



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Análisis morfológico, fisiológico y transcripcional del hongo halófilo
Aspergillus sydowii durante su exposición a condiciones poliaromáticas y
extremas de baja actividad de agua.”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

HEIDY PEIDRO GUZMÁN

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ramón Alberto Batista García

Índice

LISTADO DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN GENERAL	10
CAPITULO 1. Análisis transcriptómico de la degradación de HPAs por el hongo halófilo <i>Aspergillus sydowii</i> en condiciones hipersalinas	13
Introducción	13
Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs)	13
Toxicidad de los HPAs.....	14
Clasificación de los HPAs	17
Remoción de HPAs	18
Metabolismo de HPAs en hongos.....	21
Transcriptómica	23
Tecnología ARN-seq	25
Transcriptómica en hongos halófilos.....	27
Transcriptómica en hongos en presencia de HPAs.....	28
Antecedentes	29
<i>A. sydowii</i> y HPAs	29
Hipótesis	30
Objetivo general:	30
Objetivos específicos:	30
Materiales y métodos	31
Cepa y condiciones de cultivo.....	31
Cuantificación de benzo [a] pireno y fenantreno	32
Ensayos de actividad enzimática	32
Experimento de inhibición de citocromos.....	33
Microscopía de <i>A. sydowii</i> en condiciones poliaromáticas	33
Ensayos de detección toxicológica	34
Extracción de ARN y secuenciación del transcriptoma de <i>A. sydowii</i> en presencia de HPAs	36
Ensamblaje y anotación del transcriptoma.....	36
Identificación de metabolitos derivados de los HPAs en el sobrenadante de los cultivos.....	37
Análisis estadísticos	37
Resultados y Discusión	38

Degradación de fenantreno y benzo [a] pireno por <i>A. sydowii</i>	38
Perfil transcriptómico e identificación de subproductos en respuesta a la degradación de Phe y BaP.....	44
Mecanismos de desintoxicación y autodefensa en respuesta a la exposición poliaromática.....	54
Cambios morfológicos en <i>A. sydowii</i> en respuesta a condiciones poliaromáticas.....	58
Toxicidad residual tras micotratamientos con <i>A. sydowii</i> : evaluación de diferentes modelos.....	60
CAPITULO 2. Análisis morfológico y molecular del halófilo <i>A. sydowii</i> en condiciones de baja actividad de agua impuesta por tres kosmotropos.....	64
Introducción	64
Actividad de agua (a_w)	64
La vida en condiciones de baja a_w	64
Mecanismos moleculares que permiten la adaptación a baja disponibilidad de agua	65
El glicerol como soluto compatible y la vía de HOG.....	66
Cambios morfológicos en condiciones de baja a_w	68
Kosmotropos y caotropos. NaCl, KCl y Sorbitol	70
<i>Aspergillus</i> en condiciones de baja actividad de agua	72
Antecedentes	73
<i>A. sydowii</i> y baja actividad de agua	73
Hipótesis.....	75
Objetivo general:.....	75
Objetivos específicos:	75
Materiales y métodos.....	76
Selección del tiempo de extracción del ARN.....	76
Extracción del ARN total y secuenciación y análisis del ARNm de <i>A. sydowii</i>	76
Transcriptoma: ensamblaje de novo y anotación funcional	78
Análisis de expresión diferencial de genes	78
Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas.	79
Análisis comparativo de la huella metabólica de <i>A. sydowii</i> (impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol), mediante FF MicroPlate.....	80
Análisis fenotípico de microarreglos	80
Caracterización de los cambios morfológicos de <i>A. sydowii</i> en condiciones de baja a_w	81
Resultados y Discusión.....	81
Perfil transcriptómico de <i>A. sydowii</i> en respuesta a condiciones de baja a_w	81
Respuesta transcripcional de <i>A. sydowii</i> a condiciones de baja a_w , impuesta por NaCl.	86
Respuesta transcripcional de <i>A. sydowii</i> a condiciones de baja a_w , impuesta por tres kosmotropos (NaCl, KCl y sorbitol).	95
Huella metabólica de <i>A. sydowii</i> en condiciones de baja a_w examinada usando la FF Microplate de	

Biolog	100
Análisis fenotípico de microarreglos	106
Análisis morfológico de <i>A. sydowii</i> en condición óptima (0.98 a _w) impuesta por NaCl y de baja a _w (0.75) impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol.	107
CONCLUSIONES	112
ANEXOS	114
REFERENCIAS	119

LISTADO DE ABREVIATURAS

ARNm: ARN mensajero
cat: Catalasa
cth: Cistationina gamma-liasa
cyp: Citocromo P450
cysD: Homocisteína sintasa
scot: Succinil-CoA:3-ketoacido-coenzima A transferasa
glo: Glioxalasa
ah: Aconitato hidratasa
td: Tioredoxina
sod: Superóxido dismutasa
gst: Glutación S-transferasa
ask: MAP kinasa
hsp70: Familia de chaperonas Hsp70
pod: Peroxidasa
man: Alpha-1,2-manosidasa
alg11: Alpha-1,2-mannosiltransferasa
uap: UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa
chs: Quitina sintasa
chit: Quitinasa
bgt: 1,3-beta-glucanosiltransferasa
pst: Glicosilfosfatidilinositol anclada a membrana (GPI anchored)
gln: Glucanasa
gts: Glucanosiltransferasa
gh: Glicósido hidrolasa
nsdD: Factor de transcripción del desarrollo sexual
sepA: Proteína de citoquinesis
flbD: Familia de proteínas MYB de desarrollo del conidióforo
wetA: Proteína regulatoria del desarrollo
c2h2: Factor de transcripción
gpdh: Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

tps: Trealosa fosfato sintasa
6pgd: 6-fosfogluconato deshidrogenasa
gale: UDP-galactosa 4-epimerasa
gapdh: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
lad: L-arabinitol 4- deshidrogenasa
lysF: Homoaconitasa
icdA: Isocitrato deshidrogenasa mitocondrial
sdh: Succinato deshidrogenasa
fh: Fumarato hidratasa
pi4k: Fosfatidilinositol 4-kinasa
prnD: Prolina oxidasa
gdh: Glutamato deshidrogenasa
hex6: Transportador de hexosas
ct: Transportador de cationes
mdh: Malato deshidrogenasa
ast: Aspartato transaminasa
mfs: Transportador de múltiples drogas
abc: Transportador de múltiples drogas
aap: Permeasa de aminoácidos
ncx: Transportador de sodio y calcio
gk: Guanilato quinasa
hst: Histona deacetilasa
rfx: Proteína de control de daño al ADN
rad2: Proteína de reparación de escisión del ADN
radC: Proteína de reparación y recombinación del ADN
rad25: Helicasa reparadora del ADN
rhp54: Proteína de reparación del ADN
mms21: Proteína de organización cromosómica y reparación del ADN
rad9: Proteína de reparación del ADN
pso2/snm1: Proteína de reparación del ADN

RESUMEN

El hongo ascomiceto halófilo *Aspergillus sydowii* EXF-12860 fue el modelo seleccionado en este estudio dada su capacidad de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y otros compuestos xenobióticos en condiciones hipersalinas. De igual manera, se comprobó su capacidad de crecimiento en los menores valores de actividad de agua (a_w) que sustentan la vida ($a_w = 0.75$). En nuestro estudio se llevó a cabo la biorremediación de HPAs de un medio hipersalino (1M NaCl) empleando al hongo *A. sydowii*, el cual fue capaz de metabolizar estos compuestos como única fuente de carbono luego de 10 días. Se estudiaron los mecanismos metabólicos de degradación de los HPAs analizando el transcriptoma de *A. sydowii* y se encontraron genes relacionados con la remodelación de la pared celular, la degradación y el metabolismo de los xenobióticos y la respuesta al estrés. Se realizaron estudios bioquímicos y toxicológicos en diferentes organismos modelo (*Physcomitrella patens*, líneas celulares humanas y el pez cebra) donde la presencia de *A. sydowii* disminuyó la toxicidad del medio contaminado con HPAs.

En un segundo estudio se realizó un análisis comparativo de las adaptaciones moleculares, fisiológicas y morfológicas de *A. sydowii* ante condiciones de baja a_w (0.75) impuesta por los kosmotropos NaCl, KCl y Sorbitol. El análisis transcriptómico reveló que *A. sydowii* desarrolla adaptaciones que le permiten mantener el equilibrio osmótico y evitar el daño oxidativo a alta salinidad. La reorganización de la pared celular, el transporte de cationes a través de la membrana y la síntesis de glicerol fueron los principales procesos regulados. A nivel morfológico se vio afectado el crecimiento de este hongo en presencia de NaCl ($a_w \cong 0,75$). A nivel metabólico la degradación de diversos sustratos orgánicos, fuentes de fósforo, azufre y nitrógeno también se vio afectada en presencia de sales (NaCl y KCl) versus solutos orgánicos

(Sorbitol) y la condición óptima de crecimiento. Desde nuestra perspectiva, este es el trabajo más completo sobre el potencial de *A. sydowii* como herramienta en enfoques de biorremediación y de adaptación a condiciones extremas de baja a_w impuesta por varios solutos.

ABSTRACT

The halophilic ascomycete fungus *Aspergillus sydowii* EXF-12860 was the model selected in this study due to its ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and other xenobiotic compounds under hypersaline conditions. Similarly, its growth capacity was verified in the lowest values of water activity (a_w) that support life ($a_w = 0.75$). In our study, the bioremediation of PAHs from a hypersaline medium (1M NaCl) was carried out using the fungus *A. sydowii*, which was able to metabolize these compounds as the only carbon source after 10 days. The metabolic mechanisms of PAHs degradation were studied by analyzing the transcriptome of *A. sydowii* and genes related to cell wall remodeling, degradation and metabolism of xenobiotics and the response to stress were found. Biochemical and toxicological studies were carried out in different model organisms (*Physcomitrella patens*, human cell lines and zebrafish) where the presence of *A. sydowii* decreased the toxicity of the medium contaminated with PAHs.

In a second study, a comparative analysis of the molecular, physiological and morphological adaptations of *A. sydowii* under low a_w conditions imposed by the cosmotrophs NaCl, KCl and Sorbitol was carried out. Transcriptomic analysis revealed that *A. sydowii* develops adaptations that allow it to maintain osmotic balance and avoid oxidative damage at high salinity. Cell wall reorganization, cation transport across the membrane, and glycerol synthesis were the main regulated processes. At the morphological level, the growth of this fungus was affected in the presence of NaCl ($a_w \cong 0.75$). At the metabolic level, the degradation of various organic

substrates, sources of phosphorus, sulfur and nitrogen was also affected in the presence of salts (NaCl and KCl) versus organic solutes (Sorbitol) and the optimal growth condition. From our perspective, this is the most complete work on the potential of *A. sydowii* as a tool in bioremediation and adaptation approaches to extreme conditions of low aw imposed by various solutes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Estudios previos realizados por nuestro equipo de trabajo en la búsqueda de microorganismos modelo capaces de crecer en condiciones extremas y degradar compuestos recalcitrantes, permitieron el aislamiento del hongo ascomiceto halófilo *Aspergillus sydowii* EXF-12860. Este hongo se obtuvo a partir de la fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar en medio mínimo suplementado con 2.0 M de NaCl (Batista-García, et al., 2014), además cuenta con actividad ligninolítica (Batista-García, et al., 2014) y la capacidad de degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) y otros compuestos xenobióticos en condiciones hipersalinas (Batista-García, et al., 2017) (González-Abradelo, et al., 2019). De igual manera, se comprobó recientemente su capacidad de crecimiento en los menores valores de actividad de agua (a_w) que sustentan la vida ($a_w = 0.75$) (Jiménez-Gómez, et al., 2020).

Los organismos que toleran condiciones de baja a_w se denominan xerotolerantes, mientras que aquellos que requieren estrictamente de estas condiciones para su crecimiento óptimo, se denominan xerófilos. Existen, por otra parte, microorganismos capaces de crecer en ecosistemas hipersalinos desarrollando mecanismos de adaptación a altos niveles de iones. Tales microorganismos se denominan halófilos o halotolerantes en lugar de xerófilos/xerotolerantes (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009).

Los grupos microbianos xerófilos y halófilos estudiados están dominados por Archeas y Eubacterias, con muy pocos ejemplos de microorganismos eucariontes (Grant, 2004). Sin embargo, dentro de estos últimos, sobresalen los hongos como modelos para el estudio de los mecanismos de adaptación a condiciones de baja a_w . En estas condiciones, los microorganismos intentan prevenir la pérdida de agua de las células acumulando solutos compatibles, tales como iones, aminoácidos o polioles, los cuales contrabalancean la alta

osmolaridad extracelular. Los hongos generalmente acumulan polioles, tales como glicerol, eritritol, arabitol o manitol, los que pueden también ser secretados al medio extracelular (Witteveen & Visser, 1995).

En hongos filamentosos, los solutos compatibles han sido escasamente estudiados, por lo que la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de estos solutos no se conoce claramente. Estos hongos, en particular del género *Aspergillus*, son modelos especialmente atractivos para el estudio de los mecanismos de tolerancia a baja a_w dado que son capaces de crecer en el rango de los menores valores de a_w que sustentan la vida (0.75- 0.9), y aun así presentan una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (Grant, 2004).

Por estos motivos es que *A. sydowii* surge como modelo para el análisis de los mecanismos moleculares y fisiológicos que caracterizan las adaptaciones a condiciones de baja a_w en los ascomicetos.

El uso indiscriminado de combustibles fósiles, los derrames de petróleo, entre otras causas relacionadas, son los factores principales que han contribuido a lo largo del tiempo a la persistencia de contaminantes xenobióticos en el ambiente. Ejemplo de este tipo de compuestos son los HPAs, caracterizados por ser tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos debido a la estabilidad de su estructura aromática. En este sentido se han implementado varias estrategias ambientales con el objetivo de remover este tipo de compuestos, entre las que se encuentra la biorremediación. El empleo de hongos filamentosos en este campo ha probado tener ciertas ventajas sobre el uso de bacterias, debido a la alta penetración del suelo mediante el micelio y la colonización rápida de diferentes sustratos. Sin embargo, muy pocos estudios se enfocan en los mecanismos moleculares que permiten a los hongos utilizar los HPAs como

única fuente de carbono en condiciones de halofilia; donde se esperaría produzcan enzimas funcionalmente estables para degradarlos en condiciones de hipersalinidad (1M NaCl), por lo que profundizar en el conocimiento de estos mecanismos permitiría la identificación de bioproductos (ej. proteínas, biotensoactivos) con potenciales aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales industriales. Por este motivo, en nuestro estudio se llevó a cabo la biorremediación de HPAs de un medio hipersalino (1M NaCl) empleando al hongo *A. sydowii*. Actualmente existen pocos estudios transcriptómicos en hongos en presencia de HPAs, y tales estudios están asociados generalmente a los genomas anotados disponibles, tal es el caso del desarrollo de microarreglos empleando el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (Chigu, Hirose, Nakamura, & H, 2010). En el caso del género *Ascomycota*, la mayoría de los estudios se han enfocado en la patogénesis y las enzimas de interés industrial, mientras que los estudios transcripcionales relacionados con la conversión de HPAs son escasos. Esta situación apunta a la necesidad de estudios adicionales empleando métodos transcriptómicos. Sin embargo, se han reportado algunos casos de regulación positiva de genes en especies fúngicas adaptadas a este tipo de compuestos, tal es el caso de los hongos *Neosartorya fischeri* (Hernández-López, Ramírez-Puebla, & Vazquez-Duhalt, 2015) y *Exophiala pisciphila* (Morel, Meux, Mathieu, & Thuillier, 2013). Por esta razón se decidió estudiar los mecanismos metabólicos de degradación de los HPAs analizando el transcriptoma de *A. sydowii* EXF-12860 crecido en glucosa (control) y HPAs como única fuente de carbono.

CAPITULO 1. Análisis transcriptómico de la degradación de HPAs por el hongo halófilo *Aspergillus sydowii* en condiciones hipersalinas

INTRODUCCIÓN

Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs)

Los HPAs son compuestos orgánicos constituidos por 2 o más anillos de benceno fusionados (Figura 1) (Haritash & Kaushik, 2009). Se presentan en el ambiente en forma de sólidos incoloros, blancos o amarillos pálidos con baja solubilidad en agua, puntos de fusión y de ebullición elevados y bajas presiones de vapor. Al aumentar su peso molecular, su solubilidad en agua disminuye, sus puntos de fusión y ebullición aumentan y sus presiones de vapor disminuyen (Clar, 1964) (Patnaik, 1999).

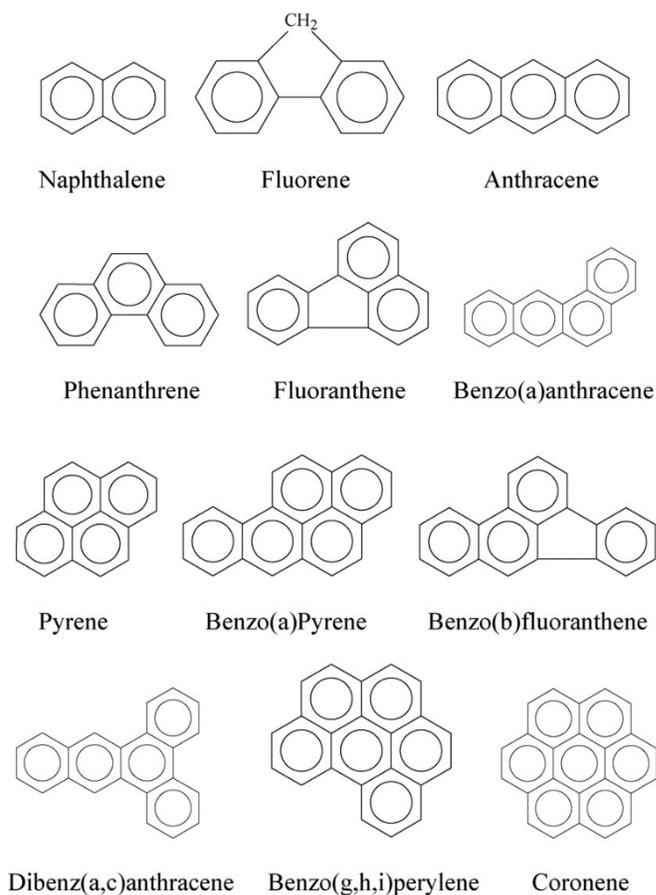


Figura 1. Estructuras químicas de algunos de los HPAs más comúnmente estudiados (Haritash-A et al. 2009).

Los HPAs se generan a partir de fuentes naturales dígase incendios forestales y erupciones volcánicas, o a partir de fuentes antropogénicas como la quema de combustibles fósiles, madera, basura, la incineración de residuos sólidos municipales y los derrames de petróleo. (Figura 2) (Hussein-A et al. 2016).

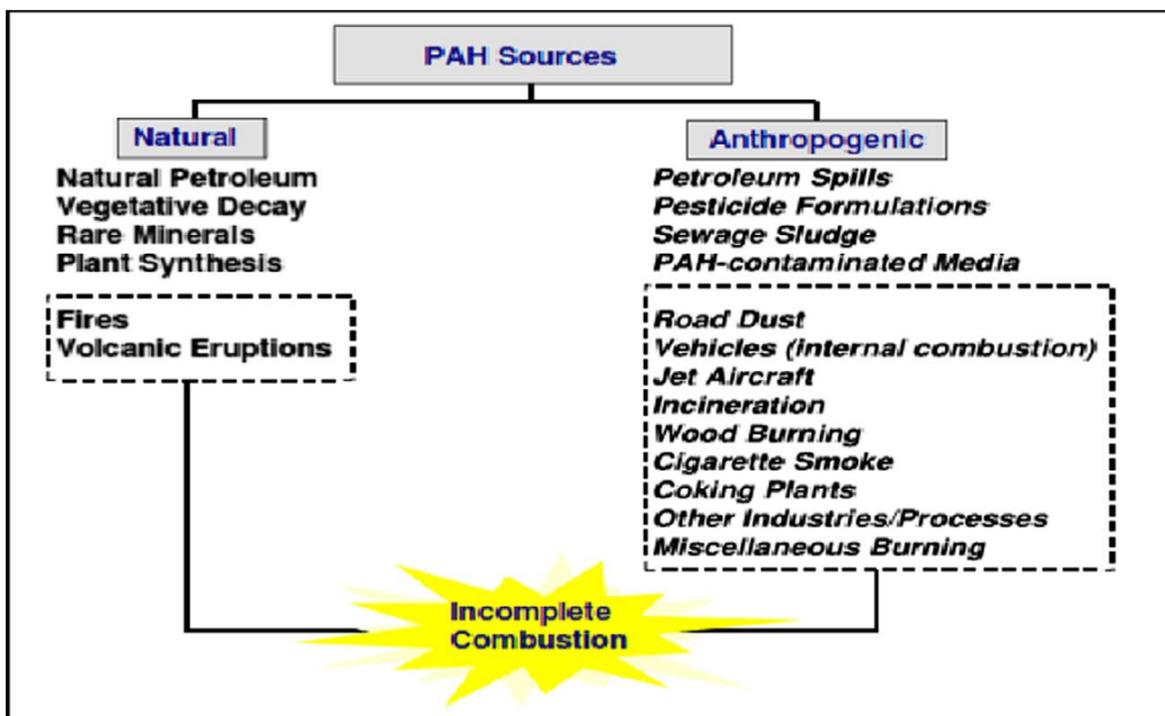


Figura 2. Fuentes naturales y antropogénicas de HPAs (Hussein-A et al. 2016).

Toxicidad de los HPAs

Los HPAs se consideran contaminantes ubicuos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos ((IARC), 1983). Este tipo de compuestos no se degradan fácilmente en condiciones naturales, ya que su persistencia en el entorno aumenta con el aumento de su peso molecular. Existen varios mecanismos responsables de la remoción de HPAs entre los que se encuentran la volatilización, fotooxidación, oxidación química, adsorción por partículas del suelo, y degradación fúngica y microbiana (Figura 3) (Cerniglia, 1992).

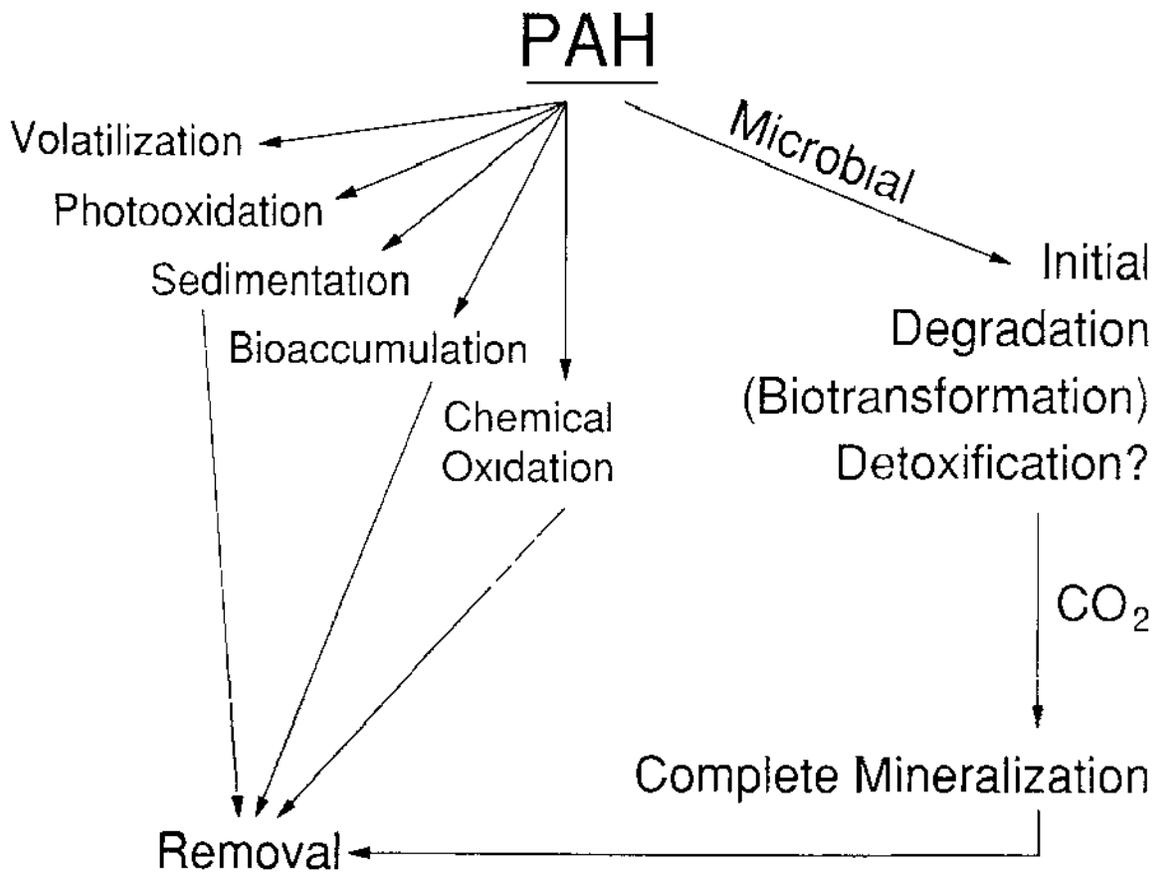
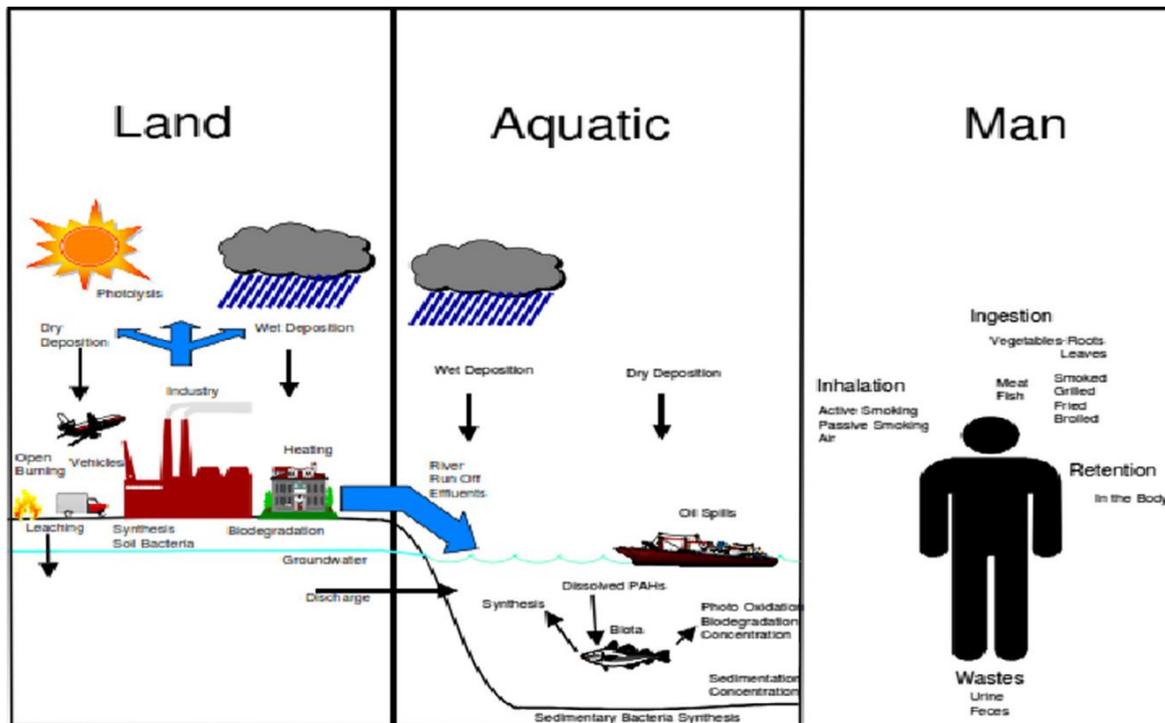


Figura 3. Mecanismos responsables de la remoción de HPAs en el entorno (Cerniglia-E *et al.* 1992).

La contaminación atmosférica es la vía principal de exposición del hombre a los HPAs, de conjunto con la ingesta de alimentos contaminados con estos compuestos (Figura 4) (Haritash & Kaushik, 2009). Es importante señalar que los HPAs afectan la salud humana de diversas formas: causan un desequilibrio en el sistema nervioso central y el sistema inmune, afectan órganos como hígado, riñones, pulmones, y algunos pueden causar irritación en la piel y las mucosas (Haritash & Kaushik, 2009), (Abdel-Shafy & Mansour, 2015), (Esra, 2016).



Source: Suess, 1976

Figura 4. Dispersión de HPAs a través del aire y ambientes terrestres y acuáticos (Haritash-A *et al.* 2012).

Su actividad genotóxica es evidente, una vez que este tipo de compuestos se biotransforman en intermediarios capaces de enlazarse covalentemente al ADN, provocando la ruptura de ambas cadenas (Abdel-Shafy & Mansour, 2015). Su oxidación da lugar a compuestos conocidos como epóxidos, intermediarios que son transformados rápidamente en carbocationes, que actúan como buenos agentes alquilantes provocando la mutagénesis del ADN (Esra, 2016). Ejemplo de ello es la conversión del benzo(a)pireno en benzo-pireno-diol epóxido (BPDE) mediante las enzimas del citocromo p450 y la epóxido hidrolasa. El BPDE forma aductos que al unirse covalentemente al ADN alteran la estructura de la doble hélice impidiendo la replicación. Por su parte, el fenantreno, inhibe la comunicación celular y la respiración mitocondrial (Abdel-Shafy & Mansour, 2015).

Muchos HPAs carecen de propiedades genotóxicas, sin embargo, la metilación de estos compuestos los convierte en metabolitos tóxicos. Las células cuentan con mecanismos de desintoxicación como la acción de los citocromos p450, proteínas que tienen la capacidad de agregar átomos de oxígeno a los anillos de los HPAs, formando moléculas más solubles en agua, que posteriormente son excretadas. Sin embargo, algunos intermediarios de esta oxidación resultan muy tóxicos (como es el caso de las quinonas) y causan daños irreparables

a las células antes de ser removidos (Esra, 2016).

El hombre no es el único afectado por la presencia de los HPAs en el entorno, muchas especies de plantas, microorganismos y aves, por solo citar algunos, son también víctimas de la contaminación con HPAs. En el caso de las bacterias, estos compuestos tienden a alojarse en las cadenas acilo de los fosfolípidos de la membrana plasmática, afectando sus funciones de conservación de energía, ocasionando cambios en su fluidez y en la conformación de diversas proteínas (Heipieper & Martínez, 2010). En el caso de las plantas, la presencia de HPAs producto de derrames de petróleo, puede afectar el intercambio de gases con la atmósfera, provocando una disminución en el crecimiento e incluso la asfixia y muerte de la planta (Smitha, Flowersb, Duncanb, & Alderb, 2006) (Lia, Zenga, Yanga, Zhouc, & Zana, 2014). Un evento muy común es la intoxicación aguda de las aves migratorias producto de la presencia de HPAs, ya que el esfuerzo que representan los vuelos prolongados moviliza las reservas de lípidos y ocasiona la liberación al torrente sanguíneo de los residuos de HPAs almacenados en forma de gotículas de grasa presentes en el tejido adiposo de las aves (Peter, 2006).

Clasificación de los HPAs

Existen dos clases representativas de HPAs, los de bajo peso molecular (2 o 3 anillos de benceno fusionados), caracterizados por ser volátiles, solubles y más susceptibles a ser degradados que aquellos de alto peso molecular (4 o más anillos de benceno fusionados), los que son absorbidos fuertemente por el suelo y los sedimentos y son más resistentes a la degradación, debido su alto peso molecular e hidrofobicidad (Bisht, et al., 2015). El benzo [a]-pireno (BaP), un HPA de alto peso molecular (5 anillos de benceno fusionados) (Cerniglia, Kelly, Freeman, & Miller, 1986) (Schmidt, Christensen, & Johnsen, 2010), ha sido ampliamente estudiado y es considerado recalcitrante, termodinámicamente estable y muy difícil de degradar (Passarini, Rodrigues, da Silva, & Sette, 2011) (Launen, Pinto, Wiebe, Kiehlmann, & Moore, 1995). Su persistencia en el ambiente como contaminante orgánico es de gran preocupación desde el punto de vista ambiental, debido a su potencial carcinogenicidad ((NTP), 2002) y bioacumulación (McElroy, Farrington, & Teal, 1989). El fenantreno es uno de los hidrocarburos más ubicuos en el ambiente (Shimada, Oginuma, Hara, & Y, 2004) (Nizetto, et al., 2008), clasificado por la US Environmental Protection Agency (EPA) como un contaminante prioritario que representa más del 49 % del total de HPAs en el ambiente, y es considerado junto con el

fluoranteno y pireno, como los principales hidrocarburos que actúan como contaminantes atmosféricos (R., 2002) (Tang, Tang, Zhu, Zheng, & Miao, 2005). Al ser un hidrocarburo aromático pequeño (3 anillos aromáticos), el fenantreno se emplea frecuentemente para desarrollar estudios sobre el metabolismo de HPAs (Pelkonen & Nebert, 1982) (Narro, Cerniglia, Van Baalen, & Gibson, 1992).

Remoción de HPAs

Métodos biológicos vs métodos fisicoquímicos

La persistencia de los HPAs en el ambiente depende tanto de sus características fisicoquímicas, como de la composición y características del medio en que se encuentran. Su recalcitrancia aumenta directamente con el aumento de su peso molecular y su coeficiente de partición octanol: agua, e inversamente con su solubilidad. Un alto valor del coeficiente de partición octanol: agua sugiere una gran persistencia de estos contaminantes en el ambiente y bajas presiones de vapor limitan su volatilidad (Cerniglia E. , 1992).

Los riesgos asociados a la presencia de HPAs pueden ser superados mediante el uso de métodos convencionales como la eliminación, alteración o aislamiento del contaminante (M.A. Providenti & Lee, 1993). Tales técnicas implican la excavación de suelos contaminados y su incineración o contención, sin embargo, estas técnicas son caras y, en muchos casos, no logran la completa eliminación de estos compuestos. Por otra parte, la biorremediación es una herramienta que permite transformar HPAs en productos inocuos, sin el gasto innecesario de químicos, tiempo y energía (O.P. Ward & Singh, 2003). Los sitios contaminados con HPAs pueden ser remediados utilizando microorganismos, algas, bacterias y hongos de forma individual o combinados (Cerniglia E. , 1992). La biorremediación de un contaminante y la velocidad a la que se logra depende de las condiciones ambientales, número y tipo de microorganismos empleados, así como de la naturaleza y estructura química del compuesto que se desea degradar (M.A. Providenti & Lee, 1993) (O.P. Ward & Singh, 2003).

Así, para diseñar una estrategia de biorremediación, deben tenerse en cuenta diversos factores. Uno de ellos, por ejemplo, sería la capacidad que tienen ciertas especies de aclimatarse a nuevos ambientes contaminados con altos niveles de HPAs, lo cual puede, en ocasiones, dar lugar a una adaptación genética (Haritash & Kaushik, 2009).

Hongos vs bacterias en la biorremediación

Las bacterias son microorganismos que participan activamente en la degradación de contaminantes orgánicos (B. Ye, Siddiqi, Maccubbin, & Kumar, 1996). Entre las especies bacterianas más conocidas capaces de degradar HPAs se encuentran *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Sphingomonas* (Aitken, Stringfellow, Nagel, & C. Kazunga, 1998). No obstante, el uso de hongos filamentosos en el campo de la biorremediación puede tener ciertas ventajas sobre el uso de bacterias, debido a la alta penetración del suelo mediante el micelio y la colonización rápida de diferentes sustratos (Bisht, et al., 2015).

Los hongos son organismos capaces de colonizar todas las matrices (suelo, agua, aire) en entornos naturales, en los que desempeñan un papel clave en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas (U. Walter, Beyer, & Rehm, 1991). El éxito evolutivo de este heterogéneo grupo de organismos se evidencia por el alto número de especies, la diversidad de nichos y hábitat y su capacidad para establecer simbiosis con otros organismos como plantas y animales (Schneider, Grosser, Jayasimhulu, & Xue, 1996).

Los hongos son organismos heterótrofos y juegan un papel importante en la descomposición de materia orgánica (Trzesicka-Mlynarz & Ward, 1995). La producción de una gran variedad de enzimas tales como amilasas, lipasas, y proteasas les permiten usar sustratos como el almidón, las grasas y diversas proteínas (Tam, Guo, Yau, & Wong, 2002). Un número más limitado de especies pueden utilizar pectina, celulosa y hemicelulosa como fuentes de carbono, mientras que otros son capaces de degradar polímeros naturales particularmente complejos y resistentes al ataque microbiano, tales como queratina, quitina y lignina (Romero, Cazau, Giorgieri, & Arambarri, 1998). Producto de la elevada inespecificidad de las enzimas implicadas en la degradación de la lignina, muchos hongos son capaces de degradar compuestos xenobióticos entre los que se encuentran los HPAs (Daane, et al., 2002). Esta capacidad convierte a los hongos en organismos de gran interés para la biorremediación ambiental (Anastasi, 2012).

Hongos en la biorremediación. *Ascomycetos* vs *Basidiomicetos*

Aunque muchos enfoques de investigación actuales promueven la aplicación de microorganismos exógenos para propósitos de biorremediación, los microorganismos autóctonos representan una ventaja cuando compiten en escenarios reales (Aranda, 2016). Así, estudios recientes indican que los hongos ascomicetos autóctonos, son el género fúngico dominante en ambientes contaminados con HPAs (Aranda, 2016).

Muchos hongos pertenecientes al género basidiomicetos han sido objeto de estudio por décadas, debido a la eficacia de sus enzimas degradadoras de lignina en la conversión de HPAs (Anastasi, 2012). Sin embargo, los hongos ligninolíticos no compiten de manera tan eficiente en ambientes naturales, puesto que requieren la presencia de sustratos lignocelulósicos en el medio, los cuales rara vez se encuentran en ambientes contaminados (Aranda, 2016). La mayoría de los suelos contaminados con HPAs están colonizados principalmente por las especies *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecylomices* y *Debaryomyces* pertenecientes al género *Ascomycota*, el phylum dominante. (Anastasi, 2012) (Aranda, 2016).

Hongos extremófilos en la biorremediación

Los hongos extremófilos son importantes desde el punto de vista ambiental, debido a su capacidad para producir extremoenzimas, caracterizadas por su termotolerancia, resistencia a cambios de pH, a altas concentraciones de sales, etc. (Neifar, et al., 2015) (Nigam, 2013). Las propiedades anteriores los convierten en candidatos ideales para el procesamiento y la bioconversión de materias primas como las presentes en las industrias alimentarias, textiles, y en procesos como la biorremediación (Singh, Raghukumar, R, & Mascarenhas-Pereira, 2013) (Sinha, Sinha, & Khare, 2014).

Muchas enzimas hidrolíticas que muestran actividad bajo condiciones extremas han sido reportadas como implicadas en procesos de remediación tales como la contaminación por crudo en condiciones hipersalinas (Naranjo-Briceno, Perniam, & Guerra, 2013). Diversas especies de hongos han sido caracterizadas como resistentes a ese tipo de condiciones extremas, entre las que se encuentran *Pestalotiopsis palmarum*, *Lecanicillium muscarium*, *Phanerocheate chrysosporium* y *Aspergillus niger* (Betancor, Johnson, & Luckarift, 2013) (Li, et al., 2013), capaces de producir extremoenzimas para descomponer HPAs como sustratos, por lo que podrían ser utilizadas eficazmente como agentes biodegradativos en el proceso de reciclaje de

residuos (Narayanan, Chopade, Raj, Subrahmanyam, & Rao, 2013) (Maruthi, 2013).

Metabolismo de HPAs en hongos

La degradación de HPAs por medio de hongos ligninolíticos ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años (Figura 5) (Cajthaml, Pacakova, & Sasek, 2001), ya que, debido a la estructura irregular de la lignina, estos hongos son capaces de producir enzimas extracelulares con muy baja especificidad de sustrato, haciéndolos adecuados para la degradación de diferentes compuestos (Hofrichter, Schneibner, Schneegab, & Fritzche, 1998). El sistema ligninolítico consta de tres grupos enzimáticos principales: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, y fenoloxidasas (lacasas, tirosinasas) (Vyas, Bakowski, Sasek, & Matucha, 1994) (Boyle, Wiesner, & Richardson, 1998).

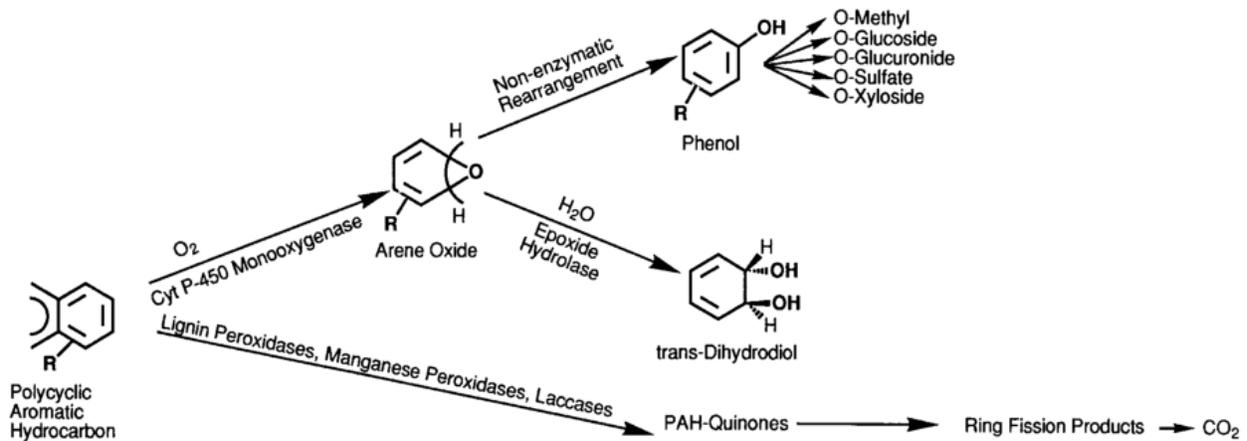


Figura 5. Vías empleadas por los hongos para metabolizar los HPAs (Cajthaml-T *et al.* 2001).

Los HPAs que penetran al interior celular se transforman en derivados hidroxy, dihidrodiol y quinonas (fase 1), proceso mediado por el sistema del citocromo P450 (CYP) y por epóxido hidrolasas (EHs). Las hemoproteínas del CYP catalizan reacciones de hidroxilación, epoxidación y monoxigenación, las cuales son comunes en el metabolismo de diversas drogas y juegan un papel importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios y ergosterol (Aranda, 2016). Las EHs, por su parte, catalizan la hidrólisis de epóxidos a sus correspondientes transdihidrodiol, participan en la síntesis de mensajeros químicos y metabolitos secundarios. Los metabolitos oxidados se conjugan entonces con sulfatos, metilos, glucosas, xilosas o ácido glucurónico (fase 2) (Aranda, 2016), proceso mediado por transferasas, entre las que se encuentran las sulfottransferasas, restringidas al género *Ascomycota*, y la glutatión transferasa,

involucrada en la defensa contra especies reactivas del oxígeno debido a su actividad peroxidasa (Aranda, 2016). Durante la fase 3, estos metabolitos son secretados o almacenados en organelos (vacuola) y una vez que se liberan al ambiente, pueden ser degradados por otros microorganismos (Figura 6). Las enzimas que participan en estas vías de desintoxicación están codificadas por familias multigénicas, incluidas en el xenoma (biosistema responsable de la detección, transporte y metabolismo de xenobióticos). Más de 6000 genes codifican para la familia CYP, la cual es más diversa en el género *Ascomicota* (Aranda, 2016).

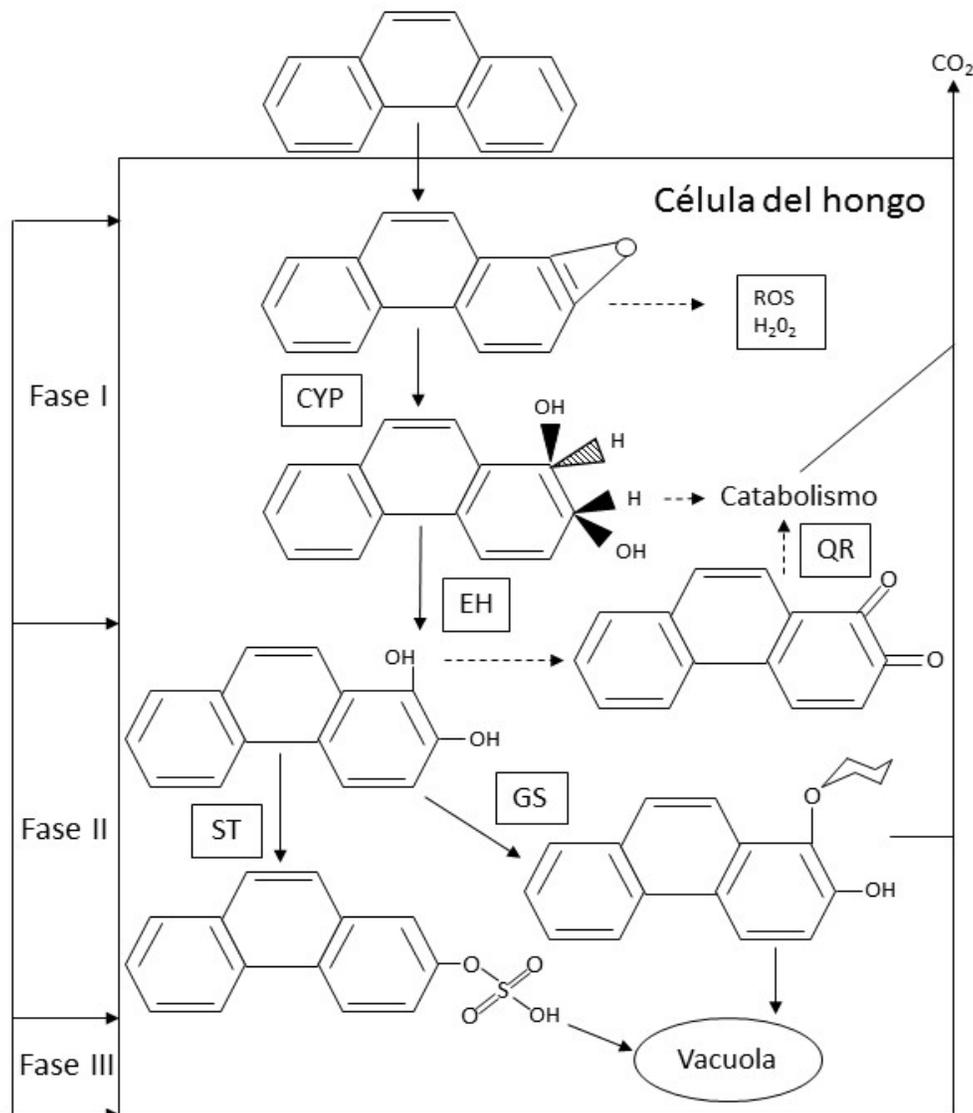


Figura 6. Modelo integrativo simplificado del mecanismo intracelular para la conversión de HPAs en hongos. CYP (Sistema del citocromo P450), EH (epóxido hidrolasa), ST (sulfotransferasa), QR (quinona reductasa).

Muchos de los ambientes contaminados por HPAs, como los sitios de extracción de petróleo y

las aguas residuales de la industria petroquímica, se caracterizan por ser salados o hipersalinos (Gousmi, et al., 2016) lo que constituye un reto adicional para las estrategias de biorremediación, puesto que pocos microorganismos son capaces de crecer en altas concentraciones de sales. *Aspergillus sydowii* ha sido reportado como un hongo halófilo con potencialidades para la producción de enzimas ligninolíticas funcionales en condiciones hipersalinas (Batista-García, et al., 2014). Según lo expuesto anteriormente, la cepa *A. sydowii*, sería uno de los pocos ejemplos de hongos ascomicetos que podrían utilizarse para la biorremediación de sitios contaminados con HPAs en condiciones hipersalinas. Con el objetivo de identificar genes con posterior utilidad en posibles aplicaciones biotecnológicas y estudiar aspectos de haloadaptación y expresión de enzimas robustas (extremoenzimas) en presencia de benzo [a] pireno y fenantreno como única fuente de carbono, resulta relevante la caracterización del transcriptoma de *A. sydowii* en estas condiciones.

Transcriptómica

Celularmente la información genética cifrada en el ADN y contenida en los genes se expresa a través de los mecanismos de transcripción y traducción, a partir de los cuales se producen moléculas de ARNm y proteínas, respectivamente. Eventos celulares tales como la replicación, la diferenciación, la división celular y otros caracteres macroscópicos tales como rasgos fenotípicos, morfológicos, funcionales y de respuesta ante estímulos son producto de la expresión diferencial de genes.

La transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que inician cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial. La regulación de la transcripción depende de la unión de activadores o represores en los elementos del promotor ubicados en la región 5' de la secuencia codificante. Los activadores o represores dictaminan la tasa de síntesis de ARNm que debe producir la maquinaria basal de transcripción, la cual está constituida por los factores de transcripción generales (GTFII) y la ARN polimerasa II (Proudfoot, Furger, & Dye, 2002). El número de moléculas producidas de un ARNm determinado depende de la función que este tenga en un proceso celular específico. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán. De manera similar, bajo ciertas circunstancias

particulares hay genes que permanecen apagados, pero un estímulo hace que se expresen y se inicia entonces la transcripción. De esta manera la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcripto, bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Más aún los niveles de ARNm pueden dar no solo una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de ARNm con cambios en la abundancia de proteínas (Lockhart & Winzeler, 2000). En conjunto, todos los transcriptos derivados de genes que se producen en una célula en un momento y bajo una condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma. El estudio y análisis del transcriptoma es esencial para el entendimiento de la función de genes. De manera general se puede establecer que si un gen se expresa en una condición o célula determinada es porque cumple allí una función. El estudio global del transcriptoma permite también establecer patrones de regulación génica coordinada, lo que contribuye no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también a identificar elementos promotores comunes a varios genes. En la década de los noventa, los northern blots, los microarreglos de ADNc (ADN complementario obtenido por transcriptasa inversa a partir de ARNm), los ADNc AFLP y el análisis serial de expresión de genes SAGE (del inglés serial analysis of gene expression), entre otras técnicas, permitieron el desarrollo y generación de conocimiento en transcriptómica, al estudiar la expresión de genes relacionados con respuestas a estímulos o a condiciones particulares, así como para determinar cambios en los patrones de expresión génica en tratamientos y cinéticas de expresión (Shalon, Smith, & Brown, 1996) (Schena, et al., 1998) (Meyers, Galbraith, Nelson, & Agrawal, 2004) (Marguerat & Bahler, 2010); sin embargo, estas estrategias resultan limitantes al estar basadas en hibridación, tener baja cobertura, y en algunos casos necesitar algún conocimiento previo de la secuencia del genoma para su implementación (Ward, Ponnala, & Weber, 2012).

Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, NGS (del inglés Next Generation Sequencing), se han revolucionado campos como los de la genómica y la transcriptómica. Estas tecnologías han permitido no solo generar información con altos rendimientos y a bajo costo, sino también abrir nuevos horizontes para el entendimiento detallado y global de procesos de expresión (Ward, Ponnala, & Weber, 2012) (Mochida & Shinozaki, 2011) (Schneeberger & Weigel, 2011).

Tecnología ARN-seq

La caracterización completa y el análisis global de la expresión génica en una célula o tejido, aun sin ninguna información genómica previa, es ahora posible a través de la implementación de la secuenciación de ADNc, o más recientemente de la secuenciación directa de ARN, tecnología conocida como ARN-seq (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009) (Garber, Grabherr, Guttman, & Trapnell, 2011) (Egan, Schlueter, & Spooner, 2012). Esta herramienta transcriptómica cambia la manera de cómo se analizan y comprenden los (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009). Además, el ARN-seq da una cobertura completa de transcritos, genera información no solo de la secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos de splicing alternativo (Lister & Ecker, 2009) (Gulledge, Roberts, Vora, Patel, & Loraine, 2012). La información de esta manera puede ser integrada e interpretada, y se constituye de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de co-expresión.

En el poco tiempo que esta tecnología se encuentra disponible se han desarrollado un grupo relativamente amplio de investigaciones dirigidas a caracterizar y a cuantificar transcriptomas, así como a comprender los mecanismos de la variación de la expresión génica. Las aplicaciones de ARN-seq se han llevado a cabo en especies eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, el ratón y el humano (Nagalakshmi, et al., 2008) (Mortazavi, Williams, McCue, Schaeffer, & Wold, 2008) (Maher, et al., 2009) (Pickrell, et al., 2010) (Gan, et al., 2010) (Daines, et al., 2011) (Peng, et al., 2012), lo que ha demostrado la alta aplicabilidad que el ARN-seq ha tenido en estudios de especies modelo.

El ARN-seq es una herramienta transcriptómica actual que está fundamentada en la secuenciación de ADNc basada en los desarrollos NGS. En esta tecnología se captura el ARN total o ARNm, el cual se fragmenta y convierte en una librería de ADNc. Uno de los pasos fundamentales es la obtención de un ARN de buena calidad que represente todos los transcritos que se producen en la condición y tejido de estudio. Para el aislamiento del ARN eucarionte con frecuencia se emplean kits de extracción de ARNm, en los que se utiliza un oligo dT para capturar los ARNm que tienen colitas de polyA (Ward, Ponnala, & Weber, 2012). La fragmentación del ARN o del ADNc se realiza o bien por nebulización, por digestión con enzimas de restricción o a través del uso de cationes divalentes bajo condiciones de presiones elevadas

(Wang, Gerstein, & Snyder, 2009). Generalmente el fraccionamiento se realiza posteriormente a la síntesis de ADNc. Esta síntesis se realiza con procedimientos estándares bien establecidos para la mayoría de los organismos que hacen uso de la enzima transcriptasa reversa.

Una vez obtenido el ADNc se ligan adaptadores de tal forma que cada fragmento generado contendrá un adaptador ligado en sus extremos 3' y 5'. Las secuencias de estos adaptadores se conocen y serán necesarias para que cada fragmento pueda ser secuenciado, y en algunos casos pueden emplearse para diferenciar otros grupos de fragmentos obtenidos a partir de muestras de ADNc diferentes; sin embargo, no en todos los casos se requiere la ligación de adaptadores, lo cual dependerá de la plataforma de secuenciación a emplear. Los adaptadores se pueden ligar directamente a la muestra de ARN, previa síntesis de ADNc (Marguerat & Bahler, 2010) (Core, Waterfall, & Lis, 2008), o alternativamente se pueden adicionar directamente a la cadena sencilla de ADNc (Marguerat & Bahler, 2010) (Maher, et al., 2009).

En cuanto a la cantidad y concentración del ARNm que se requiere para la tecnología ARN-seq, el rango está actualmente entre 5 y 10 µg, con una concentración alrededor de 500 ng/µl [Ryan Kim, UC Davis Genome Center; Nong Chen, Business Development Director, BGI Americas, comunicación personal].

Por otro lado, dentro de las aplicaciones y ventajas que tiene la tecnología ARN-seq está que da una cobertura completa de transcritos, genera información tanto de la secuencia como de la estructura de exones y sitios de splicing alternativo (Lister & Ecker, 2009) (Gulledge, Roberts, Vora, Patel, & Loraine, 2012). Asimismo, los datos arrojados por ARN-seq tienen una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de PCR (del inglés polimerase chain reaction) cuantitativa (qPCR) (Ward, Ponnala, & Weber, 2012) (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009) (Nagalakshmi, et al., 2008). Además, también se ha mostrado que los resultados son altamente reproducibles (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009).

La tecnología ARN-seq actualmente está disponible comercialmente en las compañías Roche/454, Solexa/Illumina, SOLiD/Life Technologies y Helicos/BioSciences; sin embargo, de las tecnologías de NGS disponibles las más aplicadas son Roche/454 y Solexa/Illumina (Strickler, Bombarely, & Mueller, 2012). No obstante, estas compañías y otras no cesan en la búsqueda de mayores rendimientos de secuenciación, obtención de lecturas más largas que se lleven a cabo en tiempo real y cada vez a costos más bajos (Metzker, 2010) (Mardis, 2011).

Uno de los objetivos al emplear la tecnología de ARN-seq no es solo identificar la presencia de

transcriptos, sino la de cuantificar el nivel de expresión de cada uno.

En este sentido aquellas lecturas que se encuentren en alta proporción representarán niveles altos de expresión de determinado gen y aquellos transcriptos ausentes, o con un bajo número de lecturas, serán aquellos que o no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos (Schenk, Carvalhais, & Kazan, 2012). En algunos casos se realizan normalizaciones químicas en las librerías de ADNc con el fin de igualar su abundancia. De esta manera aquellos transcriptos altamente expresados no serán los únicos para los que se obtengan lecturas en la secuenciación (Ward, Ponnala, & Weber, 2012).

Transcriptómica en hongos halófilos

Los hongos halófilos han desarrollado estrategias adaptativas que les han permitido sobrevivir en ambientes hipersalinos. Liu y colaboradores en el 2017 (Liu, Ding, Rao, & Zhang, 2017), analizaron comparativamente el transcriptoma del hongo halófilo *Aspergillus montevidensis* ZYD4 con el objetivo de dilucidar los mecanismos de respuesta de este hongo a altas concentraciones de sal (estrés por salinidad). Se encontraron diferencialmente expresados 2352 genes, de los cuales 733 fueron regulados positivamente y relacionados a procesos como la acumulación de glicerol, el almacenamiento de solutos compatibles, la esporulación asexual, entre otros. Estos resultados proporcionan una mejor comprensión a nivel molecular de los mecanismos osmoadaptativos en este tipo de hongos halófilos.

El hongo halófilo *Aspergillus oryzae* es ampliamente utilizado para la producción industrial de salsa de soya, por lo que se encuentra expuesto a un entorno complejo, donde puede desarrollar sin lugar a duda estrés por salinidad. Bin y colaboradores en el 2017 (Bin, Long, Zhihong, & Li, 2017), analizaron los mecanismos bioquímicos de protección de este hongo bajo condiciones de estrés salino. Los resultados transcriptómicos mostraron la expresión de genes regulados positivamente, relacionados con la acumulación de arginina y la síntesis de ácido oleico. Este estudio proporciona una caracterización global del transcriptoma de *A. oryzae* bajo condiciones de estrés por salinidad, además de mostrar el papel de múltiples genes que pueden ser utilizados como blanco para la mejora de la tolerancia a la sal por medio de ingeniería genética.

Zack y colaboradores (Zajc, Kogej, Galinski, Ramos, & Gunde-Cimerman, 2014), analizaron el transcriptoma del hongo extremófilo *Wallemia ichtyophaga* en respuesta a condiciones

limitantes de salinidad y demostraron el papel que juega la pared celular de *W. ichtyophaga* en su respuesta a altas concentraciones de sal. El análisis reveló un enriquecimiento significativo de genes asociados a hidrofobinas, proteínas presentes en la pared celular. Este descubrimiento es de particular interés debido a las numerosas aplicaciones de las hidrofobinas en la industria farmacéutica y la medicina.

Cong y colaboradores en el 2017 (Cong, et al., 2017), analizaron el transcriptoma del hongo *Aspergillus sydowii* MS-19 aislado de una región antártica. En este estudio se anotaron 701 CAZymes, incluyendo 17 celulasas Y 19 feruloil esterases relacionadas con la degradación de lignocelulosa. Además, se anotaron 1 lacasa y tres peroxidasas similares a la lignina y manganeso peroxidasas, así como una glutatión y una catalasa-peroxidasa. Este estudio proporciona información útil para mejorar nuestra comprensión acerca de la producción de enzimas lignocelulósicas a bajas temperaturas.

Transcriptómica en hongos en presencia de HPAs

Actualmente existen pocos estudios transcriptómicos en hongos en presencia de HPAs, y tales estudios están asociados generalmente a los genomas anotados disponibles. El desarrollo de microarreglos empleando el basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* demostró que los citocromos P450 (CYPs) se encuentran expresados diferencialmente en presencia de antraceno y tienen propiedades catalíticas distintas en antraceno y antrona (Chigu, Hirose, Nakamura, & H, 2010). En esta especie, las enzimas glutatión-S transferasas (GSTs) Ure2p4 y Ure2p6 se expresan específicamente luego del tratamiento con HPAs (Thuillier, Ngadin, Thion, & Billard, 2011). Los experimentos realizados empleando RT-PCR en *P. chrysosporium* en condiciones no ligninolíticas mostraron que dos CYPs monooxigenasas (CYP63A2 y CYP5136A3) fueron reguladas positivamente en presencia de benzo [a] pireno produciendo metabolitos P450-hidroxilados (Sukanta, Bhattacharya, Khajamohiddin, Jodi, & Yadav, 2013). En el caso del género *Ascomycota*, la mayoría de los estudios se han enfocado en la patogénesis y las enzimas de interés industrial, mientras que los estudios transcripcionales relacionados con la conversión de HPAs son escasos. Esta situación apunta a la necesidad de estudios adicionales empleando métodos transcriptómicos. Sin embargo, se han reportado algunos casos de regulación positiva de genes en especies fúngicas adaptadas a este tipo de compuestos, tal es el caso del hongo *Neosartorya fischeri* (Edna, Shamayim, & Rafael, 2015),

capaz de transformar asfaltenos, donde se observó una regulación positiva en genes que codifican para monooxigenasas. *Exophiala pisciphila* (Shen, et al., 2015), aislada de un suelo contaminado con metales pesados, mostró una regulación positiva de GSTs, especialmente Ure2p, bajo diferentes condiciones ambientales.

ANTECEDENTES

***A. sydowii* y HPAs**

En el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM se aisló y caracterizó el hongo halófilo *A. sydowii* (Batista-García, et al., 2014). Este hongo mostró capacidad para producir enzimas ligninolíticas haloestables como lacasas, peroxidasas y esterases. Adicionalmente, se realizaron estudios que demostraron que este hongo crece en HPAs como única fuente de carbono (ejemplo: pireno y fenantreno, 50 mM) y en presencia de NaCl hasta 2.0 M. Además, no muestra inhibición en su crecimiento cuando crece en medios sólidos en presencia de estos xenobióticos.

La contaminación causada por HPAs, y los efectos derivados de estos xenobióticos, constituyen temas prioritarios en la agenda ambiental internacional. Los HPAs causan efectos nocivos para el hombre y el medio ambiente, y son altamente tóxicos. El estudio de la degradación microbiana de HPAs tiene un alcance relevante en el contexto de aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo la biorremediación de ecosistemas y efluentes industriales contaminados con HPAs. Aunque existen estudios que abordan estas temáticas, el conocimiento sobre los procesos microbianos de biodegradación y/o mineralización de HPAs en condiciones hipersalinas son aún muy limitados, más aún en hongos filamentosos, de ahí la pertinencia de este proyecto.

Hipótesis

La presencia de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas (1M NaCl), induce cambios en la expresión génica que le permiten a *A. sydowii* removerlos, lo que a su vez nos permitirá comprender cómo el hongo actúa sobre este tipo de compuestos.

Objetivo general:

Analizar morfológica, toxicológica y molecularmente la respuesta de *Aspergillus sydowii* durante su exposición a condiciones poliaromáticas en presencia de 1.0 M de NaCl.

Objetivos específicos:

1. Analizar la dinámica de remoción de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno en el hongo halófilo *A. sydowii* en presencia de 1.0 M de NaCl.
2. Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii* crecido en benzo [a] pireno y fenantreno o glucosa, ambas condiciones suplementadas con 1.0 M de NaCl.
3. Identificar bioproductos durante la degradación de benzo [a] pireno y fenantreno.
4. Analizar los cambios morfológicos en *A. sydowii* en respuesta a condiciones poliaromáticas.
5. Evaluar la toxicidad de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas en los modelos *Physcomitrella patens*, líneas celulares humanas y el pez cebra luego del microtratamiento con *A. sydowii*.

Materiales y métodos

Cepa y condiciones de cultivo

A. sydowii EXF-12860 es un hongo halófilo aislado del bagazo de caña de azúcar suplementado con 2 M NaCl (Batista-García, et al., 2014). La cepa se conservó en 20% de glicerol a -80°C y fue depositado en la colección de hongos extremófilos en la Facultad de Biotecnología, Universidad de Ljubljana, Eslovenia. Las esporas frescas y el micelio fueron obtenidos de cultivos en agar extracto de malta (MEA) con 1 M NaCl.

Se obtuvo un pre-inóculo de *A. sydowii* en medio líquido mediante la inoculación de 1×10^6 esporas en matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio mínimo (MM) suplementado con glucosa al 2% y 1 M NaCl.

La composición del MM fue: $7.8 \text{ mg l}^{-1} \text{ CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $18 \text{ mg l}^{-1} \text{ FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $500 \text{ mg l}^{-1} \text{ MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $10 \text{ mg l}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $50 \text{ mg l}^{-1} \text{ KCl}$, $1 \text{ g l}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4$, $2 \text{ g l}^{-1} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $2 \text{ g l}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $100 \text{ mg l}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $5 \text{ mg l}^{-1} \text{ MnSO}_4$, $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0,1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ CoCl}_2$. Se incubó el cultivo fúngico a 28°C y 150 r.p.m. hasta llegar a la fase exponencial de crecimiento (4 días). Posteriormente, el micelio fue colectado y centrifugado a 4000g, a 4°C durante 10 min y lavado tres veces con solución salina (0,5% NaCl). Para agotar los nutrientes acumulados en el hongo después de su crecimiento en el medio suplementado con glucosa, 3 g de micelio fueron transferidos a matraces de 250 ml que contenían 50 ml de MM con 0,5% de NaCl y se incubó durante 18h a 28°C y 150 r.p.m. Posteriormente, el micelio se colectó como anteriormente fue descrito y se inoculó 1 g en matraces de 250 ml que contenían 30 ml de MM, 1 M NaCl y una mezcla de 50 p.p.m. de benzo [a] pireno (BaP) (Sigma-Aldrich, Catálogo No. B1760, St. Louis, EE. UU.) y 50 p.p.m. de fenantreno (Phe) (Sigma – Aldrich, No. de catálogo P11409, St. Louis, EE. UU.), para una concentración total de 100 p.p.m. Los cultivos se incubaron a 28°C y 150 r.p.m. durante 10 días.

Para evaluar la remoción de los HPAs, se retiraron los matraces luego de 0, 0,5, 1, 2, 3, 8 y 10 días. La remoción, bioadsorción y biodegradación total de BaP y Phe se determinaron en cada tiempo de muestreo. Matraces sin inocular con y sin HPAs se incluyeron en el experimento como controles negativos y positivos respectivamente. Los cultivos se hicieron por triplicado para cada tiempo experimental y se realizaron en total 3 experimentos independientes (total n

= 9 por cada tiempo).

Para el análisis del transcriptoma, se colectó el micelio después de 3 días de exposición a los HPAs y se utilizaron como control matraces conteniendo glucosa (2%) y 1 M NaCl.

Cuantificación de benzo [a] pireno y fenantreno

El sobrenadante del cultivo y el micelio se separaron mediante centrifugación a 4000g y 4°C durante 10 min. El BaP y Phe fueron recuperados mediante extracción con solventes orgánicos utilizando 2 ml de hexano (calidad espectrometría de masas). Se realizaron tres extracciones consecutivas utilizando 2 ml de sobrenadante o 1,5 g de micelio húmedo. Seis mililitros de hexano fueron recuperados y luego concentrados seis veces usando un evaporador de vacío rotatorio. Se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro masas (GC-MS) para determinar cuantitativamente el BaP y Phe según Lee y colaboradores (Lee, et al., 2010). Brevemente, la separación de HPAs se realizó en un GC G1800A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) utilizando una columna de sílice fundida HP-5 MS (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 mm de espesor de película) (Hewlett Packard) y acoplado a un detector de ionización de electrones.

Todas las determinaciones experimentales se realizaron por triplicado para cada muestra. La remoción de HPAs se calculó como la diferencia entre los HPAs en el sobrenadante del tratamiento micelial y la concentración media de HPAs en los controles negativos. La bioadsorción fue considerada como la concentración de BaP y Phe cuantificados en la fracción micelial. La biodegradación se calculó como la diferencia entre la media de los HPAs en los controles negativos y la cantidad total de HPAs en el sobrenadante y el micelio del hongo.

Ensayos de actividad enzimática

Las actividades enzimáticas de lacasas y peroxidasas se midieron mediante la oxidación del 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina 6-sulfónico) (ABTS) (1 mM) (Sigma-Aldrich, Catalogue No. A1888, St. Louis, EE. UU.) a 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en ácido cítrico 0,1 M y tampón de fosfato de hidrógeno disódico 0,1 M a pH 5, según Touahar y colaboradores (Touahar, Haroune, Ba, Bellenger, & Cabana). Para la actividad peroxidasa se utilizó el mismo protocolo con la adición de H₂O₂ (0,005%). La actividad esterasa se midió siguiendo la conversión del 2-naftil-acetato (Sigma-Aldrich, No. de catálogo N6875) a naftol ($\epsilon = 23,395 \text{ M}^{-1}$

1 cm – 1) a 538 nm (Batista-García, et al., 2014). La actividad de la citocromo c reductasa (NADPH) se midió con un kit de ensayo de citocromo c reductasa (NADPH) (Sigma-Aldrich, Catálogo No. CY0100, St. Louis, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La actividad de la UPO se midió según Camacho-Morales y colaboradores (Camacho-Morales, García-Fontana, & Fernández-Irigoyen, 2018). Una Unidad InteARNcional (UI) de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima por miligramo de proteína total que cataliza la oxidación de 1 mmol de sustrato por minuto.

Experimento de inhibición de citocromos

Se incubó un pre-inóculo de *A. sydowii*, el cual fue lavado y colectado como se describió anteriormente. Posteriormente 1 g de micelio se inoculó en matraces de 250 ml que contenían 30 ml de MM, NaCl 1 M, 100 p.p.m. concentración final de BaP y Phe (1: 1) y 1 mM o 10 mM de butóxido de piperonilo (PPB) (Sigma-Aldrich, número de catálogo 291102, St. Louis, EE. UU.) como inhibidor de citocromos (CYC). Los cultivos se incubaron a 28°C y 150 r.p.m. Para la evaluación de la inhibición de CYC, los matraces de cultivo se retiraron después 0, 0,5, 1, 3 y 6 días. Matraces no inoculados con PPB se incluyeron en el experimento como controles negativos. Los cultivos se hicieron por triplicado para cada experimento y tiempo. Posteriormente, se colectaron los sobrenadantes para proceder con la cuantificación de BaP y Phe como fue descrito previamente.

Microscopía de *A. sydowii* en condiciones poliaromáticas

Se observaron muestras del hongo expuestas a BaP y Phe utilizando el método de agar invertido (Hickey, Swift, Roca, & and Read, 2004) en un Microscopio NiKon Eclipse Ti-U equipado con un objetivo Apo 60x / 1,49 A.N. usando una cámara Hamamatsu Orca Flash 4.0. Las muestras se fijaron y tiñeron con blanco de calcoflúor, y fueron excitadas con una lámpara de mercurio usando Filtros ET-DAPI. El micelio cultivado en presencia de glucosa se observó también al microscopio.

Ensayos de detección toxicológica

HPAs residuales y posibles metabolitos intermediarios se colectaron como se describió previamente a partir del sobrenadante mediante extracción con hexano. Los extractos orgánicos se evaporaron hasta 2 ml. Extractos orgánicos de MM no inoculados con o sin los HPAs se incluyeron como controles negativos y positivos, respectivamente.

Para evaluar la fitotoxicidad, el musgo *Physcomitrella patens* se cultivó en medio sólido Knop (Reski & Abel, 1985) durante 7 días a 22°C y 16h de luz / 8h de oscuridad. El control se suplementó con hexano. Las plantas fueron cultivadas durante 44 días a 22 °C y 16h de luz / 8h de oscuridad, para analizar el crecimiento relativo de las mismas durante el tratamiento. Los explantes fueron fotografiados con una cámara Nikon Colpix 5000 al día 0 y 44 del experimento. El área (mm²) cubierta por las plantas se midió utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). La tasa de crecimiento relativo se calculó de acuerdo con Medina-Andrés y colaboradores (Medina-Andrés, 2015).

La citotoxicidad para las células humanas se evaluó mediante la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una citoquina de estrés por células mononucleares de sangre periférica adulta (PBMC) expuestas a diferentes volúmenes del sobrenadante de cultivo. Se aislaron las PBMC mediante centrifugación diferencial sobre Lymphoprep (Axis-Shield, Escocia). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Thermo Fisher, número de catálogo 11875093, EE. UU.) suplementado con glutamina 2 mM, antibióticos comerciales (50 U ml⁻¹ de penicilina, 50 mg ml⁻¹ de estreptomycin) y 5% de suero fetal bovino (Thermo Fisher, Catalogue No. 16140063, EE. UU.). Las células se estimularon durante 6 h con los sobrenadantes obtenidos tras el tratamiento fúngico o con medios de control. Posteriormente, las células se sedimentaron y el ARN se obtuvo usando el método TRIzol (Thermo Fisher, número de catálogo 15596026, EE. UU.). Se utilizó un miligramo de ARN total para obtener el ADNc, utilizando la transcriptasa inversa RevertAid y poli (I-C) (Thermo Fisher, número de catálogo K1691, EE. UU.).

Los niveles de transcritos TNF α se midieron mediante qPCR en un termociclador StepOne (Applied Biosystems), usando la mezcla: Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Fisher, catálogo n.º K0221, EE. UU.). El gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) se utilizó como referencia para la normalización. Los siguientes cebadores se utilizaron para la amplificación: GAPDH forward, 5' CCCCCGGTTTCTATAAATTGAGCCC 3' y

reverse 5' AAATCCGTTGACTCCGACCTTCACC 3'; TNF α , forward 5' CTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAC 3' y reverse 5' ATGAGGTACAGGCCCTCTGAT 3'.

Los embriones de la línea AB y de tipo salvaje del pez cebra (*D. rerio*) fueron obtenidos de cruces naturales y criados a 28°C en base a procedimientos estándar (Westerfield, 2000). Los huevos fueron obtenidos por apareamiento al azar de parejas del pez cebra. Estos se colectaron a la mañana siguiente y se transfirieron a placas petri de plástico (60 huevos por placa) que contenían 10 ml de agua embrionaria fresca. Además, los embriones enfermos y muertos sin fertilizar se identificaron con un microscopio de disección y se extrajeron. Las etapas embrionarias fueron determinadas por criterios morfológicos de acuerdo con Kimmel y colaboradores (Kimmel, 1995). Los peces cebra se manipularon de acuerdo con las regulaciones locales de bienestar animal, y todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética (Instituto de Biotecnología, UNAM). A las 3,5h posteriores a la fertilización, los embriones se volvieron a checar, y cualquier otro embrión muerto o insalubre fue eliminado. Se seleccionaron embriones en etapa de esfera y se transfirieron a una placa de 48 pocillos; 10 embriones por pocillo.

Posteriormente se absorbió el agua del embrión y se cargaron 300 μ l del sobrenadante en cada pocillo. Los experimentos se realizaron por triplicado en cada tiempo y se realizaron tres experimentos independientes. Como control, se cultivó un conjunto de embriones con agua embrionaria en la misma placa, pero también en una placa petri de manera independiente. Las placas se cultivaron en una cámara húmeda a 28°C de 24h a 72h y el retraso en el desarrollo y pigmentación de los embriones se observó bajo un microscopio de disección. Los embriones fueron anestesiados con triclaína, inmovilizados con metilcelulosa en placas de agar y visualizados con un microscopio estéreo (Leica MZ 12.5, Zeiss, Germani). Además, fueron fotografiados utilizando una cámara CCD (AxioCam MRc 5, Zeiss, Germani) y el software AxioVision Rel. 48. Los análisis estadísticos se realizaron con tres réplicas experimentales independientes. El número exacto de réplicas biológicas se indica en la leyenda de las figuras. El análisis estadístico fue realizado con la prueba t de student del software Prism (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Las barras de error en los gráficos de columnas representan la desviación estándar de la media.

Extracción de ARN y secuenciación del transcriptoma de *A. sydowii* en presencia de HPAs

El micelio fúngico se colectó por centrifugación y maceración en nitrógeno líquido. El ARN total se aisló usando el método de extracción con TRIzol (Thermo Fisher, Catálogo No. 15596026, EE. UU.), se resuspendió en agua libre de ARNs y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior. La integridad del ARN fue evaluada en geles de agarosa y mediante electroforesis capilar (Agilent Bioanalyzer 2100, San Diego, CA, ESTADOS UNIDOS). Las muestras fueron secuenciadas por la compañía ABM (Vancouver, Canadá). Se llevó a cabo la construcción de las bibliotecas utilizando el kit de preparación de la biblioteca de ARNm TruSeq de Illumina (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). El control de calidad se realizó utilizando el ensayo de ADN Qubit y Agilent Bioanalyzer 2100. Las bibliotecas se agruparon, cuantificaron por qPCR y secuenciaron a 2×150 pb en la plataforma Illumina HiSeq-2500. La secuenciación del transcriptoma se realizó para tres cultivos / muestras independientes por grupo.

Ensamblaje y anotación del transcriptoma

Las lecturas sin procesar se filtraron para eliminar k-meros erróneos, así como adaptadores usando el software Rcorrector versión 1.0.4 (Song y Florea, 2015) y Trimmomatic versión 0.39 (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014). Las lecturas resultantes se ensamblaron utilizando el software Trinity (Haas, et al., 2013). El software BLAST fue utilizado para la anotación funcional, mientras que la anotación de la ontología genética (GO) se realizó utilizando la versión Blast2GO 5.2 (Conesa, et al., 2016). La cuantificación de los transcritos se realizó utilizando el software Kallisto versión 0.46.1 (Bray, Pimentel, Melsted, & Pachter, 2016). Los recuentos brutos se filtraron para eliminar el número bajo de transcritos (CPM $<1,5$ en más de tres muestras) y posteriormente se normalizaron usando el método RUVs en la versión RUVSeq 3.2 (Risso, Ngai, Speed, & Dudoit, 2014). El análisis de expresión diferencial de la transcripción se llevó a cabo utilizando el software DESeq2 (Love, Huber, & Anders, 2014). Los transcritos con un $\log_{2}\text{FC} > 1$ y una tasa de falsos positivos (FDR) < 0.1 se consideraron como diferencialmente expresados (DE). Se realizó un análisis de enriquecimiento de GO con topGO versión 3.2 (Alexa & Rahnenfuhrer, 2019) y se visualizaron los datos usando el software GOplot versión 1.02 (Walter, Sánchez-Cabo, & Ricote, 2015). El análisis de enriquecimiento de las vías metabólicas

se realizó utilizando el software BlastKOALA versión 2.2 (Kanehisa, Sato, & Morishima, 2015). Los datos transcriptómicos se encuentran disponibles públicamente en el Centro de Información Biotecnológica Nacional (NCBI): ID de envío: SUB7393773, ID de BioProject SRA: PRJNA631102.

Identificación de metabolitos derivados de los HPAs en el sobrenadante de los cultivos.

Subproductos de la degradación de los HPAs en el sobrenadante de cultivo se identificaron utilizando cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) Acquity I-Class System (Waters, Milford, CT, EE. UU.) con un CORTECS-UHPLC Columna HILIC C-18 de 1,6 μm (2,1 mm \times 50 mm; Waters) y acoplado a un Synapt G2S QToF MS (Waters). Los análisis de espectros, incluido m/z y cálculo de errores, así como la identificación de metabolitos se realizaron utilizando el Software MassLynx v4.1 (Waters, Milford, EE. UU.).

Análisis estadísticos

Se realizó una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar diferencias estadísticamente significativas. Posteriormente se realizó un análisis de comparación múltiple *post hoc* a través de una prueba de Tukey. Los niveles de significancia son siempre expresados como un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el software de análisis de datos GraphPad Prism versión 7.03 (software GraphPad).

Resultados y Discusión

Degradación de fenantreno y benzo [a] pireno por *A. sydowii*

La remoción de Phe y BaP de un medio líquido hipersalino (1 M NaCl) con HPAs como única fuente de carbono, tuvo un perfil similar para ambos sustratos poliaromáticos en *A. sydowii* (Figura 7a). Durante el primer día de cultivo, los HPAs se adsorbieron principalmente en el micelio, alcanzando altos niveles de agotamiento (70% y 75% para BaP y Phe respectivamente), seguido de una desorción, liberando casi la mitad de los HPAs adsorbidos en el medio. La degradación comenzó después de 2 días, lo que resultó en la eliminación de hasta el 90% para ambos HPAs después de 10 días de cultivo (Figura 7a). La eliminación del Phe y el BaP por medio del micelio muerto fue muy baja (<1%), incluso después de 10 días de cultivo (datos no mostrados), lo que indica que la biotransformación y no adsorción fue el principal proceso de eliminación. En 10 días, *A. sydowii* fue capaz de degradar hasta un 71% de BaP y 73% de Phe en condiciones hipersalinas (Figura 7a). Estos procesos fueron acompañados de una disminución drástica de la demanda química de oxígeno (DQO), del 97% después de 12 h de micotratamientos al 99,8% después de 10 días (Figura 7b).

La degradación de los HPAs se ha correlacionado con una reducción del pH del medio, debido a la liberación del ácido 1-hidroxi-2-naftoico, un intermedio temprano del metabolismo del Phe, así como debido a la liberación de ácido ftálico o ácido protocatequínico, ambos producidos durante la degradación de Phe (Sun, et al., 2020). Por esta razón, evaluamos los cambios en el pH durante el crecimiento de *A. sydowii* en presencia de Phe y BaP (Figura 7b). El pH permaneció casi invariable en medios no inoculados (5.7-5.8) pero se redujo a 4.8 después de 4 días en cultivos con *A. sydowii*, coincidiendo con la máxima degradación de HPAs y la reducción de la DQO. Posteriormente, el pH aumentó lentamente y alcanzó valores de 5.2 en el día 10 (Figura 7b), apoyando la noción de que los intermedios ácidos de la degradación de los HPAs son más tarde asimilados por el micelio fúngico.

Enzimas extracelulares modificadoras de lignina (LME), tales como lacasas, manganeso peroxidasa, peroxigenasas inespecíficas (UPO) y esterases se midieron en cultivos de *A. sydowii*. Estas enzimas están potencialmente involucradas en la biotransformación de HPAs en el sobrenadante de cultivo (Aranda, 2016) (González-Abradelo, et al., 2019), aunque la degradación total de HPAs por estas enzimas no ha sido determinada inequívocamente en

ascomicetos (Aranda, 2016). Como se muestra en la Figura 7c, las actividades lacasa y manganeso peroxidasa alcanzaron su punto máximo en el segundo día y disminuyeron ligeramente a partir de entonces, mientras que la actividad esterasa alcanzó su punto máximo en el cuarto día. No se detectó actividad de UPO.

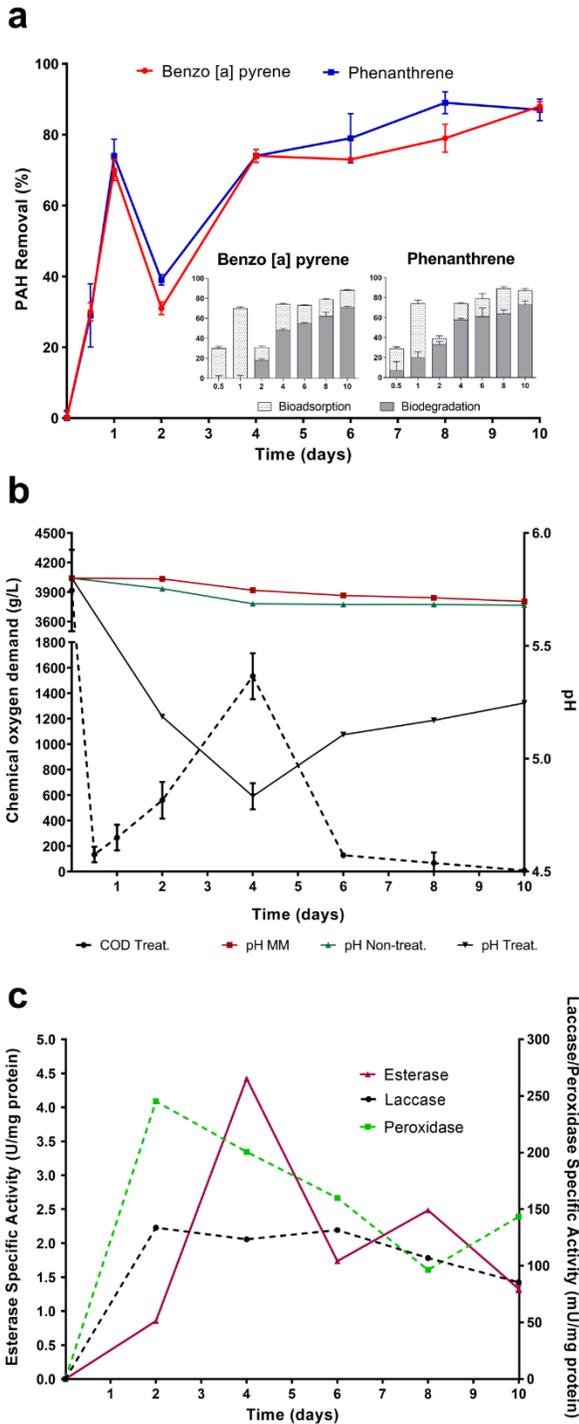


Figura 7. Caracterización bioquímica del proceso de degradación de HPAs en *Aspergillus sydowii* expuesto a condiciones hipersalinas.

A. Análisis temporal de la remoción de benzo [a] pireno y el fenantreno. Los recuadros representan la contribución de la bioadsorción y la biodegradación a la eliminación total de cada HAP.

B. Demanda química de oxígeno (DQO) y pH del sobrenadante del cultivo durante el transcurso de tiempo de la degradación de HPAs.

C. Actividades manganeso peroxidasa, lacasa y esterasa en el sobrenadante de cultivo durante la degradación de HPAs. detectaron actividades enzimáticas en los controles negativos (medio con glucosa). Tratamiento de DQO: demanda de oxígeno químico después del tratamiento con hongos. pH MM: valores de pH determinados para medio mínimo. pH Non-treat: valores de pH de no tratados (no inoculados) en medio mínimo suplementado con HPAs. pH Treat: valores de pH del MM suplementado con HPAs y tratados con *A. sydowii*.

Planteamos la hipótesis de que los mayores cambios transcripcionales tienen lugar durante la fase activa de la desintoxicación de los HPAs. Por lo tanto, nos enfocamos en los perfiles de degradación de estos para elegir el marco de tiempo apropiado para el análisis transcriptómico. La degradación de Phe comenzó inmediatamente (7% en 12 h), mientras que la degradación de BaP se observó después de 1 día de cultivo (Figura 8a). La tasa de conversión de HPAs fue exponencial entre 1 y 4 días ($R^2 = 0,998$, coeficiente de correlación de Spearman). Por tanto, la extracción del ARN total para el análisis del transcriptoma se realizó después 3 días de cultivo (Figura 8a), cuando *A. sydowii* alcanzó la máxima velocidad de degradación de HPAs.

Dado que los citocromos (CYC) [p. Ej. citocromos P450 (CYP)] son ampliamente reconocidos por su participación en la biotransformación de HPAs en ascomicetos (Aranda, 2016) (Loss, et al., 2019), se investigó el papel de los CYC durante la desintoxicación los HPAs en *A. sydowii*. La actividad NADPH-CYC c reductasa se determinó después de tres días de micotratamiento en presencia del inhibidor de CYC, butóxido de piperonilo (PPB) (Haroune, Saibi, Cabana, & Bellenger, 2016), resultando en la inhibición parcial de CYC mediante la adición de 1,0 mM y PPB 10 mM (Figura 8b). Ambas concentraciones de este inhibidor fueron suficientes para reducir la biodegradación de Phe y BaP (Figura 8c). La biotransformación de BaP fue fuertemente inhibida por PPB, ya que 1,0 mM de PPB redujo su degradación en aproximadamente un 15% después del primer día, mientras que 10 mM de PPB abolió completamente la biodegradación de BaP (Figura 8c). La bioconversión de Phe también disminuyó, pero en menor medida. Estos resultados sugieren que *A. sydowii* degrada tanto Phe como BaP en parte por un mecanismo mediado por CYC.

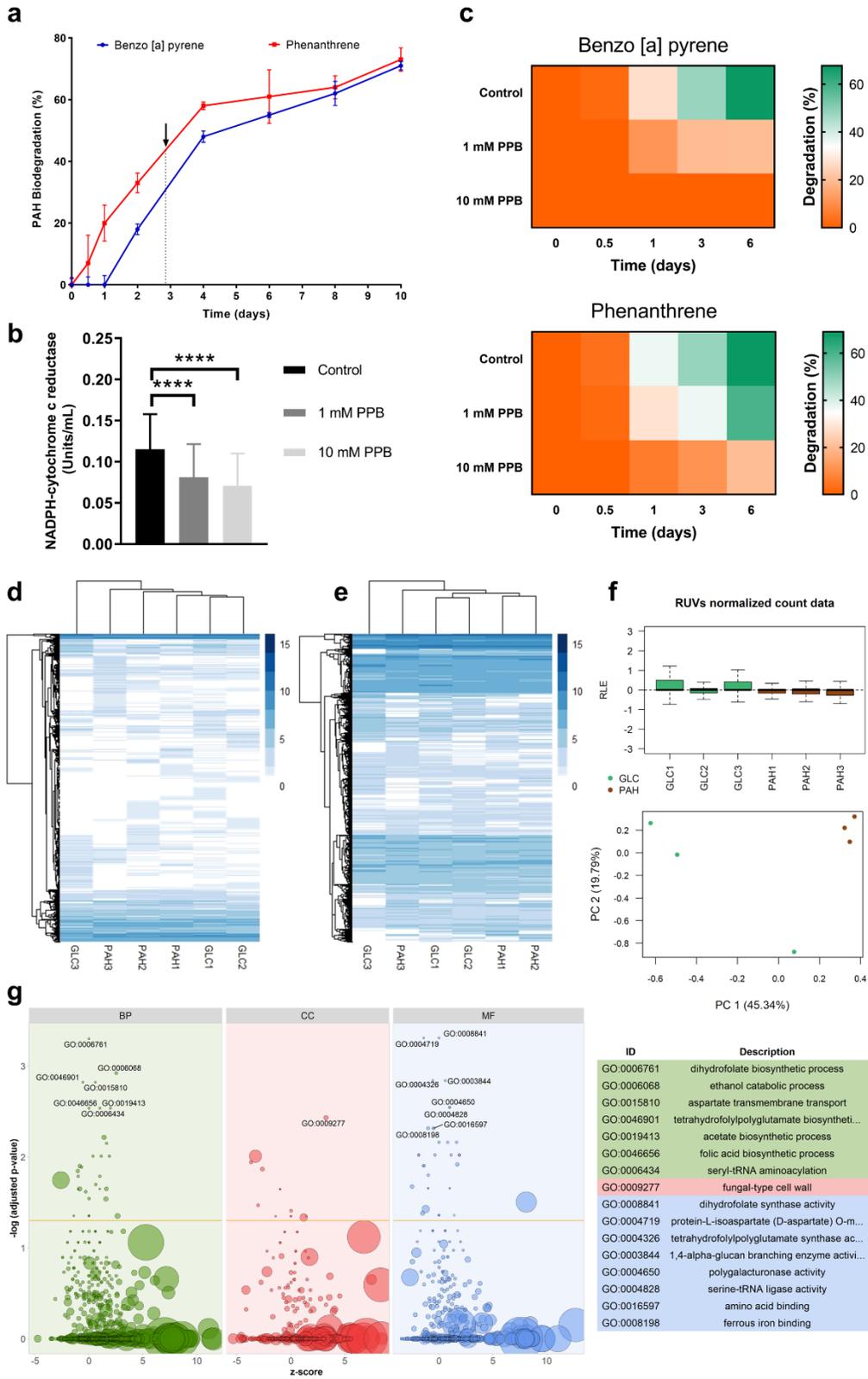


Figura 8. Análisis del transcriptoma de *Aspergillus sydowii* durante el proceso de degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).

A. Selección del tiempo para el análisis transcriptómico en el transcurso del proceso de biodegradación de HPAs. La flecha marca la hora seleccionada (día 3) para la extracción de ARN total.

B. Inhibición de la NADPH-citocromo c reductasa el por butóxido de piperonilo (PPB) en las células de *A. sydowii* al tiempo del análisis por ARN-Seq.

C. Evaluación del efecto de la inhibición del citocromo por el PPB sobre la degradación de benzo [a] pireno y fenantreno.

D – F. Preprocesamiento de datos de ARN-Seq para el análisis de expresión diferencial. Agrupación de perfiles de transcriptoma (D) antes y (E) después del filtrado de transcritos con bajo número de conteos. GLC, glucosa.

F. Efecto del método de normalización (RUV) sobre la expresión logarítmica relativa (RLE) (cuadro superior), que muestra las distribuciones de expresión entre muestras y la distribución de las muestras en un análisis de componentes principales (cuadro inferior) agrupadas por grupos de tratamiento.

G. Análisis de enriquecimiento de ontología genética (GO) en el conjunto de genes expresados diferencialmente durante la degradación de HPAs en *A. sydowii*. Este gráfico fue generado usando GOplot versión 1.02 (Walter et al., 2015). BP, procesos biológicos; CC, componentes celulares; MF, función molecular.

Muchos estudios han observado el potencial de los hongos ascomicetos, en particular, diferentes especies del género *Aspergillus* para metabolizar los HPAs (Sutherland & Cerniglia, 2010) (Aranda, 2016). Por ejemplo, *A. japonicus* pudo degradar hasta el 80% de los HPAs presentes en el suelo después de 14 días (Ileanacho, Okerentugba, Orji, & Ataikiru, 2014), mientras que *A. flavipes*, *A. fumigatus* y *A. terreus* asimilaron del 13% al 45% de los HPAs después de 21 días (Pernia, Demey, Inojosa, & Briceño, 2012). Otras especies prometedoras dentro del mismo género son *A. sclerotiorum*, *A. ustus*, *A. niger* y *A. terricola* (Passarini, Rodrigues, da Silva, & Sette, 2011) (Godoy, et al., 2016) (Guntupalli, Thunuguntla, Chalasani, Rao, & Bondili, 2019) (Teng, Wu, & Gong, 2019). Recientemente, Loss y colaboradores (Loss, et al., 2019) caracterizaron el crecimiento de *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. oryzae* y *A. fumigatus* en presencia de BaP, demostrando de manera convincente que solo el micelio vivo es capaz de removerlo significativamente, como se confirmó en nuestro estudio para *A. sydowii*. *Aspergillus spp.* no es el único género *Ascomiceto* con una capacidad sobresaliente para eliminar una amplia gama de HPAs citotóxicos. Otros ascomicetos como *Fusarium equiseti*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium pinophilum*, *Pestalotiopsis sp.*, *Pseudollascheria boydii*, *Talaromyces verruculosus*, *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma harzianum* también han mostrado una capacidad versátil para degradar los HPAs (Kristanti & Hadibarata, 2015) (Zafra, Taylor, Absalón, & Cortés-Espinosa, 2016) (Aranda, 2016) (Velmurugan, Lee, Cha, & Lee, 2017)

(Gao, et al., 2019). La alta salinidad, por su parte, podría afectar negativamente la eliminación de los HPAs (Kargi & Dince, 2000) (McGenity T. , 2010).

En la cepa de *A. sydowii* que estudiamos, la degradación de los HPAs no se vio afectada por la salinidad del medio (1 M NaCl) (González-Abradelo, et al., 2019). Este resultado está en correspondencia con lo reportado por Hidayat y colaboradores (2012) quienes demostraron que la biodegradación del criseno no cambió en presencia del halotolerante *Fusarium sp.* F092 cultivado bajo condiciones salinas y no salinas. Como se ha evidenciado para otros microorganismos (Zafra, Taylor, Absalón, & Cortés-Espinosa, 2016) (Daccò, et al., 2020) (Yaguchi, et al., 2020), el origen ecológico de *A. sydowii* podría afectar sus capacidades de degradación xenobiótica. Por ejemplo, una cepa de origen marino de *A. sydowii* fue capaz de degradar solo el 30% de antraceno después de 14 días en agua de mar artificial (NaCl 0,5 M) (Biolli, et al., 2018), mientras que nuestra cepa terrestre mostró una degradación de HPAs considerablemente mayor. Curiosamente, la cepa de *A. sydowii* empleada en nuestro estudio reveló un perfil similar de degradación tanto para Phe como para BaP (Figuras 7a y 8a) a pesar de que estos HPAs exhiben diferente peso molecular, potencial de ionización y solubilidad (Kadri, et al., 2016). En contraposición, Gao y colaboradores (Gao, et al., 2019) informaron la remoción preferente de Phe por *T. verruculosus*.

A la luz de las posibles aplicaciones biotecnológicas de *A. sydowii* para la biorremediación, cabe señalar que los cambios en el pH podrían servir como un indicador de la degradación de HPAs, lo que sería relevante para una futura escalabilidad industrial. Sin embargo, no todos los hongos ascomicetos reportados mostraron cambios de pH similares durante la degradación de HPAs. Por ejemplo, el pH disminuyó gradualmente en cultivos de *A. fumigatus* durante la degradación del antraceno (Ye, et al., 2011), mientras que en *P. oxalicum* aumentó (Aranda, 2016), lo que indica diferentes estrategias de degradación de subproductos en diferentes hongos. El perfil de actividad enzimática extracelular LME no se correlacionó con el agotamiento de Phe y BaP durante los 10 días de cultivo (Fig. 7c). Solo al principio, la producción de lacasa y manganeso peroxidasa mostró una tendencia similar a la de las conversiones Phe y BaP. No se observó correlación ($r = 0,19$) entre la actividad de enzimas extracelulares y la degradación de Phe y BaP. Esto sugiere la presencia de vías adicionales (probablemente intracelulares) para la degradación de Phe y BaP en *A. sydowii*. Se encontraron resultados similares en *P. oxalicum* durante la degradación del antraceno (Aranda, 2016).

Perfil transcriptómico e identificación de subproductos en respuesta a la degradación de Phe y BaP

Para analizar el transcriptoma de *A. sydowii*, las muestras de ARNm se sometieron a secuenciación por medio de Illumina HiSeq, dando como resultado 89255452 lecturas con una longitud promedio de 150 nucleótidos. Del ensamblaje con Trinity, se obtuvieron 33560 contigs (también conocidos como transcritos), correspondiente a 28751 posibles genes. El perfil de expresión de las muestras (Figura 8d) mostró la prevalencia de transcritos con bajo número de conteos, lo que podría disminuir la potencia estadística de la prueba de expresión diferencial. Por lo tanto, aplicamos un filtro para eliminar los transcritos con bajo número de conteos (por ejemplo, transcritos con conteos por millón (CPM) $<1,5$ en más de tres muestras fueron eliminados), resultando en un conjunto de 13 745 contigs usados para análisis subsiguientes (Figura 8e). Este paso de filtrado descartó los transcritos con bajos niveles de expresión en todas las muestras, lo que permitió una mejor distribución semejante a una distribución binomial negativa (como lo supone el método de expresión diferencial, DESeq2, utilizado aquí) (Love, Huber, & Anders, 2014). El filtrado de transcritos con bajo número de conteos también aumenta el poder estadístico de la prueba.

La agrupación jerárquica de los perfiles de expresión mostró que las muestras no se separaron de acuerdo con el grupo de tratamiento (Figuras 8d y 8e), indicando la necesidad de una normalización posterior para recuperar la separación en grupos de tratamiento. Después de aplicar los RUV (eliminación de variaciones no deseadas) todas las muestras tuvieron distribuciones homogéneas de RLE y clusterizaron como dos grupos diferentes, como puede verse en el análisis de componentes principales (Figura 8f). El análisis de expresión diferencial del transcriptoma de *A. sydowii* crecido en presencia de HPAs como única fuente de carbono versus un control con glucosa resultó en 170 genes regulados positivamente y 76 regulados negativamente. El análisis de enriquecimiento de GO de este conjunto de transcritos DE, mostró que varios procesos biosintéticos estaban regulados negativamente (Figura 8g), como se esperaba debido al agotamiento de la fuente de carbono inducido por el tratamiento con los HPAs. GOs relacionados con la vía catabólica del etanol (GO: 0006068) se encontraron enriquecidos, reflejando los cambios de la fuente de carbono. Curiosamente, hubo un aumento

en la expresión de genes asociados con remodelación de la pared celular de hongos, específicamente las enzimas ramificadoras 1,4-alfa-glucano, posiblemente reflejando la reestructuración de la pared celular relacionada con la presencia de xenobióticos como un estímulo externo (Nishida, Ozato, Matsui, Kuroda, & Ueda, 2013). Por ejemplo, en el tolerante a solventes *Saccharomyces cerevisiae* HK-211 ha sido bien documentada la regulación positiva de genes que codifican proteínas de la pared celular durante la perturbación del solvente (Matsui, 2008) (Nishida, Ozato, Matsui, Kuroda, & Ueda, 2013).

La mayoría de los genes regulados positivamente durante la degradación de HPAs codifican proteínas implicadas en la degradación y el metabolismo de xenobióticos, desintoxicación celular, metabolismo del ADN / ARN, señales y respuestas al estrés, y la inducción de genes implicados en las funciones mitocondriales (por ejemplo, la respiración y la oxidación de ácidos grasos), lo que sugiere una modificación drástica del estado bioenergético de *A. sydowii* en presencia de Phe y BaP. Además, un gen de la anhidrasa carbónica (*cah*) también se encontró regulado positivamente en respuesta a la ausencia de carbono. Los genes *cah* tienen funciones clave en otros *Aspergilli* durante la nutrición mineral en condiciones oligotróficas como se menciona en este estudio (Xiao, Smeekens, & Wu, 2016) (Loss, et al., 2019).

El transcriptoma de *A. sydowii* tras la exposición a HPAs reveló genes diferencialmente expresados (DE) que podrían desempeñar un papel importante en el metabolismo xenobiótico, incluidas las cloroperoxidasas (*cpo*), CYC (*bc1*, *cyc*, *cox*), NADH ubiquinona oxidorreductasas (*qr*), dioxigenasas, deshidrogenasas y la glutatión-S transferasas (*gst*), entre otras. Solo un gen *cpo* se encontró regulado positivamente entre las enzimas extracelulares capaz de degradar los HPAs. Las cloroperoxidasas son híbridos funcionales extracelulares de hemo-peroxidadas y enzimas CYP450. Catalizan una amplia variedad de reacciones químicas como halogenaciones, deshalogenaciones, deshidrogenaciones de CYP450, así como oxi y epoxigenizaciones (inserción de oxígeno) de dobles enlaces en compuestos aromáticos (Wang, Gerstein, & Snyder, 2009). Las cloroperoxidasas pueden oxidar los sulfuros heterocíclicos y oxidar HPAs como el dibenzotiofeno (Vázquez-Duhalt, Ayala, & Márquez-Rocha, 2001). Curiosamente, los genes de lacasa (*lac*) no exhibieron cambios en el nivel de expresión cuando *A. sydowii* creció en presencia de Phe y BaP. Sobre los mecanismos intracelulares implicados en la degradación de los HPAs, los genes *bc1*, *cyc* y *cox* también se regularon positivamente en presencia de Phe y BaP. Los CYC son capaces de catalizar reacciones oxidativas y

epoxidaciones, y se han investigado por su capacidad para oxidar tiofenos y sulfuros orgánicos a sulfóxidos (Sakaki, 2012). Los CYC también pueden oxidar HPAs como el antraceno y el pireno, y catalizar la formación de antraquinona e 1,8-pirenediona (Kadri, et al., 2016). El micotratamiento también indujo la expresión de genes que codifican para la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (*qr*) y la 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa (*bnal*). Las quinonas oxidoreductasas (p. ej., NADH-ubiquinona oxidoreductasa) catalizan la biotransformación de quinonas en semiquinonas, que son subproductos derivados de los HPAs altamente citotóxicos (El-Najjar, et al., 2011), mientras que las dioxigenasas intervienen para formar dihidrodioles. En este estudio identificamos la regulación positiva de los genes de la deshidrogenasa, p. ej. *bnal*, la deshidrogenasa / reductasa de cadena corta (*sdr*) y la deshidrogenasa reductasa dependiente de FMN (*fdh*).

Curiosamente, las esterasas (por ejemplo, carboxilesterasa (*ces*) y aciltioesterasa (*acot2*)) y la proteasa [carboxipeptidasa vacuolar (*cps*)] también se identificaron como DE. Un supuesto gen redox mitocondrial *fmp46*, que podría ser requerido en la reducción de pequeñas moléculas tóxicas, también fue regulado positivamente. Otros genes DE codificaron para la glutatión-S-transferasa, tiol-metiltransferasa y N-acetiltransferasa de aminoácidos, capaces de combinarse con HPAs parcialmente oxidados, glutatión, grupos metilo y grupos de aminoácidos respectivamente (Thuillier, Ngadin, Thion, & Billard, 2011).

Una de las principales causas de la toxicidad por HPAs es la inducción de daño al genoma, posiblemente al intercalarse en la doble hélice del ADN (Velmurugan, Lee, Cha, & Lee, 2017). Este efecto es contrarrestado por la inducción de mecanismos de reparación y mantenimiento de la integridad del genoma, algunos de los cuales se observaron en los cultivos con HPAs. Por ejemplo, la exonucleasa de reparación del ADN (*dre*), la tirosil ADN fosfodiesterasa (*tdp*) y la nucleósido difosfato quinasa (*ndk*) se regularon positivamente. Otros genes que desempeñan un papel importante en la recombinación del ADN, la expresión / estabilidad del ARNm y en el procesamiento del siARN (p. ej., *ADNj*, *mug134* y *trax*), así como los genes requeridos en el transporte de proteínas y ARNm a través de la envoltura nuclear (por ejemplo, *tpn*), se encontraron también DE. Además, los genes implicados en la estructura de la cromatina en células eucariotas [p. Ej. histonas H4 (*hh4*) y H2A (genes *hh2a*)] y un gen de histona lisina o arginina desmetilasa (*jmjc*) aumentaron tras la exposición a los HPAs. Finalmente, la acetil-CoA reductasa (*acr*), la aciltioesterasa (*acot2*) y la tiorredoxina (*trx*) se encontraron sobreexpresadas.

Estas están involucradas en la respuesta celular manteniendo el balance redox de la célula. Se empleó la metabolómica para determinar los metabolitos intermediarios producidos durante la biodegradación de Phe y BaP. Los subproductos directos hidroxilados de HPAs (dihidroxi-Phe e hidroxí-BaP diol) se identificaron en el sobrenadante del cultivo de *A. sydowii* después de 3 días de incubación. Los ácidos hidroxinaftoico y dihidroxibenceno (catecol) también se detectaron. No se identificaron metabolitos aromáticos en los sobrenadantes de cultivo después de 10 días. Estos resultados sugieren que tanto el Phe como el BaP se mineralizan después de 10 días de micotratamiento.

La evidencia transcriptómica de la regulación génica durante la biotransformación de HPAs nos permitió proponer posibles vías de degradación de compuestos poliaromáticos en *A. sydowii*. Muchos de los pasos metabólicos en las vías de degradación de los HPAs son comunes para una amplia gama de microorganismos, desde bacterias hasta algas, y se encuentran incluso en plantas (Srivastava & Kumar, 2019). En contraste con las bacterias, donde la degradación intracelular de los HPAs se produce por asimilación (ganan carbono y energía para el crecimiento), la mayoría de los hongos transforman compuestos aromáticos mediante procesos co-metabólicos (donde una parte de los productos de degradación de estos compuestos son metabolizados) (Prenafeta, Hoog, & Summerbell, 2019). Sin embargo, los subproductos encontrados producto de la degradación de HPAs en bacterias también se pueden encontrar en hongos (Winqvist, et al., 2014). La principal diferencia entre las vías metabólicas de hongos y bacterias son las enzimas involucradas, dado que muchas transformaciones pueden ser catalizadas por varias familias enzimáticas. En consecuencia, proponemos que en *A. sydowii* dos vías diferentes ocurren simultáneamente (Figura 9). La primera denominada "vía mitocondrial" involucra enzimas unidas a la membrana de las mitocondrias, incluidos los citocromos, una CYC oxidasa, deshidrogenasas de cadena respiratoria y una quinona reductasa. El segundo camino que fue designado como "citosólico", involucra enzimas solubles como una dioxigenasa, una deshidrogenasa reductora de cadena corta, una tiol metiltransferasa, una glutatión transferasa y una fructosa 1,6-bisfosfatasa, entre otras. Aunque consideramos que ambas vías pueden mineralizar eficazmente los HPAs, el mecanismo más probable es posiblemente una combinación de ambos donde los metabolitos intermediarios se transportan de la mitocondria al citosol y viceversa.

La Figura 9 muestra todas las posibles biotransformaciones de HPAs en *A. sydowii*, según la

identidad de los genes DE encontrados en el análisis transcriptómico. Los valores logFC obtenidos para aquellos genes DE implicados en ambas vías biodegradativas se encuentran en concordancia con los reportados en otros estudios ómicos que describen la respuesta proteómica de *P. oxalicum* durante la biotransformación del antraceno (Camacho-Morales, García-Fontana, & Fernández-Irigoyen, 2018).

Enzimas extracelulares como peroxidasas y las lacasas se han relacionado ampliamente con la conversión de HPAs por hongos (Aranda, 2016). El patrón de enzimas LME sintetizadas en *A. sydowii* (Figura 7c) ha sido observado durante la degradación de la biomasa lignocelulósica y otros materiales recalcitrantes. Inicialmente, los hongos degradan la lignina a través de lacasas y peroxidasas, seguido de esterasas cuando la hemicelulosa se vuelve más accesible. En el caso de la asimilación de HPAs, las peroxidasas y lacasas extracelulares podrían catalizar la oxidación enzimática de anillos fenólicos, mientras que la participación de esterasas no se comprende completamente. Ya que muchos hongos ascomicetos producen LME extracelular para inducir la pudrición blanda de la lignina, la secreción de esterasas podría estar relacionada con la activación de los mecanismos reguladores conservados evolutivamente e implicados en la degradación de lignocelulosa. Aunque se ha reportado actividad esterasa en las primeras etapas de mineralización de los HPAs para diferentes hongos (Pozdnyakova, Nikiforova, & Turkovskaya, 2010) (González-Abradelo, et al., 2019), nuestros datos transcriptómicos no mostraron una sobreexpresión de estos genes en presencia de HPAs en *A. sydowii*. Por el contrario, la alta expresión transcriptómica de lacasas se observó previamente en *Pleurotus ostreatus* en presencia de naftaleno (Elhusseiny, Amin, & Shebl, 2018), y en *T. verruculosus* en presencia de pireno o Phe (Gao, et al., 2019). En conjunto, los perfiles enzimáticos y transcripcionales de *A. sydowii* confirman la falta de correlación entre la producción de LME y la degradación de HPAs en varios ascomicetos (por ejemplo, *Cadophora luteo-olivacea*, *Cladosporium*, *Lecythophora* y *P. oxalicum*) (Aranda, 2016). Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia transcriptómica de la implicación de genes *cpo* durante la degradación de HPAs por hongos. Por escasez de información a nivel molecular, no se conocía hasta ahora que dicho gen se sobreexpresaba en estas condiciones. Fue hipotetizado que las cloroperoxidasas podrían ser particularmente importantes en la degradación extracelular de HPAs de alto peso molecular (por ejemplo, BaP), con un bajo coeficiente de difusión para la penetración a través de la membrana celular (Gao, et al., 2019). Un estudio previo en el

basidiomiceto *Fanerochaete chrysosporium* informó genes cpo DE cuando el hongo se cultivó en un extracto cetónico de roble, lo que indica su papel fundamental en la degradación xenobiótica (Thuillier, Ngadin, Thion, & Billard, 2011). Mientras la actividad peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa total, peroxidasa de lignina o manganeso) suele ser medida en muchos estudios de exposición de hongos a los HPAs (Godoy, et al., 2016) (Aranda, 2016) (Guntupalli, Thunuguntla, Chalasani, Rao, & Bondili, 2019), la actividad de la cloroperoxidasa no suele ser determinada. La cloroperoxidasa no solo halogena sustratos orgánicos susceptibles al ataque electrofílico, pero también posee propiedades de oxigenasa. De esta manera, se asemeja a las monooxigenasas dependientes de CYP450, miembro de las proteínas hemotiolato (Chen, et al., 2014), que catalizan una multitud de reacciones de transferencia de oxígeno (Urlacher & Schmid, 2004). La cloroperoxidasa podría estar involucrada durante la micorremediación, en la transformación de HPAs en quinona (Figura 9) vía peroxigenación (p. Ej., el oxígeno se origina a partir del H₂O₂) (Manoj & Hager, 2001).

Este mecanismo se asemeja a la llamada "derivación de peróxido en el ciclo catalítico de las enzimas CYP450 (Nordblom, White, & Coon, 1976) (Sundaramoorthy, Turner, & Poulos, 1995) (Matsunaga, Sumimoto, Ayata, & Ogura, 2002) (Denisov, Makris, Sligar, & Schlichting, 2005). Actualmente, la internalización de los HPAs no se comprende bien en hongos. Cuando los transportadores de antraceno, pireno y BaP se estudiaron en *Fusarium solani*, solo se observó un transporte pasivo por medio de las hifas para la absorción de estos HPAs, el cual no se halló correlacionado a ningún proceso de transporte específico o energético (Verdin, Sahraoui, Newsam, Robinson, & Durand, 2005). En nuestro estudio no identificamos ningún transportador de membrana extracelular DE, lo que sugiere que la entrada de HPAs mediante el micelio de *A. sydowii* se produce a través de transportadores constitutivos o pasivos. En la "vía citosólica" (Figura 9), el paso de oxidación intracelular inicial de los HPAs podría ser catalizado por dioxigenasas, lo que resulta en la hidroxilación de dos átomos de carbono adyacentes del anillo aromático, generando así un trans-dihidrodiol. Esta reacción convierte moléculas hidrófobas, a menudo tóxicas, en productos más hidrófilos, permitiendo el metabolismo posterior por otras enzimas (Gibson & Parales, 2000) (Hernández-Ortega, et al., 2015). Las dioxigenasas utilizan NAD(P)H como reductor y transfieren electrones al sitio activo para el dioxígeno, un requisito previo para la hidroxilación del sustrato (Hernández-Ortega, et al., 2015). Ambos, el hidroxibenzo [a] pireno (mono o dihidroxilado) y fenantreno-diol que se identificaron en *A.*

sydowii, también se encontraron en diferentes hongos ascomicetos y basidiomicetos: *Armillaria sp.*, *A. niger*, *Candida sp.*, *Corioloopsis byrsina*, *P. chrysosporium*, *P. oxalicum*, *Pleurotus pulmonarius* y *Polyporus sp.* (Ning, Wang, Ding, & Lu, 2010) (Hadibarata, Tachibana, & Askari, 2011) (Hadibarata & Kristanti, 2013) (Hadibarata & Chuang, 2014) (Parshikov, Woodling, & Sutherland, 2015) (Aranda, 2016) (Kadri, et al., 2016) (Agrawal & Sushil, 2017) (Hadibarata, Khudhair, Kristanti, & Kamyab, 2017) (Birolli, et al., 2018).

Posteriormente, los trans-dihidrodiolés de los HPAs se vuelven a aromatizar a través de la deshidrogenasa reductora de cadena corta para producir un derivado dihidroxilado, similar al catecol (Ghosal, Ghosh, Dutta, & Ahn, 2016). El catecol se puede transformar por una dioxigenasa en un semialdehído 2-hidroximucónico, que se puede dividir en acetaldehído y piruvato para entrar al ciclo del ácido tricarbóxico (Fuchs, Boll, & Heider, 2011). De manera similar, los HPAs dihidroxilados se pueden transformar mediante una dioxigenasa, que media su incorporación en la vía de degradación del benzoato. Curiosamente, un intermediario de esta vía es el ácido hidroxinaftoico, identificado en el sobrenadante de *A. sydowii* (Figura 9). La presencia de catecol y ácido naftoico en la biodegradación de los HPAs sugieren la eliminación mediante dioxigenación y la posterior meta-escisión, lo que conduce a la mineralización de los HPAs, como fue observado en *Trichoderma sp.*, *T. asperellum* y *Poly porus sp.* (Hadibarata, Khudhair, & Salim, 2012) (Zafra, Taylor, Absalón, & Cortés-Espinosa, 2016).

Los HPAs dihidroxilados se pueden conjugar posteriormente en el citosol con tioles, glutatión o monosacáridos, un proceso mediado por el aminoácido tiol-metiltransferasa, la N-acetiltransferasa, glutatión-S transferasa y la glicosiltransferasa, respectivamente (Figura 9). La conjugación de HPAs tiene varios propósitos desde (i) solubilización en agua que puede facilitar su eventual eliminación, a (ii) etiquetado involucrado en el tráfico y almacenamiento intracelular, (iii) activación de las moléculas para etapas metabólicas posteriores, o (iv) reducción de la toxicidad previniendo su interacción con proteínas y ácidos nucleicos (Verdin, Sahraoui, Newsam, Robinson, & Durand, 2005) (Morel, Meux, Mathieu, & Thuillier, 2013). Al respecto, la glutatión-S-transferasa puede catalizar la adición nucleofílica del glutatión reducido a centros electrofílicos en compuestos orgánicos. Los subproductos del glutatión derivado de los HPAs se han identificado como intermediarios en la degradación de estos (Dasari, Ganjayi, Yellanurkonda, Basha, & Meriga, 2018).

Por otro lado, la tiol-metil transferasa cataliza la metilación de los catecoles (Cai, Li, & Zhang,

2007), que pueden ser transformados más tarde por una acil-tioesterasa al correspondiente oxometiltioéter. Las glicosiltransferasas catalizan la transferencia de grupos glicosilo a un nucleófilo aceptor, con retención o inversión de configuración en el centro anomérico, y el conjugado resultante puede ser transformado por una glicosil hidrolasa (no DE) (Harms, Schlosser, & Wick, 2011).

Alternativamente, en la "vía mitocondrial" propuesta la oxidación de los HPAs podría ser catalizada por la CYP-450 monooxigenasas (no DE) para formar un óxido de areno (Figura 9), que a su vez podría transformarse en un trans-dihidrodiol y en HPAs dihidroxilados a través de los complejos CYC *bc1*, CYC *c* y citocromo oxidasa. Estas enzimas pueden realizar hidroxilaciones a derivados de los HPAs en presencia de peróxido de hidrógeno. Además de estar involucradas en el sistema de transporte de electrones, también son capaces de catalizar reacciones de tipo peroxidasa (Sakaki, 2012). En las mitocondrias, los HPAs dihidroxilados puede ser transformados por quinonas reductasas en quinonas y derivados dicarboxílicos de HPAs, subproductos tóxicos de la degradación de estos (Monks & Jones, 2002). Las quinonas oxidorreductasas y las dioxigenasas se encontraron sobreexpresadas. en comunidades microbianas que habitan en suelos contaminados por hidrocarburos (Wang, Li, Zhan, & Zhu, 2016), apoyando un posible papel en degradación de HPAs. Las reductasas deshidrogenasas se han descrito también como una de las enzimas capaces de catalizar la conversión de quinonas en hidroquinonas (Hoffmann & Maser, 2007). Los niveles de expresión de ARNm de genes *qr*, *sdr* y *bnal* se encontraron DE en cultivos de *T. verruculosus* suplementados con HPAs (Gao, et al., 2019), mientras que el proteoma de *P. oxalicum* reveló DE la producción de estas enzimas en presencia de antraceno (Camacho-Morales, García-Fontana, & Fernández-Irigoyen, 2018). Los derivados dicarboxílicos de los HPAs podrían luego combinarse con la coenzima A (CoA), y en una forma más soluble, ingresar al catabolismo.

La vía de degradación de los HPAs fúngicos actualmente propuesta incluye la oxidación por la monooxigenasa CYP450 y la hidratación catalizada por enzimas del óxido de areno resultante para producir trans-dihidrodiol mediante la epóxido hidrolasa. Los genes que codifican ambas enzimas no se encontraron DE en *A. sydowii* en el momento en que analizamos el transcriptoma. Además, este mecanismo debería ser más complejo a medida que los intermediarios metabólicos son transportados entre el citosol y el espacio entre membranas mitocondriales como se mencionó anteriormente.

Los genes *cyc* se han asociado en gran medida con la biotransformación de HPAs en *Ascomycota*. Estudios transcriptómicos previos han demostrado que los genes *cyc* son regulado positivamente durante el bioagotamiento de HPAs (Hernández-López, Perezgasga, Huerta-Saquero, Mouriño-Pérez, & Vazquez-Duhalt, 2016) (Huarte-Bonnet, et al., 2018) (Gao, et al., 2019) (Loss, et al., 2019). Por ejemplo, en *A. niger* se observó un aumento significativo en el nivel de transcripción de los genes *cyc* P450 durante la exposición a Phe (Huarte-Bonnet, et al., 2018). Aunque generalmente se reconoce que la familia CYP450 juega un papel fundamental en la degradación de HPAs por hongos, un estudio reciente indicó que los CYC distintos de los CYP450 se emplearon en la asimilación de hidrocarburos (Huarte-Bonnet, et al., 2018). En concordancia, un análisis transcriptómico en *A. nidulans* reveló que el BaP no indujo CYC (Loss, et al., 2019). El gen *cyc c*, regulado positivamente en *A. sydowii*, fue regulado negativamente cuando *T. verruculosus* creció en presencia de pireno o Phe (Gao, et al., 2019). Estas diferencias sugieren que la respuesta transcripcional de los CYC durante la metabolización de HPAs podría ser notablemente diferente en ciertos hongos, reflejando su ecología y posiciones filogenéticas (Huarte-Bonnet, et al., 2018).

S-transferasa; GST, glicosiltransferasa; QR, NADH-ubiquinona oxidorreductasa; SDR, deshidrogenasa / reductasa de cadena corta; TMT, tiol metiltransferasa; NAT, aminoácido N-acetiltransferasa

Mecanismos de desintoxicación y autodefensa en respuesta a la exposición poliaromática.

La adsorción fue una de las principales respuestas celulares para mitigar la toxicidad de los HPAs (Figura 10). El Phe y el BaP, así como subproductos identificados como intermediarios metabólicos en este estudio, se pueden adsorber fácilmente en la pared celular del micelio debido a interacciones hidrofóbicas (Aranda, 2016). Anteriormente analizamos cómo la tiol-metil transferasa, la N-acetiltransferasa aminoácídica y la glutatión-S-transferasa podrían estar directamente implicadas en las vías metabólicas de los HPAs. Sin embargo, su función inespecífica en el mantenimiento del estado redox de la célula (Thuillier, et al., 2014) podría explicar también su regulación positiva en estas condiciones. El análisis transcriptómico reveló que el Phe y el BaP inducían el sistema de glutatión en *A. sydowii* (Fig. 10). Este importante mecanismo de desintoxicación eucariótico facilita la salida de ciertos metabolitos intermediarios de los HPAs altamente citotóxicos (Weisman, Alkio, & Colón-Carmona, 2010) (Lenoir, et al., 2017). El sistema está compuesto principalmente por la glutatión-S-transferasa, el glutatión oxidado y la glutatión reductasa (Liu, Ding, Rao, & Zhang, 2017), probablemente involucradas en la protección contra el estrés oxidativo (Morel, Meux, Mathieu, & Thuillier, 2013). Como se muestra en la Fig.10, este mecanismo de desintoxicación apunta a una variedad de sustratos hidrofóbicos con glutatión para su transporte a vacuolas o al medio extracelular (Morel, Meux, Mathieu, & Thuillier, 2013). Los conjugados de glutatión se bombean intracelularmente a las vacuolas mediante una proteína de repetición del bucle PQ, de la membrana vacuolar, donde la serina carboxipeptidasa vacuolar y la carboxilesterasa desempeñan un importante papel catabólico. Además, los glutatiónilatos podrían transportarse extracelularmente mediante bombas de glutatión (Marrs, 1996) (Morel, Meux, Mathieu, & Thuillier, 2013) o ser bombeados intracelularmente por proteínas multirresistentes dependientes asociadas a glutatión (Morel, Meux, Mathieu, & Thuillier, 2013). Los conjugados de aminoácidos o azúcares también pueden ser transportado por proteínas asociadas a multirresistencia (Figura 10).

Entre los genes implicados en la homeostasis redox, las tiorredoxinas y la xantina deshidrogenasas desempeñan un papel citoprotector frente al estrés oxidativo causado por la

asimilación de los HPAs (Hanschmann, Godoy, Berndt, Hudemann, & Lilling, 2013) (Aranda, 2016) (Figura 10). La acumulación de los transcritos *acr* es también una señal del daño oxidativo que probablemente es inducido por Phe y BaP en *A. sydowii*. Por otro lado, el gen *acot2*, implicado en el metabolismo de lípidos peroxisomales, la oxidación y el tráfico subcelular de ácidos grasos mitocondriales (Tillander, Alexson, & Cohen, 2017), también se encontró DE en el transcriptoma.

Esta observación está de acuerdo con los estudios que informan que las especies reactivas del oxígeno producidas por el metabolismo de los HPAs causan daño peroxidativo de lípidos (Singh, et al., 2007) (Gao, et al., 2019). Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados en otros hongos, informando que los genes que median la reparación del daño oxidativo se regularon positivamente durante la biodepleción de HPAs (Thuillier, et al., 2014) (Velmurugan, Lee, Cha, & Lee, 2017) (Camacho-Morales, García-Fontana, & Fernández-Irigoyen, 2018) (Loss, et al., 2019). Por el contrario, no encontramos genes DE codificando catalasas (*cat*) y superóxido dismutasas (*sod*) como en estudios sobre *A. nidulans*, *Paecilomyces sp.*, *P. chrysosporium* y *P. oxalicum*, cuando se cultivan en presencia de xenobióticos (Thuillier, et al., 2014) (Velmurugan, Lee, Cha, & Lee, 2017) (Camacho-Morales, García-Fontana, & Fernández-Irigoyen, 2018) (Loss, et al., 2019).

También se sobreexpresó un gen que codifica la anhidrasa carbónica durante el tratamiento con HPAs en *A. sydowii*. La anhidrasa carbónica cataliza la hidratación del CO₂ y tiene un papel importante en el transporte de iones, equilibrio ácido-base y el transporte ácido-base. La detección de CO₂ es un proceso crucial para mejorar la supervivencia y proliferación en condiciones de crecimiento hostiles (Xiao, Smeeckens, & Wu, 2016) (Loss, et al., 2019) (p. Ej., PAH como única fuente de carbono). Las anhidrasas carbónicas en *A. nidulans* juegan roles importantes que responden a los cambios ambientales (Xiao, Smeeckens, & Wu, 2016), similar a las condiciones utilizadas en este estudio.

En conjunto, la regulación positiva de por ejemplo la tiol metil transferasa (*tmt*), aminoácido N-acetil transferasa (*nat*), *gst*, glutatión reductasa (*gr*), *trx*, *acot2* y *cah* refleja la activación de los mecanismos de desintoxicación y autodefensa en *A. sydowii* cuando se expone a Phe y BaP (Figura 10).

Se conoce que los HPAs inducen daño genotóxico y alteraciones epigenéticas. Productos intermediarios reactivos producidos durante la biodegradación de Phe y BaP puede unirse

covalentemente al ADN formando aductos de HPAs -ADN, que aumentan la probabilidad de mutaciones genéticas. Además, el BaP induce la metilación genética que interrumpe los patrones de metilación del ADN en eucariotas (Velmurugan, Lee, Cha, & Lee, 2017).

El análisis transcriptómico reveló una regulación positiva de ciertos genes implicados en los mecanismos de reparación del ADN, integridad del genoma y la expresión y estabilidad del ARNm. Por ejemplo, *tdp* (gen DE en *A. sydowii*) elimina una variedad de aductos covalentes del ADN, necesarios para reparar roturas de doble hebra del ADN causadas por radicales libres (Kawale & Povirk, 2018). La respuesta al daño del ADN fue regulada positivamente en el micelio tratado con HPAs de *A. nidulans*, *Paecilomyces sp.* y *P. oxalicum* (Velmurugan, Lee, Cha, & Lee, 2017) (Camacho-Morales, García-Fontana, & Fernández-Irigoyen, 2018) (Loss, et al., 2019). Además, el Phe y BaP afectaron el tráfico nuclear de proteínas y ARNm en *A. sydowii* ya que los genes *trp* se encontraron sobreexpresados. La regulación positiva de los genes *jmjc* demostraron que los HPAs pueden causar perturbaciones epigenéticas. Los genes *jmjc* están involucrados en la metilación de histonas, que afecta notablemente a la regulación de la expresión génica (Klose, Kallin, & Zhang, 2006). Finalmente, los genes implicados en el control del ciclo celular [peptidil-prolil isomerasa (*ppi*)] también se sobreexpresaron en *A. sydowii*. Estos genes influyen en la regulación transcripcional y se encontraron DE en el proteoma de *Pseudomonas fluorescens* durante degradación de naftaleno (Herbst, et al., 2013). En resumen, nuestros resultados sugieren que el Phe y el BaP indujeron toxicidad genética en *A. sydowii* (Figura 10), contrarrestada por un marcado aumento en el nivel de ARNm relacionado con los mecanismos de reparación del ADN, ayudando a mantener la estructura del genoma, previniendo daños extensos al ADN, regulando la transcripción y controlando el tráfico celular. La Figura 10 resume la respuesta de desintoxicación y estrategias de autodefensa ante la exposición a HPAs en *A. sydowii* en condiciones hipersalinas, así como la regulación transcripcional de ciertas enzimas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos.

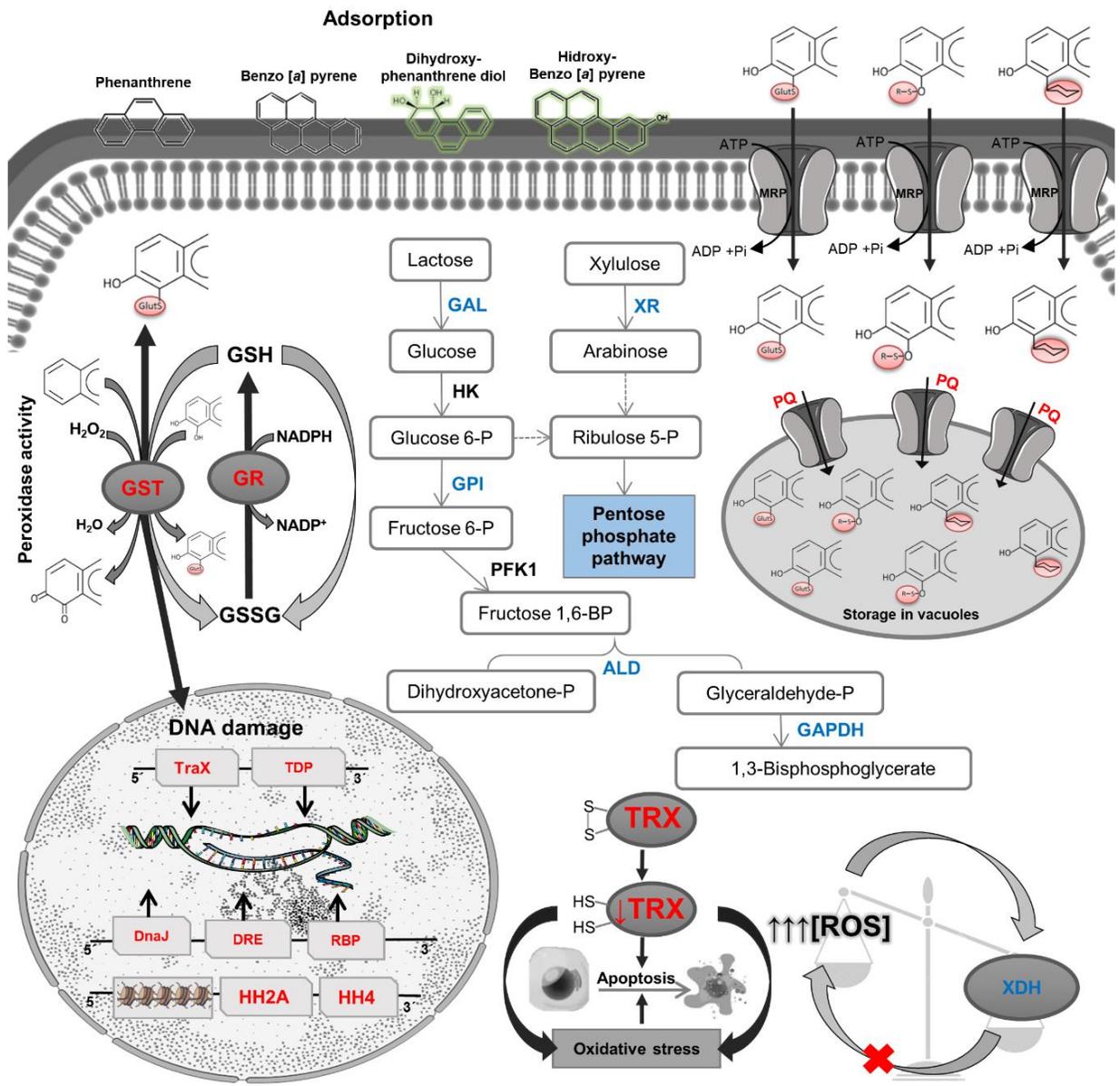


Fig. 10. Mecanismos propuestos de tolerancia al estrés inducido por HPAs, agotamiento de nutrientes, genotoxicidad y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células de *A. sydowii* tras la exposición a benzo [a] pireno y fenantreno. Transcritos de enzimas o proteínas representadas en rojo se encontraron reguladas positivamente y en azul reguladas negativamente en el análisis del transcriptoma. Los metabolitos resaltados en verde fueron identificados en los sobrenadantes del cultivo al día tres mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución - análisis de espectrometría de masas. ALD, aldolasa; ATP, trifosfato de adenosina; ADNJ, chaperona ADNJ, también conocida como proteína de choque térmico de 40 kD. Está involucrada en el estrés celular; DRE, Exonucleasa de reparación del ADN; GAL, galactosidasa; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; GPI, glucosa fosfoisomerasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión; GSSG, glutatión oxidado; GST, glutatión S-transferasa; HH,

histona; HK, hexoquinasa; MRP, proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos (transportador); Pi, pirofosfato; PQ, proteína repetida de bucle PQ de membrana vacuolar; PFK1, fosfofructoquinasa; RBP, proteína de unión al ARN; TDP, tirosil-ADN fosfodiesterasa; TraX, proteína de unión al ADN; TRX, tiorredoxina; XDH, xantina deshidrogenasa; XR, xilulosa reductasa.

Cambios morfológicos en *A. sydowii* en respuesta a condiciones poliaromáticas

Dado que las condiciones de estrés modifican la micromorfología en los hongos, examinamos los detalles morfológicos de *A. sydowii* cuando fue expuesto a condiciones poliaromáticas (Figura 11). El micelio de la condición control con glucosa añadida se caracterizó por un crecimiento polarizado sostenido y septación completa (Figura 11A y B). En los cultivos con Phe y BaP las hifas presentaron una hinchazón isotrópica (Figura 11C, D, G – N) y la presencia de grandes vacuolas en compartimentos subapicales (Figura 11C – N), mientras que los compartimentos apicales mostraban con frecuencia un crecimiento polarizado (Figura 11C, D, G – N). Adicionalmente, las hifas fueron más ramificadas que en los cultivos de control (Figura 11C, D, G – I, L, M). La presencia de Phe y BaP, sin embargo, no imposibilitó la germinación de esporas en las condiciones estudiadas (Figura 11J, K, M)

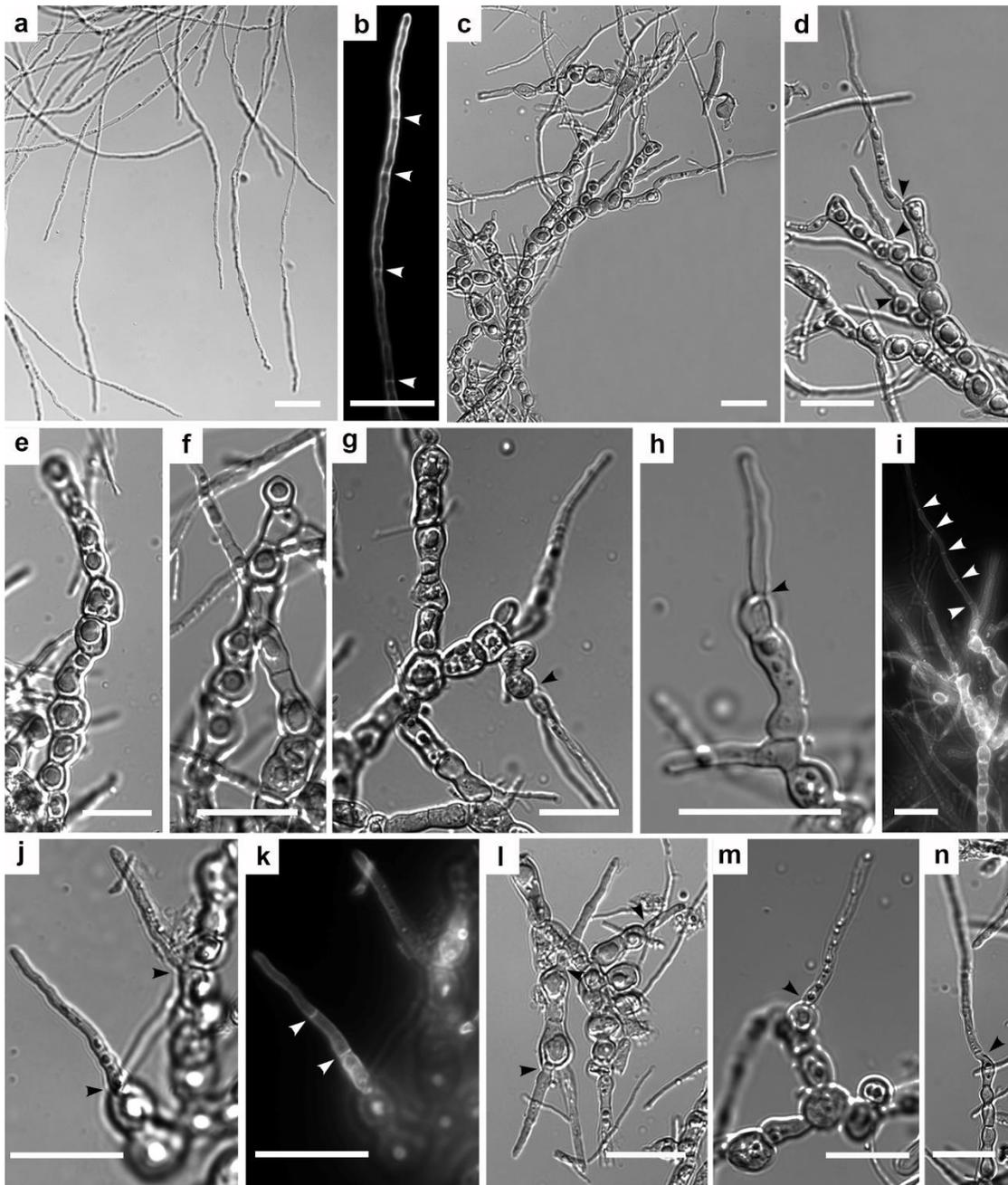


Fig. 11. Microscopía de contraste de interferencia diferencial del micelio de *Aspergillus sydowii*.

A y B. Crecimiento de *A. sydowii* en presencia de glucosa. C – N. Crecimiento de *A. sydowii* en presencia de benzo [a] pireno y fenantreno (Mezcla de HPAs, 1: 1, 100 p.p.m. como concentración final). (A) Hifas con crecimiento celular polarizado. (B) Hifa polarizada con tabicación completa (flechas blancas). (C – N) Hifas (sin crecimiento polarizado) con hinchazón isotrópica de crecimiento celular y expansión vacuolar. Las flechas negras resaltan los compartimentos apicales con crecimiento polarizado. Las flechas blancas señalan la tabicación. Barra de escala: 20 μm

Toxicidad residual tras micotratamientos con *A. sydowii*: evaluación de diferentes modelos

Se evaluó la toxicidad residual después de los tratamientos con *A. sydowii* en el musgo *Physcomitrella patens*, en células mononucleares de sangre humana periférica adulta (MCPB), y el pez cebra (*Danio rerio*) para determinar la seguridad de los intermedios metabólicos obtenidos de Phe y BaP. Los micotratamientos de HPAs por *A. sydowii* disminuyeron la toxicidad de los medios sintéticos desalados que contenían Phe y BaP en los diferentes sistemas probados (Fig. 12).

El musgo (*P. patens*) cultivado en un medio expuesto a HPAs con el micotratamiento aumentó su tasa de crecimiento casi dos veces en comparación con el control sin micotratamiento (Figura 12A). La inmunotoxicidad de los medios tratados también disminuyó dado que se abolieron los niveles de transcripción de TNF- α aproximadamente tres veces cuando los HPAs fueron biodegradados por el hongo (Figura 12B).

Los análisis toxicológicos usando embriones del pez cebra (*D. rerio*) fueron ideales debido a su pequeño tamaño y la facilidad al tratamiento a base de agua. Los embriones se cultivaron con el medio tratado durante 72 h; la letalidad, el desarrollo embrionario y los defectos de pigmentación se evaluaron a las 24, 48 y 72 h después de la exposición al sobrenadante. A las 24 y 48 h posteriores, la letalidad del tratamiento se observó solo en los embriones tratados con el sobrenadante del segundo día, mientras que se observó una mejora en la viabilidad con el sobrenadante tratado a partir del día cuatro en adelante; los embriones desarrollados en medio mínimo se consideraron como controles (Figura 12C y D). Sin embargo, la viabilidad embrionaria evaluada a las 72 h postratamiento se vio afectada (Figura 12E). Los embriones tratados mostraron un ligero retraso en el desarrollo a las 24 h de tratamiento comparado con el control (Fig. 12F). Después de 48 h de tratamiento, se observó un claro efecto sobre la pigmentación, principalmente en embriones expuestos a agua tratada desde el segundo día en comparación con los embriones de control. Se observó una mejora en la pigmentación en el resto de los embriones tratados. (Figura 12G y H).

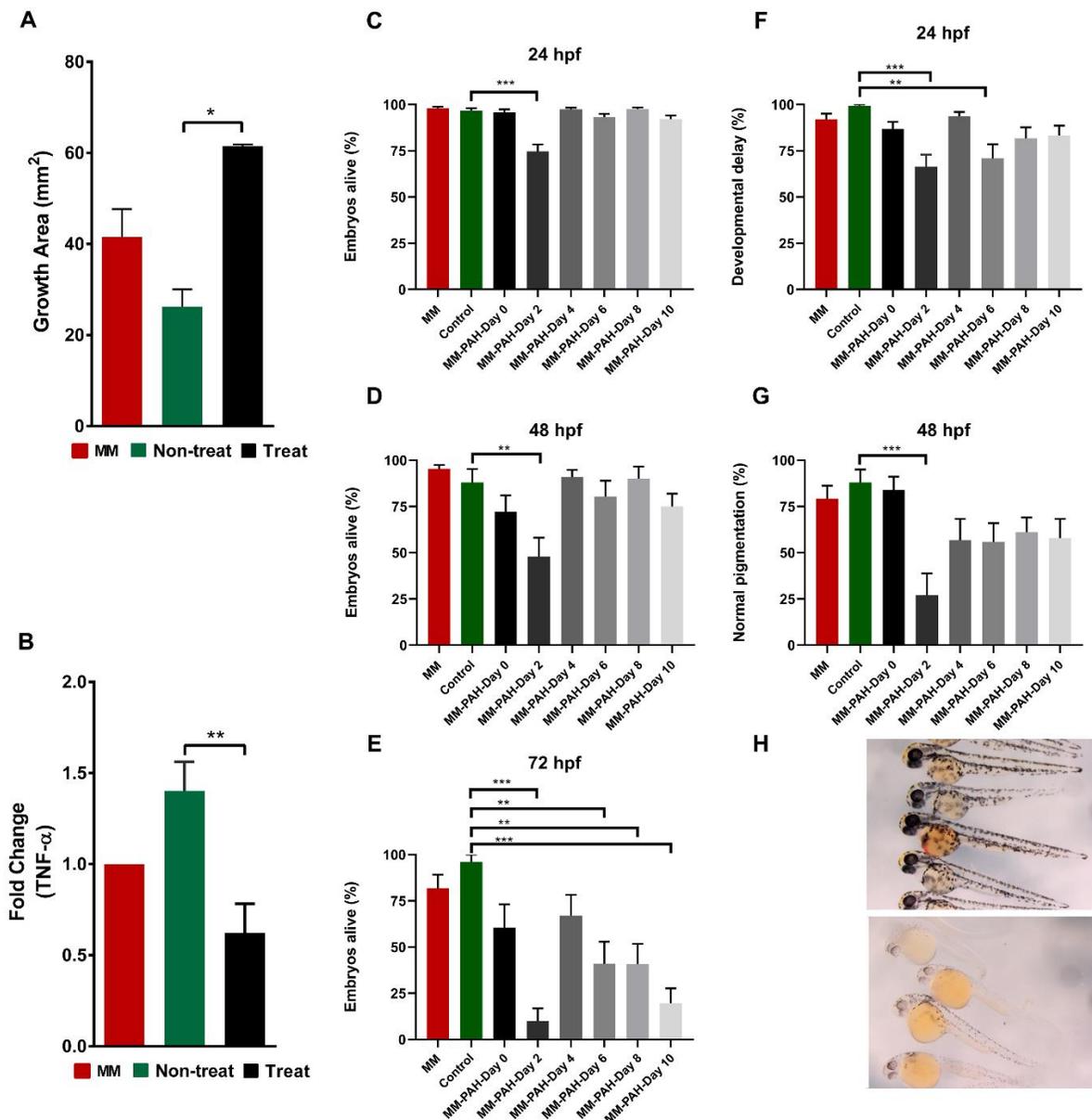


Figura 12. Toxicidad residual de los HPAs en el sobrenadante del cultivo después del tratamiento con *Aspergillus sydowii*.

A. Evaluación de la fitotoxicidad mediante el análisis de la tasa de crecimiento relativo del musgo *Physcomitrella patens* crecido durante 44 días en sobrenadantes con HPAs y tratados con *A. sydowii* (Treat), HPAs sin *A. sydowii* (Non-treat).

B. Evaluación de la toxicidad para las células humanas mediante la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) por células mononucleares de sangre periférica adulta. (MCPB).

C. Viabilidad embrionaria del pez cebra a las 24 h de cultivo en el sobrenadante desde el día 0 hasta el día 10, se observa una diferencia estadística al tiempo dos comparado con control o medio mínimo (MM) (n = 2173).

D. Viabilidad embrionaria del pez cebra a las 48 h de cultivo en el sobrenadante desde el día 0 hasta el día 10, se

observa una diferencia estadística en el tiempo dos comparado con control o medio mínimo (MM) (n = 1131).

E. Viabilidad embrionaria del pez cebra a las 72 h de cultivo en el sobrenadante desde el día 0 hasta el día 10, se observa diferencia estadística en todos los tiempos en comparación con el medio de control o mínimo (MM) (n = 1065).

F. Retraso del desarrollo embrionario del pez cebra medido a las 24 h de cultivo en el sobrenadante desde el día 0 hasta el día 10.

G. La pigmentación se vio afectada en presencia de HPAs a las 48 h de cultivo en el sobrenadante del micotratamiento del día dos en comparación con el medio de control y en días posteriores en el agua tratada con *A. sydowii*. * p <0,5, ** p <0,01, *** p <0,001.

H. Embriones del pez cebra a las 48 h de cultivo. Los embriones control mostraron pigmentación normal en esta etapa embrionaria; mientras que los embriones tratados con sobrenadante de agua micotratada con HPAs mostraron un claro defecto en la pigmentación. Hpf, horas después de la fertilización.

Para la evaluación de la disminución en la toxicidad de los medios después del micotratamiento con *A. sydowii* se utilizaron diferentes organismos modelo. Nuestros resultados demostraron que la micorremediación disminuyó la toxicidad.

Existe abundante evidencia de que los HPAs son tóxicos para varias especies de plantas con flores dado que afectan su germinación (Maila & Cloete, 2002), reduciendo el crecimiento de sus raíces, número y tamaño de sus hojas e induciendo respuestas al estrés (Alkio, 2005). Las plantas no vasculares, como los musgos, son, debido a su simple anatomía aún más sensibles a los xenobióticos y, por lo tanto, ampliamente utilizados como bioindicadores de contaminación del suelo, del aire y del agua (Cortis, et al., 2016) (Pradhan, et al., 2017). En este estudio utilizamos el musgo *P. patens*, para determinar la eficiencia de *A. sydowii* en la reducción de la toxicidad de los HPAs. Los análisis de toxicidad previos sobre los efectos de los HPAs, específicamente Phe y fluoreno, sobre la fisiología de *P. patens* demostraron que la presencia de 0.5 μM de Phe disminuyó su actividad fotosintética durante las primeras 48 h de exposición y que *P. patens* sintetiza glutatión como parte de su estrategia de defensa (Burrit, 2008). Estos mecanismos de defensa podrían explicar el efecto ligeramente negativo de la HPAs en *P. patens* durante nuestro ensayo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el micotratamiento con *A. sydowii* generalmente mostró un impacto positivo. Además, la toxicidad residual también exhibió una importante reducción en células humanas de acuerdo con los niveles expresados del factor TNF α por MCPB expuestos a sobrenadantes después del micotratamiento. Está bien documentado que los HPAs inducen inmunotoxicidad, respuestas proinflamatorias y carcinogénesis (Wang, Lin, Jhang, & Tung, 2017). Por esta razón, utilizamos TNF α como molécula bioindicadora de inmunotoxicidad después de los micotratamientos.

El pez cebra (*D. rerio*) se ha establecido como un modelo para probar los efectos de diversos contaminantes en estudios toxicológicos (Ali, Khaliq, Sajid, & Akbar, 2019). El tratamiento de embriones de pez cebra con los sobrenadantes después del micotratamiento mostró un efecto en la viabilidad y en el retraso del desarrollo dependiente del tiempo. Curiosamente los embriones mostraron solo diferencias estadísticas con respecto a la viabilidad y la pigmentación a las 24 y 48 h después del tratamiento solo con sobrenadantes del segundo día en comparación con el control. No se observó diferencia estadística al comienzo del tratamiento, posiblemente debido a que el primer día de cultivo los HPAs se adsorben principalmente en el micelio. Se observó un claro efecto en la viabilidad, desarrollo y pigmentación cuando comenzó la degradación de los HPAs después de 2 días de tratamiento con *A. sydowii*; estos efectos se redujeron cuando los embriones se expusieron al agua tratada a partir del cuarto día en adelante. Los defectos en la pigmentación a las 48 h luego del tratamiento con agua del segundo día de cultivo sugieren que la acumulación de subproductos identificados en el sobrenadante del cultivo de *A. sydowii* podrían afectar la acumulación de melanina. Los embriones cultivados con HPAs y con micotratamiento se desarrollaron normalmente, lo que demuestra que el tratamiento de la HPAs con *A. sydowii* es eficaz para reducir la toxicidad de los HPAs. Sin embargo; la viabilidad se vio claramente afectada después de las 72 h de cultivo con los sobrenadantes micotratados; este hallazgo sugiere que incluso cantidades muy pequeñas de HPAs pueden afectar el desarrollo embrionario, haciendo el modelo del pez cebra muy sensible a la detección de contaminantes en el agua.

CAPITULO 2. Análisis morfológico y molecular del halófilo *A. sydowii* en condiciones de baja actividad de agua impuesta por tres kosmotropos.

INTRODUCCIÓN

Actividad de agua (a_w)

El desarrollo biológico de los microorganismos en diferentes ambientes está condicionado por la disponibilidad de agua. La forma más común de referirnos a la disponibilidad de agua en un ambiente particular es empleando el término a_w . La a_w se basa en la ley de Raoult para soluciones ideales, y no toma en consideración las interacciones del soluto con otros componentes, excepto con el agua (Grant, 2004). La a_w del medio representa la fracción molar de las moléculas de agua totales que están disponibles, y es igual a la relación que existe entre la presión de vapor de la solución, respecto a la del agua pura (P/P_0). Se conoce que la a_w del agua pura es 1 y la del resto de las soluciones es <1 . A bajos valores de a_w (≤ 0.9), el agua se convierte en un factor limitante para la vida. Diferentes tipos y cantidades de solutos presentes en el ambiente son capaces de disminuir los valores de a_w alterando a su vez la presión osmótica del medio y/o ejerciendo efectos tóxicos sobre los organismos (Zajc, et al., 2013). Los ecosistemas áridos, árticos y acuáticos con concentraciones de $\text{NaCl} \geq 1\text{M}$, se han considerado como ambientes de baja a_w , al igual que los medios donde la concentración de solutos orgánicos o de glucosa es muy elevada $\geq 50\%$ como lo es la miel de abeja. En consecuencia, para garantizar el crecimiento, los microorganismos desarrollan mecanismos de supervivencia que están estrechamente relacionados con las condiciones específicas de su nicho ecológico.

La vida en condiciones de baja a_w

Los organismos capaces de crecer en condiciones de baja a_w se conocen comúnmente como xerotolerantes, mientras que aquellos que requieren estrictamente condiciones de baja a_w para su crecimiento óptimo se denominan xerófilos. Los retos impuestos por los iones y solutos orgánicos no son necesariamente los mismos. Muchos microorganismos xerófilos que crecen en alimentos con alto contenido de azúcar son tolerantes a bajos niveles de a_w impuestos por iones (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009). Sin embargo, lo contrario no siempre es cierto: los microorganismos que crecen en lagos hipersalinos ($\text{NaCl} \geq 1.0\text{M}$), por regla

general no pueden crecer en medios con similar a_w impuesta por solutos orgánicos (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009). En particular, los microorganismos que crecen en ecosistemas hipersalinos desarrollan mecanismos de adaptación a altos niveles de iones. Tales microorganismos se denominan halófilos o halotolerantes en lugar de xerófilos/xerotolerantes (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009).

La mínima a_w que es capaz de sustentar la vida es de 0.61, medida en el hongo xerófilo *Xeromyces bisporus*, mientras que el hongo más halófilo que se conoce actualmente es *Wallemia ichthyophaga*, el cual requiere de al menos de un 10% de NaCl para su crecimiento. Los grupos microbianos xerófilos y halófilos estudiados están dominados por Archeas y Eubacterias, con muy pocos ejemplos de microorganismos eucariontes (Grant, 2004). Sin embargo, dentro de estos últimos, sobresalen los hongos como modelos para el estudio de los mecanismos de adaptación a condiciones de baja a_w . Particularmente, varias levaduras y basidiomicetos filamentosos han sido identificados en lagos hipersalinos y otros ecosistemas de baja a_w (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009), (Gunde-Cimerman, Zalar, Hoog, & Plemenitaš, 2000). Dentro de la sección *Wallemiales* (basidiomicetos filamentosos), se han caracterizado especies predominantemente halófilas y algunas xerófilas, y se han estudiado los mecanismos de respuestas a condiciones de baja a_w (Zajc, et al., 2013).

Mecanismos moleculares que permiten la adaptación a baja disponibilidad de agua

Existen un número de estrategias propuestas que son empleadas por los hongos xerófilos para sobrevivir en condiciones de baja a_w . Entre los mecanismos moleculares que permiten la adaptación a estas condiciones se encuentra la síntesis de solutos compatibles, los cuales balancean la alta osmolaridad extracelular. La mayoría de los hongos descritos acumulan glicerol como soluto mayoritario, pero también pueden acumular trealosa, manitol y arabitol, entre otros (Zajc, et al., 2013), (Kogej, et al., 2008). De acuerdo con su naturaleza, los solutos compatibles se dividen en: polialcoholes (glicerol, manitol, sorbitol, entre otros), α y β -aminoácidos y sus derivados (betaína, ectoína, hidroxiectoína, L- α -glutamato, β -glutamina, entre otros), y, por último, azúcares y sus derivados (sacarosa, trealosa), etc. En bacterias se ha reportado la presencia de solutos compatibles como glicina-betaína y glutamato, mientras que en hongos se ha descrito la acumulación de solutos como trealosa, y polioles como manitol, glicerol, arabitol y sorbitol (Kogej, et al., 2008), (Zajc, Kogej, Galinski, Ramos, & Gunde-

Cimerman, 2014). En el caso de los polioles, pueden funcionar además como compuestos de almacenamiento de carbono y jugar un papel fundamental en el balance del potencial redox celular, así como en la eliminación de especies reactivas del oxígeno (Witteveen & Visser, 1995).

Sin embargo, el estudio de los mecanismos de homeostasis relacionados con la síntesis y acumulación de solutos compatibles en los hongos filamentosos es limitado. Algunos estudios reportan que el glicerol es el soluto compatible que se encuentra frecuentemente en distintos microorganismos. Por ejemplo, en estudios realizados en *Aspergillus niger* se observó que en micelio “joven” (48-72 horas) se acumula mayoritariamente glicerol, seguido de eritritol, mientras que en micelio “viejo” (120 horas) se encuentran preferencialmente manitol y eritritol (Witteveen & Visser, 1995), (Van Leeuwen, et al., 2013). Algunos autores han propuesto que la acumulación de solutos compatibles es una de las adaptaciones de mayor importancia fisiológica en hongos halófilos. Se ha reportado que la levadura *H. werneckii* y el basidiomiceto *W. ichthyophaga*, contienen mezclas de polioles (glicerol, arabitol y manitol) (Zajc, Kogej, Galinski, Ramos, & Gunde-Cimerman, 2014), mientras que en *A. niger* y *Aspergillus nidulans* se ha descrito la acumulación de trealosa y manitol en las conidiosporas, como una estrategia de osmoadaptación a condiciones de hipersalinidad (Van Leeuwen, et al., 2013), (Ruijter, Visser, & Rinzema, 2004). Sin embargo, el glicerol puede relacionarse no solo a la presión osmótica, producida por concentraciones elevadas de NaCl, sino también con concentraciones elevadas de otros solutos, entre ellos la glucosa (Plemenitas, Vaupotic, Lenassi, Kogej, & N., 2008), (Dakal, Solieri, & Giudici, 2014).

A pesar de estas evidencias el conocimiento acerca de la acumulación de solutos compatibles y las estrategias de haloadaptación se encuentra limitado tanto a nivel molecular como fisiológico (Zajc, Kogej, Galinski, Ramos, & Gunde-Cimerman, 2014). En hongos filamentosos, los solutos compatibles han sido escasamente estudiados, por lo que la regulación de los genes involucrados en la biosíntesis de estos solutos no se conoce claramente.

El glicerol como soluto compatible y la vía de HOG

En 1945 se demostró que las levaduras xerófilas producían alcoholes polihídricos, particularmente glicerol, a partir de un proceso de fermentación del azúcar, pero no fue hasta

1972 que Brown y Simpson propusieron una función fisiológica para esta acumulación de polioles en las levaduras (Brown A. D., 1972). Ellos concluyeron que la función primaria de los polioles (principalmente arabitol y glicerol), era actuar como solutos compatibles, lo que permitía mantener los procesos vitales de la célula, a la vez que mantenían un equilibrio osmótico entre el entorno celular interno y la a_w externa. De hecho, se ha demostrado, que la acumulación de polioles como solutos compatibles, es común tanto para los hongos ascomicetos como para los basidiomicetos en respuesta a condiciones de baja a_w . En cuestiones de molaridad, el glicerol es más eficaz que otros polioles (eritritol, manitol, arabitol) disminuyendo el potencial de agua micelial, por lo que se considera el soluto compatible de elección durante el estrés en condiciones de baja a_w (Kubicek, 2007).

Los estudios comparativos en dos levaduras estrechamente relacionadas, *Zygosaccharomyces rouxii*, que es un xerófilo, y *S. cerevisiae* (no- xerófila), han demostrado que, aunque ambos acumulan glicerol en respuesta a una disminución en la a_w externa, los mecanismos difieren. *S. cerevisiae* responde a la disminución de la a_w sintetizando más glicerol, mientras que en *Z. rouxii*, la cantidad total de glicerol producida no cambia apreciablemente con la a_w , pero la proporción retenida por las células aumenta en respuesta a la disminución de la a_w (Dingkan, et al., 2019).

La acumulación de glicerol por hongos xerófilos filamentosos, en respuesta a condiciones de baja a_w , fue reportado en 1982 en las especies xerófilas *Chrysosporium fastidium*, *Penicillium chrysogenum* y *A. niger* (Williams & Hallsworth, 2009).

El glicerol se acumula durante las primeras etapas de crecimiento, pero se agota rápidamente en las últimas, por ejemplo, durante la producción de conidios, especialmente cuando los cultivos se crecen en medios salinos con una fuente de carbono limitada. Algunas especies liberan glicerol al medio de cultivo, mientras que otras no. Una comparación entre la especie xerófila *Penicillium janczewskii* y la especie no-xerófila *Penicillium digitatum* mostró que la primera liberaba pequeñas cantidades de glicerol al medio, mientras que en el medio de cultivo de *P. digitatum*, fueron detectadas grandes cantidades de este soluto (Williams & Hallsworth, 2009).

La síntesis de glicerol se regula a través de la vía de respuesta al estrés HOG (high osmolarity glycerol)- MAPK (mitogen-activated protein kinase). En *S. cerevisiae*, el componente principal de la vía es la MAPK activada por estrés (Hog1), que está regulada por la quinasa MAPK (Pbs2).

Los cambios en la osmolaridad son detectados por el osmosensor de membrana (Sho1), que a su vez señala la activación de Pbs2, lo que resulta en la fosforilación y la acumulación de Hog1. Esto activa posteriormente la reacción en cascada que conduce a la síntesis y acumulación de glicerol. Los hongos filamentosos (p. Ej., *Aspergillus* y *Neurospora*) tienen ortólogos de todos los componentes principales de la vía HOG (Salazar, Vongsangnak, & Panagiotou, 2009). La vía HOG y su regulación se han estudiado exhaustivamente en el no-xerófilo *S. cerevisiae*, pero todavía hay muy pocos datos disponibles sobre la expresión diferencial de los componentes HOG en respuesta al estrés osmótico en hongos xerófilos.

Otro de los mecanismos moleculares desarrollados por los hongos en respuesta a condiciones de baja a_w es el transporte de iones y/o solutos a través de la membrana plasmática, con el objetivo de contrarrestar el efecto nocivo que puede tener la acumulación de estos sobre el funcionamiento de las proteínas intracelulares. En este sentido, las ENA ATPasas juegan un papel fundamental en la exclusión de iones tóxicos como el Na^+ . También se ha descrito la existencia de un transporte con baja y alta afinidad en el influjo de K^+ y en el eflujo de Na^+ ; así como un balance osmótico establecido por un simporte de Na^+ -glicerol. La homeostasis intracelular del hidrógeno (H^+), también juega un papel importante en la tolerancia a la salinidad. La enzima H^+ -ATPasa genera el potencial de membrana que se requiere para que ocurra el intercambio K^+/Na^+ en las células. Todos estos mecanismos responden al mantenimiento de la homeostasis de iones a nivel celular.

En condiciones de hipersalinidad, se ha observado un incremento en el contenido de aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico) en las proteínas. Una mayor proporción de aminoácidos ácidos es característica de las proteínas expuestas a altas concentraciones de sal, como se ha observado en las proteínas halófilas de Archaea (Madern, Ebel, & Zaccai, 2000). Los aminoácidos ácidos en una superficie proteica permiten la unión de grandes cantidades de sales y agua en condiciones de solvente, y de esta manera mantienen conformaciones solubles y activas en un ambiente que generalmente es perjudicial para otras proteínas (Siglioccolo, Paiardini, Piscitelli, & Pascarella, 2011).

Cambios morfológicos en condiciones de baja a_w

Los principales cambios morfológicos en hongos en condiciones de baja a_w incluyen un engrosamiento de la pared celular, así como cambios en su composición, y el incremento en

número y/o tamaño de las vesículas intracelulares, posiblemente asociadas a la acumulación de solutos osmóticamente activos (denominados solutos compatibles) (Kogej, et al., 2008). El engrosamiento de la pared celular, sin embargo, no es una respuesta generalizada en hongos halotolerantes como *Aspergillus flavus* y *Penicillium roquefortii*, en los cuales disminuye el grosor de la pared celular (PC) mientras aumenta el de la membrana citoplasmática.

Los dos parámetros principales en la composición de la membrana celular que juegan un rol importante en la permeabilidad de esta y en la habilidad de la célula para retener uno de los solutos compatibles mejor estudiados en hongos (glicerol), son: la composición y el grado de saturación de los ácidos grasos en la bicapa lipídica.

Se ha visto que, en condiciones de estrés osmótico, los organismos xerófilos incrementan la fluidez de la membrana en comparación con los organismos no-xerófilos. Las levaduras xerófilas *Debaryomyces hansenii* y *Hortaea werneckii* poseen una menor proporción esterol-fosfolípidos que la no-xerófila *Saccharomyces cerevisiae*. Además, estos organismos pueden incrementar la desaturación de los ácidos grasos de una forma más exitosa, en comparación con sus contrapartes no-xerófilas. El crecimiento en agrupamientos celulares compuesto por numerosas células esféricas es otro mecanismo propuesto en el género *Wallemiales* y en *Hortaea werneckii*, que potencian la supervivencia en condiciones de estrés (Plemenitas, Vaupotic, Lenassi, Kogej, & N., 2008).

Se han descrito también variaciones en la morfología de las hifas y la conidiación de hongos halófilos en condiciones de hipersalinidad. Hongos como *Wallemia muriae* y *Wallemia sebi* desarrollaron hifas con compartimentos más gruesos y de menor longitud en comparación a lo observado en condiciones de baja salinidad.

La melanización de la pared celular es otro mecanismo importante que ayuda a mantener una alta concentración intracelular de glicerol en *H. werneckii* a pesar de su membrana altamente fluida. Este patrón de melanización tiene variaciones atendiendo a la salinidad, siendo la capa de melanina menos compacta y con gránulos más pequeños en condiciones de alta concentración de NaCl. Los gránulos de melanina probablemente limitan la permeabilidad de la pared celular por la reducción de los tamaños de sus poros como se ha descrito en *Cryptococcus neoformans* (Jacobson & Ikeda, 2005)

La presencia de hidrofobinas (HFBs) en la superficie de la pared celular es una estrategia particular descrita recientemente en hongos filamentosos. Son proteínas pequeñas de

naturaleza anfipática, las cuales han sido asociadas con la formación de los agrupamientos celulares (Zajc, et al., 2013), la morfogénesis de las hifas aéreas y la adhesión de las hifas a superficies hidrofóbicas (Wösten, 2001). En los hongos halófilos se ha visto que tienen un mayor porcentaje de residuos acídicos que sus homólogos en hongos no halófilos, característica encontrada en arqueas extremófilas. En un estudio transcriptómico de *A. sydowii* se describieron 4 genes de HFBs (*sih1*, *sih2*, *sih3*, *sih4*). En este estudio, *sih1* y *sih2* se expresaron en presencia 2.0 M de NaCl mientras que *sih4* se expresó en ausencia de NaCl (Pérez-Llano, et al., 2020).

En el halófilo extremo *Aspergillus montevidensis* y el halotolerante *Aspergillus glaucus* se ha descrito que el estrés por la presencia de NaCl promueve el cambio de una reproducción sexual a asexual (Ding, Liu, Lu, & Gong, 2019) y además la formación de conidióforos a través de la activación de las vías de señalización Ras y MAPK que estimulan la vía central del desarrollo asexual: "*brlA* → *abaA* → *wetA*" (Liu, Li, & Wu, 2017). Un análisis transcriptómico en el hongo *Aspergillus cristatus* mostró que la mayoría de los genes relacionados con la esporulación, están regulados negativamente en condiciones de alta presión osmótica (Ge, et al., 2016)

Kosmotropos y caotropos. NaCl, KCl y Sorbitol

Los solutos iónicos y no-iónicos pueden clasificarse en caotropos o kosmotropos dependiendo de si son o no disruptores de estructuras acuosas, respectivamente. Los caotropos debilitan las interacciones electrostáticas y desestabilizan macromoléculas biológicas mientras lo contrario es cierto para los kosmotropos (Parmar & Muschol, 2009). La caotropicidad puede limitar el metabolismo microbiano, la replicación y la supervivencia. Algunos caotropos pueden penetrar los dominios hidrofóbicos de los sistemas macromoleculares desprendiendo su capa de hidratación y así, a través de su volumen físico, desordenan las estructuras terciarias y cuaternarias de los mismos. La serie de iones Hofmeister o Serie Liotrópica clasifica particularmente a los iones en caotropos o kosmotropos de acuerdo con el efecto de estas sales en la precipitación de las proteínas (Williams & Hallsworth, 2009).

Tanto el NaCl como el KCl son sales clasificadas como kosmotropos y son capaces de unir hasta 14 moléculas de agua en su estructura cuando se disocian en sus iones; sin embargo, la toxicidad que ejercen a nivel celular a altas concentraciones es diferente. Por su parte, el

sorbitol, es un polialcohol kosmotropo capaz de unir hasta 6 moléculas de agua en su estructura, por lo que su efecto en la disminución de la a_w es menor respecto al de las sales mencionadas con anterioridad.

En un estudio realizado por Rath y colaboradores en el 2016 (Rath, Maheshwari, Bengtson, Rousk, & Cullen, 2012), donde estudiaron el efecto tóxico de diferentes sales en la tasa de crecimiento, mineralización y nitrificación de hongos y bacterias, se determinó que la tasa de respiración y el crecimiento fúngico eran principalmente inhibidos por NaCl respecto al resto de las sales estudiadas (KCl, Na₂SO₄, y K₂SO₄). En un artículo publicado por Ramón Serrano en 1996 sobre la tolerancia a la sal en plantas y microorganismos, se planteó que en *Saccharomyces cerevisiae* crecida en un medio con glucosa, el NaCl resultó mucho más tóxico que una concentración osmótica equivalente de KCl y sorbitol (Serrano, 1996). Las altas concentraciones de NaCl (>1M) inhiben la mayoría de las enzimas, debido a la perturbación del equilibrio hidrofóbico-electrostático entre las fuerzas que mantienen la estructura proteica (Wyn Jones & Gorham, 1983). Además, las funciones de membrana también se ven afectadas por altas concentraciones de sal, probablemente debido a cambios estructurales en las proteínas. El sodio es capaz de interferir con diferentes sitios de unión a potasio en proteínas y ARN, mientras que el cloruro interfiere con los sitios aniónicos involucrados en la unión al ARN. La fosfoenolpiruvato carboxilasa, la glutatión reductasa y la ribulosa bisfosfato carboxilasa son enzimas con sustratos aniónicos especialmente sensibles a la inhibición por cloruro (0,1-0,2 M) (Serrano, 1996). La inhibición por sodio puede esperarse en el caso de enzimas activadas por potasio como la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa y la DPG-almidón sintetasa (Wyn Jones & Gorham, 1983), sin embargo, no hay información sobre la sensibilidad a la sal de estas enzimas. La toxicidad sódica en células de levadura se ha identificado por medio de la enzima 3',5'-bisfosfato nucleotidasa, implicada en la activación del sulfato (Glaser, Thomas, & Gaxiola, 1993), (Murguía, Bellés, & Serrano, 1995).

El sorbitol, por otra parte, pertenece al grupo de los polialcoholes y es sintetizado a partir de la glucosa 6-fosfato por la enzima sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH) y sorbitol-6-pirofosfatasa (S6PP). Un estudio realizado por Górk-Nieć y colaboradores en 2009 (Górk-Nieć, Perlińska-Lenart, Zembek, Palamarczyk, & Kruszewska, 2010), evaluó el efecto de 1 M de sorbitol sobre el crecimiento, la glicosilación y secreción de proteínas, así como la composición de la pared celular en *Trichoderma reesei*. Estos resultados mostraron que la

presencia de este osmolito afecta la composición de la pared celular, la morfología celular, así como la glicosilación y síntesis de glicoproteínas, todo ello relacionado con el metabolismo de los carbohidratos.

Los solutos no-iónicos como el glicerol, el sorbitol y la glucosa son menos inhibitorios que el NaCl. Beuchat y Pitt (1990) (Beuchat & Pitt, 1990) estudiaron la influencia de la glucosa, el sorbitol y el NaCl (a_w : 0,82 - 0,97) en la formación de colonias en *Wallemia sebi* y, de acuerdo con estos resultados, informaron que los diámetros de las colonias eran generalmente más grandes en los medios que contenían sorbitol. Estos autores reportaron, de igual manera, una reducción en el crecimiento de este hongo en presencia de NaCl en comparación a los solutos no-iónicos glucosa y glicerol. En su opinión, un fenómeno de difusión que ocurre en ambas direcciones a través de la membrana celular, podría ser la explicación principal para la reducida capacidad de crecimiento de los hongos observada con NaCl. Los iones Na^+ y Cl^- difunden desde un área de alta concentración (medio PDA) hasta un área de menor concentración (células fúngicas). Este fenómeno conduce a una mayor pérdida de agua de la célula y es más marcado en el caso de los solutos iónicos que los solutos no-iónicos.

Los reportes sobre la posible vida en condiciones extremadamente altas de solutos cosmotrópicos (estabilizantes como: NaCl, KCl y Sorbitol), son escasos para procariontes y casi ausentes para el dominio Eucariota, incluidos los hongos (Serrano, 1996), de ahí la pertinencia de este proyecto.

***Aspergillus* en condiciones de baja actividad de agua**

Los hongos ascomicetos filamentosos, en particular del género *Aspergillus*, son quizás los hongos xerófilos degradadores de alimentos de mayor importancia económica. Crecen óptimamente en climas templados y tropicales (mínimo 9°C, óptimo 25-30°C) y toleran tanto las temperaturas elevadas (máximo 40-47°C) como condiciones de baja a_w . Es por este motivo que son modelos especialmente atractivos para el estudio de los mecanismos de tolerancia a baja a_w , dado que son capaces de crecer en el rango de los menores valores de a_w que sustentan la vida (0.75-0.80), y aun así presentan una gran diversidad metabólica que les permite crecer en diferentes sustratos (Grant, 2004) (Tabla I). Por ejemplo, varias especies de *Aspergillus* caracterizadas como xerófilas/halófilas son eficientes en la degradación de biomasa, la

degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y la producción de compuestos de valor añadido que las hacen potencialmente atractivos para la industria.

Tabla I. Actividad de agua mínima inhibitoria para el crecimiento de microorganismos en alimentos. (Tomado de (Grant, 2004)).

a_w value	prokaryotes	yeasts	moulds
0.97–0.95	<i>Clostridium</i> spp. <i>Pseudomonas</i> spp. <i>Escherichia</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Pediococcus</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp. <i>Vibrio</i> spp.		
0.95–0.90	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.	<i>Rhodotorula</i> spp. <i>Pichia</i> spp. <i>Candida</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp.	<i>Rhizopus</i> spp. <i>Mucor</i> spp.
0.90–0.85	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Saccharomyces</i> spp. <i>Hansenula</i> spp. <i>Torulopsis</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
0.85–0.80		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Aspergillus patulum</i>
0.80–0.75	haloarchaea		<i>Aspergillus glaucus</i> <i>Aspergillus conicus</i> <i>Aspergillus flavus</i>
< 0.70		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	<i>Xeromyces bisporus</i>

ANTECEDENTES

A. sydowii y baja actividad de agua

A. sydowii es un hongo halófilo que se encuentra de forma ubicua en varios nichos ecológicos, desde suelos cercanos al Ártico hasta regiones tropicales (Butinar, Frisvad, & Gunde-Cimerman, 2011). Su capacidad para la producción de enzimas y la degradación de biomasa lo han convertido en un modelo atractivo para la industria, por lo cual actualmente se dispone de su genoma secuenciado. Contar con este organismo modelo hará más factible la anotación funcional y la identificación de genes durante los análisis transcriptómicos. Este hongo es capaz de crecer en un rango de temperaturas que van desde los 4 – 40°C, aunque óptimamente crece entre los 22 – 28°C y 1 M de NaCl. Al igual que otros miembros de su género, *A. sydowii* es capaz de crecer en condiciones de baja actividad de

agua (0.75 – 0.81) (Pasanen, Korpi, Kalliokoski, & Pasanen, 1997). Este hongo ha sido estudiado principalmente por su potencial biotecnológico como productor de metabolitos secundarios y enzimas ligninolíticas. Sin embargo, a la fecha no hay suficiente información acerca de los mecanismos de haloadaptación y/o xerotolerancia de hongos ascomicetos como este, por lo que sería interesante una caracterización más profunda de las estrategias que le permiten contrabalancear la presión osmótica y/o contender con la toxicidad causada por las altas concentraciones de solutos como el NaCl, KCl y Sorbitol en el medio circundante.

Hipótesis

Realizar un estudio detallado de la morfología y la expresión génica de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w impuesta por los kosmotropos NaCl, KCl y Sorbitol, nos permitirá comprender los mecanismos de adaptación de este hongo a dichas condiciones.

Objetivo general:

Analizar las adaptaciones moleculares y morfológicas de *A. sydowii* ante condiciones de baja a_w (impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol).

Objetivos específicos:

1. Seleccionar el tiempo de extracción del ARN mediante la evaluación del crecimiento de *A. sydowii* en condición óptima de a_w (0.5 M NaCl~0.98 a_w).
2. Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii* crecido en condición óptima de a_w (0.5 M NaCl~0.98 a_w) vs condición de baja a_w (5.13 M NaCl ~0.75 a_w).
3. Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii* crecido en condiciones de baja a_w (5.13 M NaCl, 4.87 M KCl y 3.45M Sorbitol~0.75 a_w).
4. Analizar comparativamente la huella metabólica de *A. sydowii* (impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol), mediante FF MicroPlate y Microarreglos Fenotípicos (PM)
5. Caracterizar los cambios morfológicos de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w

Materiales y métodos

Selección del tiempo de extracción del ARN

Se cultivó el hongo *A. sydowii* en medio de cultivo líquido (YMA) a 0.5M de NaCl (0.98 a_w). Se determinó la tasa de crecimiento mediante la medición del peso húmedo y peso seco de la biomasa total durante 6 días en esta condición óptima de crecimiento de la cepa, con el objetivo de seleccionar el tiempo de extracción del ARN (Figura 13).

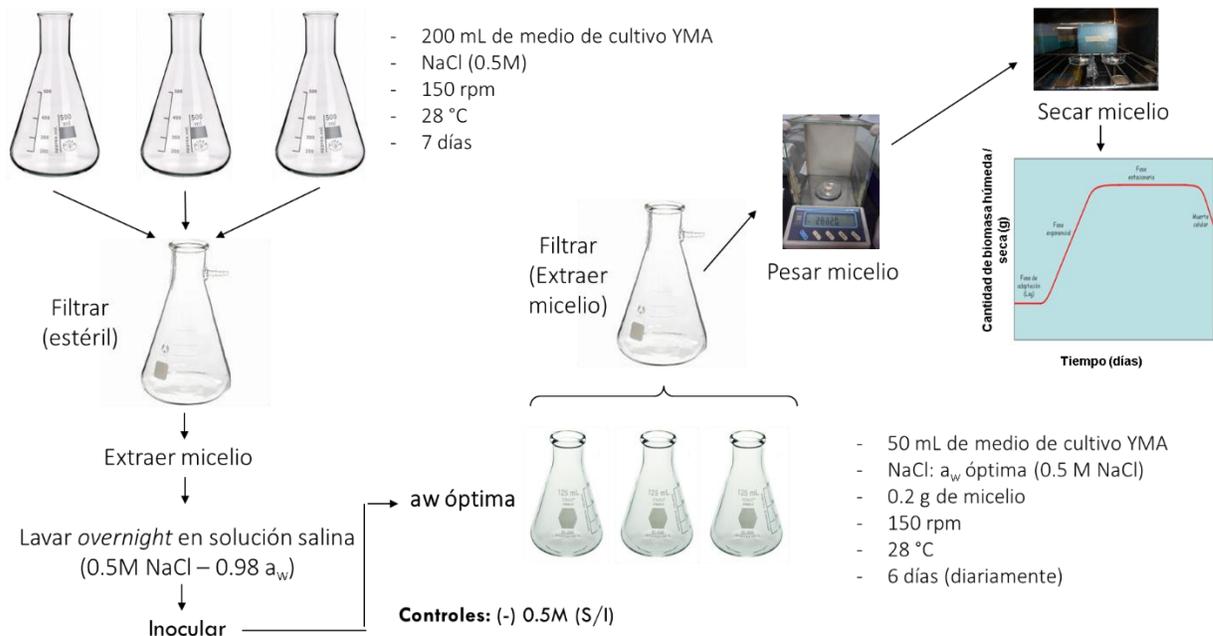


Figura 13. Metodología empleada para evaluar el crecimiento de *A. sydowii* en condiciones de a_w óptima (0.5 M NaCl).

Extracción del ARN total y secuenciación y análisis del ARNm de *A. sydowii*

La purificación del ARN se realizó mediante el método del fenol ácido, según las instrucciones del fabricante (Chomczynski & Sacchi, 1987). Se emplearon 3 réplicas de cada uno de los cultivos crecidos durante 4 días en condición óptima (0.5 M NaCl~ 0.98 a_w , 28°C y 150 rpm) y en condiciones de baja a_w (5.13 M NaCl, 4.87 M KCl y 3.45M Sorbitol~0.75 a_w , 28°C y 150 rpm) (Figura 14). La integridad y pureza del ARN se evaluó inicialmente mediante electroforesis en gel de agarosa (1% de agarosa en tampón MOPS, 0.9% formaldehído).

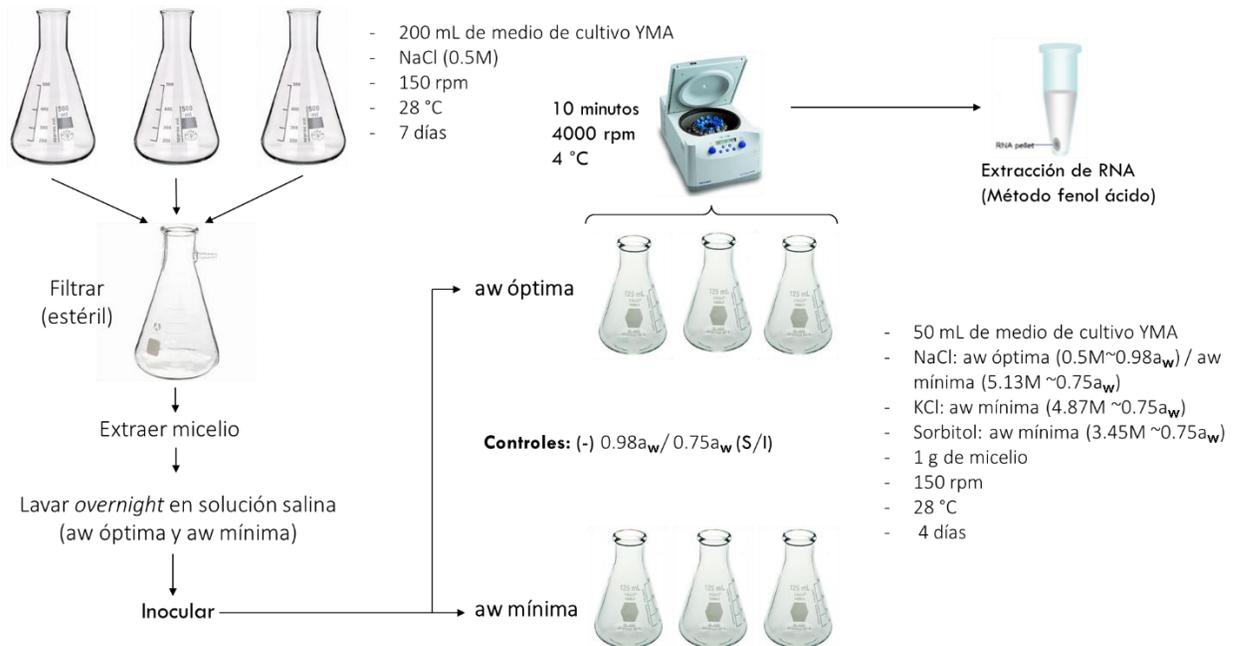


Figura 14. Metodología empleada para obtener el ARN total de *A. sydowii* en condiciones de a_w óptima y a_w mínima

Posteriormente, las muestras se analizaron mediante electroforesis capilar (Qubit ARN Assay Kit and Agilent bioanalyzer) para determinar el RIN (del inglés ARN Integrity Number).

La construcción de bibliotecas, así como la secuenciación del ARNm mediante la técnica ARN Seq se realizaron en las instalaciones de MacroGen, Korea. Para ello se utilizó el Illumina TruSeq ARNm library prep kit. El control de calidad de las bibliotecas se realizó utilizando un Qubit ADN assay and Agilent bioanalyzer. Las bibliotecas se agruparon y cuantificaron mediante qPCR. El análisis de la calidad de las secuencias se realizó mediante el software FASTQC (Brown, Pirrung, & McCue, 2017). Dados los parámetros de calidad obtenidos, fue necesario realizar un pre-procesamiento de las lecturas. Para ello se utilizaron varias herramientas bioinformáticas como el rCorrector y bbnorm, para la eliminación de k-meros erróneos en las lecturas, seguido de Trimmomatic, para remover los adaptadores resultado del proceso de secuenciación y finalmente se usó RemoveFastqcOverrepSequenceReads.py para remover las secuencias sobrerrepresentadas (Freedman A. , 2016).

Transcriptoma: ensamblaje de novo y anotación funcional

El ensamblaje de las secuencias se realizó de novo utilizando el software Trinity (Haas, et al., 2013). La anotación de las secuencias ensambladas se realizó mediante BLAST (Expectation value: $1e^{-3}$, Open Gap Penalty: 9, Gap Extension Penalty: 2) en la base de datos RefSeq utilizando el software Blast2GO (Götz, et al., 2008). Para la cuantificación de la abundancia de los transcritos se utilizó el programa Kallisto (Li & Dewey, 2011). Los niveles de expresión se reportaron en transcritos por millón (TPM) (Conesa, et al., 2016) (Wagner, Kin, & Lynch, 2012).

Análisis de expresión diferencial de genes

Los análisis de expresión diferencial (ED) se realizaron utilizando el software Blast2GO, que a su vez utiliza el programa edgeR el cual permite la identificación de genes expresados diferencialmente en una condición experimental versus la otra. El paquete de software edgeR que pertenece al proyecto Bioconductor (un proyecto de código abierto para el análisis de datos genómicos en R (Gentleman, et al., 2004), implementa métodos de estadísticas cuantitativas para evaluar el valor de significancia individual de genes entre dos condiciones experimentales. Para realizar el análisis de expresión diferencial se eliminaron los transcritos con bajos niveles de expresión en todas las condiciones, es decir, aquellos que tenían menos de dos conteos por millón de lecturas ($cpm < 2$). Se consideraron como DE aquellos transcritos con $\log FC > 2$ y $FDR < 0.05$. Mediante CPM Filter se estableció un filtro para excluir genes con conteos bajos en las librerías ya que estos genes pueden interferir con las aproximaciones estadísticas posteriores. El filtrado se realizó sobre una base de conteos por millón (CPM), que tiene en cuenta las diferencias en el tamaño de las librerías entre las muestras. El método estadístico de normalización utilizado fue TMM. Se utilizó un diseño simple que realiza una comparación pareada entre muestras que pertenecen a dos condiciones experimentales. La prueba estadística empleada fue GLM (Quasi Likelihood F-Test) que es una alternativa del Ratio Test y provee mayor robustez y control sobre la tasa de error cuando el número de réplicas es bajo. El flujo de trabajo a seguir para realizar este análisis de expresión diferencial se describe en la Figura 15.

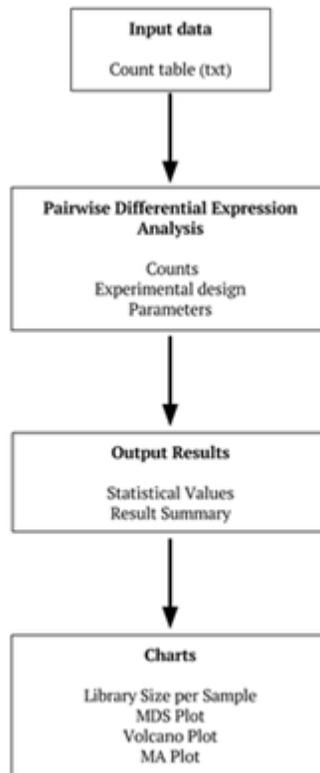


Figura 15. Flujo de trabajo a seguir para realizar el análisis de expresión diferencial empleando el software Blast2GO.

Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas.

La anotación de términos de GO se realizó mediante el programa Blast2GO (Götz, et al., 2008). Para la determinación del enriquecimiento se utilizó el método computacional de Fisher incluido en el programa Blast2GO. Por medio de este método se obtuvieron los gráficos correspondientes a rutas o vías metabólicas en base a los términos correspondientes a las ontologías: Proceso biológico (BP), Función Molecular (MF) y Componente Celular (CC). En cada caso se graficaron los términos más significativos de acuerdo con estos métodos y se realizó el análisis de los niveles de expresión de los transcritos anotados con esos términos.

Análisis comparativo de la huella metabólica de *A. sydowii* (impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol), mediante FF MicroPlate

Para el análisis de la huella metabólica de *A. sydowii*, se procedió a cultivar el hongo en condición óptima como se describió previamente. El micelio fue lavado inicialmente con PBS 1X, transferido a un tubo estéril de 15ml conteniendo 2ml de este reactivo y macerado completamente con una espátula. Luego se añadieron al tubo 9ml de fluido de inoculación (IF) y el equivalente a una a_w de 0.75 para cada uno de los solutos anteriormente mencionados (NaCl, KCl y Sorbitol). Posteriormente la suspensión fue filtrada y macerada al mismo tiempo usando un colador de células de 40 μm y el émbolo de una jeringa, hasta que los niveles de absorbancia a 490nm y 750nm fueron de 0.2. La suspensión fue posteriormente inoculada de acuerdo con el protocolo de Biolog FF-MicroPlate (100 μl por placa) e incubada a 28 °C durante 7 días. La DO fue medida diariamente a 490nm y 750nm (Gryta Agata, Oszust, & Kotowicz, 2016).

Análisis fenotípico de microarreglos

Para caracterizar fisiológicamente las capacidades metabólicas de *A. sydowii* en condiciones baja a_w , se evaluó la asimilación de diferentes fuentes de fósforo, azufre y nitrógeno por este hongo utilizando la tecnología Biolog Phenotypic MicroArray (PM) (Biolog, Hayward, CA, Estados Unidos). Se utilizaron las microplacas PM3B y PM4A, la primera para determinar la utilización de nitrógeno y la segunda de azufre y fósforo. Las placas se inocularon siguiendo el protocolo de Viti y colaboradores (Viti, Decorosi, Marchi, Galardini, & Giovannetti, 2015) con las siguientes modificaciones: se añadió a la mezcla de inoculación el equivalente a una a_w de 0.75 para cada uno de los solutos anteriormente mencionados (NaCl, KCl y Sorbitol). Posteriormente la suspensión fue filtrada y macerada al mismo tiempo usando un colador de células de 40 μm y el émbolo de una jeringa, hasta que los niveles de absorbancia a 590nm fueron de 0.2. La suspensión fue posteriormente inoculada de acuerdo con el protocolo de Biolog PM3B y PM4A (100 μl por placa) e incubada a 28 °C durante 7 días. La DO fue medida diariamente a 590nm y 750nm.

Caracterización de los cambios morfológicos de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w

Para el análisis morfológico fue inoculado 0.1g de micelio fresco en placas de YMA conteniendo NaCl ($a_w=0.98$) y NaCl, KCl y Sorbitol a 0.75 a_w . Estas placas fueron incubadas por 7 días a 28°C en la oscuridad. Las características generales de crecimiento de las colonias como: elevación, presencia de surcos y/o estructuras de reproducción, pigmentación de los conidios y características de las hifas hialinas del borde de la colonia fueron observadas con un estéreo AmScope con FMA050 fixed adapter y cámara acoplada AmScope MU1000, con los objetivos 0.7x y 2x, en los días 0,3 y 7. Para la obtención de las imágenes de las hifas, ramificaciones y estructuras de reproducción las muestras fueron observadas en un microscopio de campo claro AmScope T720 acoplado a una cámara AmScope serie MU1000, con los objetivos 10x, 40x y 100x. Para evitar la ruptura de estas microestructuras durante la preparación de las muestras se utilizó la técnica de cultivo en portaobjetos o microcultivo permitiendo así la recuperación de estructuras intactas. La observación de microestructuras se realizó en las 3 condiciones usando azul de lactofenol como tinción. Para el procesamiento de imágenes se utilizaron los programas ImageJ FIJI y Photoshop.

Resultados y Discusión

Perfil transcriptómico de *A. sydowii* en respuesta a condiciones de baja a_w

Planteamos la hipótesis de que los mayores cambios transcripcionales tienen lugar durante la fase activa de crecimiento de *A. sydowii*. Por lo tanto, determinamos la tasa de crecimiento de esta cepa mediante la medición del peso húmedo y seco de su biomasa en la condición óptima de crecimiento (0.5 M NaCl, 28°C y 150 rpm), para elegir el marco de tiempo apropiado para el análisis transcriptómico. La tasa de crecimiento de *A. sydowii* fue exponencial entre los días 2 y 6 ($R^2 = 0,996$, Spearman coeficiente de correlación). Por tanto, la extracción del ARN total para el análisis del transcriptoma se realizó después de 4 días de cultivo (Figura 16a), lo que se corresponde con la mitad de dicha fase exponencial.

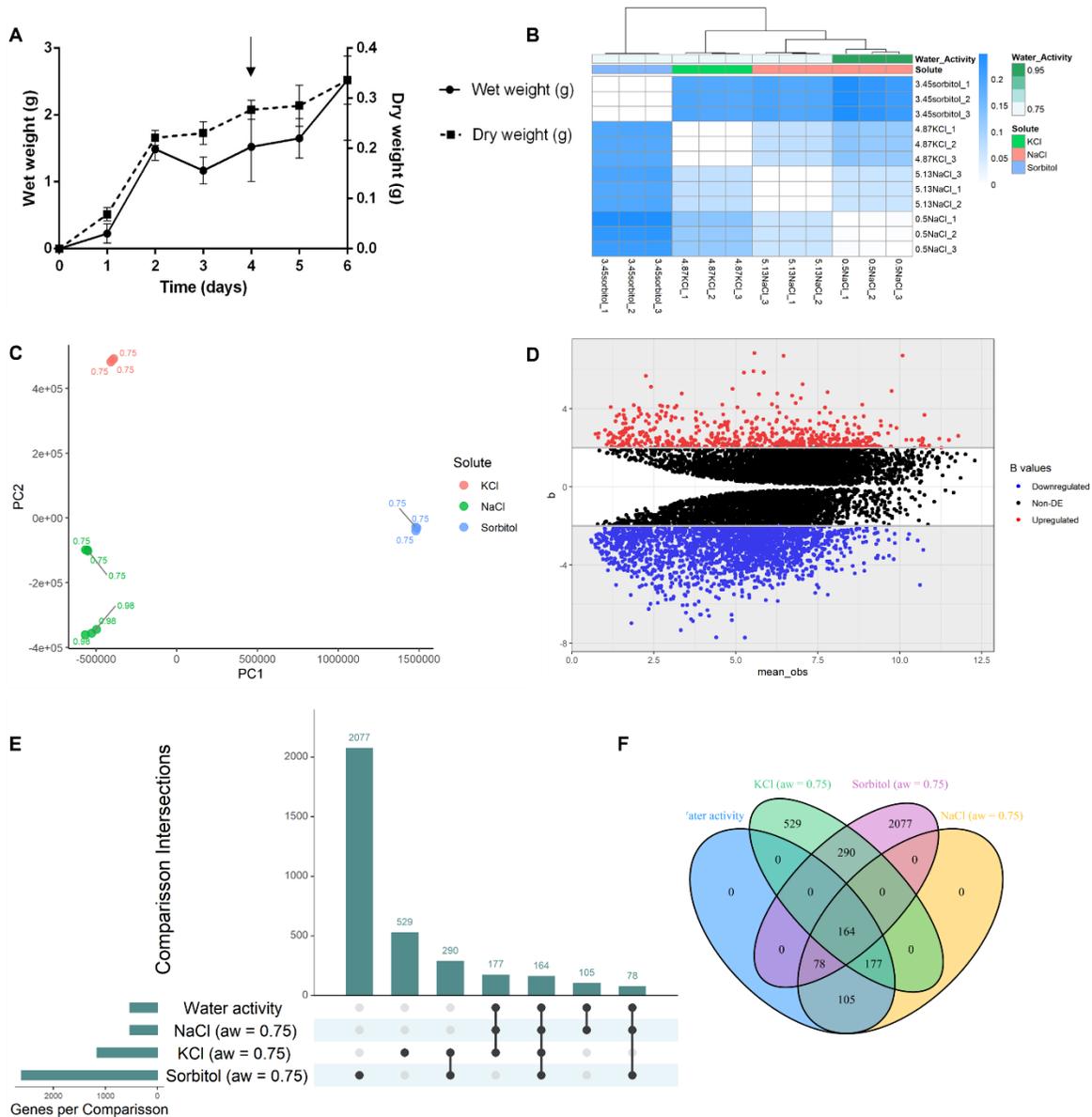


Figura 16. Análisis del transcriptoma de *Aspergillus sydowii* en condiciones de baja a_w

A. Curva de crecimiento de *A. sydowii* en el tiempo en su condición óptima de crecimiento (0.5 M NaCl, 28°C y 150 rpm).

B. Diagrama representativo de la cercanía entre muestras de un mismo grupo y con muestras de grupos diferentes basado en los datos transcriptómicos obtenidos en este estudio.

C. Distribución de las muestras en un análisis de componentes principales, agrupadas por grupos de tratamiento

D. Representación gráfica de la media de genes diferencialmente expresados en este estudio; genes con un $\log_{2}FC > 2$: regulados positivamente (rojo) y con un $\log_{2}FC < -2$: regulados negativamente (azul). Genes con niveles de expresión invariables se representan en negro.

E. Gráfica que muestra el número de genes DE compartidos o no entre las diferentes condiciones de estudio evaluadas. Las barras verticales muestran el número de genes que se cruzan entre las comparaciones, indicado por los círculos negros conectados debajo del histograma. Las barras

horizontales muestran el tamaño del conjunto de genes.

F. Diagrama de Venn que muestra la superposición entre los genes expresados diferencialmente en las diferentes comparaciones.

Esto concuerda con lo planteado por Zajc y colaboradores en el 2013 (Zajc, et al., 2013) para la secuenciación del genoma y transcriptoma del hongo halófilo *Wallemia ichthyophaga*, así como lo reportado por B. Wang y colaboradores en el 2010 (Wang, Guangwu, Wang, & Ying, 2010) para el análisis del transcriptoma de *Aspergillus oryzae*. A nivel molecular esto se traduce en que, en el punto máximo de la fase exponencial se han traducido el mayor número de enzimas relacionadas el crecimiento del hongo en estas condiciones, por lo que, si se pretende realizar un análisis transcriptómico de *A. sydowii* en estas condiciones, es acertado seleccionar, para la extracción del ARN, un tiempo que se encuentre a la mitad de dicha fase exponencial, dado que, a diferencia de lo que ocurre en organismos procariontes, donde la transcripción y la traducción son dos procesos acoplados (de manera que a medida que se forman las cadenas de ARNm y se separan del molde, los ribosomas proceden a su traducción), en organismos eucariontes son dos procesos independientes separados en tiempo y espacio, ya que la transcripción ocurre en el núcleo mientras que la traducción ocurre en el citoplasma de la célula.

Para analizar el transcriptoma de *A. sydowii*, las muestras de ARNm se sometieron a secuenciación por medio de Illumina HiSeq, se analizó su calidad mediante el software fastqc y se procedió a su depuración. Posteriormente, se ensamblaron de novo mediante el software Trinity. En este estudio se compararon las lecturas correspondientes a la condición óptima de a_w (0.5 M NaCl ~ 0.98 a_w) vs la condición de baja a_w (5.13 M NaCl ~ 0.75 a_w). En este caso, el transcriptoma contiene 35825 fragmentos ensamblados (contigs) los cuales pertenecen a 20178 posibles estructuras génicas (Tabla 2), donde el 50% de las bases ensambladas se encuentran en contigs de al menos 1898 bases de longitud. Seguidamente se ensamblaron las lecturas correspondientes a las 3 condiciones de baja a_w (5.13 M NaCl, 4.87 M KCl y 3.45M Sorbitol). En este caso, el transcriptoma contiene 35825 fragmentos ensamblados (contigs) los cuales pertenecen a 20178 posibles estructuras génicas, donde el 50% de las bases ensambladas se encuentran en contigs de al menos 1898 bases de longitud.

La agrupación jerárquica de los perfiles de expresión mostró que las muestras se separaron de acuerdo con el grupo de tratamiento y por réplicas (Figuras 16b y 16c), además se observó una mayor cercanía entre grupos de sales que con respecto a las muestras con sorbitol. En la tabla 2 y la figura 16d se muestran el número de genes regulados positiva y negativamente en las comparaciones del análisis de expresión diferencial llevado a cabo en este estudio.

Tabla 2. Genes diferencialmente expresados (positiva y negativamente) en las condiciones evaluadas en el transcriptoma de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w .

Condiciones	# Genes DE	# Genes regulados (+)	# Genes regulados (-)
Baja actividad de agua	524	243	281
NaCl ($a_w=0.75$)	524	243	281
KCl ($a_w=0.75$)	11160	318	842
Sorbitol ($a_w=0.75$)	2609	572	2037

En nuestro estudio se observó además cierto número de genes compartidos entre las diferentes condiciones de cultivo evaluadas, de acuerdo con las comparaciones realizadas (Figura 16e y 16f). 177 genes se compartieron en condiciones de baja a_w impuestas por sales, lo que nos habla de una posible función de estos relacionada con el estrés iónico y 105 genes se encontraron exclusivamente en presencia de NaCl ($0.75 a_w$), los que podrían estar involucrados con la toxicidad de este ion a nivel celular.

El enriquecimiento de términos GO para el conjunto de genes DE en las condiciones de estudio antes mencionadas reveló que en condición óptima vs baja a_w impuesta por NaCl los principales procesos biológicos regulados fueron la biosíntesis de ácidos grasos (GO:0000036) (Figura 17 y Anexos), lo que posiblemente represente un aumento en la fluidez de la membrana y ha sido observado en algunos halófilos como *H. werneckii* y *A. pullulans* (Kogej, Ramos, Plemenitas, & Gunde-Cimerman,

2005); y la actividad de proteínas quinasas (GO:0000079), lo cual se corresponde con la activación de la cascada MAPK o Vía de Hog que tiene lugar en respuesta a este tipo de estrés (Plemenitaš, et al., 2014). Por otro lado, se encontró regulada positivamente la remoción de radicales superóxido (GO:0034599), lo cual es un indicativo de que el estrés salino a 5.13M de NaCl también resulta en un estrés oxidativo (Michael, Manuela, Mark, Thomas, & Breitenbach-Koller, 2015). De igual manera se observó una regulación positiva en el transporte transmembrana de manosa (GO:0015761) y aminoácidos (GO:0006865) y la síntesis de estos últimos como el glutamato (GO:0019676) y aspartato (GO:0008652), lo que podría estar relacionado con la adaptación a los cambios en la osmolaridad celular provocados por la presencia de NaCl en el medio. Así mismo se encontró enriquecida la entrada de glucosa a la célula (GO:0005887), la que pudiera servir como materia prima para la síntesis de compuestos como el glicerol. De igual manera, con el objetivo de obtener glucosa y por ende energía en estas condiciones de estrés, se vieron enriquecidos procesos como la gluconeogénesis (GO:0015976) y el ciclo del glioxilato (GO:0009514). En la comparación realizada entre las muestras en presencia de NaCl vs KCl en condiciones de baja actividad de agua (Figura 17 y Anexos), se observó la regulación positiva de la síntesis de triptófano (GO:0000028), prolina (GO:0018208) y lisina (GO:0004755), así como procesos metabólicos relacionados con la síntesis de glicerol (GO:0062197), lo cual es indicativo de la utilidad de estos compuestos en contender contra las condiciones de baja actividad de agua impuesta por KCl. En la comparación realizada entre las muestras en presencia de NaCl vs Sorbitol en condiciones de baja actividad de agua (Figura 17 y Anexos), se encontraron regulados, además de la mayor parte de los procesos anteriormente mencionados, procesos glucolíticos (GO:0006096) y relacionados al Ciclo de Krebs (GO:0006099), probablemente con el objetivo de metabolizar las grandes cantidades de sorbitol presentes en el medio. Por último, en la comparación realizada entre las muestras en presencia de KCl vs Sorbitol en condiciones de baja actividad de agua, se encontraron de igual manera enriquecidos, la mayoría de los procesos anteriormente mencionados (Figura 17 y Anexos).

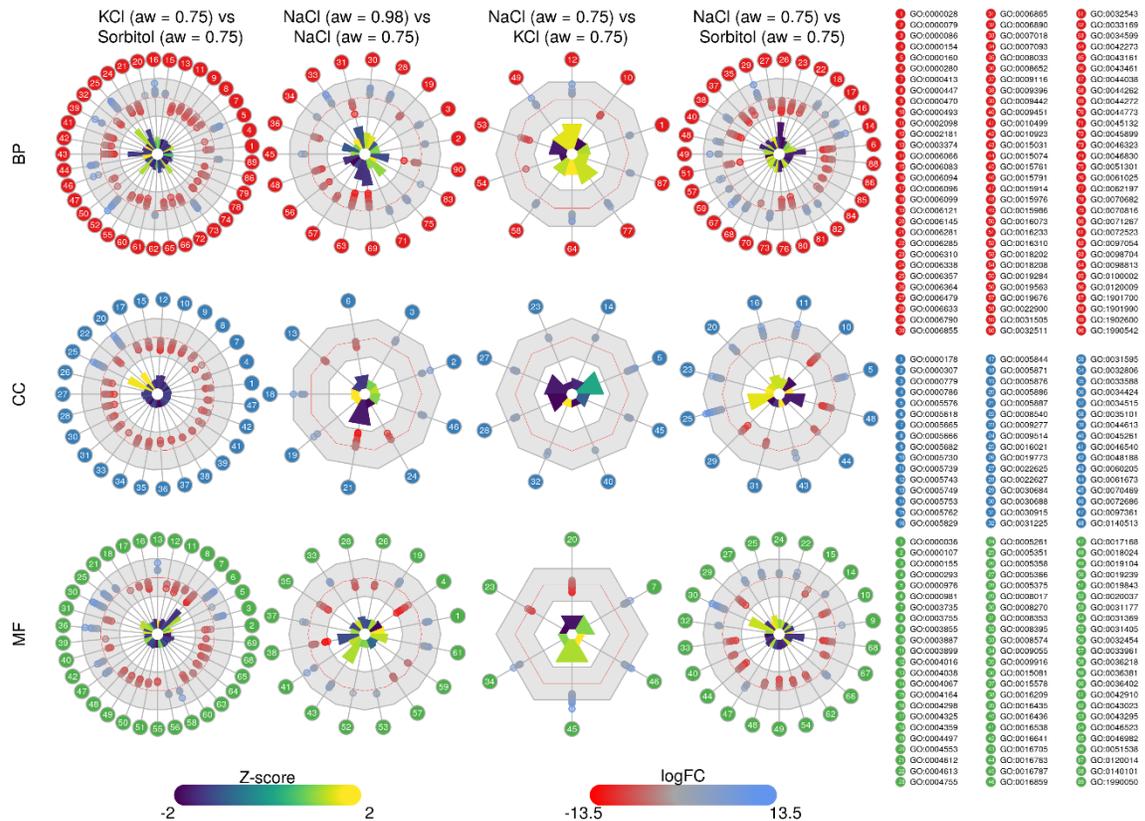


Figura 17. Enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas del transcriptoma de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w .

Respuesta transcripcional de *A. sydowii* a condiciones de baja a_w , impuesta por NaCl.

La Vía de Hog y la estrategia de solutos compatibles

En el transcriptoma de *A. sydowii* se encontraron activados al menos 10 procesos relacionados con la respuesta transcripcional a condiciones de baja a_w impuesta por NaCl. Entre estos procesos se encuentran: la vía de Hog, el transporte de solutos a través de la membrana plasmática, cambios en la composición de la PC, la respuesta al estrés oxidativo, el Ciclo de Krebs, la vía de fosfatos, procesos energéticos, la regulación de factores de traducción, el control de calidad de las proteínas y la vía biosintética de aminoácidos, por solo mencionar algunos (Figura 18 y 19). En este trabajo se mencionan los genes relacionados con cada uno de estos procesos y su rol en contender con estas condiciones extremas de salinidad.

Entre los genes DE se encontraron varios anotados como proteínas quinasas y MAPK, lo que sugiere que la Vía de Hog o la síntesis de solutos compatibles

probablemente se encuentren activas en estas condiciones. Además, se identificó la sobreexpresión del gen *sln1*, una histidina-quinasa de membrana que actúa como osmosensor ante cambios en la presión de turgencia o elasticidad de la membrana producto de la hipersalinidad del medio (Plemenitas, Vaupotic, Lenassi, Kogej, & N., 2008). En condiciones de estrés osmótico, la autofosforilación de *sln1* se reprime y *ssk1* (segunda enzima en la cascada MAPK) es subsecuentemente desfosforilada. Esta enzima se une entonces y activa a *ssk2* provocando su autofosforilación. La *ssk2* activada es entonces capaz de unirse y fosforilar a *pbs2* que activa finalmente a la MAPK *hog1*, la cual a su vez induce la expresión de genes osmoreguladores y de respuesta al estrés. Entre estos genes se encuentra aquel que codifica para la glicerol 3-P deshidrogenasa (*Gpd1*), enzima clave en la síntesis de glicerol (cataliza la conversión de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3-P), también DE en este estudio. El glicerol es ampliamente utilizado por la célula ya sea como fuente de carbono, en la síntesis de glicerofosfolípidos y triacilglicéridos, para combatir el estrés oxidativo y ayudar a mantener la turgencia celular (Plemenitaš, et al., 2014).

Otro de los solutos compatibles encargados de mantener la estabilidad osmótica en la célula es la trehalosa. En nuestro estudio se encontró DE la enzima responsable de su síntesis, la trehalosa-6-fosfato sintasa (*TPS1*). Actualmente se conoce que la trehalosa no es únicamente una fuente de carbono, sino que además tiene una función protectora frente a varios tipos de estrés. En el hongo *A. nidulans* se ha visto que la trehalosa se acumula en respuesta a estrés oxidativo, estrés por calor y durante la conidiación, no siendo así en el caso del estrés osmótico (Pérez-Llano, et al., 2020). La trehalosa es capaz de actuar además como protector intracelular durante la deshidratación debido a su capacidad única para reemplazar el agua de forma reversible tras la deshidratación de las bicapas de fosfolípidos (Hallsworth & Magan, 1994). Estos mecanismos, de ser confirmados mediante la cuantificación de trehalosa, pudiera constituir una estrategia novedosa de respuesta a estrés osmótico en halófilos.

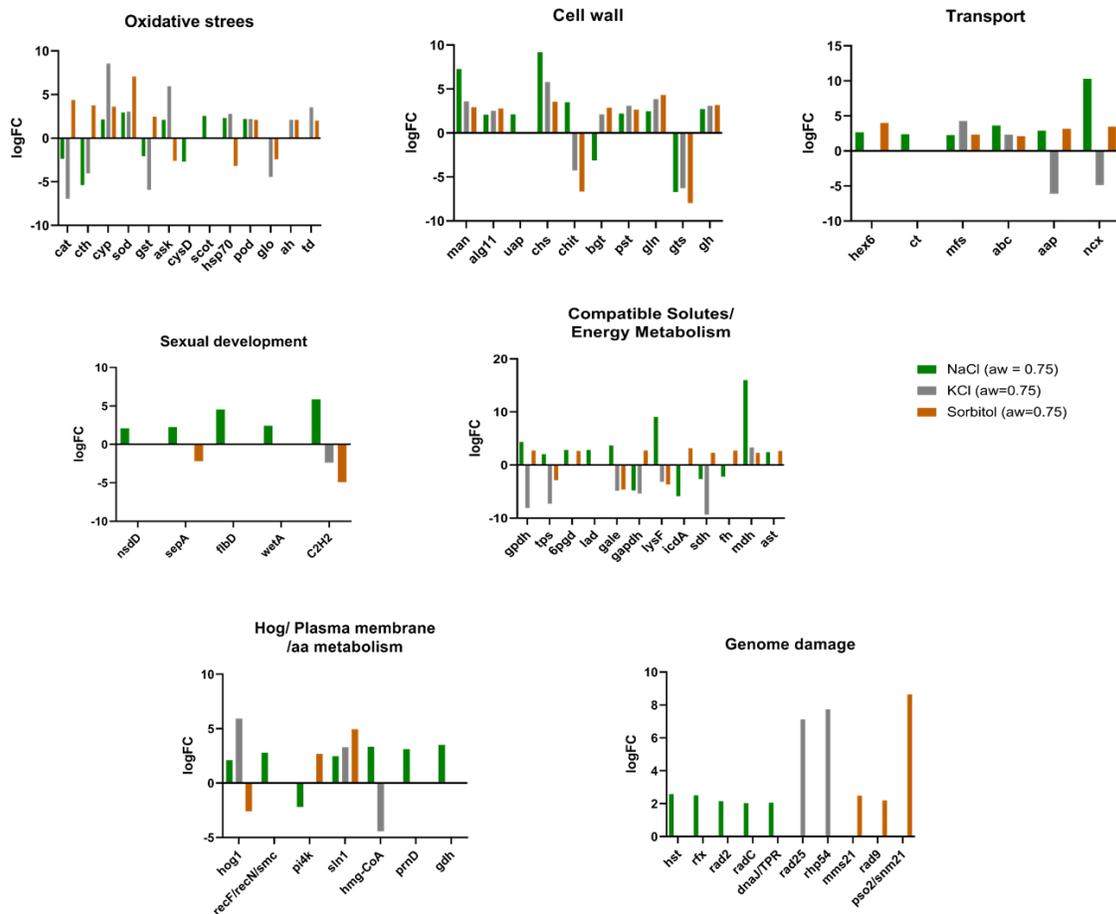


Figura 18. Genes DE (Up y Down) correspondientes a los principales procesos regulados en *A. sydowii* en respuesta a condiciones de baja a_w .

La importancia del metabolismo energético en *A. sydowii*.

La estrategia de solutos compatibles requiere una alta aportación de energía para mantener las correspondientes concentraciones de soluto intracelular y la homeostasis iónica (Gostinčar, Lenassi, Gunde-Cimerman, & Plemenitaš, 2011). La adaptación a la alta demanda energética es claramente visible en *A. sydowii* en condiciones de baja a_w . El metabolismo de producción de energía pareciera estar activado por la regulación positiva de genes que codifican para las enzimas del Ciclo de Krebs (malato y glutamato deshidrogenasas) la vía de las pentosas fosfato (6-fosfogluconato deshidrogenasa), y la modulación del almacenamiento energético (UDP-galactosa 4-epimerasa). El aumento del suministro de energía también se combina con la síntesis de proteínas, que se apoya en la regulación positiva de factores reguladores de la traducción (factor de iniciación de la traducción eucarionte #5), la regulación positiva de los componentes del control de calidad de

las proteínas (familia de chaperonas Hsp70) y el transporte (aminoácido permeasa) (Gostinčar, Lenassi, Gunde-Cimerman, & Plemenitaš, 2011).

Sistemas de transporte en condiciones de baja a_w

La mayoría de los hongos halófilos cuentan con un gran número de sistemas de transporte para mantener la homeostasis y el equilibrio iónico a ambos lados de la membrana plasmática, y además eliminar iones tóxicos como el sodio. En nuestro estudio, 4 transportadores tipo ABC se expresaron diferencialmente. La súper familia de proteínas ABC (ATP-binding cassette transporter) transportan diversos tipos de sustratos, incluidos azúcares, aminoácidos, antibióticos, lípidos, esteroides, péptidos, metabolitos endógenos y iones (Pérez-Llano, et al., 2020). De acuerdo con Pérez-Llano y colaboradores en el 2020, los genomas de *A. sydowii* y *Aspergillus versicolor* revelaron un gran número de genes que codifican para este tipo de transportadores, los que podrían tener un papel en asegurar una rápida absorción de ciertos aminoácidos bajo condiciones hipersalinas. En nuestro transcriptoma se encontraron, además, otros 2 transportadores de aminoácidos DE. La osmorregulación en procariontes en respuesta a la alta salinidad a menudo implica la acumulación de aminoácidos como la prolina y la betaína, pudiendo ser el caso de los hongos halófilos que crecen en medios ricos (Pérez-Llano, et al., 2020).; sin embargo, la contribución de los transportadores ABC en la halotolerancia, permanece inexplorada en hongos halófilos.

La superfamilia de transportadores MFS también se encontró DE (4 genes). Esta es la familia más grande de transportadores secundarios y muestran una amplia especificidad de sustrato que va desde iones a carbohidratos, lípidos, aminoácidos, péptidos, nucleósidos y otras moléculas (Quistgaard, Löw, Guettou, & Nordlund, 2016). El transportador tipo simporte de glicerol/H⁺ (Stl1), es un miembro de esta familia y juega un papel fundamental bajo condiciones de estrés hiperosmótico, como se ha visto en *S. cerevisiae* y *W. ichthyophaga* (Plemenitaš, Konte, Gostinčar, & Cimerman, 2016). En nuestro estudio, también se expresaron diferencialmente 2 transportadores de Na⁺/Ca⁺ y 1 transportador de cationes. De acuerdo con lo planteado por Plemenitaš y colaboradores en el 2016, los transportadores de cationes previenen la acumulación intracelular de NaCl, y así evitan los efectos

tóxicos que tendría esta sal, mientras mantienen, al mismo tiempo, una alta relación KCl/NaCl, que es necesaria para el pleno funcionamiento de la célula, otra tarea crucial en ambientes con alta salinidad.

Cambios fisiológicos, a nivel de membrana y PC en respuesta al estrés salino.

La respuesta transcripcional de *A. sydowii* a nivel de composición y remodelación de la PC sufrió cambios significativos en estas condiciones de extrema salinidad. En *A. sydowii*, al menos 11 diferentes transcritos codificando 8 quitina sintasas se han identificado bajo condiciones de estrés salino (Pérez-Llano, et al., 2020). En nuestro estudio se encontraron diferencialmente expresadas la quitina sintasa y la quitinasa, enzimas encargadas de la síntesis y degradación de quitina, respectivamente. La quitina es un polímero lineal de β -1,4-N-acetyl-glucosamina, está localizada muy cerca de la membrana celular y se entrecruza con α (1-3)-glucanos formando un núcleo hidrofóbico rígido rodeado por β (1-3)-glucanos entrelazados. Este polímero ayuda a mantener la forma y rigidez de la PC, de ahí la importancia de regular su síntesis y degradación en condiciones de baja a_w . Adicionalmente, el gen *alg1*, que codifica para la alpha-1,2-mannosyltransferasa, involucrada en la remodelación o modificación de las fibras de quitina, también se expresó diferencialmente.

La glicosilfosfatidilinositol anclada a membrana (GPI anchored) es una familia de proteínas que juegan un rol fundamental en la morfogénesis y organización de la PC en hongos, y 3 genes que codifican para esta enzima se expresaron diferencialmente en nuestro transcriptoma. Dos funciones se han asignado a estas proteínas, dependiendo de su localización en la PC. En primer lugar, aquellas unidas covalentemente a polisacáridos tienen diversas funciones biológicas como filamentación, apareamiento, floculación o adhesión a la matriz celular externa, y se denominan GPI-manoproteínas. En segundo lugar se encuentran las GPI de unión, involucradas en la biosíntesis de la PC. En este grupo se encuentra la familia de las glucanosiltransferasas (GEL), responsables de la elongación y acortamiento de los β (1-3)-glucanos (Bruneau, 2001). De hecho, en nuestro estudio, se encontraron DE 3 genes que codifican específicamente para esta familia y 4 codificando a glucanasas, que, como su nombre lo indica, están encargadas de romper los

enlaces glucosídicos de los glucanos.

Finalmente, 2 genes que codifican para la familia de las glicosidasas (CRH), también parte de las GPI-anchored, se expresaron diferencialmente. Las glicosidasas son responsables de la transglicosilación, formando enlaces quitina-glucano. La delección de los genes *crh* en *Candida albicans*, incrementó la elasticidad de la PC, reduciendo su supervivencia ante un shock osmótico, mientras que la sobreexpresión de estos genes tuvo un efecto osmoprotector. En *A. sydowii* a 2M de NaCl también se reportó la presencia de un homólogo del gen *crh* (Pérez-Llano, et al., 2020).

En resumen, si la función de las proteínas GEL es abolida, o el contenido de glucanos disminuye por acción de las glucanasas, el contenido de quitina en la pared celular se incrementaría por medio de la quitina sintasa DE, y viceversa. Esto podría ser un mecanismo compensatorio para restaurar la rigidez de la PC, indicando un balance entre la proporción de β (1-3)-glucanos y la producción de quitina.

La quitina se sintetiza a partir de la uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), que también es un donante de azúcares para la síntesis de glicoproteínas, glicosaminoglicanos y las GPI anchored. En eucariotas, la UDP-GlcNAc se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato (Fru-6P) y L-glutamina en una cascada de cuatro reacciones enzimáticas. La cuarta de esas reacciones es catalizada por la enzima UDP-GlcNAc pirofosforilasa (UAP1). La UAP1 (E.C.2.7.7.23) es miembro de la familia de nucleótido difosfato pirofosforilasas. Esta enzima cataliza la síntesis de UDP-GlcNAc a partir de UTP y GlcNAc-1P y también la pirofosforólisis inversa de la UDP-GlcNAc ($UTP + GlcNAc-1P \rightleftharpoons UDP-GlcNAc + PPi$) (Olawale G. Raimi, 2020). La UAP1 se encontró DE en este estudio y como se mencionó anteriormente, es parte crucial en la cascada de síntesis de quitina y proteínas GPI anchored, que responden a cambios en la osmolaridad celular.

Muchos organismos eucariotas son capaces de adaptarse a cambios osmóticos dada su habilidad para modificar la composición de esteroides de sus membranas celulares. La 3-Hydroxy- 3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductasa (HMGR, EC 1.1.1.34), es el principal regulador del flujo metabólico en la vía del mevalonato para la biosíntesis de esteroides, y cataliza la deacilación reductiva NADPH dependiente, de HMG-CoA a mevalonato. Esta enzima, DE en nuestro estudio, es crucial para la

producción biosintética de esteroides y otros isoprenoides (Vaupotic, Veranic, Petrovic, Gunde-Cimerman, & Plemenitas, 2008). Poco se sabe sobre la regulación de la actividad de la HMGR en el grupo de hongos halófilos moderados a extremos que se han adaptado a crecer en ambientes hipersalinos (Gunde-Cimerman, Zalar, Hoog, & Plemenitaš, 2000), sin embargo, Vaupotič y colaboradores en el 2008 demostraron que la actividad de la HMGR es crucial para la halotolerancia, así como para los cambios en la prenilación de proteínas en respuesta a cambios de salinidad (Vaupotic, Veranic, Petrovic, Gunde-Cimerman, & Plemenitas, 2008). La acción de esta enzima posiblemente incrementa la fluidez de la membrana, lo que se observó previamente en las levaduras halotolerantes *H. werneckii* y *Aureobasidium pullulans* (Kogej, Ramos, Plemenitas, & Gunde-Cimerman, 2005). Otra enzima DE en nuestro estudio fue la fosfatidilserina descarboxilasa, la cual conecta el metabolismo de los glicerolípidos con la producción de glicerol y juega un rol fundamental en la síntesis de fosfolípidos. En plantas y hongos, los fosfolípidos han servido de intermediarios claves en la síntesis de glicerol y como mensajeros secundarios cruciales en respuesta al estrés osmótico vía activación de la fosfolipasa C (Meijer & Munnik, 2003).

En el halófilo extremo *Aspergillus montevicensis* y el halotolerante *Aspergillus glaucus* se ha descrito que el estrés por la presencia de NaCl promueve el cambio de una reproducción sexual a asexual (Ding, Liu, Lu, & Gong, 2019) y la formación de conidióforos a través de la activación de las vías de señalización Ras y MAPK que estimulan la vía central del desarrollo asexual: “*brlA* → *abaA* → *wetA*” (Liu, Li, & Wu, 2017). Un paso clave y esencial para el desarrollo del conidióforo es la activación del gen *brlA*, que codifica un factor de transcripción de dedos de zinc, C₂H₂ (DE en nuestro estudio), que induce la expresión de otros genes necesarios para el desarrollo asexual. El gen *wetA*, también DE en nuestro transcriptoma, funciona en la fase tardía de la conidiación y juega un papel fundamental en la síntesis de componentes cruciales de la PC (Yu, Mah, & Seo, 2006).

Respuesta al estrés oxidativo y daño al genoma en *A. sydowii*

Se ha demostrado que los ambientes hipersalinos desencadenan la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en varios organismos eucariotas (Gunde-

Cimerman & Gostincar, 2018). Como era de esperarse en estas condiciones, las respuestas al estrés osmótico y oxidativo se superponen. En la célula podemos encontrar 3 ROS principales: la reducción del oxígeno molecular (O_2) produce anión superóxido (O_2^-), que se convierte, mediante la actividad de la superóxido dismutasa (DE expresada), en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual se reduce por completo mediante la actividad de catalasas o peroxidasas a agua, o es parcialmente reducido (a través de la reacción de Fenton catalizada por iones ferrosos) a radical hidroxilo ($HO\bullet$). En nuestro estudio se encontraron DE una peroxidasa y una hemo peroxidasa. El daño causado por el (O_2^-), está dirigido principalmente a proteínas con grupos protésicos Fe-S. Los $HO\bullet$ son extremadamente oxidantes y causan daños indiscriminados a los principales grupos de biomoléculas. En comparación a esto, el H_2O_2 es una molécula pequeña, no cargada y relativamente estable que puede difundir a través de las membranas biológicas, dañando principalmente a proteínas Fe-S (Warris & Ballou, 2019).

La superfamilia del citocromo p450 (CYPs), de igual manera, juega un papel fundamental contra el estrés oxidativo. Se conoce que varios CYPs fúngicos desempeñan un rol crítico en el metabolismo primario y secundario y la degradación de xenobióticos. En nichos ambientales limitados (tales como ambientes con baja disponibilidad de agua), algunos hongos utilizan metabolitos secundarios para competir contra otros organismos, incluyendo bacterias, plantas, animales e incluso otros hongos, y los CYPs han sido relacionados directamente con la biosíntesis de dichos metabolitos. Además, uno de los CYPs fúngicos mejor estudiados (CYP51), media el metabolismo primario de la biosíntesis de ergosterol, el cual, como vimos anteriormente, es necesario para la regulación de la fluidez y permeabilidad de la membrana en estas condiciones. Adicionalmente, el CYP55, otra enzima desintoxicante, también se ha visto que exhibe actividad NADH-peroxidasa (Shin, Kim, Lee, & Son, 2018). En nuestro estudio, se encontraron 6 genes CYPs DE.

La cisteína sintasa (DE en nuestro estudio), como su nombre lo indica, es la enzima responsable de la síntesis de cisteína (Cys), un aminoácido crucial en la respuesta celular antioxidante. Por poner un ejemplo, la Cys 32 y la Cys 35, son sitios activos importantes para la actividad y conformación de la tiorredoxina, enzima involucrada en la remoción de ROS, particularmente H_2O_2 (Matsuzawa, 2017).

En nuestro estudio, analizamos también la transcripción de genes relacionados con

la oxidación lipídica, ya que es un proceso fuertemente inducido por el estrés oxidativo (Busch & Binder, 2017). Encontramos DE a la enzima succinyl-CoA-3-ketoacid-coenzyme A transferasa, cuya función central es el catabolismo de los cuerpos cetónicos. Aunque el vínculo entre esta enzima y el estrés oxidativo no se ha estudiado exhaustivamente, en la bacteria *Burkholderia pseudomallei*, se ha sugerido que esta enzima responde a ROS, y es necesaria en la transferencia de CoA del succinil-CoA a lípidos oxidados, durante el estrés oxidativo.

La aconitasa es una enzima del Ciclo de Krebs que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato vía cis-aconitato. Esta enzima (DE en nuestro estudio), es un importante mediador del estrés oxidativo, el metabolismo y la regulación del hierro (Fazius, Shelest, Gebhardt, & Brock, 2012).

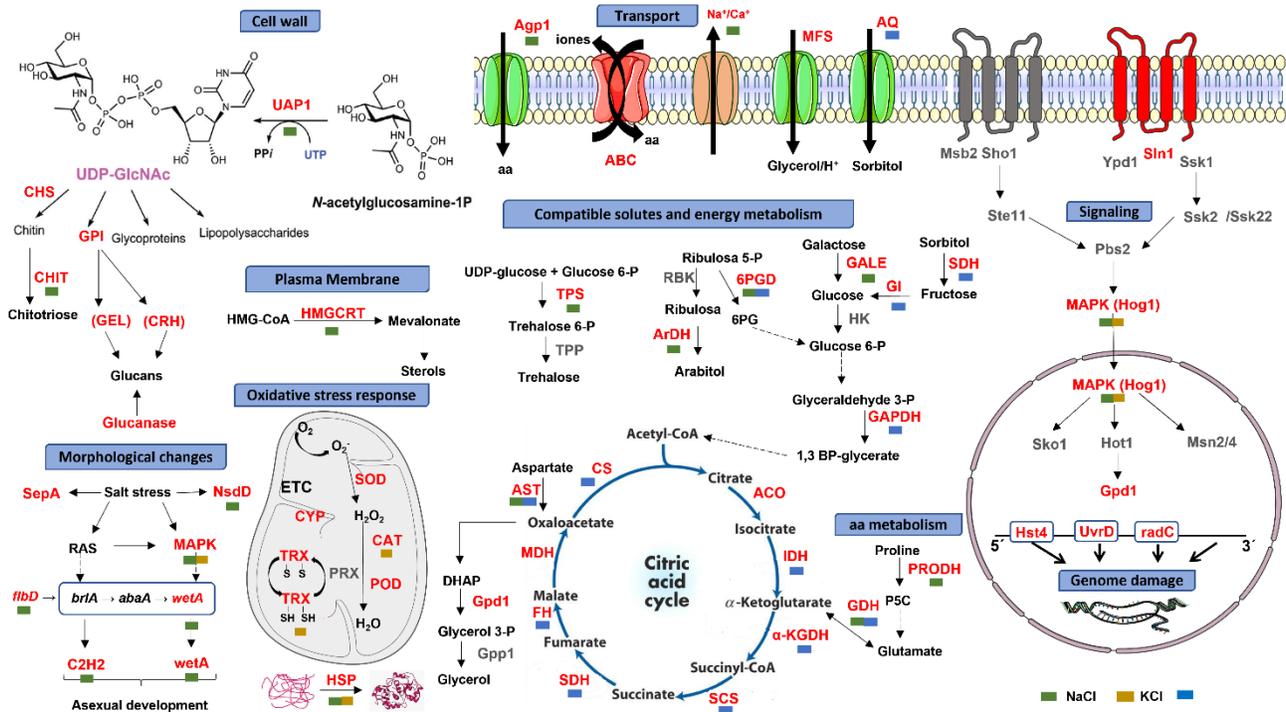
En condiciones de baja actividad de agua también observamos una respuesta transcripcional relacionada con daños al genoma. Encontramos en este trabajo genes DE cuyas funciones principales están relacionadas con la estabilidad del genoma y la reparación del ADN, tal es el caso de la UvrD-helicasa; la proteína de recombinación y reparación del ADN, radC; la proteína de reparación por escisión del ADN, rad2 y la enzima de replicación y prevención de daño al genoma, Rfx1. Igualmente encontramos DE a la histona deacetilasa (Hst4). Esta clase de enzimas eliminan los grupos acetilo de la N-acetil-lisina en las histonas, permitiendo que las histonas envuelvan el ADN más firmemente (Camile, Semighini, Goldman, & Harris, 2005). Otra enzima DE fue la Histona metiltransferasa, encargada de transferir 1, 2 o 3 grupos metilo a los residuos de lisina y arginina en las histonas. Este proceso de metilación de las histonas es la principal modificación epigenética de la cromatina, que determina la expresión génica, la estabilidad genómica, entre otros procesos.

Respuesta transcripcional de *A. sydowii* a condiciones de baja a_w , impuesta por tres kosmotropos (NaCl, KCl y sorbitol).

En el transcriptoma de *A. sydowii* crecido en presencia de NaCl, KCl o sorbitol a un mínimo de a_w de 0.75, se encontraron diferencias en la transcripción de genes involucrados en modificar la composición de la membrana plasmática; un mecanismo descrito en respuesta a altas concentraciones de sales en hongos halotolerantes (Gunde-Cimerman, Ramos, & Plemenitaš, 2009) (Figura 18 y 19). La HMGR (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA) se encontró DE únicamente en presencia de NaCl y de igual manera se encontraron dos genes codificando una acyl-CoA dehydrogenase, cuya función es catalizar el paso inicial en cada ciclo de β -oxidación de ácidos grasos en las células eucariotas, liberando $FADH_2$ y acetyl-CoA. Este último puede ser usado posteriormente en la síntesis de glicerol (principal soluto compatible en condiciones de baja a_w), además de proveer energía metabólica para el crecimiento del hongo, desempeñando un rol fundamental bajo condiciones de estrés osmótico. Estas diferencias respecto a la presencia de KCl o sorbitol pueden deberse a que, en presencia de altas concentraciones de NaCl, las funciones a nivel de membrana se ven más afectadas y hay mayores cambios estructurales a nivel de proteínas (Gimmler, Kaaden, Kirchner, & Weyand, 1984). Los cambios génicos transcripcionales asociados a la construcción, deconstrucción y remodelación de la PC fúngica sugieren que, en *A. sydowii*, esta estructura es extensamente modificada en condiciones de baja a_w . Curiosamente, encontramos expresados diferencialmente el doble de genes relacionados con este proceso en presencia de NaCl vs KCl y sorbitol. Además, las enzimas UAP1 y quitinasa solo se expresaron diferencialmente en presencia de NaCl. Se ha sugerido que los hongos son más tolerantes a la exposición aguda a la sal que las bacterias para tres de cuatro sales (KCl, Na_2SO_4 , K_2SO_4), excepto para NaCl. Las paredes celulares quitinosas de los hongos ofrecen una mejor protección contra la pérdida de agua, lo que los hace más resistentes a los cambios de humedad (Strickland & Rousk, 2010). Sería razonable que esto también ofreciera protección contra el bajo potencial hídrico provocado por una mayor concentración osmótica. De acuerdo con esta predicción, se ha demostrado que los hongos son capaces de hacer frente a la alta presión osmótica causada por altas concentraciones de sustratos orgánicos. Sin

embargo, en presencia de altas concentraciones de NaCl, ocurre un fenómeno de difusión a ambos lados de la membrana celular, lo que conduce a una mayor pérdida de agua de la célula y es más marcado en el caso de solutos iónicos que en solutos no iónicos. Esto podría explicar por qué en presencia de 5.13 NaCl, los cambios a nivel de PC son más acentuados.

Figura 19. Representación esquemática de los genes DE encontrados en el transcriptoma de *A. sydowii* en 0.5 y 5.13 M NaCl, 4.87 M KCl y 3.45M de Sorbitol.



Entre las adaptaciones principales a condiciones de baja a_w en hongos se encuentra el aumento en la concentración de solutos compatibles intracelulares. Como se mencionó anteriormente, en *A. sydowii*, algunos transcritos asociados con el metabolismo de estos osmolitos se expresaron diferencialmente en respuesta al estrés osmótico. Sin embargo, en relación con la activación de la vía HOG, no hubo cambios significativos cuando comparamos las 3 condiciones de estudio (NaCl, KCl y sorbitol). Estudios previos señalan que la vía HOG se activa por un aumento en la concentración de diferentes sustancias químicas (NaCl, KCl, sorbitol), lo que demuestra que la activación está relacionada con el cambio osmótico más que con el aumento en la concentración de una sustancia específica (Gustin, Albertyn, Alexander, & Davenport, 1998), lo cual explicaría los resultados obtenidos en nuestro estudio. No obstante, únicamente en presencia de NaCl se encontraron DE

las enzimas trealosa-fosfato sintasa y L-arabinitol 4-deshidrogenasa, responsables de la síntesis de trealosa y arabitol, respectivamente. Esto sugiere la necesidad de mantener estables la presión de turgencia, el volumen celular y la concentración de electrolitos (todos elementos importantes para la proliferación celular) en condiciones de estrés osmótico asociado fundamentalmente a la presencia de NaCl en el medio de cultivo. Además de los polioles, existen otros tipos de moléculas orgánicas como los aminoácidos y sus derivados capaces de actuar como solutos compatibles. En nuestro estudio se encontró DE la enzima prolina oxidasa únicamente en presencia de NaCl. Esto coincide con lo reportado por Kai-Hui Liu y colaboradores en el 2017 para el análisis transcriptómico del hongo *Aspergillus montevicensis* crecido en condiciones hipersalinas (4.5M NaCl) (Liu, Li, & Wu, 2017). La prolina es un osmolito que se acumula en respuesta a varios tipos de estrés como déficit de agua y salinidad. Además de estar asociado al balance osmótico estabiliza complejos proteicos, elimina radicales libres y es una fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento de los organismos. La prolina oxidasa es una enzima clave en el ciclo de la prolina donde también se genera glutamato, otro aminoácido que se ha visto juega un rol fundamental en la osmoprotección en varias bacterias. En presencia de NaCl también se encontró DE la enzima NADP-glutamato deshidrogenasa encargada de la síntesis de este osmolito (Ben Rejeba, et al., 2015).

Con relación al número de sistemas de transporte, el análisis de expresión génica mostró un mayor enriquecimiento cuando el hongo creció en presencia de NaCl vs KCl y Sorbitol. Esto, probablemente con el objetivo de regular los niveles y el flujo a través de la membrana plasmática de iones tóxicos como el sodio (Na⁺) (Rath, Maheshwari, Bengtson, Rousk, & Cullen, 2012). Se encontró además DE, únicamente en presencia de NaCl, un bromodominio perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales capaces de unirse a residuos acetilados de lisina en las histonas. Estudios previos han demostrado que estos bromodominios juegan un rol fundamental en múltiples tipos de estrés incluyendo salinidad, altas temperaturas, etc, además de que su delección causa disfunción mitocondrial y apoptosis bajo condiciones de estrés salino (Chen, Xie, Cai, Yang, & Duan, 2013). En el estudio realizado por Chen y colaboradores en el 2013 en *S. cerevisiae* se demostró además que la expresión de la enzima HAL2 está regulada por dicho

bromodominio. HAL2 codifica para una nucleotidasa 3'-bifosfato, encargada de convertir un producto intermediario de la asimilación de sulfato, la 3'-fosfoadenosina-5'-fosfato (*pAp*) en AMP y Pi. La actividad de esta enzima se inhibe a altas concentraciones de sodio provocando la acumulación de *pAp*. Si *pAp* se acumula es capaz de inhibir la actividad de la 5'-3'-exoribonucleasa y bloquear la síntesis de metionina, de ahí la importancia de la regulación de esta enzima (Chen, Xie, Cai, Yang, & Duan, 2013).

Diferentes condiciones de estrés, incluyendo la privación de agua debido a altas concentraciones de un soluto en particular causan daño oxidativo a las células. La relación entre la capacidad antioxidante de un hongo y la halotolerancia a nivel genómico ha sido investigada solo recientemente en el halófilo *W. ichthyophaga*, los halotolerantes *H. werneckii* y *A. pullulans* (Gostinčar, Lenassi, Gunde-Cimerman, & Plemenitaš, 2011) y nuestro hongo en estudio *A. sydowii* (Jiménez-Gómez, et al., 2020). En nuestro estudio se investigó la respuesta celular antioxidante de *A. sydowii* expuesto a tres condiciones de baja a_w : NaCl, KCl y sorbitol basado en la respuesta transcripcional de este hongo. Curiosamente, en presencia de KCl el número de enzimas relacionadas con este fenómeno fue mayor respecto a las dos condiciones de estudio restantes. Se encontraron DE en KCl la tioredoxina, la catalasa y la familia de chaperonas Hsp20 y Hsp12. La tioredoxina es una proteína redox pequeña involucrada en la remoción de ROS particularmente H_2O_2 , capaz de activar proteínas de señalización como las peroxiredoxinas y las quinasas. Las catalasas por su parte protegen las células del daño oxidativo almacenando iones Fe (II) para así evitar la formación de radicales libres y convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Finalmente, las heat-shock proteins (HSP) son chaperonas moleculares involucradas en la estabilización y renaturalización de proteínas mal plegadas.

Por otro lado, estudios en cultivos celulares de tabaco indicaron que concentraciones osmóticas equivalentes de sorbitol y manitol son menos inhibitorias del crecimiento que iguales concentraciones de NaCl. Sin embargo, el KCl resultó ser incluso más tóxico que el NaCl (La Rosa, Handa, Hasegawa, & Bressan, 1985) lo cual pudo deberse a una mayor absorción de iones cloruro procedentes del KCl respecto al NaCl. Esto podría explicar lo observado en nuestro estudio.

Con relación a los cambios en la estrategia reproductiva de *A. sydowii* en

condiciones de baja a_w , se observó una sobreexpresión de enzimas relacionadas con este fenómeno fundamentalmente en presencia de NaCl. Tal es el caso de los factores de transcripción Zn (II)2Cys6 y C2H2 que se ha visto que controlan positivamente la reproducción asexual en muchos hongos filamentosos (Chung, Choi, Park, Jeon, & Lee, 2013) (Gil-Durán, et al., 2015). Estos resultados son consistentes con los reportados para *A. montevicensis* y *Aspergillus glaucus* (Liu, Ding, Rao, & Zhang, 2017). De igual manera se encontraron únicamente DE en presencia de NaCl los genes *wetA* (mencionado anteriormente en este trabajo) y *flbD*, requerido para la iniciación de la conidiación y la activación del gen *brla*, anteriormente mencionado en nuestro estudio (Park & Yu, 2012).

Otro dato interesante en nuestro estudio fue encontrar DE a la enzima gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa en presencia únicamente de sorbitol. Esto concuerda con lo reportado por Luisa Neves y colaboradores en la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* (Neves, Oliveira, & Lucas, 1997), donde demostraron que esta enzima se inhibía cuando este organismo creía en presencia de 3M de NaCl y KCl. Además de esta enzima clave en la vía glicolítica, encontramos también que, en presencia de sorbitol, la mayoría de las enzimas asociadas al ciclo de Krebs se encontraban DE. Tal es el caso de la citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, fumarasa, malato deshidrogenasa y piruvato carboxilasa. Esto es indicativo por un lado de la necesidad energética de la célula para mantener estable la concentración intracelular de solutos y la homeostasis iónica y por otro de la probable transformación de sorbitol a fructosa (mediante la sorbitol deshidrogenasa DE en nuestro estudio), que puede llegar a convertirse en piruvato y alimentar este ciclo de manera constante.

Huella metabólica de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w examinada usando la FF Microplate de Biolog

En este estudio se realizó el primer análisis comparativo de la huella metabólica de *A. sydowii* en condiciones de baja actividad de agua usando la FF Microplate de Biolog.

Se evaluaron por triplicado 5 condiciones: control (sin sales ni solutos añadidos), NaCl (0.98 a_w), NaCl (0.75 a_w), KCl (0.75 a_w) y Sorbitol (0.75 a_w), en este caso cada uno de estos compuestos empleados se añadió al fluido de inoculación y luego junto con el hongo fueron inoculados en las placas correspondientes, las cuales cada una contenía 96 fuentes de carbono distintas.

Los resultados encontrados sugieren que la condición control y óptima de crecimiento son bastantes semejantes entre sí, y en estas el hongo es capaz de degradar eficientemente las fuentes de carbono presentes en el medio, como se muestra en la Figura 20a.

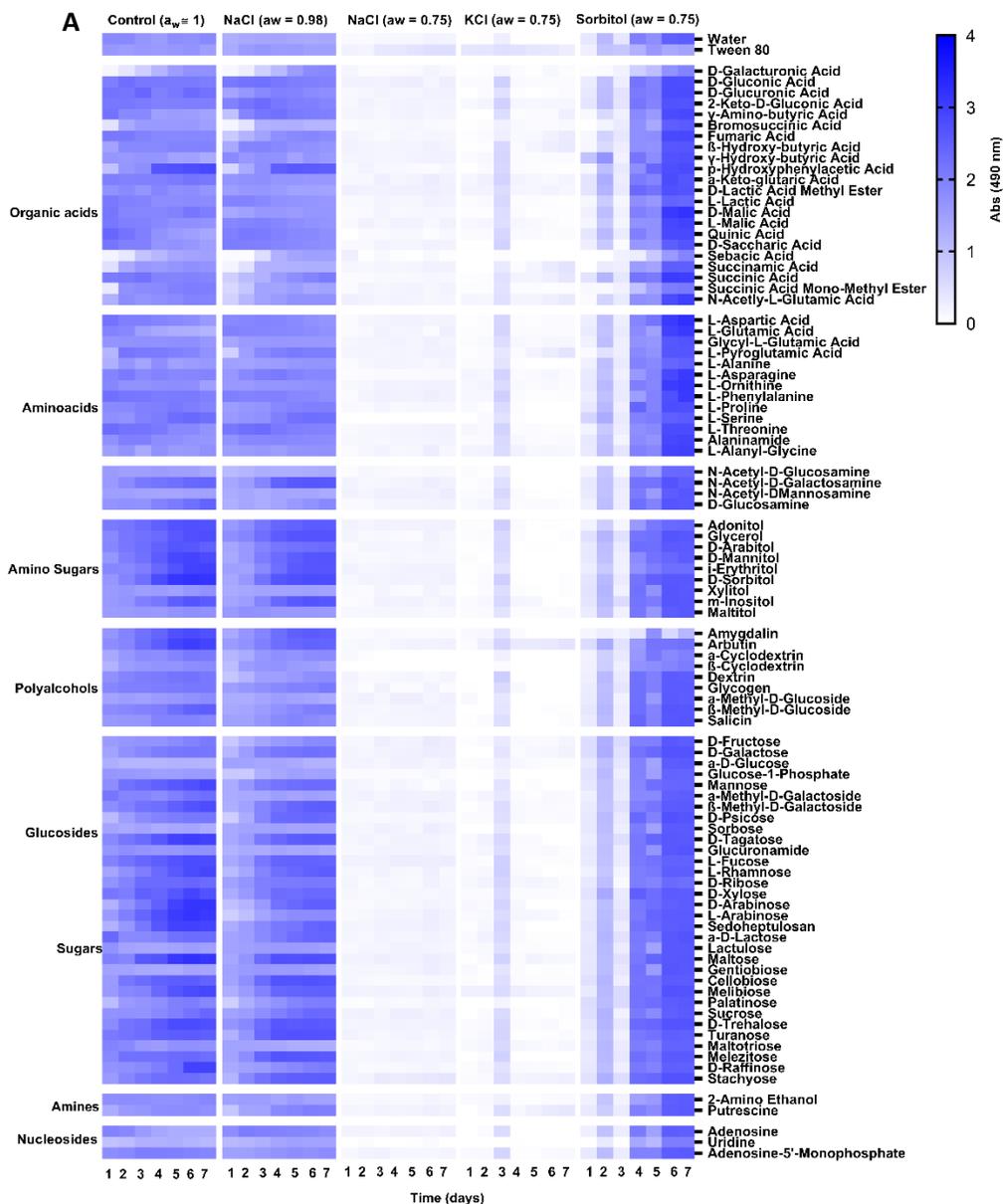


Figura 20a. Análisis de la huella metabólica de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w . Representación gráfica en forma de heatmap de la reducción del tetrazolium dye en el tiempo en las condiciones de cultivo evaluadas (0.5 y 5.13 M NaCl, 4.87 M KCl y 3.45M de Sorbitol) medida a 490nm.

Cuando el hongo fue cultivado en presencia de sales (NaCl y KCl) se observó aproximadamente hasta veinte veces menos degradación de los diferentes grupos de fuentes de carbono testeadas en comparación a cuando este fue cultivado en la condición control y óptima de crecimiento. Probablemente este fenómeno esté relacionado con la toxicidad de estas sales, particularmente el sodio. En presencia de la sal KCl, por su parte, al tercer día se observó un aumento de tres veces en el consumo de las 96 fuentes de carbono testeadas respecto al resto de los tiempos

(Figura 20a), lo que a su vez coincide con la fase máxima de crecimiento del hongo en condiciones óptimas. En el caso del sorbitol, la degradación de este sustrato comienza a ser visible a partir del día 2 de cultivo lo que probablemente está relacionado con que a partir de este día comienza la fase exponencial de crecimiento de *A. sydowii* anteriormente señalada en este trabajo. En la Figura 20b y 20c se representa gráficamente el consumo a 490 y 750nm de las fuentes de carbono evaluadas para cada condición de estudio. En el eje x se representa la absorbancia a 490nm y en el eje y a 750nm. En la figura podemos observar un panel para cada tratamiento y uno con todos los tratamientos. En los paneles correspondientes a los tratamientos individuales el color de los puntos es correspondiente al tipo de fuente de carbono (azúcares, ácidos orgánicos, etc).

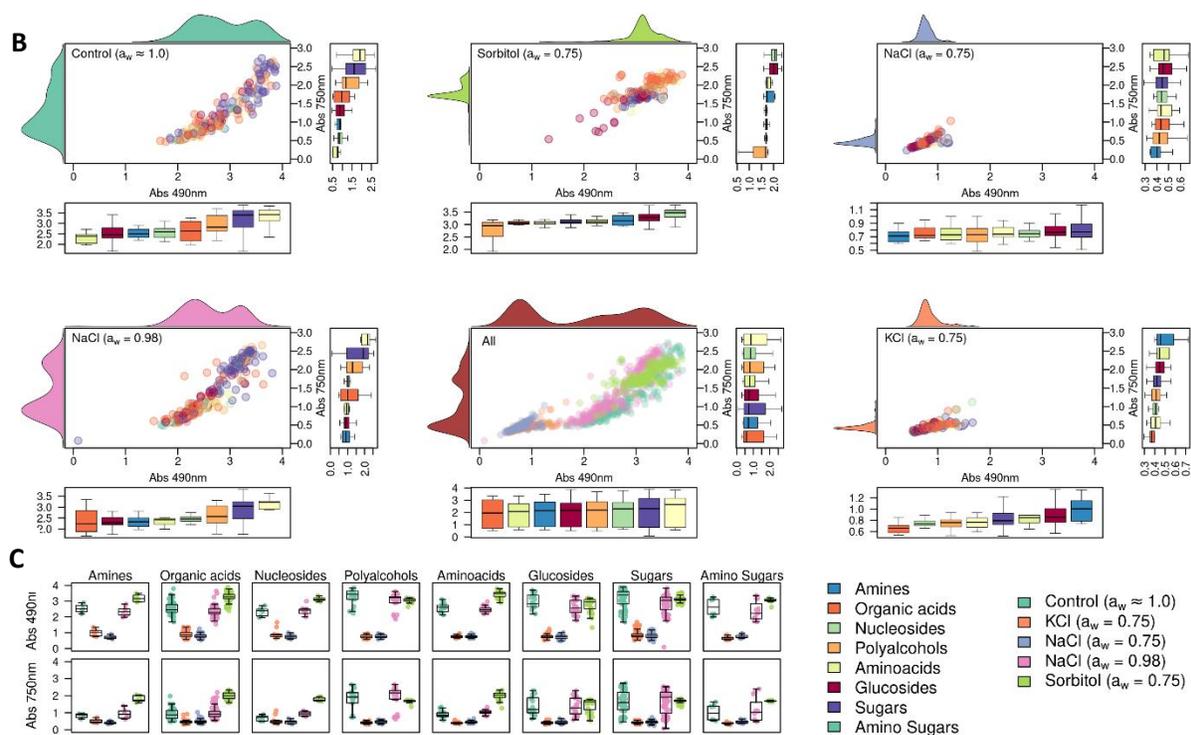


Figura 20b y c. Análisis de la huella metabólica de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w . Representación gráfica del consumo a 490 y 750nm de las fuentes de carbono evaluadas para cada condición de estudio.

En el panel donde se representan todos los tratamientos el color de los puntos es correspondiente al color de cada tratamiento. Encima y a la izquierda de los scatterplots se pueden observar diagramas de densidad de los puntos para cada uno de los ejes. Debajo y a la derecha de los scatterplots se pueden ver los boxplots

de los datos en función del tipo de sustrato, los cuales se encuentran ordenados de acuerdo con la mediana, por lo que los sustratos de la extrema derecha son los que se consumieron más y los de arriba son los que promovieron más el crecimiento en cada tratamiento. En la figura se observa que los sustratos más consumidos y/o degradados en el caso de la condición control y óptima de crecimiento son azúcares y glucósidos, mientras que en las condiciones extremas de salinidad se consumen más aminoazúcares y aminoácidos. En el caso del sorbitol también se emplean fundamentalmente aminoazúcares y nucleósidos en su defecto. Sin embargo, se puede observar claramente cómo el consumo de las fuentes de carbono en general se ve afectado en las condiciones con alta salinidad seguido de la condición extrema en presencia de sorbitol, mientras que en la condición control y óptima de crecimiento, el hongo es capaz de degradar eficientemente estos sustratos para crecer. Por último, en la figura 20c se observan los boxplots para cada tipo de sustrato por tratamiento donde los resultados indicaron que los tratamientos control/nacl 0.98/sorbitol son iguales entre ellos y diferentes a kcl/nacl 0.75 (Kruskal wallis test).

En la figura 20d y 20e se encuentra representada la correlación entre la absorbancia a 490 y 750nm para cada una de las fuentes de carbono evaluadas, para cada condición de estudio.

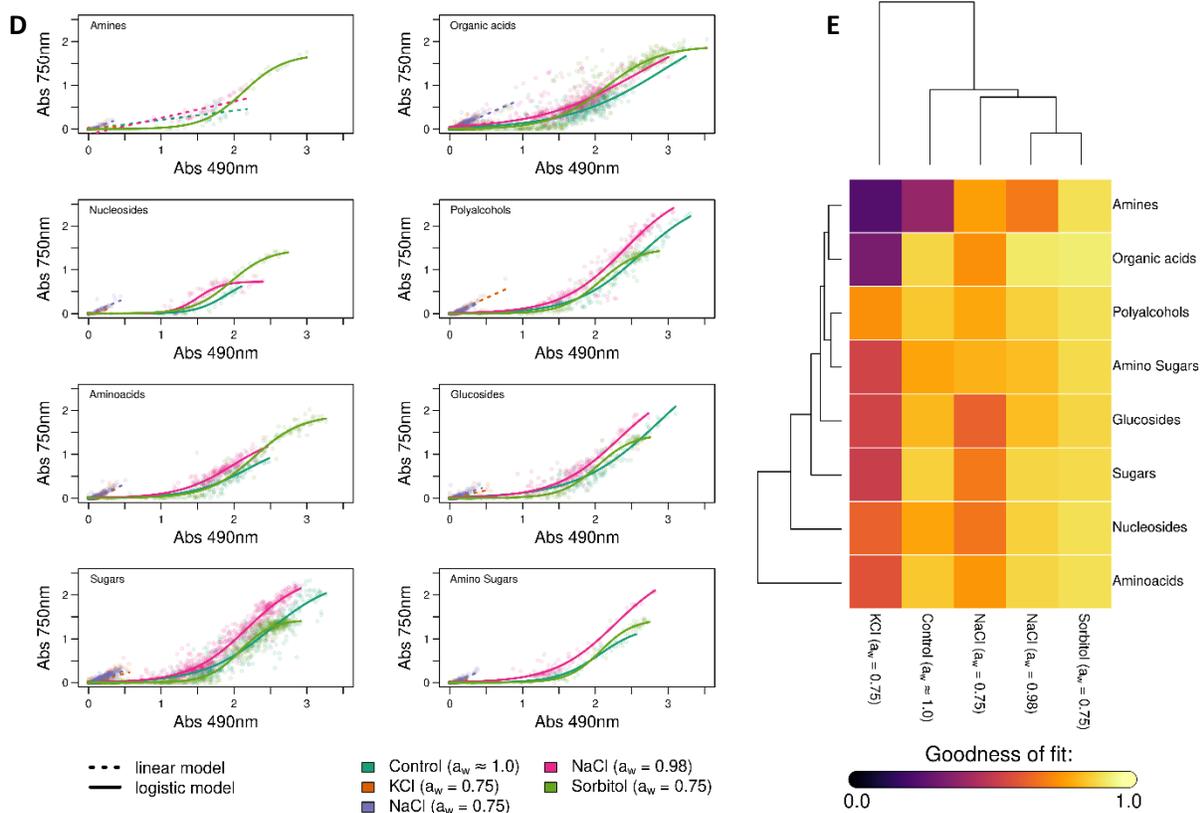


Figura 20d y e. Análisis de la huella metabólica de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w . Correlación entre la absorbancia a 490 y 750nm para cada una de las fuentes de carbono evaluadas para cada condición de estudio.

En este caso los resultados obtenidos arrojaron una menor correlación entre degradación y crecimiento en las condiciones extremas de salinidad vs las condiciones óptima, control y con sorbitol, siendo esta última en la que mayor correlación se observó. Esto podría explicarse dado que en las condiciones con mayor presencia de solutos orgánicos como el sorbitol o donde no hay una toxicidad tan elevada, la célula puede usar sus mecanismos habituales para degradar compuestos y utilizarlos para crecer, sin embargo, este crecimiento se ve afectado en condiciones con alta presencia de sales como se mencionó anteriormente, ya que el hongo debe emplear varias de estas fuentes de carbono además de para crecer, para contender contra la alta osmolaridad del medio, los cambios a nivel de MP y el estrés oxidativo que estas condiciones generan. La mayor correlación en cuestión de fuentes de carbono empleadas se observó para los ácidos grasos y azúcares y la menor para el caso de las aminas. Esto tiene sentido ya que los azúcares o los ácidos orgánicos son fuentes de energía fácilmente utilizables

mientras que las aminas como es el caso de la etanolamina son fundamentales en la formación de las membranas celulares por lo que su degradación como fuente de carbono para el crecimiento no sería en muchos casos una opción viable para la célula.

En Figura 20f se puede observar, por otro lado, la cinética de consumo de las distintas fuentes de carbono para cada uno de los tratamientos evaluados y en la Figura 20g una representación en forma de vectores de las variables más típicas de una cinética logística (máximo consumo, máximo índice de consumo y fase lag de consumo de sustrato y máximo crecimiento, máximo índice de crecimiento y fase lag de crecimiento) por tratamiento.

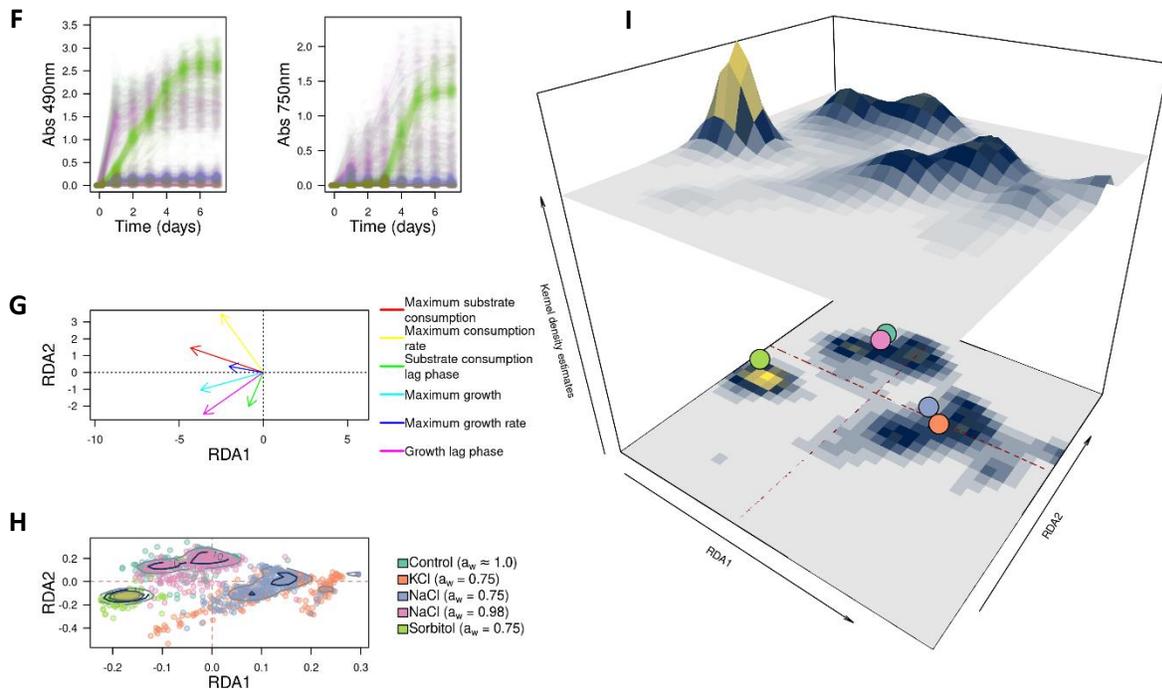


Figura 20f, g, h e i. Análisis de la huella metabólica de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w .

F. Cinética de consumo de las fuentes de carbono para cada uno de los tratamientos evaluados.

G. Representación en forma de vectores de las 4 variables más típicas de una cinética logística (altura, velocidad máxima de cambio, fase lag y el tiempo al que alcanza la mitad de la altura) para cada una de las curvas (crecimiento y consumo) por tratamiento.

H e I. Ordenamiento de los tratamientos en 2D (H) y 3D (I) de acuerdo con las características de sus cinéticas tanto de consumo de sustrato como de crecimiento.

Finalmente, en las figuras H e I se encuentra representado el ordenamiento de los tratamientos en 2D (H) y 3D (I) de acuerdo con las características de sus cinéticas

tanto de consumo de sustrato como de crecimiento, donde se muestra la agrupación de las condiciones de estudio en tres grupos principales, uno que corresponde a las condiciones control y óptima de crecimiento, otro a las condiciones salinas y el último a la condición con sorbitol. En este caso podemos concluir que en las condiciones control y óptima de crecimiento el patrón de degradación de las fuentes de carbono evaluadas es similar, así como también lo es en el caso de las sales NaCl y KCl, considerando a las muestras con sorbitol como un grupo externo a estos.

Análisis fenotípico de microarreglos

Para caracterizar las capacidades metabólicas de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w , se evaluó la utilización de una variedad de fuentes únicas de fósforo, azufre o nitrógeno mediante el ensayo Biolog Phenotypic MicroArray que determina la capacidad de un microorganismo para utilizar estas fuentes. La detección positiva de la actividad metabólica se basa en la transferencia de electrones desde el sustrato de crecimiento, a través de la cadena de transporte de electrones (ETC), al compuesto coloreado redox tetrazolio, transformando el mismo en una forma reducida de color violeta.

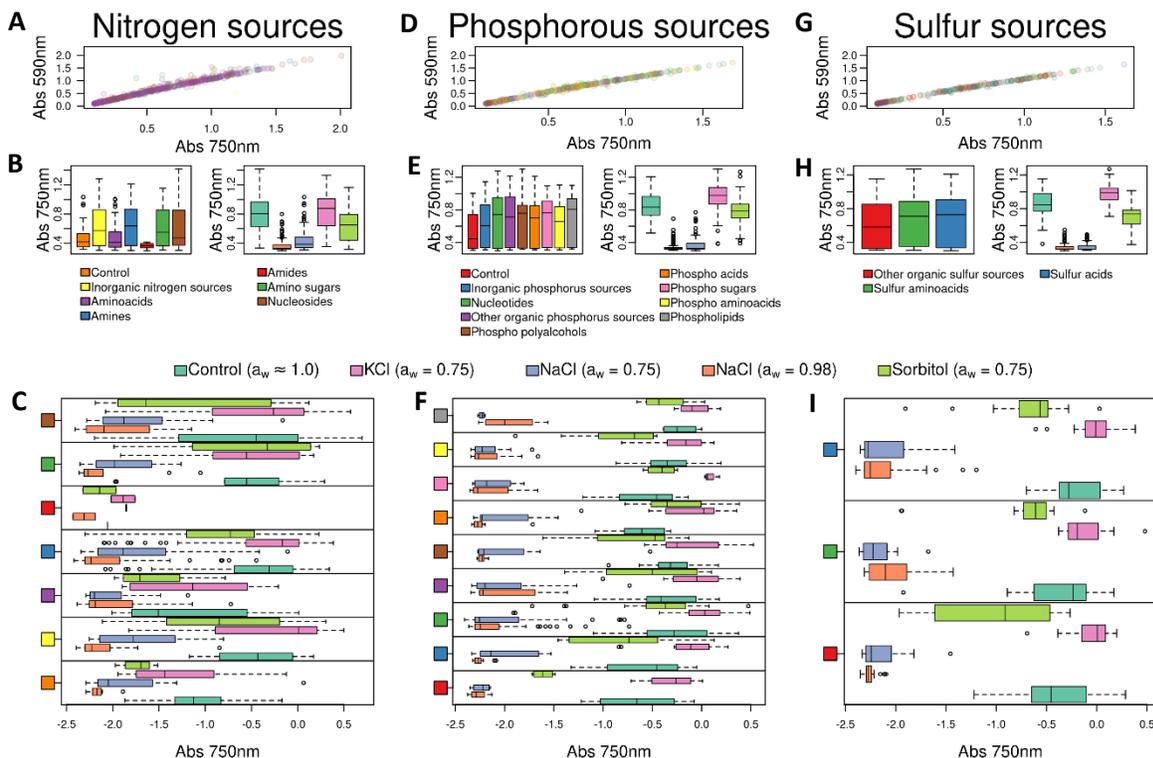


Figura 21. Análisis fenotípico de microarreglos de *A. sydowii* en condiciones de baja a_w .

A, B y C. Correlación entre la absorbancia a 490 y 750nm para cada una de las fuentes de carbono evaluadas para cada condición de estudio. A. Fuentes de nitrógeno; B. Fuentes de fósforo y C. Fuentes de azufre.

B, E y H. Representación gráfica donde se muestran los valores de absorbancia medida a 590nm para las diferentes condiciones y tipos de fuentes de N/P/S.

C, F e I. Representación gráfica de la absorbancia medida a 590nm donde se muestran las condiciones para cada uno de los tipos de fuentes de N/P/S.

De acuerdo con los resultados obtenidos para cada una de las fuentes de fósforo, nitrógeno y azufre (N/P/S), la correlación entre la DO a 590 y 750nm tuvo un carácter lineal (Figura 21a, 21b y 21c), lo que indica una relación directa entre la degradación y el uso de estas fuentes para el crecimiento del hongo.

En la figura 21b, 21e y 21h se representan las mediciones de DO de manera general por tratamientos y por tipo de fuente de N/P/S. En las condiciones con alta salinidad, dígase KCl y NaCl a 0.75 de a_w prácticamente no se observó degradación de dichas fuentes respecto a la condición control, condición óptima, o sorbitol, lo que sugiere un comportamiento similar al observado para la degradación de las fuentes de carbono estudiadas en este trabajo. Este mismo comportamiento se puede observar en otra representación de los datos donde se muestran cada una de las condiciones por grupo de fuentes de N/P/S (Figura 21c, 21f y 21i). En el caso de las fuentes de nitrógeno, las amidas fueron el grupo menos consumido por el hongo y específicamente en NaCl 0.75 a_w no se observó su degradación. En resumen, los niveles de degradación entre las diferentes fuentes de carbono analizadas en este estudio fueron similares, y entre condiciones se agruparon en dos grupos principales, uno donde no hubo prácticamente degradación (en presencia de NaCl y KCl (0.75 a_w)) y otro donde sí se observó un efecto degradativo (en presencia del Control, Sorbitol (0.75 a_w) y NaCl (0.98 a_w)).

Análisis morfológico de *A. sydowii* en condición óptima (0.98 a_w) impuesta por NaCl y de baja a_w (0.75) impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol.

Para el análisis morfológico de *A. sydowii* se procedió a cultivar el hongo tal y como se describió en materiales y métodos, seguido de la toma de fotografías para conocer las diferencias en las estructuras de reproducción y vegetativas del hongo

en las 4 condiciones de estudio, en el transcurso del tiempo. En la figura 22a se pueden observar las características macroscópicas de las colonias como la textura, los bordes y la apariencia en color. Al día 0 se observan aún las colonias con un aspecto levaduriforme y no filamentoso. Al día 3 ya se observan diferencias entre las diferentes condiciones de cultivo. Cuando se analiza el crecimiento del hongo en su condición óptima, es imposible observar la colonia completa en el campo de visión, a diferencia del resto de las condiciones. A la derecha de la imagen, que corresponde al mismo día se observa un acercamiento al borde de las colonias haciendo énfasis en el largo de las hifas exploratorias. En este tiempo ya el hongo se ve más filamentoso y se pueden comenzar a observar las estructuras de reproducción únicamente en NaCl ($a_w=0.98$) y Sorbitol ($a_w=0.75$), aunque los conidióforos son aún inmaduros con una coloración blanca característica como se observa en la figura. Al séptimo día ya se puede observar un cambio de coloración en los conidióforos en NaCl ($a_w=0.98$) y Sorbitol ($a_w=0.75$) ya que van madurando. Las hifas se ven más desarrolladas, más ramificadas y son más densas. En el caso de KCl ($a_w=0.75$), al séptimo día se comienzan a observar las estructuras de reproducción, mientras que en NaCl ($a_w=0.75$), la colonia permanece exactamente igual que al día 0. Esto nos indica que el crecimiento del hongo se ve principalmente afectado en NaCl ($a_w=0.75$) seguido de KCl ($a_w=0.75$), Sorbitol ($a_w=0.75$) y NaCl ($a_w=0.98$). Al parecer la toxicidad que representa el NaCl es superior a la del resto de los solutos evaluados afectando su reproducción y crecimiento. En el caso de sorbitol, aun cuando representa un estrés para la célula, es considerado una fuente de carbono, por lo que el efecto negativo en el desarrollo del hongo no es tan evidente como en el caso de las sales a 0.75 a_w .

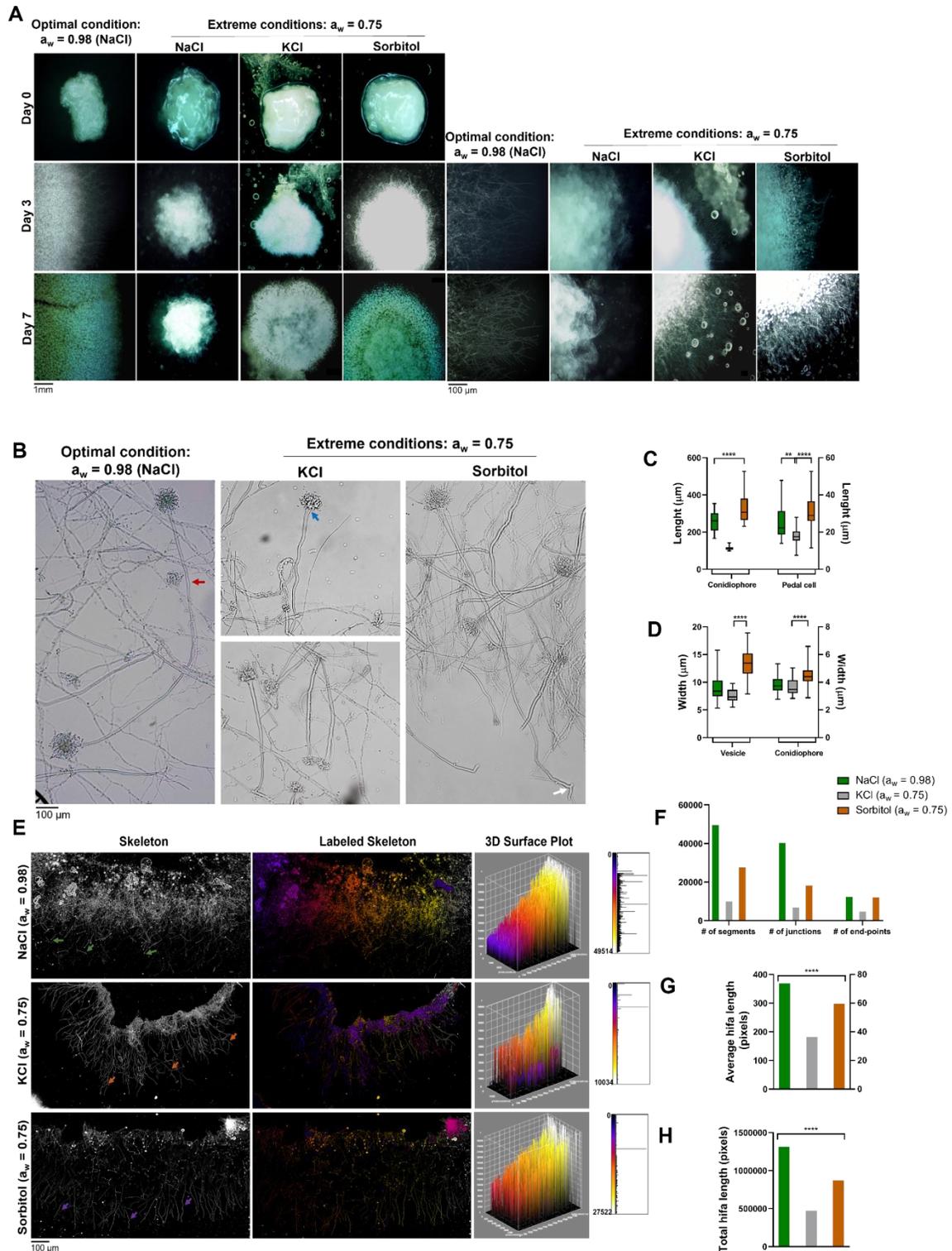


Figura 22. Análisis morfológico de *A. sydowii* en condición óptima ($0.98 a_w$) impuesta por NaCl y de baja a_w (0.75) impuesta por NaCl, KCl y Sorbitol.

A. Características macroscópicas de *A. sydowii* vistas al estereoscopio a los días 0, 3 y 7 días de cultivo crecido en condición óptima (0.5 M NaCl ($a_w = 0.98$)) y de baja actividad de agua (5.13 M NaCl ($a_w = 0.75$), 4.87 M KCl ($a_w = 0.75$) y $3.45 \text{ M de Sorbitol}$ ($a_w = 0.75$)).

- B. Representación de las estructuras de reproducción de *A. sydowii* al día 7 de cultivo crecido en condición óptima (0.5 M NaCl ($a_w = 0.98$)) y de baja actividad de agua (5.13 M NaCl ($a_w = 0.75$), 4.87 M KCl ($a_w = 0.75$) y 3.45 M de Sorbitol ($a_w = 0.75$)).**
- C. Representación gráfica del largo en μM del conidióforo y la célula pedal señaladas en el panel B.**
- D. Representación gráfica del ancho en μM del conidióforo y la vesícula señaladas en el panel B.**
- E. Análisis de las estructuras vegetativas de *A. sydowii* en condición óptima (0.5 M NaCl ($a_w = 0.98$)) y de baja actividad de agua (5.13 M NaCl ($a_w = 0.75$), 4.87 M KCl ($a_w = 0.75$) y 3.45 M de Sorbitol ($a_w = 0.75$)) empleando el plugin Analyze Skeleton 2D/3D correspondiente al software Image J.**
- F. Representación gráfica del número de segmentos, uniones y extremos de las hifas en condición óptima (0.5 M NaCl ($a_w = 0.98$)) y de baja actividad de agua (5.13 M NaCl ($a_w = 0.75$), 4.87 M KCl ($a_w = 0.75$) y 3.45 M de Sorbitol ($a_w = 0.75$)).**
- G. Representación gráfica de la media del largo de las hifas en condición óptima (0.5 M NaCl ($a_w = 0.98$)) y de baja actividad de agua (5.13 M NaCl ($a_w = 0.75$), 4.87 M KCl ($a_w = 0.75$) y 3.45 M de Sorbitol ($a_w = 0.75$)).**
- H. Representación gráfica del largo total de las hifas en condición óptima (0.5 M NaCl ($a_w = 0.98$)) y de baja actividad de agua (5.13 M NaCl ($a_w = 0.75$), 4.87 M KCl ($a_w = 0.75$) y 3.45 M de Sorbitol ($a_w = 0.75$)).**

En la figura 22b se muestran las estructuras de reproducción al día 7 de cultivo, de las cuales se analizaron diferentes parámetros para poder comparar estos en las diferentes condiciones de estudio. En la imagen solo se observan 3 condiciones, ya que en NaCl ($a_w=0.75$) a ese tiempo aún no se observan estas estructuras. En el caso de KCl ($a_w=0.75$) hay 2 paneles, ya que representa la mitad de las otras 2 condiciones observándolos a la misma escala. En la figura se observan a detalle las diferentes estructuras de reproducción las cuales se midieron como son el conidióforo, la vesícula, la célula pedal (Figura 22c y 22d). Como se observa en la gráfica los conidióforos y la célula pedal más larga, así como la vesícula más ancha corresponden a la condición de Sorbitol ($a_w=0.75$), lo que podría deberse a que, al ser una fuente de carbono, le sirva al hongo para crecer más fácilmente. En este caso las estructuras de reproducción más pequeñas corresponden a la condición de KCl ($a_w=0.75$), lo que podría deberse a que este soluto genera mayor toxicidad y estrés en el hongo que los otros dos mencionados anteriormente.

En nuestro estudio se realizó además una caracterización morfológica de las estructuras vegetativas del hongo en las 3 condiciones antes mencionadas (Figura 22e, 22f, 22g y 22h). Mediante el programa Image J se pudieron analizar diversos parámetros como el largo total y la media del largo de las hifas, así como el número de segmentos, uniones y extremos de las mismas. En este caso, nuestros resultados arrojaron que en cada uno de estos parámetros la condición de NaCl

($a_w=0.98$) fue la más favorecida, siendo la de KCl ($a_w=0.75$) la menos favorecida. Esto tiene sentido ya que la condición que menos estrés genera en el hongo es la de NaCl ($a_w=0.98$), por lo que es de esperar que las hifas sean más largas y el número de ramificaciones de estas sea mayor respecto a las demás condiciones. En condiciones de estrés fundamentalmente en presencia de sales como el KCl, el hongo empieza a limitar el crecimiento polarizado de las hifas ya que su maquinaria está en función de sobrevivir más que de crecer o reproducirse como se mencionó con anterioridad.

En la condición de baja a_w producto de la presencia de NaCl ($a_w=0.75$) en el medio, *A. sydowii* es capaz de limitar su crecimiento con el objetivo de sobrevivir. Esto se comprobó por Jiménez y colaboradores en el 2020 mediante un examen micromorfológico (Jiménez-Gómez, et al., 2020), donde se observó una reducción en el diámetro de las hifas y un aumento en el número de septos respecto a la condición óptima de crecimiento de este hongo. Esto, con el objetivo de aprovechar al máximo las reservas de nutrientes que posee y evitar un gasto energético en la producción de estructuras de reproducción como conidióforos, vesícula y conidios, en estas condiciones de estrés limitantes. Las implicaciones de este fenómeno se reflejan no solo a nivel morfológico como ya se planteó, sino también a nivel molecular, donde el gen de la septina A, implicada en la septación y morfogénesis de las hifas, se encontró expresado diferencialmente en esta condición (Figura 18). Además, se regularon positivamente genes relacionados con la síntesis de glucanos, involucrados en el aumento de la porosidad y flexibilidad de la pared celular. En resumen, *A. sydowii* es capaz de sobrevivir empleando diversas estrategias a nivel molecular que se reflejan de igual manera a nivel morfológico.

CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que *A. sydowii* es capaz de remover dos de los contaminantes orgánicos más importantes, Phe y BaP (HPAs), de ambientes hipersalinos. Cuando *A. sydowii* fue expuesto a un estrés tóxico y a inanición debido a la presencia de los HPAs como única fuente de carbono, se expresaron positivamente el doble de genes en comparación con el crecimiento en glucosa. Debido a la inanición relacionada a la presencia de los HPAs como única fuente de carbono, varios procesos biosintéticos fueron regulados negativamente (por ejemplo, el catabolismo del azúcar, la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos, la reproducción y el metabolismo secundario). Los genes regulados positivamente estuvieron relacionados con cambios en la fuente de carbono (por ejemplo, el gen *cah* en respuesta a la ausencia de glucosa), la remodelación de la pared celular, la degradación y el metabolismo de xenobióticos, la desintoxicación celular, el metabolismo del ADN / ARN, la reparación del ADN, el mantenimiento de la integridad del genoma, el metabolismo energético (por ejemplo, la respiración y la oxidación de ácidos grasos), la señalización y la respuesta general al estrés. Por otro lado, identificamos por primera vez la regulación positiva de un gen *cpo* (cloroperoxidasa), lo que indica que esta enzima podría desempeñar un papel importante durante la degradación de los HPAs en hongos.

Basado en los análisis transcriptómicos propusimos dos vías paralelas para la degradación de compuestos poliaromáticos en *A. sydowii*: mitocondrial y citosólica. La vía mitocondrial involucra enzimas unidas a la membrana de las mitocondrias, incluidos los citocromos, una CYC oxidasa, deshidrogenasas y una quinona reductasa. La vía citosólica involucra enzimas solubles como la dioxigenasa, la deshidrogenasa reductasa de cadena corta, la tiol metiltransferasa, la glutatión transferasa y la fructosa 1,6-bisfosfatasa, entre otras.

Por otro lado, nuestros resultados demostraron que la privación de agua inducida por las concentraciones saturantes de NaCl, KCl y Sorbitol tienen un impacto importante en la morfología celular de *A. sydowii* que incluyó un remodelado morfológico extenso para enfrentar el estrés salino. Al comparar los perfiles transcriptómicos de *A. sydowii* en cuatro condiciones diferentes, se observó que las respuestas fisiológicas a la baja actividad de agua manifestada por la presencia de

diferentes solutos en el medio de cultivo, varían de una condición a otra. De hecho, en cada condición analizada, las respuestas podrían asumirse como un estado fisiológico distinto. Estas condiciones extremas indujeron de manera general un incremento en la producción de glicerol y trealosa, una reestructuración de la pared celular y posibles cambios a nivel de membrana, así como cambios en el desarrollo sexual exclusivamente en la condición extrema con NaCl. Desde nuestra perspectiva, este es el trabajo más completo sobre el potencial de *A. sydowii* como herramienta en enfoques de biorremediación y de adaptación a condiciones extremas de baja a_w impuesta por varios solutos.

ANEXOS

GO enriquecidos para las categorías de Proceso Biológico, Función Molecular y Componente Celular.

GO ID	GO Name
Proceso Biológico (KCl vs Sorbitol aw = 0.75)	
GO:0000028	ribosomal small subunit assembly
GO:0000154	ARNr base methylation
GO:0000160	phosphorelay signal transduction system
GO:0000413	protein peptidyl-prolyl isomerization
GO:0000447	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rARN from 5.8S rARN and LSU-rARN from tricistronic rARN transcript (SSU-rARN, 5.8S rARN, LSU-rARN)
GO:0000470	maturation of LSU-rARN
GO:0002098	tARN wobble uridine modification
GO:0003374	mitochondrial fission
GO:0006083	carbon utilization
GO:0006094	gluconeogenesis
GO:0006145	purine nucleobase catabolic process
GO:0006281	ADN repair
GO:0006338	nucleosome assembly
GO:0006357	negative regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0006890	retrograde vesicle-mediated transport
GO:0009442	purine nucleobase catabolic process
GO:0010499	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process
GO:0010923	negative regulation of phosphoprotein phosphatase activity
GO:0015031	intracellular protein transport
GO:0015074	ARN-dependent ADN biosynthetic process
GO:0015791	carbohydrate transport
GO:0015914	phospholipid translocation
GO:0016073	box H/ACA ARN 3'-end processing
GO:0016310	protein phosphorylation
GO:0019284	L-methionine salvage from S-adenosylmethionine
GO:0032511	vesicle budding from membrane
GO:0032543	mitochondrial lysyl-tARN aminoacylation
GO:0033169	chromatin remodeling
GO:0043161	carbohydrate metabolic process
GO:0043461	lipid transport
GO:0045899	ubiquitin-dependent protein catabolic process
GO:0046323	glucose import
GO:0046830	maturation of SSU-rARN from tricistronic rARN transcript (SSU-rARN, 5.8S rARN, LSU-rARN)
GO:0070682	proteasome regulatory particle assembly
GO:0070816	positive regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0120009	phospholipid transport
GO:1902600	electron transport chain
Componente Celular (KCl vs Sorbitol aw = 0.75)	
GO:0000178	chromatin remodeling
GO:0000786	nucleosome assembly
GO:0005665	nuclear-transcribed ARNm catabolic process
GO:0005666	transcription

GO:0005682	spliceosomal snRNP assembly
GO:0005730	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rARN from 5.8S rARN and LSU-rARN from tricistronic rARN transcript (SSU-rARN, 5.8S rARN, LSU-rARN)
GO:0005743	mitochondrial citrate transmembrane transport
GO:0005762	protein peptidyl-prolyl isomerization
GO:0005844	regulation of translational termination
GO:0005886	protein phosphorylation
GO:0008540	ubiquitin-dependent protein catabolic process
GO:0016021	integral component of membrane
GO:0019773	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process
GO:0022625	cytoplasmic translation
GO:0022627	positive regulation of translational fidelity
GO:0030688	endonucleolytic cleavage in ITS1 to separate SSU-rARN from 5.8S rARN and LSU-rARN from tricistronic rARN transcript (SSU-rARN, 5.8S rARN, LSU-rARN)
GO:0030915	double-strand break repair via homologous recombination
GO:0031595	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process
GO:0032806	positive regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0033588	tARN wobble uridine modification
GO:0034424	late endosome to vacuole transport via multivesicular body sorting pathway
GO:0034515	regulation of transcription
GO:0035101	ADN binding
GO:0044613	protein import into nucleus
GO:0046540	mARN splicing, via spliceosome
GO:0048188	histone lysine methylation
GO:0097361	tARN wobble uridine modification
Función Molecular (KCl vs Sorbitol aw = 0.75)	
GO:0000107	histidine biosynthetic process
GO:0000155	phosphorelay signal transduction system
GO:0000976	regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0000981	negative regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0003735	positive regulation of translational fidelity
GO:0003755	protein peptidyl-prolyl isomerization
GO:0003899	transcription by ARN polymerase III
GO:0003899	adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway
GO:0004038	purine nucleobase catabolic process
GO:0004298	proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process
GO:0004325	heme biosynthetic process
GO:0004359	NAD biosynthetic process
GO:0004612	acetate metabolic process
GO:0005351	glucose import
GO:0008270	rADN heterochromatin assembly
GO:0008353	positive regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0015081	phosphate ion transmembrane transport
GO:0016435	maturation of LSU-rARN
GO:0016436	enzyme-directed rARN 2'-O-methylation
GO:0016641	amine metabolic process
GO:0017168	glutathione metabolic process
GO:0018024	histone lysine methylation
GO:0019104	base-excision repair
GO:0019239	diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase activity
GO:0019843	positive regulation of translational fidelity
GO:0031405	acetyltransferase activity

GO:0032454	chromatin remodeling
GO:0036218	nucleoside triphosphate metabolic process
GO:0036402	ubiquitin-dependent protein catabolic process
GO:0043295	translational initiation
GO:0046523	L-methionine salvage from S-adenosylmethionine
GO:0046982	maturation of LSU-rARN
GO:0140101	mitochondrial lysyl-tARN aminoacylation
GO:1990050	phospholipid transport
Proceso Biológico (NaCl aw = 0.98 vs NaCl aw = 0.75)	
GO:0000079	regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity
GO:0000086	ADN replication initiation
GO:0006121	tricarboxylic acid cycle
GO:0006633	protein polyubiquitination
GO:0006855	xenobiotic transmembrane transport
GO:0006865	amino acid transmembrane transport
GO:0007018	mitotic sister chromatid segregation
GO:0007093	protein phosphorylation
GO:0008652	aspartate biosynthetic process
GO:0015761	mannose transmembrane transport
GO:0015976	gluconeogenesis
GO:0019563	gluconeogenesis
GO:0019676	glutamate biosynthetic process
GO:0034599	removal of superoxide radicals
GO:0044272	ethanol catabolic process
GO:0045132	homologous chromosome segregation
GO:0051301	cellular protein localization
GO:0098704	initial mitotic spindle pole body separation
GO:1990542	mitochondrial respiratory chain complex III
Componente Celular (NaCl aw = 0.98 vs NaCl aw = 0.75)	
GO:0000307	regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity
GO:0000779	centromere complex assembly
GO:0005618	carbohydrate catabolic process
GO:0005749	tricarboxylic acid cycle
GO:0005871	microtubule-based movement
GO:0005876	mitotic sister chromatid segregation
GO:0005887	glucose import
GO:0009514	glyoxylate cycle
GO:0072686	attachment of spindle microtubules to kinetochore
Función Molecular (NaCl aw = 0.98 vs NaCl aw = 0.75)	
GO:0000036	fatty acid biosynthetic process
GO:0000293	iron ion transport
GO:0004497	obsolete oxidation-reduction process
GO:0005358	glucose import
GO:0005375	cellular copper ion homeostasis
GO:0008574	mitotic sister chromatid segregation
GO:0009916	alternative respiration
GO:0015578	mannose transmembrane transport
GO:0016209	removal of superoxide radicals
GO:0016538	regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity
GO:0016705	chromatin remodeling

GO:0020037	obsolete oxidation-reduction process
GO:0031177	ergosterol biosynthetic process
GO:0033961	cis-stilbene-oxide hydrolase activity
GO:0036381	cellular amino acid metabolic process
GO:0042910	xenobiotic transmembrane transport
Proceso Biológico (NaCl vs KCl aw = 0.75)	
GO:0000028	tryptophan biosynthetic process
GO:0000493	box H/ACA snoRNP assembly
GO:0002181	ribosomal small subunit assembly
GO:0015986	generation of precursor metabolites and energy
GO:0018202	phosphorelay signal transduction system
GO:0018208	peptidyl-proline hydroxylation to 4-hydroxy-L-proline
GO:0022900	ATP synthesis coupled proton transport
GO:0042273	ribosomal large subunit assembly
GO:0062197	glycerol metabolic process
GO:1901700	mitochondrial electron transport
Componente Celular (NaCl vs KCl aw = 0.75)	
GO:0005576	sporocarp development involved in asexual reproduction
GO:0005753	ATP synthesis coupled proton transport
GO:0009277	galactose metabolic process
GO:0022625	ribosomal large subunit assembly
GO:0022627	maturation of SSU-rARN from tricistronic rARN transcript (SSU-rARN, 5.8S rARN, LSU-rARN)
GO:0031225	cellulose catabolic process
GO:0045261	ATP synthesis coupled proton transport
GO:0070469	mitochondrial electron transport
Función Molecular (NaCl vs KCl aw = 0.75)	
GO:0003735	translational elongation
GO:0004553	trehalose catabolic process
GO:0004755	lysine biosynthetic process via aminoadipic acid
GO:0009055	mitochondrial electron transport
GO:0016787	carbohydrate metabolic process
GO:0016857	L-phenylalanine catabolic process
Proceso Biológico (NaCl vs Sorbitol aw = 0.75)	
GO:0000280	mitotic sister chromatid biorientation
GO:0006066	glycerol metabolic process
GO:0006094	gluconeogenesis
GO:0006096	glycolytic process
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle
GO:0006285	base-excision repair
GO:0006310	premeiotic ADN replication
GO:0006364	maturation of SSU-rARN from tricistronic rARN transcript (SSU-rARN, 5.8S rARN, LSU-rARN)
GO:0006479	peptidyl lysine dimethylation
GO:0006790	glutathione metabolic process
GO:0008033	protein glycosylation
GO:0009116	'de novo' IMP biosynthetic process
GO:0009396	one-carbon metabolic process
GO:0009451	tARN wobble uridine modification
GO:0015976	glyoxylate cycle

GO:0015986	mitochondrial electron transport
GO:0016233	telomere capping
GO:0019676	glutamine biosynthetic process
GO:0031505	fungal-type cell wall organization
GO:0044038	fungal-type cell wall organization
GO:0044262	arabinan catabolic process
GO:0044773	protein phosphorylation
GO:0046323	glucose import
GO:0061025	mitochondrial fission
GO:0071267	L-methionine salvage from methylthioadenosine
GO:0072523	purine nucleobase catabolic process
GO:0097054	glutamine metabolic process
GO:0098813	attachment of spindle microtubules to kinetochore
GO:0100002	ADN damage checkpoint signaling
GO:0120009	phospholipid transport
GO:1901990	G1/S transition of mitotic cell cycle
Componente Celular (NaCl vs Sorbitol aw = 0.75)	
GO:0005576	arabinan catabolic process
GO:0005730	ADN repair
GO:0005739	tricarboxylic acid cycle
GO:0005829	glutaminy-tARN aminoacylation
GO:0005886	phospholipid transport
GO:0009277	fungal-type cell wall organization
GO:0016021	integral component of membrane
GO:0030684	nucleocytoplasmic transport
GO:0030915	ribosome biogenesis
GO:0060205	mannose metabolic process
GO:0061673	anaphase-promoting complex-dependent catabolic process
GO:0140513	maturation of SSU-rARN
Función Molecular (NaCl vs Sorbitol aw = 0.75)	
GO:0003855	negative regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0003887	premeiotic ADN replication
GO:0004067	asparagine metabolic process
GO:0004164	peptidyl-diphthamide biosynthetic process from peptidyl-histidine
GO:0004613	acetate metabolic process
GO:0005261	mitochondrial ATP synthesis coupled proton transport
GO:0005351	glucose import
GO:0005366	carbohydrate transport
GO:0008017	mitochondrial fission
GO:0008270	regulation of transcription by ARN polymerase II
GO:0008395	steroid biosynthetic process
GO:0008574	mitotic sister chromatid segregation
GO:0016436	enzyme-directed rARN 2'-O-methylation
GO:0016763	'de novo' IMP biosynthetic process
GO:0017168	glutathione metabolic process
GO:0018024	histone lysine methylation
GO:0019104	base-excision repair
GO:0031369	ADN damage checkpoint signaling
GO:0043023	ribosomal large subunit export from nucleus
GO:0051538	glutamine metabolic process
GO:0120014	phospholipid transport
GO:0140101	methionyl-tARN aminoacylation

REFERENCIAS

- (IARC), I. A. (1983). *Benzo[a]pyrene, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, vol. 32, Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.*
- (NTP), N. T. (2002). *Report of the NTP on Carcinogens.* Washington,DC.: Tenth Report on Carcinogens.
-] J. Schneider, R. G. (1996). Degradation of pyrene, benzo [a] anthracene and benzo [a] pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.*, 13-19.
- A. Hussein, M. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian JouARNI of Petroleum*, 107–123.
- A.K. Haritash, C. K. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *JouARNI of Hazardous Materials*, 1–15.
- A.K. Haritash, C. K. (2012). Seasonal and spatial occurrence and distribution of respirable particulate-bound atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Hisar city and their potential health-risks. *Asian J. Water Environmental*.
- Abd El-Latif Hesham, S. K. (2012). Biodegradation of high molecular weight PAHs using isolated yeast mixtures: application of meta-genomic methods for community structure analyses. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. (2015). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian JouARNI of Petroleum*.
- Agrawal, N., & Sushil, K. (2017). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (pyrene) using novel fungal strain *Coriolopsis byrsina* strain APC5. . *Int Biodeter Biodegr* , 122: 69–81.
- Aitken, M., Stringfellow, W., Nagel, R., & C. Kazunga, S. C. (1998). Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.*, 743–752.
- Akasaka. R., Mashino. T. and Hirobe, M. (1993). Cytochrome P450-like substrate oxidation catalyzed by cytochrome c and immobilized cytochrome c. . *Arch. Biochem. Biophys*, 355-360.
- Alexa, A., & Rahnenfuhrer, J. (2019). topGO: enrichment analysis for gene ontology. R package version 2.38.1.
- Alexandre de Menezes, N. C. (2012). Comparative metatranscriptomics reveals widespread community responses during phenanthrene degradation in soil. *Environmental Microbiology* .
- Ali, I., Khaliq, S., Sajid, S., & Akbar, A. (2019). Biotechnological applications of halophilic fungi: past, present, and future. En S. Tiquia-Arashiro, & M. Grube, *Fungi in Extreme*

Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance (págs. 291–306).
Switzerland: Springer Nature.

- Alkio, M. T.-C. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in *Arabidopsis* include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *J. Exp. Bot.*
- Anamika Sharma, S. B. (2016). Enhanced biodegradation of PAHs by microbial consortium with different amendment and their fate in in-situ condition. *JouARNI of Environmental Management*.
- Anastasi, A. (2012). *The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi*.
- Andrews, S. K.-P. (2014). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Anne Thuillier, A. A. (2011). Functional Diversification of Fungal Glutathione Transferases from the Ure2p Class. *InteARNtional JouARNI of Evolutionary Biology*.
- Anthony Verdin, A. L.-H. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution*.
- Aranda, E. (2016). Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Current Opinion in Biotechnology*, 1–8.
- Aravind Subramanian, P. T. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS*.
- B. Ye, M., Siddiqi, A., Maccubbin, S., & Kumar, H. S. (1996). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobili*. *Environ. Sci. Technol*, 136–142.
- Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., . . . and Folch-Mallol, J. (2014). Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Apergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation. *PLoS One*.
- Batista-García, R. A., Kumar, V., Ariste, A., Tovar-Herrera, O. E., Savary, O., Peidro-Guzmán, H., . . . Cabana, H. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *JouARNI of Environmental Management*, 1-11.
- Ben Rejeba, K., Benzarti, M., Debez, A., Baillyc, C., Arnould, S., & Chedly, A. (2015). NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *JouARNI of Plant Physiology*, 5-15.
- Betancor, L., Johnson, G., & Luckarift, H. (2013). Stabilized laccases as heterogeneous bioelectrocatalysts. *ChemCatChem*, 46–60.
- Beuchat, L., & Pitt, J. (1990). Influence of solute, pH, and incubation temperature on recovery of heat-stressed *Wallemia sebi* conidia. *Appl Environ Microbiol*, 2545-2550.
- Bin Wang, G. G. (2010). Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mARN sequencing. *Nucleic Acids Research*.
- Bin, H., Long, M., Zhihong, H., & Li, H. (2017). Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*.

- Bin-Bin Xie, D. L.-L.-L. (2015). Deep ARN sequencing reveals a high frequency of alternative splicing events in the fungus *Trichoderma longibrachiatum*. *BMC Genomics*.
- Birolli, W., Santos, D., Alvarenga, N., Garcia, A., Romao, L., & Porto, A. (2018). Biodegradation of anthracene and several PAHs by the marine-derived fungus *Cladosporium* sp. CBMAI 1237. *Mar Pollut Bull*, 129: 525–533.
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., & Krishan, D. (2015). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian J. Microbiol*, 7–21.
- Boldrin, B. T. (1993). Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene and Pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied environmental microbiology*.
- Bolger, A., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114–2120.
- Boyle, D., Wiesner, C., & Richardson, A. (1998). Factors affecting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biol. Biochem*, 873–882.
- Bray, N., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Biotechnol*, 34: 525–527.
- Brown, A. D. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *Jour. of General Microbiology*, 72--589.
- Brown, J., Pirrung, M., & McCue, L. (2017). FQC Dashboard: Integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*.
- Bruneau, J. M. (2001). Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis*, 2812-2823.
- Burrit, D. (2008). Glutathione metabolism in bryophytes under abiotic stress. En N. Khan, S. Singh, & S. Umar, *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants* (págs. 111–147.). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Busch, C., & Binder, C. (2017). Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, 398–406.
- Butinar, L., Frisvad, J., & Gunde-Cimerman, N. (2011). Hypersaline waters – a potential source of foodborne toxigenic aspergilli and penicillia. *FEMS Microbiology Ecology*, 186-199.
- C.P. Kaushik, A. H. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health. *Our Earth*, 1–7.
- Cai, W., Li, J., & Zhang, Z. (2007). The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *J Hazard Mater*, 148: 38–42.
- Cajthaml, T., Pacakova, V., & Sasek, V. (2001). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Listy*.
- Camacho-Morales, R., García-Fontana, C., & Fernández-Irigoyen, J. (2018). Anthracene drives subcellular proteome-wide alterations in the degradative system of *Penicillium oxalicum*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 159:127–135.

- Camile, P., Semighini, G., Goldman, S., & Harris, D. (2005). The ADN Damage Response of Filamentous Fungi: Novel Features Associated with a Multicellular Lifestyle. *Applied Mycology and Biotechnology*, 117-139.
- Cerniglia, C. E., Kelly, D. W., Freeman, J. P., & Miller, D. W. (1986). Microbial metabolism of pyrene. *Chem Biol Interact.*
- Cerniglia, E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 351-368.
- Chen, J., Xie, L., Cai, J., Yang, C., & Duan, X. (2013). Enzymatic synthesis of glutathione using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett*, 35(8):1259-64.
- Chen, W., Lee, M., Jefcoate, C., Kim, S., Chen, F., & Yu, J. (2014). Fungal cytochrome P450 monooxygenases: their distribution, structure, functions, family expansion, and evolutionary origin. *Genome Biol Evol*, 6: 1620–1634.
- Chigu, N. L., Hirose, S., Nakamura, C., & H, T. (2010). Cytochrome P450 monooxygenases involved in anthracene metabolism by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 156-9.
- Chung, H., Choi, J., Park, S.-Y., Jeon, J., & Lee, Y.-H. (2013). Two conidiation-related Zn(II)2Cys6 transcription factor genes in the rice blast fungus. *Fungal Genetics and Biology*, 61, 133–141.
- Clar, E. (1964). Polycyclic Hydrocarbons. *Academic Press*.
- Conesa, A. M.-C. (2016). A survey of best practices for RNA- seq data analysis. *Genome Biology*.
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., . . . Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*.
- Cong, B., Wang, N., Liu, S., Liu, F., Yin, X., & Shen, J. (2017). Isolation, characterization and transcriptome analysis of a novel Antarctic *Aspergillus sydowii* strain MS-19 as a potential lignocellulosic enzyme source. *BMC Microbiology*.
- Core, L., Waterfall, J., & Lis, J. (2008). Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science*, 1845-1848.
- Cortis, P., Vannini, C., Cogoni, A., Mattia, F., Bracale, M., Mezzasalma, V., & Labra, M. (2016). Chemical, molecular, and proteomic analyses of moss bag biomonitoring in a petrochemical area of Sardinia (Italy). *Environ Sci Pollut Res*, 23: 2288–2300.
- Daane, L., Harjono, I., Barns, S., Launen, L., Palleroni, N., & Haggblom, M. (2002). PAH degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. *Int. J Syst. Evol. Microbiol*.
- Daccò, C., Girometta, C., Asemoloye, M., Carpani, G., Piccoa, A., & Tosi, S. (2020). Key fungal degradation patterns, enzymes and their applications for the removal of aliphatic hydrocarbons in polluted soils: a review. *Biodeter Biodegr*, 147: 104866.

- Daines, B., Wang, H., Wang, L., Li, Y., Han, Y., Emmert, D., . . . Chen, R. (2011). The *Drosophila melanogaster* transcriptome by Paired-End ARN Sequencing. *Genome Research* , 315-324.
- Dakal, T., Solieri, L., & Giudici, P. (2014). Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int J Food Microbiol.*, 140-57.
- Dasari, S., Ganjaji, M., Yellanurkonda, P., Basha, S., & Meriga, B. (2018). Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chem Biol Interact*, 294: 81–90.
- Denisov, I., Makris, T., Sligar, S., & Schlichting, I. (2005). Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev* , 105: 2253–2277.
- Ding, X., Liu, K., Lu, Y., & Gong, G. (2019). Morphological, transcriptional, and metabolic analyses of osmotic-adapted mechanisms of the halophilic *Aspergillus montevidensis* ZYD4 under hypersaline conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 3829-3846.
- EADN, L. H.-L., Shamayim, T. R.-P., & Rafael, V.-D. (2015). Microarray analysis of *Neosartorya fischeri* using different carbon sources, petroleum asphaltene and glucose-peptone. *Genom Data*.
- Eduardo Torres, *. J. (1995). Site-directed mutagenesis improves the biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation . *Enzyme and Microbial Technology* .
- Egan, A., Schlueter, J., & Spooner, D. (2012). Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *American Journal of Botany*, 175-185.
- Elhousseiny, S., Amin, H., & Shebl, R. (2018). Modulation of laccase transcriptome during biodegradation of naphthalene by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiol*, 22: 217–225.
- El-Najjar, N., Gali-Muhtasib, H., Ketola, R., Vuorela, P., Urtti, A., & Vuorela, H. (2011). The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochem Rev* , 10: 353–370.
- Esra, B. (2016). Potential effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine foods on human health: a critical review. *JouARNI Toxin Reviews*, 3-4.
- Fazius, F., Shelest, E., Gebhardt, P., & Brock, M. (2012). The fungal α -amino adipate pathway for lysine biosynthesis requires two enzymes of the aconitase family for the isomerization of homocitrate to homoisocitrate. *Mol Microbiol*.
- Freedman, A. (2016). Best Practices for De Novo Transcriptome Assembly with Trinity. *Harvard*.
- Freedman, A. (2016). Best Practices for De Novo Transcriptome Assembly with Trinity . <https://informatics.fas.harvard.edu/best-practices-for-de-novo-transcriptome-assembly-with-trinity.html>.
- Fuchs, G., Boll, M., & Heider, J. (2011). Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* , 9: 803–816.

- Gan, Q., Chepelev, I., Wei, G., Tarayrah, L., Cui, K., Zhao, K., & Chen, X. (2010). Dynamic Regulation of Alternative Splicing and Chromatin Structure in Drosophila Gonads Revealed by ARN-seq. *Cell Research*, 763-783.
- Gao, R., Hao, D., Hu, W., Song, S., Li, S., & Ge, G. (2019). Transcriptome profile of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading fungi isolated from taxus rhizosphere. *Curr Sci*, 116: 1218-1228.
- Garber, M., Grabherr, M., Guttman, M., & Trapnell, C. (2011). Computational Methods for Transcriptome Annotation and Quantification Using ARN-seq. *Nature Methods*, 469-478.
- Ge, Y., Wang, Y., Liu, Y., Tan, Y., Ren, X., Zhang, X., . . . Liu, Z. (2016). Comparative genomic and transcriptomic analyses of the Fuzhuan brick tea-fermentation fungus *Aspergillus cristatus*. *BMC Genomics*, 7;17:428.
- Gentleman, R. C. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*.
- Gentleman, R., Carey, V., Bates, D., Bolstad, B., Dettling, M., & Dudoit, S. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, 5(10).
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T., & Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Front Microbiol*, 7: 1-27.
- Gibson, D., & Parales, R. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 11: 236-243.
- Gil-Durán, C., Rojas-Aedo, J., Medina, E., Vaca, I., García-Rico, R., & Villagrán, S. (2015). The *pcz1* Gene, which Encodes a Zn(II)₂Cys₆ Protein, Is Involved in the Control of Growth, Conidiation, and Conidial Germination in the Filamentous Fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS ONE*, 10(3): e0120740.
- Gimmler, H., Kaaden, R., Kirchner, U., & Weyand, A. (1984). The chloride sensitivity of *Dunaliella parva* enzymes. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 131-150.
- Glaser, H., Thomas, D., & Gaxiola, H. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involves a putative phosphatase gene. *EMBO J*, 3105-3110.
- Godoy, P., Reina, R., Calderón, A., Wittich, R., García Romera, I., & Aranda, E. (2016). Exploring the potential of fungi isolated from pah-polluted soil as a source of xenobiotics-degrading fungi. *Environ Sci Pollut Res*, 23: 20985-20996.
- González-Abradelo, D., Pérez-Llano, Y., Peidro-Guzmán, H., Sánchez-Carbente, M. R., Folch-Mallol, J. L., Aranda, E., . . . Batista-García, R. A. (2019). First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. *Bioresour Technology*, 279:287-296.
- Górka-Nieć, W., Perlińska-Lenart, U., Zembek, P., Palamarczyk, G., & Kruszewska, S. (2010). Influence of sorbitol on protein production and glycosylation and cell wall formation in *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology*, 855-862.

- Gostinčar, C., Lenassi, M., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitaš, A. (2011). Fungal Adaptation to Extremely High Salt Concentrations. *Advances in Applied Microbiology*, 71-96.
- Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Williams, T., Nagaraj, S., Nueda, M., . . . Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res*, 3420-35.
- Gousmi, N., Sahmi, A., Li, H. Z., Poncin, S., Djebbar, R., & and Bensadok, K. (2016). Purification and detoxification of petroleum refinery wastewater by electrochemical process. *Environ. Technol*, 1–26.
- Grant, W. (2004). Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 29;359(1448):1249-66.
- Grunden, S. D. (2013). Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Gryta Agata, M., Oszust, K., & Kotowicz, N. (2016). Fast and Accurate Microplate Method (Biolog MT2) for Detection of Fusarium Fungicides Resistance/Sensitivity. *OUARNL Frontiers in Microbiology*, 489.
- Gulledge, A., Roberts, A., Vora, H., Patel, K., & Loraine, A. (2012). Mining Arabidopsis thaliana ARN-Seq Data with Integrated Genome Browser Reveals Stress-Induced Alternative Splicing of the Putative Splicing Regulator SR45A. *American Journal of Botany*.
- Gunde-Cimerman, N., & Gostinčar, C. (2018). Overview of Oxidative Stress Response Genes in Selected Halophilic Fungi. *Genes*.
- Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 1231-1241.
- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Hoog, S., & Plemenitaš, A. (2000). Hypersaline waters in salterns – natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiology Ecology*, 235-240.
- Guntupalli, S., Thunuguntla, V., Chalasani, L., Rao, C., & Bondili, J. (2019). Degradation and metabolite profiling of benz (a) anthracene, dibenz (a, h) anthracene and indeno [1, 2, 3-cd] pyrene by *Aspergillus Terricola*. *Polycycl Aromat Compd*, 39: 84–92.
- Gustin, M., Albertyn, J., Alexander, M., & Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1264-300.
- Haas, B. J. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from ARN-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc*.
- Haas, B., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P., Bowden, J., . . . Friedman, N. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from ARN-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc.*, 1494-512.
- Hadibarata, T., & Chuang, Z. (2014). Optimization of pyrene degradation by white-rot fungus *Pleurotus Pulmonarius* F043 and characterization of its metabolites. *Bioprocess Biosyst Eng* , 37: 1679–1684.

- Hadibarata, T., & Kristanti, R. (2013). Biodegradation and metabolite transformation of pyrene by basidiomycetes fungal isolate *Armillaria* Sp. F022. *Bioprocess Biosyst Eng*, 36: 461–468.
- Hadibarata, T., Khudhair, A., & Salim, M. (2012). Breakdown products in the metabolic pathway of anthracene degradation by a ligninolytic fungus *Polyporus* sp. S133. *Water Air Soil Pollut*, 223: 2201–2208.
- Hadibarata, T., Khudhair, A., Kristanti, R., & Kamyab, H. (2017). Biodegradation of pyrene by *Candida* Sp. S1 under high salinity conditions. *Bioprocess Biosyst Eng*, 40: 1411–1418.
- Hadibarata, T., Tachibana, S., & Askari, M. (2011). Identification of metabolites from phenanthrene oxidation by phenoloxidases and dioxygenases of *Polyporus* sp. S133. *J Microbiol Biotechnol*, 21: 299–304.
- Hallsworth, J., & Magan, N. (1994). Effects of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 8-11.
- Han M, C. H. (2004). Degradation of Phenanthrene by *Trametes versicolor* and Its Laccase. *The JouARNI of Microbiology*, 94-98.
- Hanschmann, E., Godoy, J., Berndt, C., Hudemann, C., & Lilling, C. (2013). Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal*, 19: 1539–1605.
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. .. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater*, 169: 1–15.
- Harms, H., Schlosser, D., & Wick, L. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat Rev Microbiol*, 9: 177–192.
- Haroune, L., Saibi, S., Cabana, H., & Bellenger, J. (2016). Intracellular enzymes contribution to the biocatalytic removal of pharmaceuticals by *Trametes hirsuta*. *Environ Sci Technol*, 51: 897–904.
- Heipieper, H. J., & Martínez, P. M. (2010). *Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms*. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.
- Herbst, F., Taubert, M., Jehmlich, N., Behr, T., Schmidt, F., Bergen, M., & Seifert, J. (2013). Sulfur-34s stable isotope labeling of amino acids for quantification (SULAQ34) of proteomic changes in *Pseudomonas fluorescens* during naphthalene degradation. *Mol Cell Proteomics*, 12: 2060–2069.
- Hernández-López, E. L., Ramírez-Puebla, S. T., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Microarray analysis of *Neosartorya fischeri* using different carbon sources, petroleum asphaltenes and glucose-peptone. *Genome Data*, 235–237.
- Hernández-López, E., Perezgasga, L., Huerta-Saquero, A., Mouriño-Pérez, R., & Vazquez-Duhalt, R. (2016). Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. *Environ Sci Pollut Res*, 23: 10773–10784.

- Hernández-Ortega, A., Quesne, M., Bui, S., Derren, J., Steiner, R., Scrutton, N., & Visser, S. (2015). Catalytic mechanism of cofactor-free dioxygenases and how they circumvent spin-forbidden oxygenation of their substrates. *J Am Chem Soc*, 137: 7474–7487.
- Hickey, P., Swift, S., Roca, M., & Read, N. (2004). Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. *Method Microbiol*, 34: 63–87.
- Hoffmann, F., & Maser, E. (2007). Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev*, 39: 87–144.
- Hofrichter, M., Schneibner, K., Schneegab, I., & Fritzsche, W. (1998). Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol*, 399-404.
- Hong Liu, D. W. (2014). Stress signaling in response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in *Arabidopsis thaliana* involves a nucleoside diphosphate kinase, NDPK-3. *Planta*.
- Huarte-Bonnet, C., Kumar, S., Saparrat, M., Girotti, J. R., Santana, M., Hallsworth, J., & Pedrini, N. (2018). Insights into hydrocarbon assimilation by eurotial and hypocrealean fungi: roles for CYP52 and CYP53 clans of cytochrome P450 genes. *Appl Biochem Biotechnol*, 184: 1047–1060.
- Iheanacho, C., Okerentugba, P., Orji, F., & Ataikiru, T. (2014). Hydrocarbon degradation potentials of indigenous fungal isolates from a petroleum hydrocarbon contaminated soil in Sakpenwa community, Niger Delta. *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology*.
- Jacobson, E., & Ikeda, R. (2005). Effect of melanization upon porosity of the cryptococcal cell wall. *Med Mycol*, 327-33.
- Jiménez-Gómez, I., Valdés-Muñoz, G., Moreno-Perlin, T., Mouriño-Pérez, R. R., Sánchez-Carbente, M. R., L, F.-M. J., . . . Batista-García, R. A. (2020). Haloadaptive Responses of *Aspergillus sydowii* to Extreme Water Deprivation: Morphology, Compatible Solutes, and Oxidative Stress at NaCl Saturation. *JouARNI of Fungi*, 27;6(4):316.
- Kadri, T., Rouissi, T., Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2016). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: a review. *J Environ Sci*, 51: 52–74.
- Kanehisa, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2015). BlastKOALA and ghost KOALA: KEGG tools for functional characterization of genome and metagenome sequences. *J Mol Biol*, 428: 726–731.
- Kargi, F., & Dince, A. (2000). Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation. *Water Environ Res*, 72: 170–174.
- Kawale, A., & Povirk, L. (2018). Tyrosyl – ADN phosphodiesterases: rescuing the genome from the risks of relaxation. *Nucleic Acids Res*, 46: 520–537.
- Kimmel, C. B. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203: 253–310.

- Klose, R., Kallin, E., & Zhang, Y. (2006). JmjC domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Mater*, 7: 715–727.
- Kogej, T., Ramos, J., Plemenitas, A., & Gunde-Cimerman, N. (2005). The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 6600-6605.
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A., Galinski, E., & Gunde-cimerman, N. (2008). Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: Role of osmolytes and melanization. *Microbiology*, 4261-73.
- Kristanti, R., & Hadibarata, T. (2015). Biodegradation and identification of transformation products of fluorene by ascomycete fungi. *Water Air Soil Pollut* , 226: 406.
- Kubicek, C. P. (2007). Fungi in Extreme Environments. En C. P. Kubicek, *Environmental and Microbial Relationships* (págs. 85-103). Berlin, Heidelberg.: Springer.
- L.M. Silva-Bedoya, M. R.-C.-C. (2014). Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. *Braz J Microbiol*.
- La Rosa, P., Handa, A., Hasegawa, P., & Bressan, R. (1985). Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells. *Plant Physiol*, 79:138-142.
- Launen, L., Pinto, L., Wiebe, C., Kiehlmann, E., & Moore, M. (1995). The oxidation of pyrene and benzo [a] pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can J. Microbiol*.
- Lee, H., Choi, Y., Kim, M., Huh, N., Kim, G., & Lim, Y. W. (2010). Degrading ability of oligocyclic aromates by *Phanerochaete sordida* selected via screening of white rot fungi. *Folia Microbiol* , 55: 447–453.
- Lenoir, I., Fontaine, J., Tisserant, B., Laruelle, F., Lounès, A., & Sahraoui, H. (2017). Beneficial contribution of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, in the protection of *Medicago truncatula* roots against benzo [a] pyrene toxicity. *Mycorrhiza*, 27: 465–476.
- Li, B. &. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from ARN- Seq data with or without a reference genome. . *BMC Bioinformatics*.
- Li, B., & Dewey, C. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from ARN-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*.
- Li, Y., K, F., S, G., Q, W., L, F., & J, C. (2013). Increased virulence of transgenic *Trichoderma koningi* strains to the Asian corn borer larvae by over-expressing heterologous chit42 gene with chitin-binding domains. *J Environ Sci Health*.
- Lia, F., Zenga, X., Yanga, J., Zhouc, K., & Zana, Q. (2014). Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments and plants of mangrove swamps in Shenzhen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 590-596.
- Lingwen Wang, F. L. (2016). Shifts in microbial community structure during in situ surfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res*.

- Lister, R., & Ecker, B. G. (2009). Next Is Now: New Technologies for Sequencing of Genomes, Transcriptomes and Beyond. *Current Opinion in Plant Biology*, 107-118.
- Liu, K.-H., Ding, X.-W., Rao, M. P., & Zhang, B. (2017). Morphological and Transcriptomic Analysis Reveals the Osmoadaptive Response of Endophytic Fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to High Salt Stress. *Frontiers in Microbiology*.
- Liu, S., Li, J., & Wu, Y. (2017). De novo transcriptome sequencing of marine-derived *Aspergillus glaucus* and comparative analysis of metabolic and developmental variations in response to salt stress. *Genes Genom*, 317–329.
- Lockhart, D., & Winzeler, E. (2000). Genomics, Gene Expression and ADN Arrays. *Nature*, 827-836.
- Loss, E., Lee, M., Wu, M., Martien, J., Chen, W., & Amador-Noguez, D. (2019). Cytochrome P450 monooxygenase-mediated metabolic utilization of benzo [a] pyrene by *Aspergillus* species. *Mol Biol Phys*, 10: 1–15.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for ARN-seq data with DESeq2. *Genome Biology*.
- M. Jason Hatfield, R. A. (2016). Carboxylesterases: General detoxifying enzymes. *Chem Biol Interact.* .
- M.A. Providenti, H., & Lee, J. T. (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J. Ind. Microbiol.*, 379–395.
- MacGillivray, A., & Shiaris, M. (1993). Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaption of enzymes. *Extremophiles*, 91–98.
- Maher, C., Kumar-Sinha, C., Cao, X., Kalyana-Sundaram, S., Han, B., Jing, X., . . . Chinnaiyan, A. (2009). Transcriptome Sequencing to Detect Gene Fusions in Cancer. *Nature*, 97-101.
- Maila, M., & Cloete, T. (2002). Germination of *Lepidium sativum* as a method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *Int Biodeter Biodegr*, 50: 107–113.
- Manoj, K., & Hager, L. (2001). Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1547: 408–417.
- Mardis, E. (2011). A Decade's Perspective on ADN Sequencing Technology. *Nature*, 198-203.
- Marguerat, S., & Bahler, J. (2010). ARN-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 569-579.
- Marrs, K. (1996). The functions and regulation of glutathione s-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47: 127–158.
- Martínez-Martínez Mónica, I. L.-G.-D.-E. (2014). Biochemical studies on a versatile esterase that is most catalytically active with polyaromatic esters. *Microbial Biotechnology*.

- Maruthi, A. (2013). *Aspergillus flavus*: A potential Bioremediator for oil contaminated soils, European JouARNI of Sustainable Development . *European JouARNI of Sustainable Development*, 57-66.
- Maser, F. H. (2007). CARBONYL REDUCTASES AND PLURIPOTENT HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASES OF THE SHORT CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE SUPERFAMILY. *Drug Metabolism Reviews*.
- Matsui, K. T. (2008). Discovery of a modified transcription factor endowing yeasts with organic-solvent tolerance and reconstruction of an organic-solvent-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl Environ Microbiol*, 74: 4222–4225.
- Matsunaga, I., Sumimoto, T., Ayata, M., & Ogura, H. (2002). Functional modulation of a peroxygenase cytochrome P450: novel insight into the mechanisms of peroxygenase and peroxidase enzymes. . *FEBS*, 528: 90–94.
- Matsuzawa, A. (2017). Thioredoxin and redox signaling: Roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Arch Biochem Biophys*, 101-105.
- McElroy, A., Farrington, J., & Teal, J. (1989). Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. *CRC Press Inc*.
- McGenity, T. (2010). *Halophilic hydrocarbon degraders*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- McGenity, T. (2010). *Halophilic hydrocarbon degraders*. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology Timmis, K.N.
- Medina-Andrés, R. S.-P.-V.-M.-C.-T.-R. (2015). The nitric oxide production in the moss *Physcomitrella patens* is mediated by nitrate reductase. . *PLoS ONE*, 10: 1–15. .
- Meijer, H., & Munnik, T. (2003). Phospholipid-Based Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 265-306.
- Metzker, M. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 31-46.
- Meyers, B., Galbraith, D., Nelson, T., & Agrawal, V. (2004). Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate. *Plant Physiology*, 637-652.
- Michael Arand, A. C. (2005). Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism, and Assay. *METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 400*.
- Michael, B., Manuela, W., Mark, R., Thomas, K., & Breitenbach-Koller, L. (2015). Oxidative Stress in Fungi: Its Function in Signal Transduction, Interaction with Plant Hosts, and Lignocellulose Degradation. *Biomolecules*, 318-342.
- Mochida, K., & Shinozaki, K. (2011). Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analyses of Plant Functions. *Plant and Cell Physiology*, 2017-2038.
- Monks, T., & Jones, D. (2002). The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr Drug Metab*, 3: 425–438.
- Morel, M., Meux, E., Mathieu, Y., & Thuillier, A. (2013). Xenomic networks variability and adaptation traits in wood decaying fungi. *Microbial Biotechnology*.

- Mortazavi, A., Williams, B., McCue, K., Schaeffer, L., & Wold, B. (2008). Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by ARN-Seq. *Nature Methods*, 621-628.
- Murguía, J., Bellés, J., & Serrano, R. (1995). A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *PubMed script*.
- Nagalakshmi, O. U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., & M, M. S. (2008). The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by ARN Sequencing. *Science*, 1344-1349.
- Naranjo-Briceno, L., Perniam, B., & Guerra, M. (2013). Potential role of oxidative exoenzymes of the extremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extraheavy crude oil. *Microb Biotechnol*, 720–730.
- Narayanan, K., Chopade, N., Raj, P., Subrahmanyam, V., & Rao, J. (2013). Fungal chitinase production and its application in biowaste management. *J Sci Ind Res*, 393–399.
- Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Van Baalen, C., & Gibson, D. T. (1992). Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1351-1359.
- Natalia N. Pozdnyakova, S. V. (2010). Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Central European Journal of Biology*.
- Neifar, M., S, M., RE, G., A, J., A, C., VK, G., . . . M, L. (2015). Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*.
- Neves, L., Oliveira, R., & Lucas, C. (1997). Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology*, 1133-9.
- Nigam, P. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 597–611.
- Ning, D., Wang, H., Ding, C., & Lu, H. (2010). Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. *Biodegradation*, 21: 889–901.
- Nishida, N., Ozato, N., Matsui, K., Kuroda, K., & Ueda, M. (2013). ABC transporters and cell wall proteins involved in organic solvent tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol*, 164: 145–152.
- Nizetto, L., Lohmann, R., Gioia, R., Jahnke, A., Temme, C., Dachs, J., & Herckes, P. (2008). PAHs in air and seawater along a north south Atlantic transect: trends, processes and possible sources. *Environ Sci Technol*, 1580-1585.
- Nordblom, G., White, R., & Coon, M. (1976). Studies on hydroperoxide-dependent substrate hydroxylation by purified liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys*, 175: 524–533.
- O.P. Ward, A., & Singh, J. V. (2003). Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. *Microbiol. Biotechnol.*, 260-270.
- Olawale G. Raimi, R. H.-G. (2020). A mechanism-inspired UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase inhibitor. *RSC Chem. Biol*, 13-25.

- Oluwaseun, O., Oluwatoyin, B., & Angela, V. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *J Environ Manage*, 60: 758–783.
- Oluwaseun, O., Oluwatoyin, B., & Angela, V. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation. *J Environ Manage*, 60: 758–783.
- Park, H., & Yu, J. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol.*, 15(6):669-77.
- Parmar, A., & Muschol, M. (2009). Hydration and hydrodynamic interactions of lysozyme: effects of chaotropic versus kosmotropic ions. *Biophys J*, 590-598.
- Parshikov, I., Woodling, K., & Sutherland, J. (2015). Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus Niger*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99: 6971–6986.
- Pasanen, P., Korpi, A., Kalliokoski, P., & Pasanen, A. (1997). Growth and volatile metabolite production of *Aspergillus versicolor* in house dust. *Environment International*, 425-432.
- Passarini, M. R., Rodrigues, M. V., da Silva, M., & Sette, L. D. (2011). Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *MarPollutBull*.
- Patnaik, P. (1999). A Comprehensive Guide to the Properties of Hazardous Chemical Substances. *John Wiley & Sons Publishers*.
- Pelkonen, O., & Nebert, D. W. (1982). Metabolism of polycyclic hydrocarbon: etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev.*, 189-222.
- Peng, Z., Cheng, Y., Chin-Ming, B., Kang, L., Tian, Z., Zhu, Y., . . . Wang, J. (2012). Comprehensive analysis of ARN-seq data reveals extensive ARN editing in a human transcriptoma. *Nature Biotechnology*.
- Pérez-Llano, Y., Rodríguez-Pupo, E., Druzhinina, I., Chenthamara, K., Cai, F., Gunde-Cimerman, N., . . . Sánchez-Carbente, M. (2020). Stress Reshapes the Physiological Response of Halophile Fungi to Salinity. *Cells.*, 25;9(3):525.
- Pernia, B., Demey, J., Inojosa, Y., & Briceño, L. (2012). Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. *Algal Biotechnology*.
- Peter, H. (2006). Birds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Avian and Poultry Biology Reviews*.
- Pickrell, J., Marioni, J., Pai, A., Degner, J., Engelhardt, B., Nkadori, E., . . . J, J. P. (2010). Understanding Mechanisms Underlying Human Gene Expression Variation with ARN Sequencing. *Nature*, 768-772.
- Plemenitaš, A., Konte, T., Gostinčar, C., & Cimerman, N. (2016). Transport Systems in Halophilic Fungi. *Adv Exp Med Biol.*, 307-325.

- Plemenitaš, A., Lenassi, M., Konte, T., Kejžar, A., Zajc, J., Gostinčar, C., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Adaptation to high salt concentrations in halotolerant/halophilic fungi: a molecular perspective. *Frontiers in Microbiology*, 199.
- Plemenitas, A., Vaupotic, T., Lenassi, M., Kogej, T., & N., G.-C. (2008). Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Stud Mycol.*, 67-75.
- Pozdnyakova, N., Nikiforova, S., & Turkovskaya, O. (2010). Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus Ostreatus* D1. . *Cent Eur J biol* , 5: 83–94.
- Pradhan, A., Kumari, S., Dash, S., Biswal, D., Dash, A., & Panigrahi, K. (2017). Heavy metal absorption efficiency of two species of mosses (*Physcomitrella patens* and *Funaria hygrometrica*) studied in mercury treated culture under laboratory conditions. *Mater Sci Eng C*, 225: 1–10.
- Prenafeta, F., Hoog, G., & Summerbell, R. (2019). *Fungal communities in hydrocarbon degradation. In Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology.* . Switzerland: Springer Nature.
- Proudfoot, N., Furger, A., & Dye, M. (2002). Integrating mARN Processing with Transcription. *Cell*, 501-512.
- Quistgaard, E., Löw, C., Guettou, F., & Nordlund, P. (2016). Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 123-32.
- R., O. (2002). Multipoint moss passive samplers assessment of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: concentrations profile and distribution along Warsaw main streets. *Chemosphere*, 181-186.
- RA, B.-G. (s.f.).
- Rafael Vazquez-Duhalt, M. A.-R. (2001). Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry* , 929-933.
- Ramón Alberto Batista García, V. V.-H.-G.-A.-C. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *JouARNI of Environmental Management*, 1-11.
- Rath, K. M., Maheshwari, A., Bengtson, P., Rousk, J., & Cullen, D. (2012). Comparative Toxicities of Salts on Microbial Processes in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Reski, R., & Abel, W. (1985). Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopenentenyladenine. *Planta*, 165: 354–358.
- Risso, D., Ngai, J., Speed, T. P., & Dudoit, S. (2014). Normalization of ARN-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nature Biotechnology*.
- Romero, M., Cazau, M., Giorgieri, S., & Arambarri, A. (1998). Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environ. Pollut.*, 355–359.
- Ruijter, G., Visser, J., & Rinzema, A. (2004). Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiology*, 1095 - 1101.

- Sakaki, T. (2012). Practical application of cytochrome P450. *Biol Pharm Bull* , 35: 844–849.
- Salazar, M., Vongsangnak, W., & Panagiotou, G. (2009). Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis. *Mol Genet Genomics*, 282-571.
- Schena, M., Heller, R., Thériault, T., Konrad, K., Lachenmeier, E., & Davis, R. (1998). Microarrays: Biotechnology's Discovery Platform for Functional Genomics. *Trends Biotechnology*.
- Schenk, P., Carvalhais, L., & Kazan, K. (2012). Unraveling Plant-Microbe Interactions: Can Multi-Species Transcriptomics Help? *Trends in Biotechnology*, 177-184.
- Schmidt, S. N., Christensen, J. H., & Johnsen, A. R. (2010). Fungal PAH-metabolites resist mineralization by soil microorganisms. *Environ Sci Technol*.
- Schneeberger, K., & Weigel, D. (2011). Fast-Forward Genetics Enabled by New Sequencing Technologies. *Trends in Plant Science* , 282-288.
- Schneider, J. R., Grosser, K., Jayasimhulu, W., & Xue, D. W. (1996). Degradation of pyrene, benzo [a] anthracene and benzo [a] pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol*, 13-19.
- Serrano, R. (1996). Salt Tolerance in Plants and Microorganisms: Toxicity Targets and Defense Responses. *InteARNTional Review of Cytology*, 1-52.
- Shalon, D., Smith, S., & Brown, P. (1996). A ADN Microarray System for Analyzing Complex ADN Samples Using Two-Color Fluorescent Probe Hybridization. *Genome Research* , 639-645.
- Shen, M., Zhao, D.-K., Qiao, Q., Liu, L., Wang, J.-L., Cao, G.-H., . . . Zhao, Z.-W. (2015). Identification of Glutathione S-Transferase (GST) Genes from a Dark Septate Endophytic Fungus (*Exophiala pisciphila*) and Their Expression Patterns under Varied Metals Stress. *Plos One*, 10(4): e0123418.
- Shimada, H., Oginuma, M., Hara, A., & Y, I. (2004). 9,10-Phenanthrenequinone, a component of diesel exhaust particles, inhibits the reduction of 4-benzoylpyridine and all-trans-retinal and mediates superoxide formation through its redox cycling in pig heart. *Chem Res Toxicol*, 1145-1150.
- Shin, J., Kim, J., Lee, Y., & Son, H. (2018). Fungal Cytochrome P450s and the P450 Complement (CYPome) of *Fusarium graminearum*. *Toxins (Basel)*.
- Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., & Pascarella, S. (2011). Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC structural biology*.
- Singh, P., Raghukumar, C., R, P. R., & Mascarenhas-Pereira, M. (2013). Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin. *Yeast*, 93–101.
- Singh, R., Sram, R., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T., & Georgieva, T. (2007). The relationship between biomarkers of oxidative ADN damage, polycyclic aromatic hydrocarbon ADN adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res* , 620: 83–92.

- Sinha, A., Sinha, R., & Khare, S. (2014). Heavy metal bioremediation and nanoparticle synthesis by metallophiles. *Geomicrobiology and biogeochemistry, soil biology.*, 101–118.
- Smitha, M., Flowersb, T., Duncanb, H., & Alderb, J. (2006). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*, 519-525.
- Srivastava, & Kumar, M. (2019). *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a sustainable approach. In Sustainable Green Technologies for Environmental Managment.* Singapore: Springer Nature.
- Stefan Gotz, J. M. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*.
- Strickland, M., & Rousk, J. (2010). Considering Fungal: Bacterial Dominance in Soils—Methods, Controls, and Ecosystem Implications. . *Soil Biology & Biochemistry*, 1385-1395.
- Strickler, S., Bombarely, A., & Mueller, L. (2012). Designing a Transcriptome Next- Generation Sequencing Project for a Nonmodel Plant Species. *American JouARNI of Botany*, 257-266.
- Sukanta, S., Bhattacharya, Khajamohiddin, S., Jodi, S., & Yadav, J. S. (2013). A novel P450-initiated biphasic process for sustainable biodegradation of benzo[a]pyrene in soil under nutrient-sufficient conditions by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *JouARNI of Hazardous Materials*.
- Sun, Y., Niu, W., Hu, X., Ma, X., Sun, Y., & Wen, Y. (2020). Oxidative degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated industrial soil using chlorine dioxide. . *Chem Eng J*, 394: 124857.
- Sundaramoorthy, M., Terner, J., & Poulosl, T. (1995). The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. . *Structure*, 3: 1367–1377.
- Sutherland, J., & Cerniglia, C. (2010). *Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.*
- Tam, N., Guo, C., Yau, W., & Wong, Y. (2002). Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong. *Mar. Poll. Bull.*, 316–324.
- Tang, L., Tang, X. Y., Zhu, Y. G., Zheng, M. H., & Miao, Q. L. (2005). Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. *Environ Int.*, 822-828.
- Tayssir Kadri, T. R. (2016). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *JouARNI of environmental sciences*.
- Teng, C., Wu, S., & Gong, G. (2019). Bio-removal of phenanthrene, 9-fluorenone and anthracene-9,10-dione by laccase from *Aspergillus Niger* in waste cooking oils. *Food Control*, 105: 219–225.

- Thuillier, A., Chibani, K., Belli, G., Herrero, E., Dumarçay, S., & Gérardin, P. (2014). Transcriptomic responses of *Phanerochaete chrysosporium* to oak acetic extracts: focus on a new glutathione transferase. *Appl Environ Microbiol*, 80: 6316–6327.
- Thuillier, A., Ngadin, A. A., Thion, C., & Billard, P. (2011). Functional diversification of fungal glutathione transferases from the ure2p class. *Int J Evol Biol*.
- Tiehm, (1994). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Tillander, V., Alexson, S., & Cohen, D. (2017). Deactivating fatty acids: acyl-CoA thioesterase-mediated control of lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 28: 473–484.
- Touahar, I., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J., & Cabana, J. (s.f.).
- Trzesicka-Mlynarz, D., & Ward, O. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH contaminated soil. *Can. J. Microbiol*, 470-476.
- U. Walter, M., Beyer, J. K., & Rehm, H. (1991). Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 671–676.
- Urlacher, V., & Schmid, R. (2004). Protein engineering of the cytochrome P450 monooxygenase from *Bacillus megaterium*. *Methods Enzymol*, 388: 208–224.
- Van Leeuwen, M., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., . . . Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in ARN profiles. *Studies in Mycology*, 59-70.
- Vaupotic, T., Veranic, P., Petrovic, U., Gunde-Cimerman, N., & Plemenitas, A. (2008). HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi. *Stud Mycol*, 61-66.
- Vazquez-Duhalt, R. (1999). Cytochrome c as a biocatalyst. *JouARNI of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
- Vazquez-Duhalt, R. W. (1993). Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.*, 494-499.
- Vázquez-Duhalt, R., Ayala, M., & Márquez-Rocha, F. (2001). Biocatalytic chlorination of aromatic hydrocarbons by chloroperoxidase of *Caldariomyces fumago*. *Phytochemistry*, 58: 929–933.
- Velmurugan, N., Lee, H., Cha, H., & Lee, Y. (2017). Proteomic analysis of the marine-derived fungus *Paecilomyces* sp. strain SF-8 in response to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Botanica Marina*, 60: 381–392.
- Verdin, A., Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., & Durand, R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ Pollut*, 133: 283–291.
- Viti, C., Decorosi, F., Marchi, E., Galardini, M., & Giovannetti, L. (2015). High-throughput phenomics. En A. Mengoni, M. Galardini, & M. Fondi, *Bacterial pangenomics. Methods and protocols* (págs. 99–123.). New York: Springer.

- Vyas, B., Bakowski, S., Sasek, V., & Matucha, M. (1994). Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiol. Ecol*, 65–70.
- Wagner, G. P. (2012). Measurement of mARN abundance using ARN-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. . *Theory in Biosciences*, 281–285.
- Wagner, G., Kin, K., & Lynch, V. (2012). Measurement of mARN abundance using ARN-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci.*, 281–285.
- Walter, W., Sánchez-Cabo, F., & Ricote, M. (2015). GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. . *Bioinformatics*, 17: 2912–2914.
- Wang, B., Guangwu, G., Wang, C., & Ying, L. (2010). Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mARN sequencing. *Nucleic Acids Research*.
- Wang, C., Lin, Y., Jhang, S., & Tung, C. (2017). Identification of informative features for predicting proinflammatory potentials of engine exhausts. *Biomed Eng Online*, 16: 1–10.
- Wang, L., Li, F., Zhan, Y., & Zhu, L. (2016). Shifts in microbial community structure during in situ surfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil. *Environ Sci Pollut Res*, 23: 14451–14461.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). ARN-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nature Reviews, Genetics*, 57-63.
- Ward, J., Ponnala, L., & Weber, C. (2012). Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany*, 267-276.
- Warris, A., & Ballou, E. (2019). Oxidative responses and fungal infection biology. *Semin. Cell Dev. Biol*, 34–46.
- Weisman, D., Alkio, M., & Colón-Carmona, A. (2010). *BMC Plant Biol* , 10: 1–13.
- Westerfield, M. (2000). A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). . *BMC Dev Biol* , 203: 169.
- Williams, J., & Hallsworth, J. (2009). Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function. *Environ Microbiol.*, 1462-2920.
- Williams, J., & Hallsworth, J. (2009). Limits of life in hostile environments: no barriers to biosphere function?. *Environ Microbiol*, 3292-3308.
- Winqvist, E., Björklöf, K., Schultz, E., Räsänen, M., Salonen, K., & Anasonye, F. (2014). InteARNtional Biodeterioration & Biodegradation Bioremediation of PAH contaminated soil with fungi e from laboratory to fi Eld scale. *Int Biodeter Biodegr* , 86: 238–247.
- Witteveen, C. F., & Visser, J. (1995). Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters*, 57–62.
- Wolfgang Fritsche, M. H. (2005). *Aerobic Degradation of Recalcitrant Organic Compounds by Microorganisms*. Environmental Biotechnology: Concepts and Applications.
- Wösten, H. (2001). Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol*, 625– 646.

- Wu Y, L. Y. (2008). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. *Biodegradation*, 247–257.
- Wyn Jones, J., & Gorham, R. (1983). Osmoregulation. *Encyclopedia of Plant Physiology*, 35–58.
- Xiao, H., Smeekens, J., & Wu, R. (2016). Quantification of tunicamycin-induced protein expression and N-glycosylation changes in yeast. *Analyst*, 141: 3737–3745.
- Yaguchi, A., Franaszek, N., O'Neill, K., Lee, S., Sitepu, I., & Boundy-Mills, K. (2020). Identification of oleaginous yeasts that metabolize aromatic compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1–13.
- Ye, J., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Qin, H., Zhang, N., & He, B. (2011). Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *J Hazard Mater*, 185: 174–181.
- Yu, J., Mah, J., & Seo, J. (2006). Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryot Cell*, 1577-1584.
- Zafra, G., Taylor, T., Absalón, A., & Cortés-Espinosa, D. (2016). Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. *J Hazard Mater*, 318: 702–710.
- Zajc, J. (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*.
- Zajc, J., Kogej, T., Galinski, E., Ramos, J., & Gunde-Cimerman, N. (2014). Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. *Appl Environ Microbiol.*, 247-256.
- Zajc, J., Liu, Y., Dai, W., Yang, Z., Hu, J., Gostinčar, C., & N., G.-C. (2013). Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichthyophaga*: haloadaptations present and absent. *BMC Genomics*, 13;14:617.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DR. JEAN MICHEL GRÉVY MACQUART
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada **Análisis morfológico, fisiológico y transcripcional del hongo halófilo *Aspergillus sydowii* durante su exposición a condiciones poliaromáticas y extremas de baja actividad de agua**, que presenta la alumna **Heidy Peidro Guzmán (10021254)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Verónica Mercedes Narváez Padilla CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Verónica Lira Ruan CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Luis Andrés Yarzabal Rodríguez Universidad Católica de Cuenca (Ecuador)	APROBADO	
Dr. Jorge Luis Folch Mallol CEIB-UAEM	APROBADO	
Dra. María Alicia González Manjarrez IFC-UNAM	APROBADO	
Dr. Rodrigo Morales Cueto FCQeI-UAEM	APROBADO	
Dr. Ramón Alberto Batista García CIDC-UAEM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2022-03-01 21:39:35 | Firmante

EuM6GJGWU/Zu74SNxvU6wSisI8NjDugFhUL2ADMtsrKaDjtBbOMqemOWNWO62/rUXoMx6DIAu/s8IAs+8Xy4i8Nlyoxu4Yfgmei6p8lIloD8uu/AZIX+ZnpKHGKQvUA8r+Fynq1KThjzYLR68hynGa78WmiU850lvrsBCK8cBpwEB1wErt/O6Ry/0T99DJXINLQNremfniT4itz8pJUxaZHEJQI2zJ+mf4b8oWGEfLk1eXcsQkRM9Zj0/aiA5SBXvYbgDJV+JlaQw215T5zpjChAkK0JLjYjvWiwIBAUaQYIcviNvv8f3rFjVtnh8FliiPoelq7U8KtlWY1J+vYmg==

MARIA ALICIA GONZALEZ MANJARREZ | Fecha:2022-03-02 04:46:36 | Firmante

ddMPPhAuOi171ebmuF3dAbHsAGzNNe8bALSQaKuU6tP7M3sBwUqT2KOzeRoApB65Wk9mOH2YRHNcxu+OOVq9dT+d6eeEXQp5weQ1Xq5rR44hiOptYBs4Igh51n7QvKqYctat+eDCxIHCBzV6b5DQUCB/vbkNeyfkgad2hvAAhrlsCTy/Y7OifJqxLELbpKqFbbZoi4tNcCPSFgth+IWMD0Se4sp1ptK/9uuizxmKQCipweCaY4W2d4XXPaSNQ0Vsu3DplcB2cmnKq5A14ZageV9GNVNmVil3r/nPXAue23cV4iqDjiiuwhf74x+6dz+XpT780h/I5VlRlDcDX0owQ==

LUIS ANDRÉS YARZÁBAL RODRÍGUEZ | Fecha:2022-03-02 07:34:56 | Firmante

HEkos3Z5eFfdp6RwrTr0NuA+Eytj+6Lledtx+art2nuZ0tymGhFvDoXwqwU3AYcLbCd35Yy52dKJiQfeHBBouUyUhwTQO/38MLZGcfuzqME/NbXmwAziQTfhJaWzpyRutJqXIW/jrJi mtC4/S9IRa8DMXeDjNFTFWJPOcg2PKhpXe6CiZndjZbD+l82WTVzbd26PblyF66L6aMTXl6202XaPXCEi8o1RD5PZRJRjmqeE++5vajckRgloTuCYFmcsFqz0qRuwc4NY9+VG49sUCPF55kvupAoQ9cKiO7wHu53BvF+g3gjn3V5JwqFonNgljP1zXHP76uoYqyooApw==

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2022-03-02 09:08:15 | Firmante

ZKwV68L7/8vNVauwy/rzjioyEBlj1/f8+IQELVpMSA6BeMmonTc38o/vrIMIAKvC02231QRR3X+kVvUDq2vYqYUJgPGzQoiQPc3mCSL6263bEBNUZFzvwOR/ASiRZwk30rmVH/yN/unKFq8sACb31HHdz50mU6A5U8vbOGrcg7xqQFalk2TUKdMtv1x3HZxh+91wDmlmVRCifCuEC+jJbA6U0aUFvK78rNKASfCWx6n+lov+K8qZpNy8/7+qvoS8Q8c0MrKnJGlcKafBrvOB4d03HWJoNhsbZmzwKJfoiRQZa0xw7P1P0p9toVEJz2ehvc0NC49cWmQr6aDQ==

JORGE LUIS FOLCH MALLOL | Fecha:2022-03-02 09:41:53 | Firmante

Hllqzgr13Mqle4GkGR2//spNAqp61S/Br+Ttqh9VI573P+Hp5SNoEKf6QPgV3IHOMIk3qJ4pVtSbOMe3UjXF8qsDul/8eWOFqQ0X/Lvik7qhp51h8CehkwY3j8x68IrV6CP/dIVqdC d1E6g6/4NWUydcsofX8td59UN19Z9JzfbY1VR47PmCBDC+X9etg2NHOkIHo05m3pBc6rLweZG3PoTUztsNNUD1oet01FP1yWxuMMQRZbW3lvd5z9E35julK15wlSRiXon2IMCSmU9pWJzhmyuQnxes/VMd/D+Ynl6ly0iS+YxYfWfYiRVOJzr+sueH9xsb5mUvilg==

VERONICA MERCEDES NARVAEZ PADILLA | Fecha:2022-03-02 10:56:33 | Firmante

hJTOWYJKZ4C0AMY6beLzuBSrXdHyqfvGBQhZWTapjcOMililHVvgYQH096eyhWYkl8+l8K5wG7/2vJN5Epf54fcGXP3CYqbyXy4eWO/8ilumbXaD4CYFMQxCW4V5ESPqS8fKkXn8DOR+Or86cJ0Vmk9BCT1Y/cd2etoP/xt0GZgkQ7dEyGBTNMhdVfcR7ySoeWcmAyutlt0tsbP/eVWgDP/SHPXweS8GLVRS1A+e8Np8y7BvqufCbdz8E5YM3+Kb69w+onS5ar2aOGbUj5jR96YkVwOwOWWg9hbgcxvqGvEdlDlddUNtD3XcK5k2l/FZwAk8BgnkJlv7/XuWVve2ag==

RODRIGO MORALES CUETO | Fecha:2022-03-02 11:12:54 | Firmante

gQjMUW7dVA9gRVbY/JssPYmg2hCEPcASwK9rhWtszplBc8OrB+UwXLDjIO0BvYqB9DzshkfdJlRTO96D+Ss769KwQralC524rGVvJFOFO/AjuQvxubzLq8GqmdLOz5Ax+4Q8q akhsQoiN9RqRHRHD/7eA54NHXZCMgXObNTojLXjIVDmPlnB0u0av5653do03vk9OnmhYTJsHcH3z1lojv1+Sf5YFKRrPWNQ3vBHGcgS9FSxW0wfczdt1q0h0XFufauGJekHnS tGde9b1UUSmjiTN2QsBht+OgL6p+sB3g17U/9kul8PogVe3cVTxqY0KBbyXCcyu2/lk+bW4IA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



OnBS2CdYH

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/B5Tnfbx3f5PpelYILRr2bXNblA1hmSZT>

