricultura sustentable, la tecnología de los alimentos, desarrollo de nuevos biomateriales, entre otros.

## 5.2 Recomendaciones

Dado que este trabajo genera evidencia para continuar investigando sobre el potencial hidrocarbonoclástico y biotecnológico de los hongos aislados, se recomienda llevar a cabo la identificación de las cepas B y D a nivel de especie, mediante el análisis de genes Barcoding como 18S, 5.8S, 28S,  $\beta$ -tubulina,  $\beta$  actina, RNA polimerasa 2, entre otros, y estudios de taxonomía clásica que permitan corroborar la información filogenética obtenida en la presente investigación.

También se sugiere realizar una validación experimental de los resultados obtenidos *in silico* con relación a las proteínas objeto de estudio, empleando técnicas de purificación, estudios de secretoma comparativa, determinación de actividades enzimáticas, y estudios de expresión génica. Todas estas herramientas permitirán corroborar la información expuesta.

Además, los resultados alcanzados pueden complementarse con la determinación de la cinética de crecimiento de los hongos aislados empleando asfaltenos o HPAs (naftaleno, dibenzotiofeno, fenantreno, pireno, etc.) como única fuente de carbono y energía. Asimismo, es necesario analizar la tasa de biodegradación y tolerancia de los aislados para crecer en diferentes condiciones de estrés abiótico, tales como altas concentraciones de sales, para seleccionar especies halófilas, amplio rango de pH, para seleccionar acidófilos y alcalófilos y, altas temperaturas, para seleccionar termófilos. Todo esto brindará información valiosa acerca de la capacidad de estos hongos para emplearse como biocatalizadores extremófilos hidrocarbonoclásticos aislados de la Amazonía capaces de degradar asfaltenos, HPAs y con capacidad de crecer en ambientes extremos.

Por último, se recomienda complementar nuestros hallazgos con estudios enfocados en establecer consorcios microbianos extremófilos hidrocarbonoclásticos con la finalidad de de diseñar un sistema de biodegradación eficiente y sostenible con el ambiente, sobre todo en regiones de alta fragilidad y diversidad biológica como la Amazonía ecuatoriana.



## REFERENCIAS

1. Speight JG, El-Gendy NS. The Future of Petroleum Biotechnology. *Introd to Pet Biotechnol.* 2018; 471–483. doi:10.1016/b978-0-12-805151-1.00012-6
2. Speight JG, El-Gendy NS. Petroleum Composition and Properties. *Introduction to Petroleum Biotechnology.* 2018. doi:10.1016/b978-0-12-805151-1.00001-1
3. Coppock RW, Christian RG. Petroleum. Third Edit. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition.* Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-811410-0.00050-7
4. Wauquier J-P. PETROLEUM REFINING V.1: Crude Oil. Petroleum Products. Process Flowsheets. *Insitut FranÇais Du Pétrole Publications;* 1995. Available: <http://books.google.com/books?id=9rq1Jdy3CTUC&pgis=1>
5. Pernía B, Demey JR, Inojosa Y, Naranjo-Briceño L. Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclástico de hongos aislados de crudo y sus derivados : Un meta-análisis Biodiversity and hydrocarbonoclastic potencial of fungi isolated from crude and petroleum derivates : a meta-analysis Abstract. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal.* 2012;3: 1–39. Available: <http://www3.inecol.edu.mx/relbaa/>
6. Suarez L, Yáñez F, León V, Naranjo L. Biotratamiento del crudo extrapesado campo Carabobo mediante enzimas extracelulares de hongos mitospóricos filamentosos Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela Por la Br . Suarez S . Lily Y . Para optar al Título de Ingeniero Químico C. 2015.
7. Hasanvand MZ, Montazer M, Salehzadeh M, Amiri M, Fathinasab M. A literature review of asphaltene entity, precipitation, and deposition, introducing recently models of deposition in the well column. *J Oil, Gas Petrochemical Sci.* 2018;1: 83–89. doi:10.30881/jogps.00016
8. Tavassoli T, Mousavi SM, Shojaosadati SA, Salehizadeh H. Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel.* 2012;93: 142–148. doi:10.1016/j.fuel.2011.10.021
9. Pineda-Flores G, Mesta-Howard AM. Petroleum asphaltenes: Generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Rev Latinoam Microbiol.* 2001;43: 143–150.
10. Prenafeta-Boldú FX, de Hoog GS, Summerbell RC. Fungal Communities in Hydrocarbon

Degradation. Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology. 2019. doi:10.1007/978-3-319-60063-5\_8-2

11. Gordon D. Understanding unconventional oil. Carnegie Pap. 2012; 1–21.
12. Bravo E. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. 2007; 1–61.
13. Finer M, Jenkins CN, Pimm SL, Keane B, Ross C. Oil and gas projects in the Western Amazon: Threats to wilderness, biodiversity, and indigenous peoples. PLoS One. 2008;3. doi:10.1371/journal.pone.0002932
14. Cando M. Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. 2011.
15. Soukarieh B, Hawari K, Hussein M, Budzinski H, Jaber F. Impact of Lebanese practices in industry, agriculture and urbanization on soil toxicity. Evaluation of the Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) levels in soil. ECSN. 2018. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.178
16. Márquez-Rocha FJ, Hernández-Rodríguez VZ, Vázquez-Duhalt R. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Biotechnol Lett. 2000;22: 469–472. doi:10.1023/A:1005663419547
17. Weissenfels WD, Klewer H, Langhoff J. Applied Microbiology Biotechnology Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons ( PAHs ) by soil particles : influence on biodegradability and biotoxicity. Carbon N Y. 1992; 689–696.
18. Chamorro A, Monard N, Páez M, León C. El petróleo en el Ecuador, la nueva era petrolera. Hist Vida. 2013.
19. Banco Central del Ecuador. Reporte del sector petrolero. 2020. Available: <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/ASP201906.pdf>
20. A VL, Espíndola F, Calles J, Janette L, Ecuatoriana A, Santos F, et al. Amazonía ecuatoriana bajo presión. Quito-Ecuador: EcoCiencia; 2019.
21. Bravo-Medina C, Marín H, Marrero-Labrador P, Ruiz ME, Torres-Navarrete B, Navarrete-Alvarado H, et al. Evaluación de la sustentabilidad mediante indicadores en unidades de producción de la provincia de Napo, Amazonia Ecuatoriana. Bioagro. 2017;29: 23–36.

22. Barraza F, Maurice L, Uzu G, Becerra S, López F, Ochoa-Herrera V, et al. Distribution, contents and health risk assessment of metal(loid)s in small-scale farms in the Ecuadorian Amazon: An insight into impacts of oil activities. *Sci Total Environ.* 2018;622–623: 106–120. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.246
23. Ministerio de Relaciones Exteriores y Movilidad Humana . El caso Chevron / Texaco en Ecuador Una lucha por la justicia ambiental y social. Quito; 2001. Available: <https://www.cancilleria.gob.ec/wp-content/uploads/2015/06/Expediente-Caso-Chevron-abril-2015.pdf>
24. San Sebastián M, Hurtig AK. Oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador: A public health emergency. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2004;15: 205–211. doi:10.1590/S1020-49892004000300014
25. Basantes AC. Ecuador: la rotura del oleoducto OCP revela el impacto de construir en zonas de alto riesgo La rotura del OCP en Ecuador: ¿un riesgo mal calculado? *Mongabay Latam.* 2020; 5. Available: <https://es.mongabay.com/2020/05/ecuador-rotura-oleoducto-ocp-petroleo/>
26. San Sebastián M, Armstrong B, Stephens C. The health of women who live near oil wells and oil production stations in the Amazon region of Ecuador. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.* 2001;9: 375–384. doi:10.1590/s1020-49892001000600004
27. Volke T, Velasco J. Tecnologías de remediación de suelos contaminados. 2002. Available: <http://www.ecopuerto.com/Bicentenario/informes/TecnologiasRemediacion.pdf>
28. Ossai IC, Ahmed A, Hassan A, Hamid FS. Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environ Technol Innov.* 2020;17: 100526. doi:10.1016/j.eti.2019.100526
29. Ortiz BI. Técnicas de Recuperación de Suelos Contaminados Aplicadas a Sedimentos Marinos . Universidad de Granada. 2017.
30. Lim MW, Lau E Von, Poh PE. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. MPB. 2016. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.023
31. Zouboulis AI, Moussas PA, Psaltou SG. Groundwater and Soil Pollution : Bioremediation ☆. 2nd ed. *Encyclopedia of Environmental Health, 2nd Edition.* Elsevier Inc.; 2018. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.11246-1

32. Ortíz Brito O, Ize I, Gavilán A. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gac Ecológica* ISSN 1405-2849. 2003;69: 83–92.
33. Kumari B, Kriti GS, Sinam G, Singh DP. Microbial Remediation of Crude. *Environ Concerns Sustain Dev*. 2018; 333–351.
34. Al-Sayegh A, Al-Wahaibi Y, Joshi S, Al-Bahry S, Elshafie A, Al-Bemani A. Bioremediation of Heavy Crude Oil Contamination. *Open Biotechnol J*. 2016;10: 301–311. doi:10.2174/1874070701610010301
35. Arulazhagan P, Sami Manif J, Rajesh B, Huda Q, Jalal M. Biodegradation of Hydrocarbons by extremophiles. In: Heimann K, Karthikeyan O, Parthiba M, Subramanian S, editors. *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons*. 2017. pp. 105–107. doi:10.1007/978-981-10-0201-4
36. Riojas H, Torres L, Mondaca I, Balderas J, Gortáres P. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. 2010.
37. Wan D, Lee H, Kwon B, Seong J, Hyuk U, Seok B, et al. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environ Pollut*. 2018;241: 254–264. doi:10.1016/j.envpol.2018.05.070
38. Muthukamalam S, Sivagangavathi S, Dhrishya D, Sudha Rani S. Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian J Microbiol*. 2017;48: 637–647. doi:10.1016/j.bjm.2017.02.007
39. Ojewumi ME, Okeniyi JO, Ikotun JO, Okeniyi ET, Ejemen VA, Popoola API. Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil. *Data Br*. 2018;19: 101–113. doi:10.1016/J.DIB.2018.04.102
40. Ghoreishi G, Alemzadeh A, Mojarrad M, Djavaheri M. Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustain Environ Res*. 2017;27: 195–202. doi:10.1016/j.serj.2017.05.002
41. Kumari S, Regar RK, Manickam N. Environmental Biotechnology Laboratory , b Academy of Scientific and Innovative Department of Biochemistry , School of Dental Sciences , Babu Banarsi Das University. *Bioresour Technol*. 2018. doi:10.1016/j.biortech.2018.01.075
42. Parthipan P, Elumalai P, Peng Y. International Biodeterioration & Biodegradation Characterization of hydrocarbon degrading bacteria isolated from Indian crude oil reservoir and their influence on biocorrosion of carbon steel API. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2018;129: 67–80.

doi:10.1016/j.ibiod.2018.01.006

43. S. Raina, N. Yahmed, R. Bhat MD. Mycoremediation: A Sustainable Tool for Abating Environmental Pollution. *Bioremediation and Biotechnology*. 2020. doi:10.1007/978-3-030-35691-0\_8
44. Singh RK, Tripathi R, Ranjan A, Srivastava AK. Fungi as potential candidates for bioremediation. *Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-818095-2.00009-6
45. Naranjo L, Pernía B, Inojosa Y, Rojas D, D'Anna LS, González M, et al. First Evidence of Fungal Strains Isolated and Identified from Naphtha Storage Tanks and Transporting Pipelines in Venezuelan Oil Facilities. *Adv Microbiol*. 2015;05: 143–154. doi:10.4236/aim.2015.52014
46. Naranjo-briceño L, Pernía B, Perdomo T, González M, Inojosa Y, Sisto Á De, et al. Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance. *Fungi Extrem Environ Ecol Role Biotechnol Significance*. 2019; 559–586. doi:10.1007/978-3-030-19030-9
47. Yadav AN, Gupta A, Mishra S, Singh S. Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 3: Perspective for Sustainable Environments. 2019. doi:10.1007/978-3-030-10480-1
48. Naranjo Briceño L, Urbina H, De Sisto A, Leon V. Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatal Biotransformation*. 2007;25: 341–349. doi:10.1080/10242420701379908
49. Naranjo L, Urbina H, González M, Córdova J, Muñoz S. Potential Of Autochthonous Non-White Rot Fungi For Partial Enzymatic Conversion (Pec-Idea Technology) Of Venezuelan Extra- Heavy Crude Oil. 2008; 1–7.
50. Oudot J, Dupont J, Haloui S, Roquebert MF. Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. *Soil Biol Biochem*. 1993;25: 1167–1173. doi:10.1016/0038-0717(93)90211-S
51. Bublitz F, Günther T, Fritsche W. Screening of fungi for the biological modification of hard coal and coal derivatives. *Fuel Process Technol*. 1994;40: 347–354. doi:10.1016/0378-3820(94)90157-0
52. Hofrichter M, Bublitz F, Fritsche W. Fungal attack on coal: I. Modification of hard coal by fungi. *Fuel Process Technol*. 1997;52: 43–53. doi:10.1016/S0378-3820(97)00014-3
53. Li Z, Huang H, Zhang S. The effect of biodegradation on bound biomarkers released from intermediate-temperature gold-tube pyrolysis of severely biodegraded Athabasca bitumen. *Fuel*.

2020;263: 116669. doi:10.1016/j.fuel.2019.116669

54. Chaillan F, Le Flèche A, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol.* 2004;155: 587–595. doi:10.1016/j.resmic.2004.04.006

55. Uribe-Alvarez C, Ayala M, Perezgasga L, Naranjo L, Urbina H, Vazquez-Duhalt R. First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microb Biotechnol.* 2011;4: 663–672. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00269.x

56. Fedorak PM, Semple KM, Vazquez-Duhalt R, Westlake DWS. Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb Technol.* 1993;15: 429–437. doi:10.1016/0141-0229(93)90131-K

57. Ayala M, Vazquez-Duhalt R. Enzymatic catalysis on petroleum products. *Stud Surf Sci Catal.* 2004;151: 67–111.

58. Ortiz M. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. *Orinoquia.* 2009;13: 137–144. doi:10.22579/20112629.208

59. Leòn V, Kumar M. Biological upgrading of heavy crude oil. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2005;10: 471–481. doi:10.1007/BF02932281

60. Gray KA, Mrachkott GT, Squires CH. Biodesulfurization of fossil fuels. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6: 229–235. doi:10.1016/S1369-5274(03)00065-1

61. Caicedo N, Gutiérrez E, Torres R. Evaluación del potencial de dos peróxidas para su aplicación en biorremediación de compuestos orgánicos recalcitrantes. *Rev Colomb Biotecnol.* 2004;3: 66–77.

62. León K. Uso de cloroperoxidasa para la oxidación de fármacos como contaminantes emergentes. Universidad Autónoma de Puebla. 2014. Available: <https://hdl.handle.net/20.500.12692/20581>

63. Águila S. “Inmovilización de Proteínas con Actividad Peroxidasa en Nanoestructuras y sus Aplicaciones Sobre Reacciones de Epoxidación de Olefinas.” Universidad de Concepción. 2010.

64. Allenmark SG, Andersson MA. Chloroperoxidase-induced asymmetric sulfoxidation of some conformationally restricted sulfides. *Chirality.* 1998;10: 246–252. doi:10.1002/(SICI)1520-636X(1998)10:3<246::AID-CHIR7>3.0.CO;2-7

65. Torres E, Ayala M. Biocatalysis based on heme peroxidases: Peroxidases as potential industrial biocatalysts. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. 2010. pp. 1–358. doi:10.1007/978-3-642-12627-7
66. Ruiz F, Martínez A. Biocatalysis based on heme peroxidases: Peroxidases as potential industrial biocatalysts. *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*. 2010. pp. 1–358. doi:10.1007/978-3-642-12627-7
67. Zhang X, Li X, Jiang Y, Hu M, Li S, Zhai Q. Combination of enzymatic degradation by chloroperoxidase with activated sludge treatment to remove sulfamethoxazole: performance, and eco-toxicity assessment. *J Chem Technol Biotechnol*. 2016;91: 2802–2809. doi:10.1002/jctb.4888
68. Ayala M, Tinoco R, Hernandez V, Bremauntz P, Vazquez-Duhalt R. Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization. *Fuel Process Technol*. 1998;57: 101–111. doi:10.1016/S0378-3820(98)00076-9
69. Van De Velde F, Bakker M, Van Rantwijk F, Rai GP, Hager LP, Sheldon RA. Engineering chloroperoxidase for activity and stability. *J Mol Catal - B Enzym*. 2001;11: 765–769. doi:10.1016/S1381-1177(00)00022-9
70. Grey CE, Rundbäck F, Adlercreutz P. Improved operational stability of chloroperoxidase through use of antioxidants. *J Biotechnol*. 2008;135: 196–201. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.03.015
71. Conesa A, Van De Velde F, Van Rantwijk F, Sheldon RA, Van Den Hondel CAMJJ, Punt PJ. Expression of the *Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *J Biol Chem*. 2001;276: 17635–17640. doi:10.1074/jbc.M010571200
72. Piontek K, Strittmatter E, Ullrich R, Gröbe G, Pecyna MJ, Kluge M, et al. Structural basis of substrate conversion in a new aromatic peroxygenase: Cytochrome P450 functionality with benefits. *J Biol Chem*. 2013;288: 34767–34776. doi:10.1074/jbc.M113.514521
73. Pecyna MJ, Ullrich R, Bittner B, Clemens A, Scheibner K, Schubert R, et al. Molecular characterization of aromatic peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84: 885–897. doi:10.1007/s00253-009-2000-1
74. Faiza M, Huang S, Lan D, Wang Y. New insights on unspecific peroxygenases: Superfamily reclassification and evolution. *BMC Evol Biol*. 2019;19: 1–19. doi:10.1186/s12862-019-1394-3
75. Hofrichter M, Kellner H, Herzog R, Karich A, Liers C, Sheibner K. Fungal Peroxygenases: A

Phylogenetically Old Superfamily of Heme Enzymes with Promiscuity for Oxygen Transfer Reactions. Grand Challenge In Fungal Biotechnology. 2020. pp. 369–403. doi:10.1007/978-3-030-29541-7\_14

76. Ullrich R, Nueske J, Scheibner K, Spantzel J, Hofrichter M. Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70: 4575–4581. doi:10.1128/AEM.70.8.4575

77. Peter S, Kinne M, Wang X, Ullrich R, Kayser G, Groves T, et al. Selective hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase. *Natl Institutes Heal.* 2013;278: 3667–3675. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08285.x.Selective

78. Gutiérrez A, Babot ED, Ullrich R, Hofrichter M, Martínez AT, Del Río JC. Regioselective oxygenation of fatty acids, fatty alcohols and other aliphatic compounds by a basidiomycete heme-thiolate peroxidase. *Arch Biochem Biophys.* 2011;514: 33–43. doi:10.1016/j.abb.2011.08.001

79. Hauptstraße K. *Psathyrella aberdarensis*, a new species of *Psathyrella* (Agaricales) from a Kenyan National Park. 2019;27: 23–30.

80. Modi A, Dawson JH. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450,. *Springer Int Publ Switz.* 2015; 63–81. doi:10.1007/978-3-319-16009-2

81. Institutsrat V, Zittau H. Conversion of pharmaceuticals and other drugs by fungal peroxygenases. 1982.

82. Bordeaux M, Galarneau A, Drone J. Catalytic, mild, and selective oxyfunctionalization of linear alkanes: Current challenges. *Angew Chemie - Int Ed.* 2012;51: 10712–10723. doi:10.1002/anie.201203280

83. Peng L, Wollenberger U, Kinne M, Hofrichter M, Ullrich R, Scheibner K, et al. Peroxygenase based sensor for aromatic compounds. *Biosens Bioelectron.* 2010;26: 1432–1436. doi:10.1016/j.bios.2010.07.075

84. Mate DM, Palomino MA, Molina-Espeja P, Martín-Díaz J, Alcalde M. Modification of the peroxygenative: Peroxidative activity ratio in the unspecific peroxygenase from *Agrocybe aegerita* by structure-guided evolution. *Protein Eng Des Sel.* 2017;30: 191–198. doi:10.1093/protein/gzw073

85. Córdoba R, Cultid G. Estudio comparativo de la actividad enzimática de lacasa (Lac), lignina peroxidasa (Lip) y manganeso peroxidasa (mnp) de “*pleurotus ostreatus*” cultivado en residuos lignocelulósicos de raquis de palma de aceite, bagazo de fique y pulpa de café. Universidad de Nariño.



2015.

86. Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* 1984;169: 247–250. doi:10.1016/0014-5793(84)80327-0

87. Rodríguez E. Caracterización molecular de lacasas de *Pleurotus eryngii*: expresión heteróloga de estas enzimas y aplicaciones en la degradación de contaminantes aromáticos. Universidad Complutense de Madrid. 2006.

88. Hofrichter M. Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme Microb Technol.* 2002;30: 454–466. doi:10.1016/S0141-0229(01)00528-2

89. Wariishi H, Valli K, Gold MH. Oxidative Cleavage of a Phenolic Diarylpropane Lignin Model Dimer by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry.* 1989;28: 6017–6023. doi:10.1021/bi00440a044

90. Wariishi H, Valli K, Renganathan V, Gold MH. Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Biol Chem.* 1989;264: 14185–14191.

91. Novotný Č, Svobodová K, Erbanová P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: Extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol Biochem.* 2004;36: 1545–1551. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.019

92. Zhang H, Zhang J, Zhang X, Geng A. Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. *Process Biochem.* 2018;66: 222–229. doi:10.1016/j.procbio.2017.12.011

93. Silva MLC, Souza VB de, Santos V da S, Kamida HM, Vasconcellos-Neto JRT de, Góes-Neto A, et al. Production of Manganese Peroxidase by *Trametes villosa* on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. *Adv Biosci Biotechnol.* 2014;05: 1067–1077. doi:10.4236/abb.2014.514122

94. Kumar A, Chandra R. Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. *Heliyon.* 2020;6: e03170. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03170

95. Wariishi H, Gold M. Lignin Peroxidase Compound III. *Biochemistry.* 1990;265: 2070–2077.

96. Páez M. Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidases de hongos

Degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Escuela Politécnica del Ejército. 2012.

97. Ghodake GS, Kalme SD, Jadhav JP, Govindwar SP. Purification and partial characterization of lignin peroxidase from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 and its application in decolorization of textile dyes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009;152: 6–14. doi:10.1007/s12010-008-8258-4

98. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kues U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J*. 2006;273: 2308–2326. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05247.x

99. Higuchi T. Biodegradation mechanism of lignin by white-rot basidiomycetes. *J Biotechnol*. 1993;30: 1–8. doi:10.1016/0168-1656(93)90021-E

100. Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enzym*. 2011;68: 117–128. doi:10.1016/j.molcatb.2010.11.002

101. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30: 215–242. doi:10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x

102. Messerschmidt A. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin Modelling and structural relationships. *Enzyme*. 1990;352: 341–352. Available: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15311.x/pdf>

103. Solomon EI, Baldwin M, Lowery M. Electronic structures of active sites in copper proteins: Contributions to reactivity. *J Inorg Biochem*. 1993;51: 450. doi:10.1016/0162-0134(93)85478-q

104. Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J Biol Chem*. 2002;277: 37663–37669. doi:10.1074/jbc.M204571200

105. Piscitelli A, Pezzella C, Giardina P, Faraco V, Sannia G. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. *Bioeng Bugs*. 2010;1: 252–262.

106. Jeon JR, Baldrian P, Murugesan K, Chang YS. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: From in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microb Biotechnol*. 2012;5: 318–332. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00273.x

107. Nunes CS, Kunamneni A. Laccases-properties and applications. *Enzym Hum Anim Nutr Princ Perspect*. 2018;4: 133–161. doi:10.1016/B978-0-12-805419-2.00007-1

108. Cañas AI, Camarero S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol Adv.* 2010;28: 694–705. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.05.002
109. Johannes C, Majcherczyk A, Hüttermann A. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996;46: 313–317. doi:10.1007/s002530050823
110. Majcherczyk A, Johannes C, Hüttermann A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol.* 1998;22: 335–341. doi:10.1016/S0141-0229(97)00199-3
111. Mai C, Schormann W, Milstein O, Huttermann A. Enhanced stability of laccase in the presence of phenolic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;54: 510–514. doi:10.1007/s002530000452
112. Kanagaraj J, Senthilvelan T, Panda RC. Degradation of azo dyes by laccase: Biological method to reduce pollution load in dye wastewater. *Clean Technol Environ Policy.* 2015;17: 1443–1456. doi:10.1007/s10098-014-0869-6
113. Cassland P, Jönsson LJ. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999;52: 393–400. doi:10.1007/s002530051537
114. Hong F, Meinander NQ, Jönsson LJ. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng.* 2002;79: 438–449. doi:10.1002/bit.10297
115. Balcázar-López E, Méndez-Lorenzo LH, Batista-García RA, Esquivel-Naranjo U, Ayala M, Kumar VV, et al. Xenobiotic compounds degradation by heterologous expression of a *trametes sanguineus* laccase in *trichoderma atroviride*. *PLoS One.* 2016;11: 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0147997
116. Evangelina J, Cano S. Amazon : the Fundamental Rights of the Ancestral Peoples Against Oil Exploitation. *Perfiles las Ciencias Soc.* 2020;7: 161–180.
117. Evans G. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Second edition. *Current protocols in molecular biology.* 1990. pp. 17–18. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
118. Khan S, Aijun L, Zhang S, Hu Q, Zhu YG. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in lettuce grown in the soils contaminated with long-term wastewater irrigation. *J Hazard Mater.* 2008;152: 506–515. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.07.014

119. Castillo R. Aplicación de la técnica de landfarming para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Universidad de Piura. 2009.
120. Andrango C, Castro D. Estudio de Recuperación de Crudos Pesados en el Ecuador Campo Pungarayacu Mediante Inyección de Vapor de Agua Utilizando Tecnología Actual. Escuela Politécnica Nacional. 2009.
121. Trejo F, Centeno G, Ancheyta J. Precipitation, fractionation and characterization of asphaltenes from heavy and light crude oils. *Fuel*. 2004;83: 2169–2175. doi:10.1016/j.fuel.2004.06.008
122. Naranjo L, De Valmaseda EM, Bañuelos O, Lopez P, Riaño J, Casqueiro J, et al. Conversion of pipercolic acid into lysine in *Penicillium chrysogenum* requires pipercolate oxidase and saccharopine reductase: Characterization of the *lys7* gene encoding saccharopine reductase. *J Bacteriol*. 2001;183: 7165–7172. doi:10.1128/JB.183.24.7165-7172.2001
123. Montenegro E, Fierro F, Fernandez FJ, Gutierrez S, Martin JF. Resolution of chromosomes III and VI of *Aspergillus nidulans* by pulsed- field gel electrophoresis shows that the penicillin biosynthetic pathway genes *pcbAB*, *pcbC*, and *penDE* are clustered on chromosome VI (3.0 megabases). *J Bacteriol*. 1992;174: 7063–7067. doi:10.1128/jb.174.21.7063-7067.1992
124. Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32: 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
125. Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices. *Bioinformatics*. 1992;8: 275–282.
126. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies : An Approach Using the Bootstrap Author ( s ): Joseph Felsenstein Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2408678> . *Evolution* ( N Y ). 1985;39: 783–791.
127. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35: 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096
128. Leonhardt S, Gebauer AM, Hofrichter M, Kellner H. Draft Genome Sequence of the Sordariomycete *Lecythophora* (*Coniochaeta*) *hoffmannii* CBS 245.38. *Genome Announc*. 2018;6: 1–2.
129. Almagro J, Sønderby CK, Sønderby SK, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. *Bioinformatics*. 2017;33: 3387–3395. doi:10.1093/bioinformatics/btx431

130. Ferrè F, Clote P. DiANNA 1.1: An extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res.* 2006;34: 182–185. doi:10.1093/nar/gkl189
131. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993;10: 512–526. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023
132. Kumar SVS, Phale PS, Durani S, Wangikar PP. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng.* 2003;83: 386–394. doi:10.1002/bit.10681
133. Kwiatos N, Rynhajllo M, Bielecki S. Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. *Front Microbiol.* 2015;6: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00933
134. Hakulinen N, Kiiskinen LL, Kruus K, Saloheimo M, Paanen A, Koivula A, et al. Crystal structure of a laccase from *melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. *Nat Struct Biol.* 2002;9: 601–605. doi:10.1038/nsb823
135. Zhang Y, Skolnick J. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* 2005;33: 2302–2309. doi:10.1093/nar/gki524
136. Faiza M, Lan D, Huang S, Wang Y. UPObase: an online database of unspecific peroxygenases. *Database (Oxford).* 2019;2019: 1–15. doi:10.1093/database/baz122
137. Stanke M, Morgenstern B. AUGUSTUS: A web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res.* 2005;33: 465–467. doi:10.1093/nar/gki458
138. Sandoval-Denis M, Guarnaccia V, Polizzi G, Crous PW. Symptomatic citrus trees reveal a new pathogenic lineage in *fusarium* and two new *neocosmospora* species. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi.* 2018;40: 1–25. doi:10.3767/persoonia.2018.40.01
139. Samuels GJ, Ismaiel A, Bon MC, De Respini S, Petrini O. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia.* 2010;102: 944–966. doi:10.3852/09-243
140. Visagie CM, Renaud JB, Burgess KMN, Malloch DW, Clark D, Ketch L, et al. Fifteen new species of *Penicillium*. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi.* 2016;36: 247–280. doi:10.3767/003158516X691627
141. Lombard L, van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW. Generic concepts in *Nectriaceae*. *Stud Mycol.* 2015;80: 189–245. doi:10.1016/j.simyco.2014.12.002

142. Ertuğrul Karatay S, Demiray E, Dönmez G. Efficient approaches to convert *Coniochaeta hoffmannii* lipids into biodiesel by in-situ transesterification. *Bioresour Technol.* 2019;285. doi:10.1016/j.biortech.2019.121321
143. Ayer WA, Kawahara N. Lecythophorin, a potent inhibitor of blue-stain fungi, from the hyphomycetous fungus *Lecythophora hoffmannii*. *Tetrahedron Lett.* 1995;36: 7953–7956. doi:10.1016/0040-4039(95)01751-3
144. De la Cruz-Quiroz R, Roussos S, Rodríguez-Herrera R, Hernandez-Castillo D, Aguilar CN. Growth inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora capsici* by native Mexican *Trichoderma* strains. *Karbala Int J Mod Sci.* 2018;4: 237–243. doi:10.1016/j.kijoms.2018.03.002
145. Das D, Bhat R, Selvaraj R. Response surface methodology to optimize inulinase production by a newly isolated *Penicillium amphipolaria* strain by solid-state fermentation of *Saccharum arundinaceum*. 2020. doi:10.21203/rs.3.rs-33849/v1
146. Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, et al. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol.* 2006;44: 2185–2190. doi:10.1128/JCM.00120-06
147. Marriott DJE, Wong KH, Aznar E, Harkness JL, Cooper DA, Muir D. *Scytalidium dimidiatum* and *lecythophora hoffmannii*: Unusual causes of fungal infections in a patient with AIDS. *J Clin Microbiol.* 1997;35: 2949–2952. doi:10.1128/jcm.35.11.2949-2952.1997
148. Rigling D, Van Alfen NK. Extra- and intracellular laccases of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59: 3634–3639. doi:10.1128/aem.59.11.3634-3639.1993
149. Meza M, Gallegos G, Hernández F, Arredondo R, Laredo E, Castillo F. Biological effectiveness of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. on apple scab (*Venturia inaequalis*) in vitro and under field conditions. *Eur J Phys Agric Sci.* 2018;6: 7–17. Available: [www.idpublications.org](http://www.idpublications.org)
150. Reva BA, Finkelstein A V., Skolnick J. What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å? *Fold Des.* 1998;3: 141–147. doi:10.1016/S1359-0278(98)00019-4
151. Hobisch M, Holtmann D, Gomez de Santos P, Alcalde M, Hollmann F, Kara S. Recent developments in the use of peroxygenases – Exploring their high potential in selective oxyfunctionalisations. *Biotechnol Adv.* 2020; 107615. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107615

152. Index Fungorum. Index Fungorum Partnership. [cited 22 Oct 2020]. doi:10.15468/ts7wsb
153. Sandoval-Denis M, Crous PW. Removing chaos from confusion: Assigning names to common human and animal pathogens in Neocosmospora. *Persoonia Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2018;41: 109–129. doi:10.3767/persoonia.2018.41.06
154. Herkert PF, Al-Hatmi AMS, De Oliveira Salvador GL, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, et al. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical fusarium species from Brazil. *Front Microbiol*. 2019;10: 1–11. doi:10.3389/fmicb.2019.00737
155. González V, García-Martínez S, Flores-León A, Ruiz JJ, Picó B, Garcés-Claver A. Neocosmospora keratoplastica, a relevant human fusarial pathogen is found to be associated with wilt and root rot of Muskmelon and Watermelon crops in Spain: epidemiological and molecular evidences. *Eur J Plant Pathol*. 2020;156: 1189–1196. doi:10.1007/s10658-020-01931-z
156. Yu ZF, Qiao M, Zhang Y, Zhang KQ. Two new species of Trichoderma from Yunnan, China. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2007;92: 101–108. doi:10.1007/s10482-006-9140-4
157. Aban JL, Barcelo RC, Oda EE, Reyes GA, Balangcod TD, Gutierrez RM, et al. Auxin production, phosphate solubilisation and ACC deaminase activity of root symbiotic fungi (RSF) from *Drynaria quercifolia* L. 2017;6: 26–31.
158. Bugos RC, Sutherland JB, Adler JH. Phenolic Compound Utilization by the Soft Rot Fungus *Lecythophora hoffmannii*. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54: 1882–1885. doi:10.1128/aem.54.7.1882-1885.1988
159. Sakaeyama SI, Sano A, Murata Y, Kamei K, Nishimura K, Hatai K. *Lecythophora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med Mycol*. 2007;45: 267–272. doi:10.1080/13693780601188602
160. Gonzáles L, Rosario A. El papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas. *REB*. 2003;22: 2–10.
161. Moreno LF, Feng P, Weiss VA, Vicente VA, Stielow JB, De Hoog S. Phylogenomic analyses reveal the diversity of laccase-coding genes in *Fonsecaea* genomes. *PLoS One*. 2017;12: 1–17. doi:10.1371/journal.pone.0171291
162. Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, et al. Important role of fungal

- intracellular laccase for melanin synthesis: Purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology*. 2003;149: 2455–2462. doi:10.1099/mic.0.26414-0
163. Fang F, Zhang XL, Luo HH, Zhou JJ, Gong YH, Li WJ, et al. An intracellular Laccase is responsible for epicatechin-mediated Anthocyanin degradation in litchi fruit Pericarp. *Plant Physiol*. 2015;169: 2391–2408. doi:10.1104/pp.15.00359
164. Poulos TL, Kraut J. The stereochemistry of peroxidase catalysis. *J Biol Chem*. 1980;255: 8199–8205.
165. Garavaglia S, Cambria MT, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, et al. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *J Mol Biol*. 2004;342: 1519–1531. doi:10.1016/j.jmb.2004.07.100
166. Mate DM, Alcalde M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnol Adv*. 2015;33: 25–40. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.007
167. Xu F, Palmer AE, Yaver DS, Berka RM, Gambetta GA, Brown SH, et al. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase: Axial perturbations of the T1 copper. *J Biol Chem*. 1999;274: 12372–12375. doi:10.1074/jbc.274.18.12372
168. Feige M, Hendershot L. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Bone*. 2011;23: 1–7. doi:10.1016/j.ceb.2010.10.012.Disulfide
169. Laps S, Atamleh F, Kamnesky G, Sun H, Brik A. General synthetic strategy for regioselective ultrafast formation of disulfide bonds in peptides and proteins. *Nat Commun*. 2021;12: 1–9. doi:10.1038/s41467-021-21209-0
170. Wiedemann C, Kumar A, Lang A, Ohlenschläger O. Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR. *Front Chem*. 2020;8: 1–8. doi:10.3389/fchem.2020.00280
171. Autore F, Del Vecchio C, Fraternali F, Giardina P, Sannia G, Faraco V. Molecular determinants of peculiar properties of a *Pleurotus ostreatus* laccase: Analysis by site-directed mutagenesis. *Enzyme Microb Technol*. 2009;45: 507–513. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.08.004
172. Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera De Los Santos M, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microb Cell Fact*. 2019;18: 1–33. doi:10.1186/s12934-019-1248-0



173. Zhukhlistova NE, Zhukova YN, Lyashenko A V., Zaitsev VN, Mikhaïlov AM. Three-dimensional organization of three-domain copper oxidases: A review. *Crystallogr Reports*. 2008;53: 92–109. doi:10.1134/S1063774508010124
174. Cázares-García SV, Vázquez-Garcidueñas MS, Vázquez-Marrufo G. Structural and Phylogenetic Analysis of Laccases from *Trichoderma*: A Bioinformatic Approach. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0055295
175. Gelo-Pujic M, Kim HH, Butlin NG, Palmore GTR. Electrochemical studies of a truncated laccase produced in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65: 5515–5521. doi:10.1128/aem.65.12.5515-5521.1999
176. Thurston C. The structure and function of fungal laccase. *Microbiology*. 1994;140: 19–26. doi:10.5771/9783845276564-901
177. Hofrichter M, Ullrich R, Pecyna MJ, Liers C, Lundell T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87: 871–897. doi:10.1007/s00253-010-2633-0
178. Li X, Zhang J, Jiang Y, Hu M, Li S, Zhai Q. Highly efficient biodecolorization/degradation of congo red and alizarin yellow r by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*: Catalytic mechanism and degradation pathway. *Ind Eng Chem Res*. 2013;52: 13572–13579. doi:10.1021/ie4007563
179. Linde D, Olmedo A, González-Benjumea A, Estévez M, Renau-Mínguez C, Carro J, et al. Two new unspecific peroxygenases from heterologous expression of fungal genes in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86: 1–16. doi:10.1128/AEM.02899-19

## ANEXOS

**Tabla 23.** Lista de herramientas bioinformáticas empleados para la caracterización molecular de las hipotéticas lacasas y peroxigenasas aromáticas.

Programa	Función	Link
SignalP Versión 4.0	Predice la presencia y ubicación de sitios de escisión de péptidos señal en secuencias de aminoácidos de diferentes organismos. Empleando una combinación de varias redes neuronales artificiales.	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/</a>
NetNGlyc 1.0	Predice sitios de N-glicosilación utilizando redes neuronales artificiales.	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/</a>
DeepLoc 1-0	Predicción de la localización subcelular de proteínas mediante aprendizaje profundo.	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/">http://www.cbs.dtu.dk/services/DeepLoc/</a>
TMHMM 2.0	Predicción de hélices transmembrana en proteínas	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/</a>
ExPASy - Compute pI / Mw Tool	Herramienta que permite el cálculo del pI teórico (punto isoeléctrico) y Mw (peso molecular) para secuencias ingresadas por el usuario.	<a href="http://web.expasy.org/compute_pi/">http://web.expasy.org/compute_pi/</a>
DiANNA 1.1	Servidor web que proporciona dos servicios:  predicción de clasificación de cisteína y predicción de conectividad de  disulfuro.	<a href="http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/">http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/</a>
Pfam	Análisis de secuencias de aminoácidos para la búsqueda de regiones funcionales	<a href="https://pfam.xfam.org/">https://pfam.xfam.org/</a> .

	denominadas dominios.	
PROCHEK	Evalúa cuan normal o inusual es la geometría de los residuos en una estructura proteica determinada, en comparación con los parámetros estereoquímicos derivados de estructuras bien refinadas y de alta resolución.	<a href="https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/">https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/</a>
PROSA	Calcula un puntaje de calidad general para una estructura de entrada específica.	<a href="https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php">https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php</a>
SWISS-MODEL	Servidor de modelado de homología de estructuras de proteínas totalmente automatizado.	<a href="https://swissmodel.expasy.org/">https://swissmodel.expasy.org/</a>
PyMOL	Sistema abierto para la visualización de moléculas.	<a href="https://pymol.org/2/">https://pymol.org/2/</a>
TM-align	Algoritmo para comparaciones de estructuras de proteínas independientes de la secuencia.	<a href="https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/">https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/</a>

**Tabla 24.** Listado de proteínas reportadas para *Coniochaeta hoffmannii* en la base de datos NCBI.

En NCBI se reportan 41 proteínas asociadas al hongo *C. hoffmannii*, donde 4 de ellas son proteínas empleadas para identificación molecular (RNA polimerasa, factor de elongación alfa). En la siguiente tabla se indican los códigos de identificación de cada una de las 37 proteínas y las proteínas resaltadas en negro son aquellas que se analizaron en el presente estudio.

Proteína	Código de identificación GenBank	Código de identificación UniprotKB
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45867.1</b>	<b>A0A2I7VT80</b>
Endo-1,4-beta-xylanasa	AUS45866.1	A0A2I7VT87
Beta-xylanasa	AUS45865.1	A0A2I7VT88
Glucanasa	AUS45864.1	A0A2I7VTA3
Proteína de la familia 5 de la glucósido hidrolasa	AUS45863.1	A0A2I7VTB1
Endo-1,4-beta-xylanasa	AUS45862.1	A0A2I7VT94
<b>Peroxidasa de hemetiolato</b>	<b>AUS45861.1</b>	<b>A0A2I7VT99</b>
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45860.1</b>	<b>A0A2I7VT81</b>
Glucanasa	AUS45859.1	A0A2I7VT83
Peroxidasa	AUS45858.1	A0A2I7VT82
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45857.1</b>	<b>A0A2I7VT72</b>
Beta-xylanasa	AUS45856.1	A0A2I7VT77
Proteína de la familia 5 de la glucósido hidrolasa	AUS45855.1	A0A2I7VT79
Proteína de la familia 7 de la glucósido hidrolasa	AUS45854.1	A0A2I7VT95

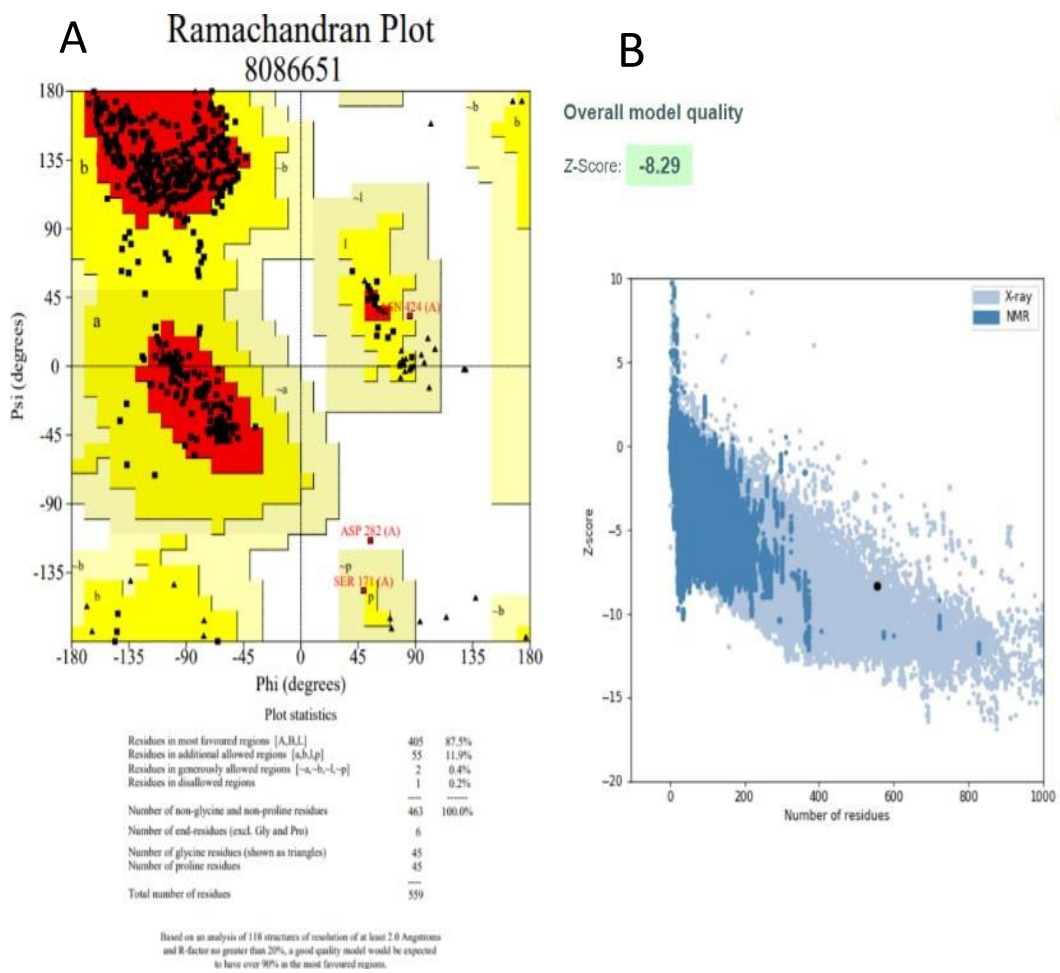
Glucanasa	AUS45853.1	A0A2I7VTA2
Proteína de la familia 5 de la glucósido hidrolasa	AUS45852.1	A0A2I7VT84
Beta-xylanasa	AUS45851.1	A0A2I7VT86
<b>Peroxidasa de hemetiolato</b>	<b>AUS45850.1</b>	<b>A0A2I7VT68</b>
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45849.1</b>	<b>A0A2I7VT75</b>
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45848.1</b>	<b>A0A2I7VT73</b>
Glucanasa	AUS45847.1	A0A2I7VT67
Glucanasa	AUS45846.1	A0A2I7VT71
Endo-1,4-beta-xylanasa	AUS45845.1	A0A2I7VT70
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45844.1</b>	<b>A0A2I7VT85</b>
Glucanasa	AUS45843.1	A0A2I7VT98
Glucanasa	AUS45842.1	A0A2I7VT74
Multicobre oxidasa (parcial)	AUS45841.1	A0A2I7VT57
Endo-1,4-beta-xylanasa	AUS45840.1	A0A2I7VT62
Beta-xylanasa	AUS45839.1	A0A2I7VT64
<b>Multicobre oxidasa</b>	<b>AUS45838.1</b>	<b>A0A2I7VT61</b>
Celobiosa deshidrogenasa	AUS45831.1	A0A2I7VT52
Proteína de la familia 5 de la glucósido hidrolasa	AUS45836.1	A0A2I7VT63
Celobiosa deshidrogenasa	AUS45835.1	A0A2I7VT65
Glucanasa	AUS45834.1	A0A2I7VT76
Proteína de la familia 5 de la glucósido hidrolasa	AUS45833.1	A0A2I7VT89
Glucanasa	AUS45832.1	A0A2I7VT66
Beta-xylanasa	AUS45830.1	A0A2I7VT49

**Tabla 25.** Criterios empleados para la selección de posible función lacasa en proteínas de *Coniochaeta hoffmannii* [196,198].

	Cu-oxidasa 3: PF07732
Dominios multicobre oxidasa (Pfam)	Cuoxidasa:PF00394
	Cu-oxidasa2:PF07731
Motivo conservado L1	H-W-H-G-x(9)-D-G-x(5)-Q-C-P-I
Motivo conservado L2	G-T-x-W-Y-H-S-H-x(3)-Q-Y-C-x-D-G-L-x- G x[FLIM]
Motivo conservado L3	H-P-x-H-L-H-G-H
Motivo conservado L4	G-[PA]-W-x-[LFV]-H-C-H-I-D-A-E-x-H- x(3)- G[LMF]x(3)-[LFM]
Motivo conservado C-terminal	D-S-G[LIV]

**Tabla 26.** Patrones de motivos específicos de sub-subfamilias y sub-superfamilias de POAs  
(Recuperado de [200]).

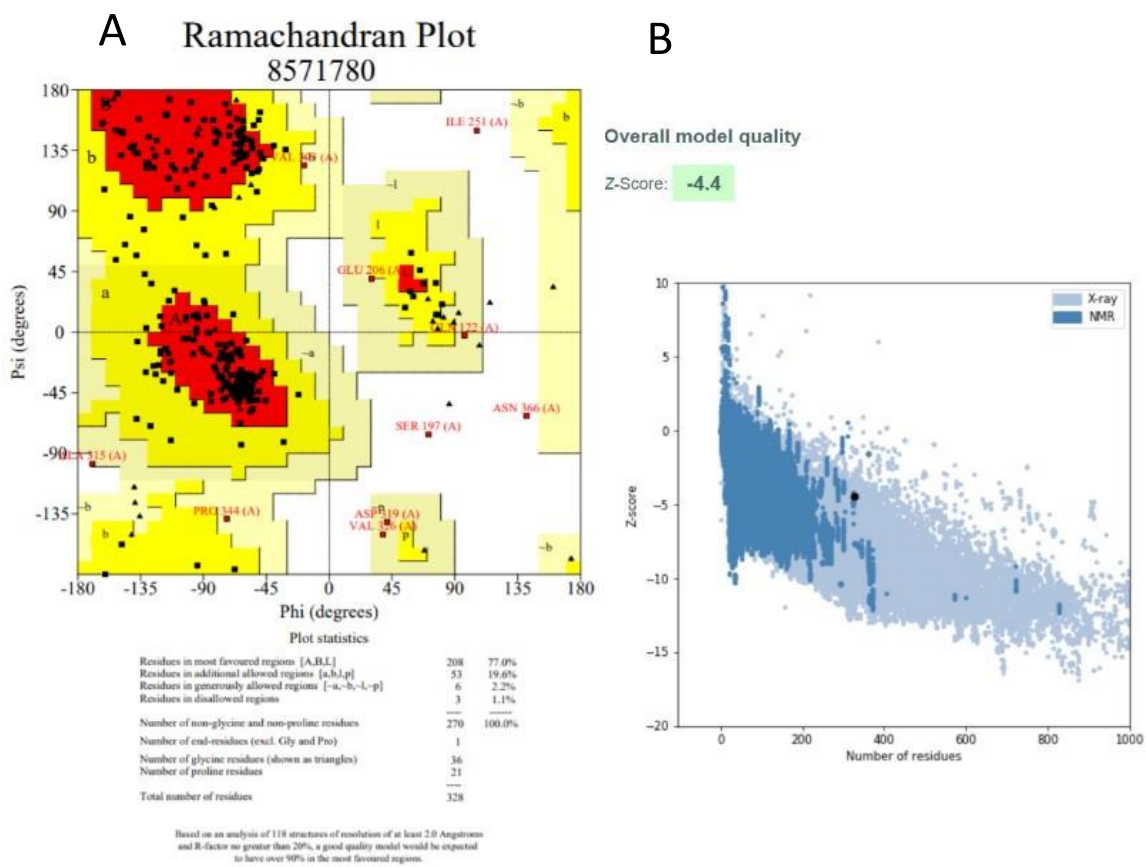
<b>Superfamilia</b>	<b>Sub-Superfamilia</b>	<b>Motivos</b>
Subfamilia-I	Subfamilia-I a	PCP—[NS]HG—SIG—HXXF— <b>EGD</b> —SXXRXD— RXXXXXE— FXD—C—C
Subfamilia-III	Subfamilia-III a	PCP—NH[NG]—G[ML]G— SIG— <b>E[GA]D</b> —SXTRXD— GPXTG—RXXXXXE—TGG— CXXE



**Figura 24.** Validación del modelo tridimensional correspondiente a la enzima Lac3.A: Validación en PROCHECK. B: Validación en PROSA







**Figura 26.** Validación del modelo tridimensional correspondiente a la enzima POA2. A: Validación en PROCHECK. B: Validación en PROSA.