



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS BASICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACION EN DINAMICA CELULAR

**Análisis comparativo del transcriptoma del hongo
halófilo *Aspergillus sydowii-like*, crecido en benzo [a]
pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. Heidy Peidro Guzmán

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ramón Alberto Batista García

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2018

Sinodales

- **Dr. Jorge Luis Folch Mallol**
- **Dra. María del Rayo Sánchez Carbente**
- **Dra. Alicia González Manjarrez**
- **Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani**
- **Dra. Sonia Dávila Ramos**

Agradecimientos

A mi asesor, el Dr. Ramón Alberto Batista García por su apoyo, guía y amistad a lo largo de los dos años que ha tomado la realización de este trabajo de Maestría.

A mis amores,
Mi compañero de vida, Osvaldo Alejandro
Mi madre, Odalys Guzmán

A mis amigos y a todos los que contribuyeron de alguna forma u otra con la realización de esta tesis, mis compañeros del lab por su ayuda, en especial a Yordanis por el tiempo dedicado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado a lo largo de mis estudios, dándome la oportunidad de realizar este trabajo de la manera más efectiva posible.

A todos, muchísimas gracias.

Tabla de Contenidos

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).....	7
Toxicidad de los HPAs.....	8
Clasificación de los HPAs	12
Remoción de HPAs.....	12
Métodos biológicos vs métodos fisicoquímicos	12
Hongos vs bacterias en la biorremediación	13
Hongos en la biorremediación. <i>Ascomycetes</i> vs <i>Basidiomycetes</i>	14
Hongos extremófilos en la biorremediación.	15
Metabolismo de HPAs en hongos.....	15
Transcriptómica	18
Tecnología RNA-seq.....	20
Transcriptómica en hongos halófilos	22
Transcriptómica en hongos en presencia de HPAs.....	23
Características de la cepa halófila moderada <i>A. sydowii</i> -like	24
Hipótesis:	26
Objetivo general:	26
Objetivos específicos:	26
Materiales y Métodos.	26
Metodología	28
Resultados y discusión	34
Evaluación de la tasa de degradación y remoción de benzo [a] pireno y fenantreno en el tiempo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Elección del tiempo de extracción del ARN en <i>A. sydowii</i> -like.	34
Determinación de la actividad enzimática en <i>A. sydowii</i> -like en presencia de HPAs.....	40
Determinación del pH en cultivos del hongo <i>A. sydowii</i> -like	42
Evaluación del efecto de la presencia de HPAs en el crecimiento del musgo <i>Physcomitrella patens</i>	43
Extracción de ARN total	45
Análisis de calidad de la secuenciación RNA-Seq.....	45

Ensamblaje de novo y anotación funcional	47
Análisis de expresión diferencial de genes	49
Enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas	52
Transcritos relacionados con la degradación de HPAs en hongos.....	60
Transcritos DE relacionados con la degradación de HPAs en hongos.....	61
Conclusión	67
Perspectivas	67

RESUMEN

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 hidrocarburos policíclicos aromáticos (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. Sin embargo, muy pocos estudios en la actualidad se enfocan en los mecanismos moleculares que permiten a los hongos utilizar los HPAs como fuente de carbono en condiciones de halofilia; donde se esperaría produzcan enzimas funcionalmente estables para degradarlos en condiciones de hipersalinidad (1M NaCl).

En este estudio se analizó el transcriptoma de *Aspergillus sydowii-like*, un hongo halófilo con potencialidad para degradar HPAs en condiciones hipersalinas. *A. sydowii-like* fue capaz de crecer en presencia de HPAs como única fuente de carbono, y luego de 4 días de cultivo, fue capaz de degradar un 48 y un 58% de benzo [a] pireno y fenantreno, respectivamente. Se investigó su capacidad para producir lacasas, peroxidasas y estererasas bajo condiciones hipersalinas. Este estudio reveló que la biodegradación era predominante sobre la biosorción como estrategia de eliminación. Se empleó la técnica de RNAseq para identificar y caracterizar el transcriptoma de *A. sydowii-like*. El ARN total se purificó y secuenció a partir de cultivos crecidos en presencia de HPAs o glucosa en condiciones hipersalinas (1M NaCl). El análisis bioinformático realizado reveló que 170 genes regulados positivamente y 76 regulados negativamente se expresaron diferencialmente en presencia de HPAs respecto al crecimiento de este hongo en presencia de glucosa (control). En presencia de HPAs, *A. sydowii-like* aumenta el número de transcritos de enzimas involucradas directamente en la degradación de este tipo de compuestos, tal es el caso de la glutatión-S-transferasa, la NADH-

ubiquinona oxidoreductasa y la cloroperoxidasa. Así mismo se favorece la respiración celular con el objetivo de oxidar los HPAs hasta CO_2 y H_2O . Este es el primer intento de análisis de la expresión génica de un hongo halófilo en presencia de HPAs.

ABSTRACT

The indiscriminate use of fossil fuels and oil spills, among other related causes are the main factors that have contributed over time to the persistence of xenobiotic pollutants in the environment. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are defined as persistent xenobiotic compounds with strong carcinogenic and mutagenic properties, highly toxic and stable in the environment due to their aromatic rings. Several eco-friendly strategies have been used to remove them from aquatic ecosystems, bioremediation included. The use of filamentous fungi in this field has proven to have certain advantages over the use of bacteria. However, very few studies focus on the molecular mechanisms that allow fungi to use PAHs as a carbon source under halophilic conditions; where it would be expected the production of functionally stable enzymes to degrade them under hypersaline conditions (1M NaCl).

In this study we analyze the transcriptome of *Aspergillus sydowii-like*, a halophile fungus with the potential for PAHs degradation under hypersaline conditions. The growth profile of *A. sydowii-like* was measured, revealing that this fungus could use PAHs as a sole carbon source. After 4 days of culture, it was capable to degrade a 48 and 58% of benzo [a] pyrene and phenantrene respectively. Its ability to produce laccases, peroxidases and esterases under hypersaline conditions was investigated. This study revealed that biodegradation was predominant over biosorption as the removal strategy. High-throughput sequencing was employed to identify and characterize the transcriptome of *A. sydowii-like*. Total RNA was purified and sequence from hypersaline cultures (1M NaCl) growing in presence of PAHs or glucose. The bioinformatic analysis showed that 170 genes were up regulated whereas 76 were down regulated demonstrating differential expression in PAHs vs glucose. In the presence of PAHs, *A. sydowii-like* increases the number of transcripts of the enzymes directly involved in the degradation of this type of compounds, such as glutathione-S-transferase, NADH-ubiquinone oxidoreductase and chloroperoxidase. Likewise, the respiratory chain is favored with the aim of oxidizing

the PAHs to CO₂ and H₂O. This is the first attempt to analyse with a high- throughput vision the gene expression of a halophile fungus in presence of PAHs.

INTRODUCCIÓN

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 hidrocarburos policíclicos aromáticos (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 de estos estudios se enfocan en los mecanismos moleculares que permiten a los hongos utilizar los HPAs como 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.

En estudios previos del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del CEIB, en busca de hongos halófilos-halotolerantes con actividad lignocelulolítica, se aisló la cepa filamentosa H1 identificada como *A. sydowii-like* atendiendo a criterios taxonómicos, micromorfológicos y moleculares. Este hongo se obtuvo a partir de la fermentación de un lote de bagazo de caña de azúcar en medio mínimo suplementado con 2.0M de NaCl (Batista-G *et al.* 2014)

Estudios realizados con el objetivo de evaluar la tasa de crecimiento de *A. sydowii-like* en presencia de NaCl (0.5M- 2.0M) y carboximetilcelulosa (2%), mostraron que la velocidad de crecimiento de la cepa *A. sydowii-like* es mayor a altas concentraciones de NaCl (1-1.5M) (Batista-G *et al.* 2014)

A. sydowii-like ha sido reportado como un hongo halófilo con potencialidades para la producción de enzimas ligninolíticas funcionales en condiciones hipersalinas y,

por tanto, sería uno de los pocos ejemplos de hongos ascomicetos que podrían utilizarse para la biorremediación de sitios contaminados con HPAs en condiciones hipersalinas, por lo que resulta relevante la caracterización del transcriptoma de *A. sydowii-like* en estas condiciones. 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-N *et al.* 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-L *et al.* 2015) y *Exophiala pisciphila* (Mélanie-M *et al.* 2013). Por este motivo, cabe señalar que nuestro estudio es el primer intento de análisis de la expresión génica de un hongo halófilo en presencia de HPAs.

ANTECEDENTES

Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs).

Los HPAs son compuestos orgánicos constituidos por 2 o más anillos de benceno fusionados (Figura 1) (Haritash-A *et al.* 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-E *et al.* 1964, Patnaik-P *et al.* 1999).

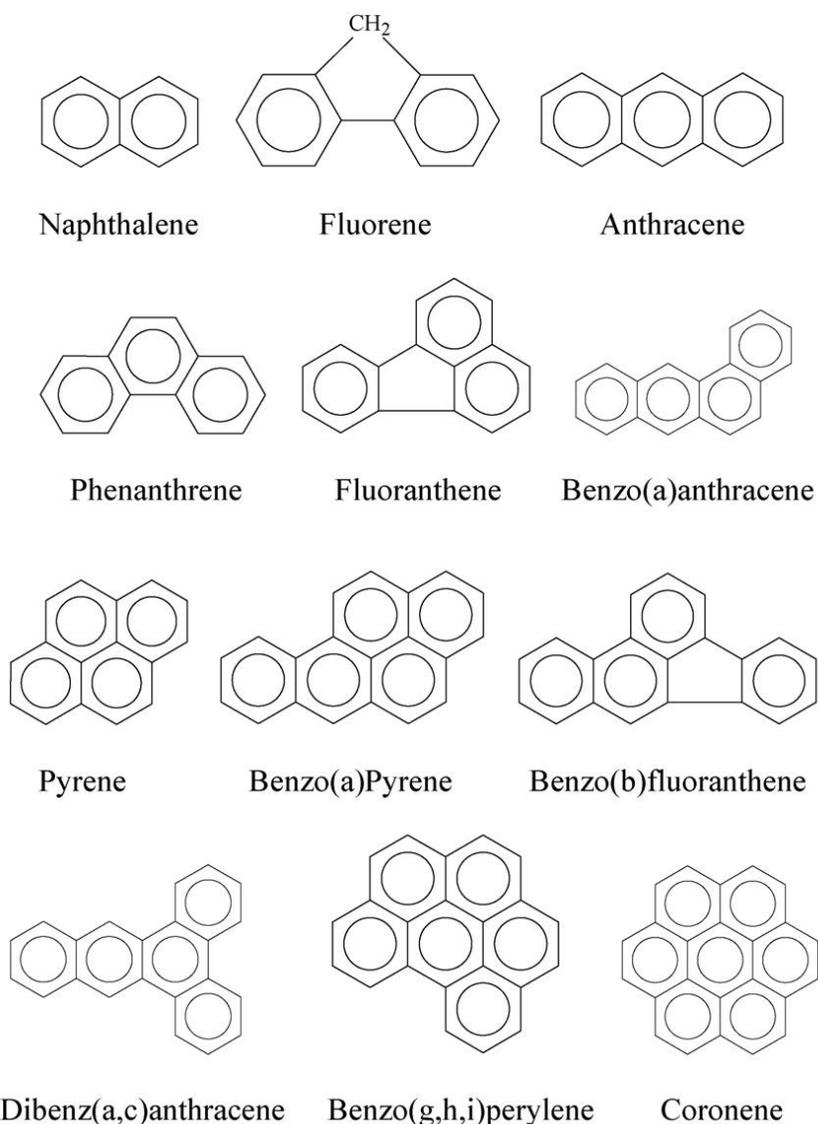


Figura 1. Estructuras químicas de algunos de los HPAs más comúnmente estudiados (Haritash-A *et al.* 2009).

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).

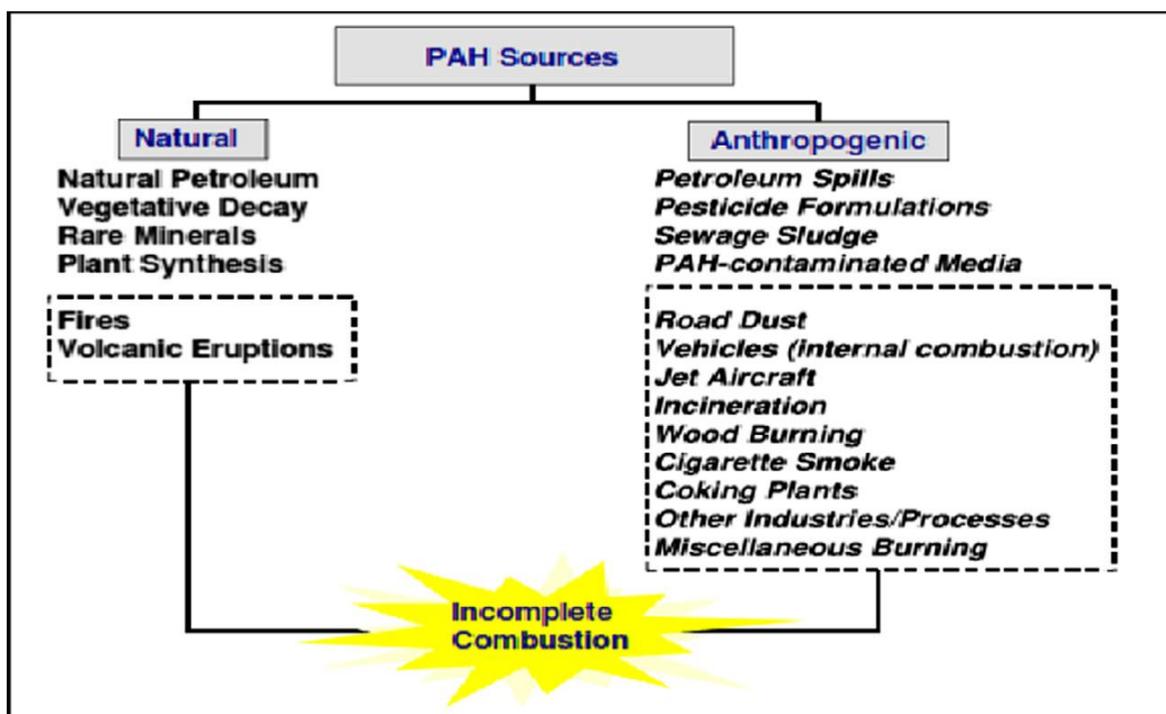


Figura 2. Fuentes naturales y antropogénicas de HPAs (Hussein-A *et al.* 2016).

Toxicidad de los HPAs

Los HPAs se consideran contaminantes ubicuos tóxicos, mutágenicos 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-E *et al.* 1992).

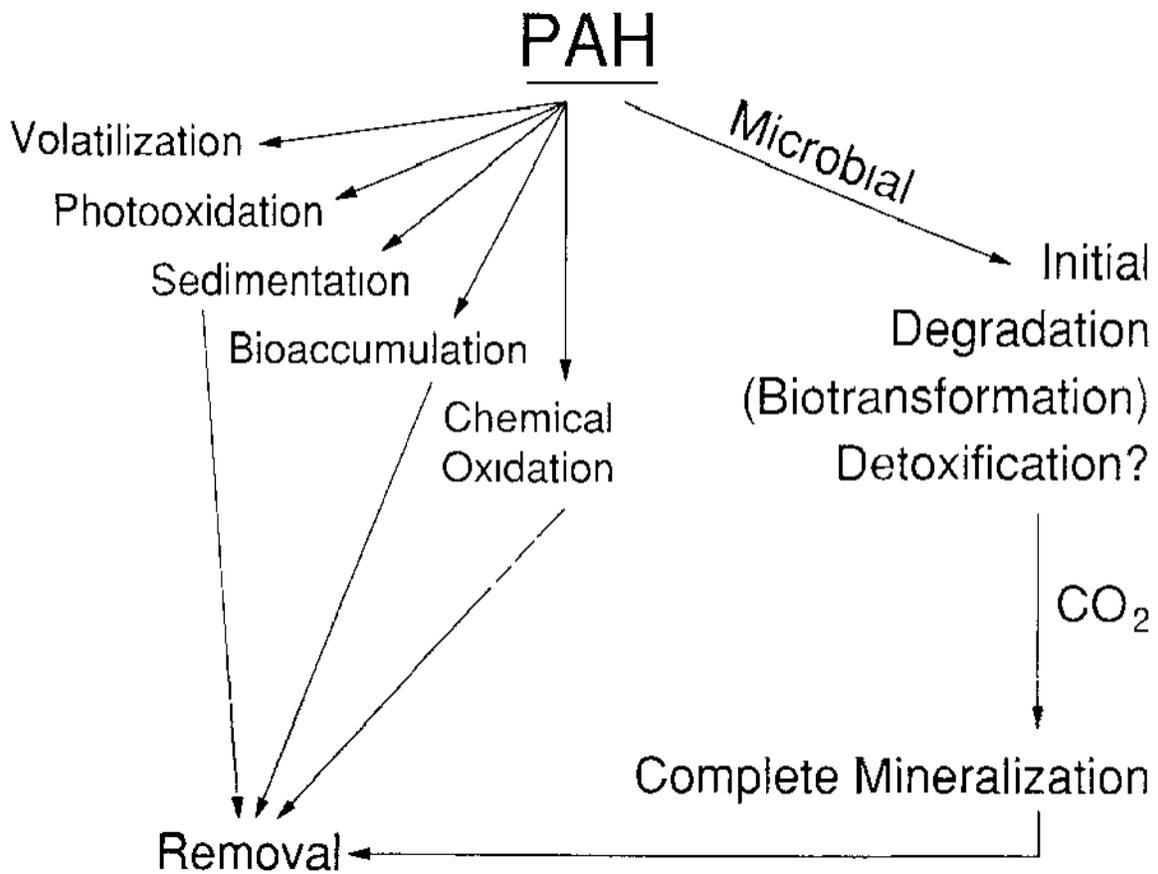
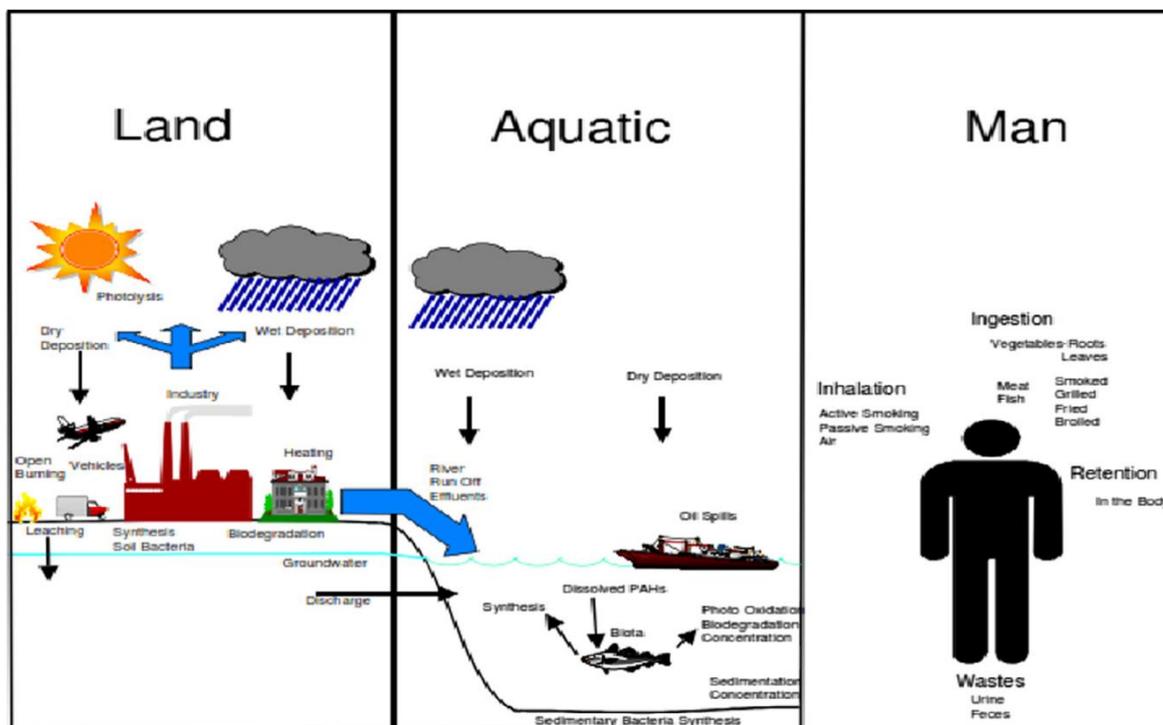


Figura 3. Mecanismos responsables de la remoción de HPAs en el entorno (Cerniglia-E *et al.* 1992).

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-A *et al.* 2012). 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-A *et al.* 2012, Hussein-A *et al.* 2016, Esra-B. 2016).



Source: Suess, 1976

Figura 4. Dispersión de HPA 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 (Hussein-A *et al.* 2016). 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-B. 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.

Muchos HPA carecen de propiedades genotóxicas, sin embargo, la metilación de estos compuestos los convierte en metabolitos tóxicos. No obstante, las células cuentan con mecanismos de detoxificación en esos casos, uno de ellos involucra la acción de los citocromos p450, proteínas que tienen la capacidad de agregar átomos de oxígeno a los anillos de los HPA, 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-B. 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, presentes en las monocapas de su membrana plasmática, afectando sus funciones de transducción de energía, ocasionando cambios en su fluidez y en la conformación de diversas proteínas (Heipieper-H *et al.* 2010). En el caso de las plantas, la presencia de HPAs producto de derrames de petróleo, puede dañar las membranas celulares de las raíces, afectando el intercambio de gases con la atmósfera a través de estas, provocando una disminución en el crecimiento e incluso la asfixia y muerte de la planta (Smitha-M *et al.* 2006, Fenglan-L *et al.* 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-H. 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-S *et al.* 2015). El benzo [a]-pireno (BaP), un HPA de alto peso molecular (5 anillos de benceno fusionados) (Cerniglia-C *et al.* 1986, Schmidt-S *et al.* 2010), ha sido ampliamente estudiado y es considerado recalcitrante, termodinámicamente estable y muy difícil de degradar (Passarini-M *et al.* 2011) (Launen-L *et al.* 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-A *et al.* 1989). El fenantreno es uno de los hidrocarburos más ubicuos en el ambiente (Shimada-H *et al.* 2004) (Nizetto-L *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 (Orliski-R. 2002, Tang-L *et al.* 2005). Al ser un hidrocarburo aromático pequeño (3 anillos aromáticos), el fenantreno se emplea frecuentemente para desarrollar estudios sobre el metabolismo de HPAs (Pelkonen-O *et al.* 1982, Narro-M *et al.* 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 (Providenti-M *et al.* 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 (Ward-O *et al.* 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 (Providenti-M *et al.* 1993, Ward-O *et al.* 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-A *et al.* 2009).

Hongos vs bacterias en la biorremediación

Las bacterias son microorganismos que participan activamente en la degradación de contaminantes orgánicos (Be-Y *et al.* 1996). Entre las especies bacterianas más conocidas capaces de degradar HPAs se encuentran *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Sphingomonas* (Aitken-M *et al.* 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-S *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 (Walter-U *et al.* 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-J *et al.* 1996). Los hongos son organismos heterótrofos y juegan un papel importante en la descomposición de materia orgánica (Trzesicka-M *et al.* 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-Y *et al.* 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-M *et al.* 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-L *et al.* 2002). Esta capacidad convierte a los hongos en organismos de gran interés para la biorremediación ambiental (Anastasi-A *et al.* 2012).

Hongos en la biorremediación. *Ascomycetes* vs *Basidiomycetes*

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-E *et al.* 2016). Así, estudios recientes indican que los hongos ascomicetes autóctonos, son el género fúngico dominante en ambientes contaminados con HPAs.

Muchos hongos pertenecientes al género basidiomicetes han sido objeto de estudio por décadas, debido a la eficacia de sus enzimas degradadoras de lignina en la conversión de HPAs (Anastasi-A. 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-E *et al.* 2016). La mayoría de los suelos contaminados con HPAs están colonizados principalmente por las especies *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecylomyces* y *Debaryomyces* pertenecientes

al género *Ascomycota*, el phylum dominante. (Anastasi-A. 2012, Aranda-E *et al.* 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-M *et al.* 2015) (Nigam-P. 2013). Las propiedades anteriores los convierten en candidatos ideales para el procesamiento y la bio-conversión de materias primas como las presentes en las industrias alimentarias, textiles, y en procesos como la biorremediación (Sinha-A *et al.* 2014, Singh-P *et al.* 2013).

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-B *et al.* 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-L *et al.* 2013) (Li-Y *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-K *et al.* 2013, Maruthi-A *et al.* 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-T *et al.* 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-M *et al.* 1998). El sistema ligninolítico consta de tres grupos enzimáticos principales: lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, y fenoloxidasas (lacasas, tirosinasas) (Vyas-B *et al.* 1994, Boyle-D *et al.* 1998).

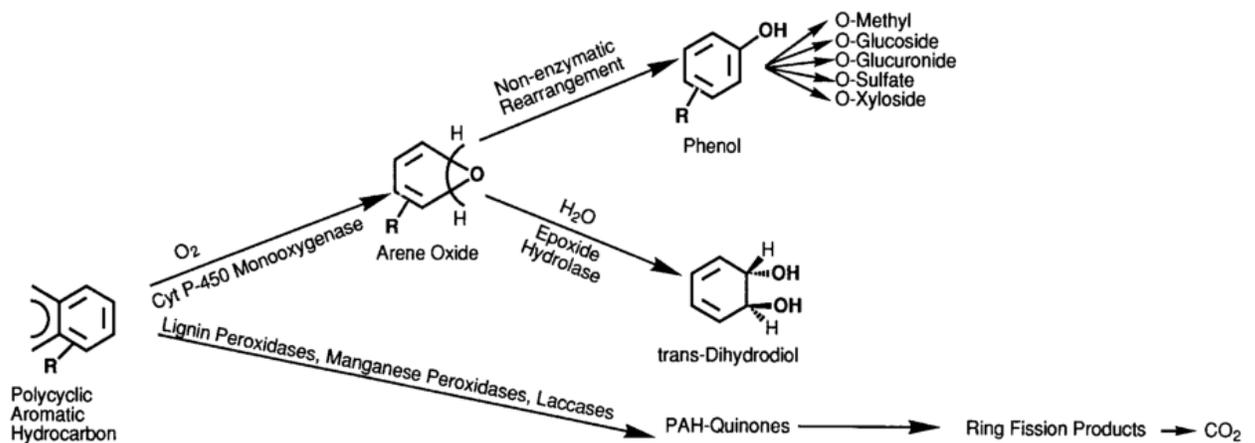


Figura 5. Vías empleadas por los hongos para metabolizar los HPAs (Cajthaml-T *et al.* 2001).

Los HPAs que penetran al interior celular se transforman en derivados hidroxilo, 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 monooxigenación, las cuales son comunes en el metabolismo de diversas drogas y juegan un papel importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios y ergosterol (Aranda-E *et al.* 2016). Las EHs, por su parte, catalizan la hidrólisis de epóxidos a sus correspondientes transdihidrodiolos, participan en la síntesis de mensajeros químicos y metabolitos secundarios. Los metabolitos oxidados se conjugan entonces con sulfatos, metilos, glucosas, xylosas o ácido glucurónico (fase 2) (Aranda-E *et al.* 2016), proceso mediado por transferasas, entre las que se encuentran las sulfotransferasas, restringidas al género *Ascomycota*, y la glutatión transferasa, involucrada en la defensa contra especies reactivas del oxígeno debido a su actividad peroxidasa (Aranda-E *et al.* 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 detoxificación 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 *Ascomycota* (Aranda-E *et al.* 2016).

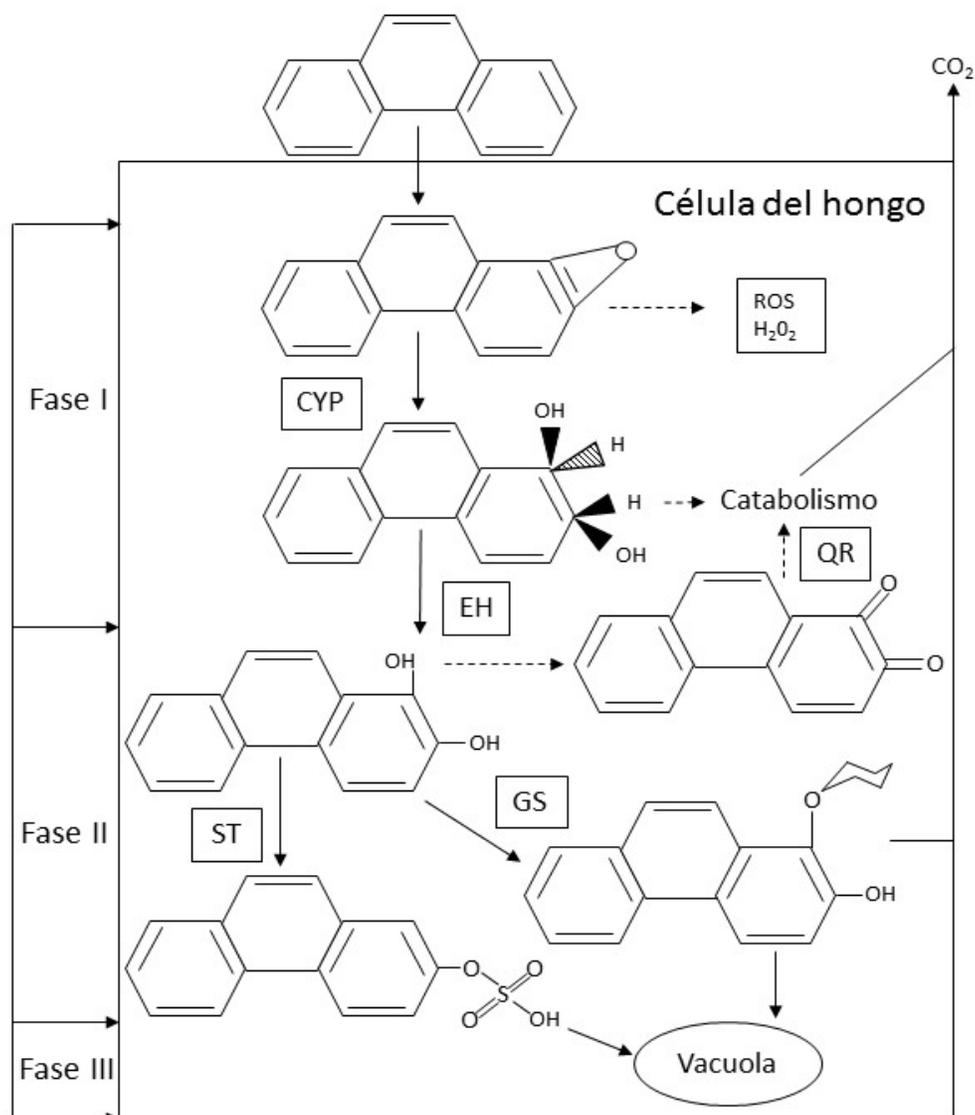


Figura 6. Modelo integrativo simplificado del mecanismo intracelular para la conversión de HPAs en hongos. CYP (Sistema del citocromo P450), EH (epóxido hidrolasa), ST (sulfotransferasa), QR (quinona reductasa).

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-N *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-like* ha sido reportado como un hongo halófilo con potencialidades para la producción de enzimas ligninolíticas funcionales en condiciones hipersalinas (Batista-G *et al.*

2014). Según lo expuesto anteriormente, la cepa *A. sydowii-like*, 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 (extremozimas) en presencia de benzo [a] pireno y fenantreno como única fuente de carbono, resulta relevante la caracterización del transcriptoma de *A. sydowii-like* 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 activan 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-N *et al.* 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 transcrito, 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-D *et al.* 2000). En conjunto, todos los transcritos 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 cDNA 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-D *et al.* 1996, Schena-M *et al.* 1998, Meyers-B *et al.* 2004, Marguerat-S *et al.* 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-J *et al.* 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-J *et al.* 2012, Mochida-K *et al.* 2011, Schneeberger-K *et al.* 2011).

Tecnología RNA-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 RNA-seq (Wang-Z *et al.* 2009, Garber-M *et al.* 2011, Egan-A *et al.* 2012). Esta herramienta transcriptómica cambia la manera de cómo se analizan y comprenden los (Wang-Z *et al.* 2009). Además, el RNA-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-R *et al.* 2009, Gulledege-A *et al.* 2012). La información de esta manera puede ser integrada e interpretada, y se constituye de gran utilidad para vislumbrar procesos biológicos y mecanismos de coexpresión.

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 RNA-seq se han llevado a cabo en especies eucariotas tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, el ratón y el humano (Nagalakshmi-O, *et al.* 2008, Mortazavi-A *et al.* 2008, Maher-C *et al.* 2009, Pickrell-J, *et al.* 2010, Gan-Q *et al.* 2010, Daines-B *et al.* 2011, Peng-Z *et al.* 2012), lo que ha demostrado la alta aplicabilidad que el RNA-seq ha tenido en estudios de especies modelo.

El RNA-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-J *et al.* 2012). La fragmentación del ARN o del cDNA 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-Z *et al.* 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-S *et al.* 2010, Core-L *et al.* 2008), o alternativamente se pueden adicionar directamente a la cadena sencilla de ADNc (Marguerat-S *et al.* 2010, Maher-C *et al.* 2009).

En cuanto a la cantidad y concentración del ARNm que se requiere para la tecnología RNA-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 RNA-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 - R *et al.* 2009, Gulledge-A *et al.* 2012). Asimismo, los datos arrojados por RNA-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-J *et al.* 2012, Wang-Z *et al.* 2009, Nagalakshmi-O *et al.* 2008). Además, también se ha mostrado que los resultados son altamente reproducibles (Wang-Z *et al.* 2009).

La tecnología RNA-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-s *et al.* 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-M. 2010, Mardis-E. 2011).

Uno de los objetivos al emplear la tecnología de RNA-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-P *et al.* 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-J *et al.* 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 (Kai-H *et al.* 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. He y colaboradores en el 2017 (Bin-H *et al.* 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 J. et al (Zajc-J *et al.* 2013), 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 *Wallemia 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 et al en el 2017 (Cong-B *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 peroxidases similares a la lignina y manganeso peroxidases, 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 anthrona (Chigu-N *et al.* 2010). En esta especie, las enzimas glutatión-S transferasas (GSTs) Ure2p4 y Ure2p6 se expresan específicamente luego del tratamiento con HPAs (Thuillier-A *et al.* 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-hidroxiados (Sukanta S. *et al.* 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 L. *et al.* 2015), capaz de transformar asfaltenos, donde se observó una regulación positiva en genes que codifican para monooxygenasas. *Exophiala pisciphila* (Mélanie-M *et al.* 2013), aislada de un suelo contaminado con metales pesados, mostró una regulación positiva de GSTs, especialmente Ure2p, bajo diferentes condiciones ambientales.

Características de la cepa halófila moderada A. sydowii-like

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-like* (Batista-G *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:

El hongo halófilo *A. sydowii-like* degradará benzo [a] pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas (1.0 M NaCl) al expresar diferencialmente enzimas oxidativas en cultivos con benzo [a] pireno y fenantreno.

Objetivo general:

Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii-like* crecido en una mezcla benzo [a] pireno: fenantreno en condiciones hipersalinas.

Objetivos específicos:

1. Analizar la tolerancia de *A. sydowii-like* a mezclas de benzo [a] pireno y fenantreno en presencia de 1.0M de NaCl.
2. Obtener el transcriptoma de *A. sydowii-like* crecido con los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno o glucosa, ambas condiciones suplementadas con 1.0 M de NaCl.
3. Analizar comparativamente el transcriptoma de *A. sydowii-like* crecido con los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno o glucosa, ambas condiciones suplementadas con 1.0 M de NaCl, para identificar genes involucrados en la degradación de HPAs.

Materiales y Métodos.**Medios de cultivo y soluciones stock****Preparación de Medio mínimo**

Para la preparación de medio mínimo se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 1 L de agua destilada: 7.8 mg de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 18 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 500 mg de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg de ZnSO_4 , 50 mg de KCl, 1 g de K_2HPO_4 y 2 g de NH_4NO_3 . Luego se ajustó el pH a 6 con ácido fosfórico – KOH al 0.25 N y se esterilizó en autoclave. Se adicionó agar (2%) cuando se requirió preparar medio de cultivo sólido.

Buffer de Citrato (0.01 M), pH 5

Se preparó una solución de citrato de sodio, la cual contenía 1,47 g de citrato de sodio en 100 mL de agua destilada. Posteriormente se preparó una solución de ácido cítrico, para lo cual se adicionaron 0.96 g del ácido en cuestión en 100 mL de agua destilada. Por último, se mezclaron en un vaso de precipitado, 60 mL de la solución de citrato de sodio y 40 mL de la solución de ácido cítrico, para un volumen final de 100 mL. Se ajustó el pH a 5.

Buffer fosfato (PBS 10 X), pH 7

En 1 L de agua destilada se adicionaron: 80g de NaCl, 2 g de KCl y 14.4 g de Na_2HPO_4 . Posteriormente se ajustó el pH a 7.

Buffer fosfato (PBS 1X)

Se preparó una solución que contenía 80 mL de agua destilada y 20 mL de PBS 10X.

Buffer fosfato (PBS 1X) - Tritón 0.1%

Se preparó una solución que contenía 50 mL de PBS 1X y 50 μL de Tritón 100X (comercial).

Solución de 2-Naftil acetato, 250 mM

Se adicionó 5 mg de 2-naftil acetato (comercial) en 500 μL de acetato de sodio (1M).

Solución de Fast Garnet

Se adicionó en 100 μL de PBS 1X – Tritón (0.1%), 10 mg de Fast Garnet.

Buffer fosfato (PBS 1X) con Tritón 0.1%

Se adicionó en 90 mL de agua destilada, 100 μL de Tritón 100X y 10 mL de PBS 10X.

Preparación de sustratos para la medición de las actividades enzimáticas:

Solución para esterasas

Se preparó una solución que contenía 10 mL de PBS 1X – Tritón (0.1 %), 50 μL de 2-naftil acetato y 10 μL de Fast Garnet.

Solución de ABTS, 30 mM

Se adicionó en 10 mL de agua destilada, 164.6 mg de ABTS. Al finalizar la preparación se cubrió el frasco con papel de aluminio, debido a que el reactivo es fotosensible.

Solución de peróxido de hidrógeno

Se añadió en 10 mL de agua destilada, 170 μ L de peróxido de hidrógeno al 30 % (reactivo comercial).

Reactivo de Lowry (reactivo de Biuret y reactivo de Folin-Ciocalteu)

Reactivo de Biuret

En 50 mL de hidróxido de sodio (0.1 N) se agregó 1g de carbonato de sodio. Posteriormente se añadieron 500 μ L de sulfato de cobre (1%) y 500 μ L de tartrato de sodio potasio (2%).

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Se realizó una disolución 1:2 del reactivo de Folin-Ciocalteu (2N) en agua destilada.

Metodología

Microorganismo

A. sydowii-like es la cepa de hongo halófilo (Batista-G *et al.* 2014) que será utilizada en este estudio. Se encuentra conservada en el cepario del Laboratorio de Biología Molecular de Hongos del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM. Se conserva a 4°C en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa y Agar Malta.

Evaluación de la remoción de benzo [a] pireno y fenantreno por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Elección del tiempo de extracción del ARN de *A. sydowii-like*.

Se cultivó el hongo *A. sydowii-like* en medio líquido (pre-inóculo: matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio mínimo (MM) + glucosa (10%), 1×10^6 esporas de *A. sydowii-like*, 1.0 M de NaCl, 28°C y 150 rpm) hasta alcanzar su fase más activa de crecimiento (establecida en estudios previos: 4 días). Luego del cuarto día, el micelio se colectó mediante centrifugación a 4000 rpm, 4°C por 10 min y fue lavado tres veces con solución salina 0.5%. Se inocularon 3.0 g de micelio en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de solución salina 0.5% y se incubaron durante 15h a 28°C y 150 rpm con el objetivo de agotar los materiales de reservas en el hongo como consecuencia de su crecimiento en un medio rico. Posteriormente, se colectó

nuevamente el micelio como fue descrito anteriormente y se inoculó 1g de micelio por triplicado en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de MM y 1.0 M NaCl, los cuales se suplementaron con la mezcla benzo [a] pireno:fenantreno (1:1; 50ppm:50ppm) o glucosa (control) (total: 6 muestras) y se incubaron a 28°C y 150 rpm. Se colectó el micelio de los cultivos a las 0, 12h, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días de cultivo.

Con el objetivo de seleccionar el tiempo de extracción del ARN de *A. sydowii-like* para su posterior análisis transcriptómico, se evaluó la remoción de benzo [a] pireno y fenantreno por *A. sydowii-like* a través de un análisis por HPLC a las 0, 12h, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 días de exposición del cultivo. El procedimiento para obtener la muestra que se aplicó posteriormente al HPLC se llevó a cabo como sigue: se realizó una extracción líquido: líquido de la muestra con hexano (Hexano 70:30 medio de cultivo), se colectó el hexano a través del uso de la bureta, separando ambas fases pasa solo tomar la fase orgánica, este paso se llevó a cabo dos veces por matraz para extraer la mayor cantidad de hidrocarburo. Posteriormente, el hexano colectado se roto-evaporó para tener un volumen aproximado de 2 ml, los cuales se secaron para finalmente agregar un mililitro de la fase móvil (Metanol-agua) que se utilizó en la columna cromatográfica. La separación se realizó usando una columna C-18 (0,25 mm de diámetro por 30 m de longitud, 0,25 µm de espesor de película) utilizando una fase móvil Metanol: H₂O (90:10) con un bombeo de 0,8 ml/minuto, con temperatura de 40 °C.

Determinación de la actividad enzimática en *A. sydowii-like* en presencia de HPAs

Las actividades enzimáticas se determinaron a partir de 2mL de sobrenadante extraído a los mismos tiempos mencionados anteriormente. El sobrenadante colectado se centrifugó en tubos de 15 ml a una velocidad de 4000 rpm durante 15 minutos y se descartó cualquier resto de micelio que pudiese contener. Para la determinación de las actividades se emplearon microplacas de 96 pocillos, y se utilizó un espectrofotómetro automatizado modelo Epoch (BioTek)

Determinación de la actividad enzimática de lacasas.

La determinación de la actividad de lacasas se monitoreó por la reacción del 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) en buffer de acetatos 2M (pH 4.5). En presencia de enzimas oxidativas como las lacasas, el ABTS se oxida dando una coloración azul. El coeficiente de extinción molar para el ABTS es de 36 000 M⁻¹ cm⁻¹. La absorbancia se determinó a 420 nm (Batista *et al.*, 2014).

Reacción:

-200 µl del sobrenadante

-90 µl de Buffer de acetatos

-10 µl de ABTS a 30 mM

Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada tres minutos durante 15 minutos

Determinación de la actividad enzimática de peroxidasas.

Para la determinación de la actividad peroxidasa se siguió el mismo protocolo empleado para las lacasas, con la diferencia de que se añadieron 10 µl de H₂O₂ (0,005%) a la mezcla de reacción. La medición se calculó a partir de los valores de absorbancia a 420 nm, por la formación del radical del ABTS (coeficiente de extinción molar de 36 000 M⁻¹ cm⁻¹). Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada tres minutos durante 15 minutos

Determinación de la actividad enzimática de esterasas.

La determinación de la actividad de esterasas se monitoreó por la reacción del 2 naftil acetato en buffer PBS 1X + Tritón (0.1%). En presencia de enzimas oxidativas como las esterasas, el 2 naftil acetato se oxida dando una coloración roja. El coeficiente de extinción molar para el 2 naftil acetato es de 23 395 M⁻¹ cm⁻¹. La absorbancia se determinó a 538 nm (Batista-G *et al.* 2014).

Reacción:

-10 mL de PBS 1X + Tritón (0.1%).

-50 µl de 2 naftil acetato (1%)

-10 µl de Fast Garnet (1%)

Las lecturas se iniciaron en el momento de adicionar el sustrato y se registraron cada cinco minutos durante 30 minutos

Los experimentos se realizaron por triplicado, con dos mediciones independientes en cada caso. Las mediciones tanto para lacasas, peroxidasas como esterasas se expresaron como actividad específica (U/mg) la cual se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de producto en la unidad de tiempo (t) por miligramo de proteína (mg)

Cuantificación de proteínas totales involucradas en la degradación de HPAs mediante Lowry

En una placa de 96 pocillos se aplica en cada pocillo 90 μL de sustrato y 190 μL del reactivo de Biuried. Se incuba a temperatura ambiente (20 °C) durante 20 minutos en la oscuridad. Posteriormente, se adicionan 20 μL del reactivo de Follin y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para el control se utilizaron 90 μL de agua destilada, 190 μL del reactivo de Biuret y 20 μL del reactivo de Follin.

Todas las muestras se aplicaron por triplicado y se midió la absorbancia a 650 nm.

Curva de calibración

A partir de una solución de referencia de Seroalbúmina Bobina (BSA, 1g/mL) se preparó una curva de calibración de 20 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Se aplicaron diluciones seriadas 1:2 en una placa de 96 pocillos, por triplicado.

Determinación del pH en cultivos del hongo *A. sydowii-like*

Se midió el pH en cultivos que contenían MM + glucosa (10%), MM + HPAs (100ppm) y MM + HPAs (100ppm) + *A. sydowii-like* a los tiempos 0,2,4,6,8 y 10 días por triplicado.

Evaluación del efecto de la presencia de HPAs en el crecimiento del musgo *Physcomitrella patens*

El musgo *Physcomitrella patens* fue cultivado en cajas con medio knop 2X por aproximadamente 7 días y luego explantes del protonema del musgo fueron cultivados en medio Knop 2X (5mL) + agua destilada (3mL) + Muestra (2mL)

Muestras evaluadas: Hexano, MM, MM+HPA o MM+HPA+A.*sydowii-like*. Se midió el crecimiento del musgo a los 44 días de cultivo. Para el análisis estadístico se empleó el paquete GraphPad Prism, versión 7.03.

Extracción de ARN total de *A. sydowii-like*

La purificación del ARN se realizó mediante el método de Tri Reagent (SIGMA) según las instrucciones del fabricante. La integridad y pureza del ARN se evaluó inicialmente mediante electroforesis en geles de agarosa (1% de agarosa en tampón MOPS, 0.9% formaldehído). Posteriormente, las muestras se analizaron mediante electroforesis capilar (Qubit RNA Assay Kit and Agilent bioanalyzer) para determinar el RIN (del inglés RNA Integrity Number).

La construcción de bibliotecas, así como la secuenciación del ARNm mediante la técnica RNA Seq se realizaron en las instalaciones de Applied Biological Materials Inc. en Canadá. Para ello se utilizó el Illumina TruSeq mRNA library prep kit. El control de calidad de las bibliotecas se realizó utilizando un Qubit DNA 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 (Andrews-S *et al.* 2014). 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, 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 novo de las secuencias se realizó utilizando el software Trinity (Haas-B *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 UniProt utilizando el software Blast2GO (Stefan-G *et al.* 2008). Para la cuantificación de la abundancia de los transcritos se utilizó el

programa Kallisto (Li-E *et al.* 2011). Los niveles de expresión se reportaron en transcritos por millón (TPM) (Conesa-A *et al.* 2016) (Wagner-G *et al.* 2012).

Análisis de niveles de expresión y expresión diferencial

El procesamiento de los datos de expresión se realizó utilizando diferentes paquetes implementados en Bioconductor, un proyecto de código abierto para el análisis de datos genómicos en R (Gentleman-R *et al.* 2004). 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 1.5 conteos por millón de lecturas ($\text{cpm} < 1.5$). Los datos de expresión fueron normalizados mediante el algoritmo RUVseq para eliminar la variación experimental en las muestras y ponderar la variación biológica (Risso-D *et al.* 2014). El análisis de la expresión diferencial de genes se realizó mediante la herramienta DESeq2 (Love-M *et al.* 2014). Se consideraron como diferencialmente expresados, aquellos transcritos con $\log_{2}(\text{FC}) > 1$ y FDR (False Discovery Rate) < 0.1 .

Análisis de enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas.

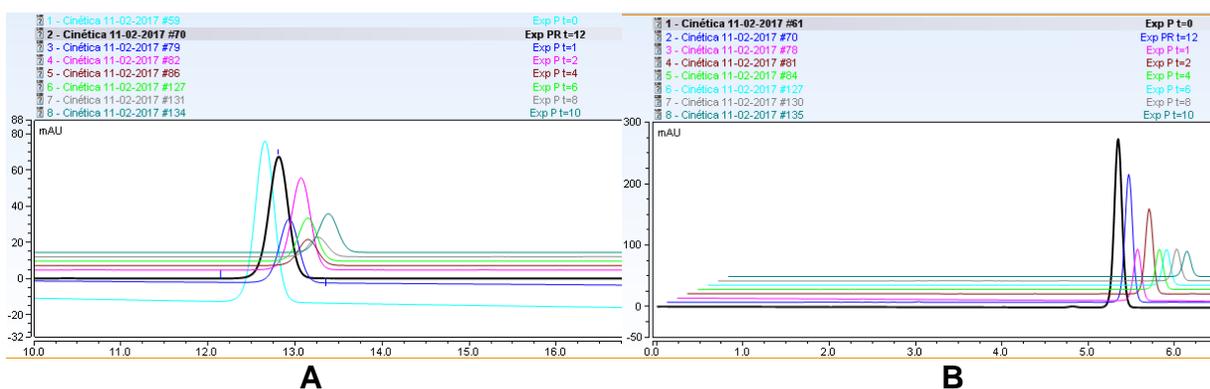
La anotación de términos de GO se realizó mediante el programa Blast2GO (Stefan-G *et al.* 2008). Para la determinación del enriquecimiento se utilizó el método computacional GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) (Aravind-S *et al.* 2005) incluido en el programa Blast2GO. Por medio de este método se obtuvieron 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 el método GSEA y se realizó el análisis de los niveles de expresión de los transcritos anotados con esos términos.

Resultados y discusión

Evaluación de la tasa de degradación y remoción de benzo [a] pireno y fenantreno en el tiempo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Elección del tiempo de extracción del ARN en A. sydowii-like.

Con el objetivo de seleccionar el tiempo de extracción del ARN del hongo *A. sydowii-like* para su análisis transcriptómico en presencia de HPAs como única fuente de carbono, se determinó el porcentaje de degradación de HPAs en el tiempo mediante un análisis por HPLC. En este trabajo se seleccionaron el benzo [a] pireno y el fenantreno, dada su abundancia en el ambiente y su empleo como indicadores para la supervisión de sitios contaminados con HPAs.

Por medio de cromatogramas obtenidos mediante HPLC, se pudo determinar, en correspondencia con el área bajo la curva representada como un valor para cada cromatograma, qué cantidad de benzo [a] pireno y fenantreno quedaba como remanente en el sobrenadante y el micelio del hongo, y de esta manera se determinó qué parte del total de HPAs había sido degradada. Los cromatogramas obtenidos son una representación de la disminución paulatina de la concentración de HPAs en el sobrenadante, así como del aumento de la cantidad de HPAs adherida al micelio en el transcurso del tiempo (figura 7). En esta figura se representan las mili-unidades de absorbancia en el eje X y en el eje Y los tiempos de retención correspondientes a cada compuesto, en el caso del benzo [a] pireno es de 12.6 minutos y del fenantreno de 5.3 minutos.



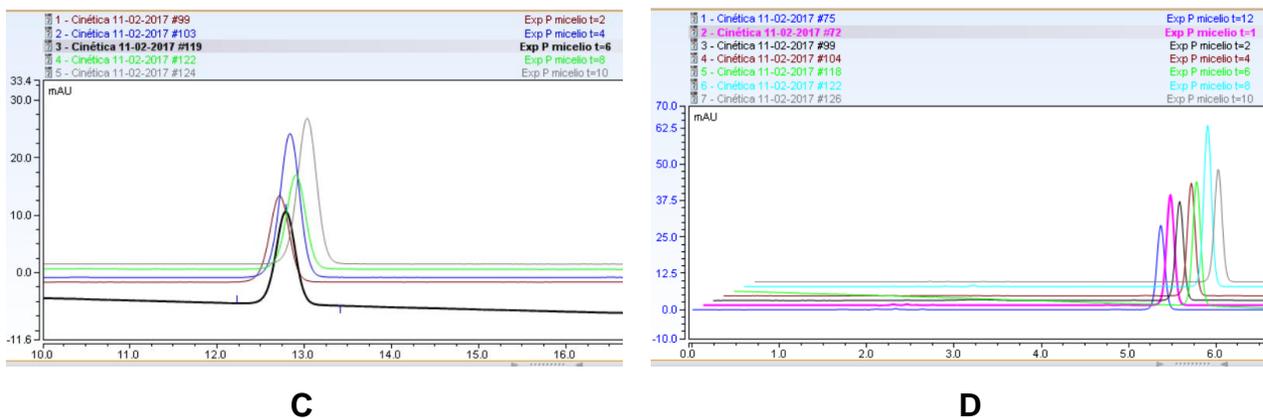
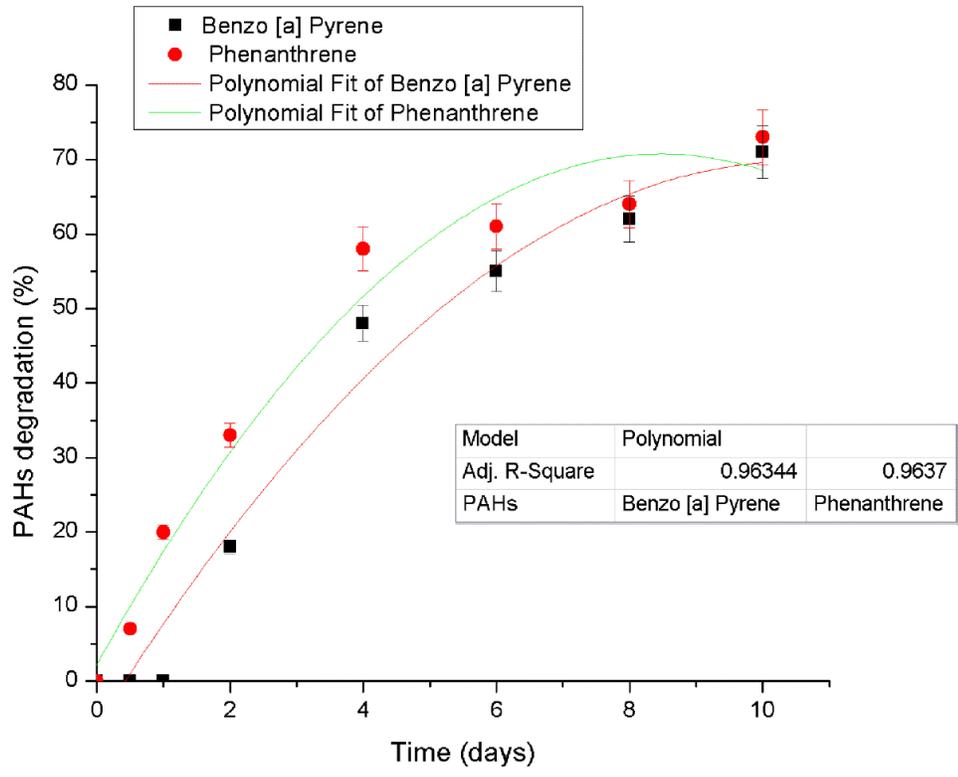
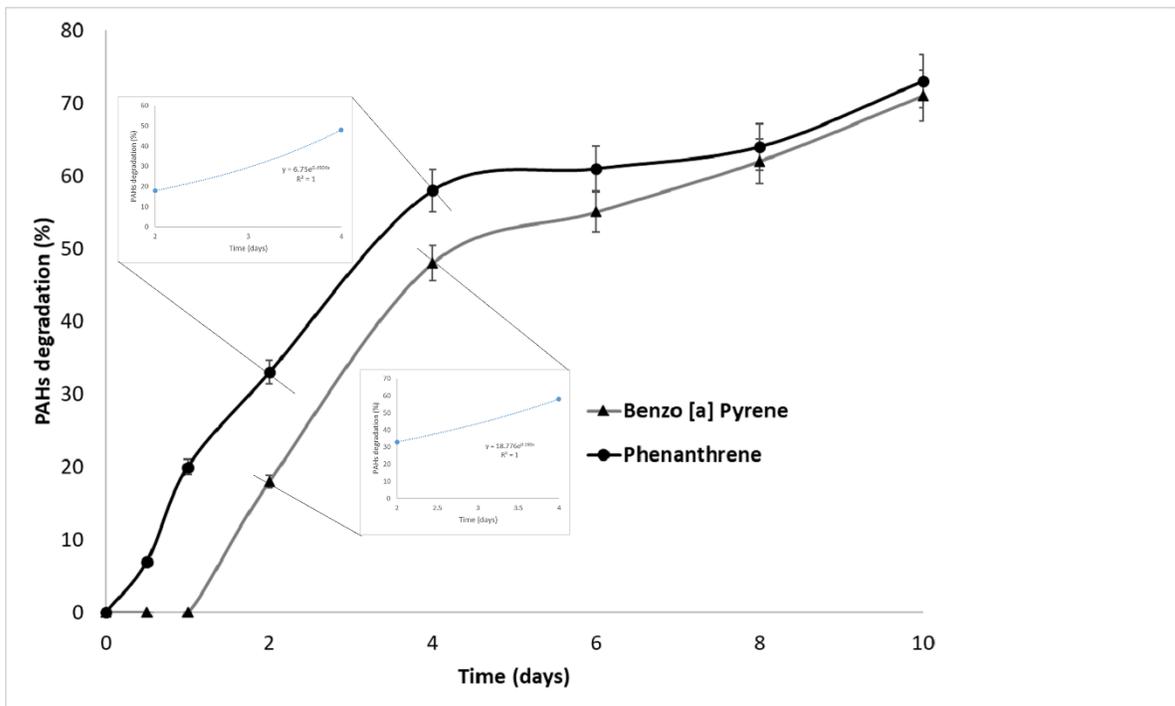


Figura 7: Cromatogramas obtenidos por HPLC del halófilo moderado *A. sydowii-like* en representación de la cantidad de HPAs presentes en el sobrenadante y el micelio del hongo. A, Benzo [a] pireno Sobrenadante; B, Fenantreno Sobrenadante, C, Benzo [a] pireno micelio, D, Fenantreno micelio

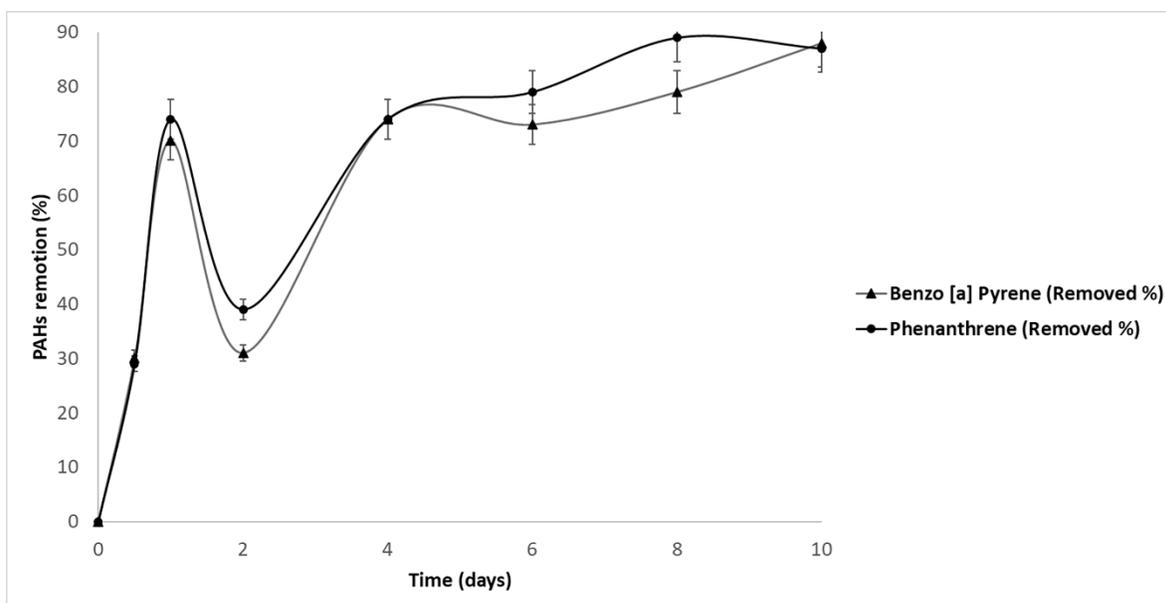
De acuerdo con los valores obtenidos de degradación y remoción de benzo [a] pireno y fenantreno por *A. sydowii-like*, se construyeron gráficos de % de degradación y remoción de HPAs en el tiempo (figura 8), donde se entiende por remoción aquello que se absorbe y se adhiere al micelio del hongo, y, por tanto, es removido del medio y por degradación aquello que solamente se absorbe y penetra al interior de la célula para ser posteriormente degradado.



A



B



C

Figura 8. Degradación y remoción de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno por *A. sydowii-like*. A, Ajuste de los valores de degradación de HPAs en el tiempo a una curva polinomial. B, Degradación de benzo [a] pireno y fenantreno en el tiempo. C, Remoción de benzo [a] pireno y fenantreno en el tiempo.

Estos resultados revelaron que la degradación y remoción de ambos hidrocarburos tiene un comportamiento similar en el tiempo a partir del día 2 de cultivo, en este sentido se alcanzó un 48 y un 58% de degradación de benzo [a] pireno y fenantreno respectivamente al día 4 (tabla 1), valores cercanos a la mitad del total de HPAs presentes en el medio, lo que está en concordancia con los resultados obtenidos por Han y colaboradores en el 2004 (Han-M *et al.* 2004) tras evaluar la degradación de fenantreno por la cepa *Trametes versicolor* 951022.

Tabla 1. Valores de degradación y remoción de benzo [a] pireno y fenantreno en el tiempo, así como de la presencia de estos HPAs en el sobrenadante y el micelio de los cultivos.

Time (days)	Benzo [a] Pyrene (%) Supernatant)	Benzo [a] Pyrene (%) Mycelium)	Benzo [a] Pyrene (%) Degraded)	Benzo [a] Pyrene (Removed %)	Phenanthrene (%) Supernatant)	Phenanthrene (%) Mycelium)	Phenanthrene (%) Degraded)	Phenanthrene (Removed %)
0	100	0	0	0	100	0	0	0
0.5	70.1 ± 1.7	30.7 ± 1.8	0	30.7 ± 1.0	71.6 ± 2.4	22.5 ± 3.9	5.9 ± 1.6	28.4 ± 1.3
1	30.6 ± 2.5	70.2 ± 1.5	0	70.2 ± 2.1	26.6 ± 2.1	54.3 ± 4.7	19.1 ± 3.4	73.4 ± 1.4
2	69.3 ± 1.3	13.1 ± 1.1	17.6 ± 1.2	30.7 ± 0.5	61.3 ± 4.2	6.3 ± 1.4	32.4 ± 2.8	38.7 ± 2.1

4	26.2 ± 1.5	26.5 ± 1.0	47.3 ± 1.2	73.8 ± 0.7	26.2 ± 2.0	16.2 ± 0.2	57.6 ± 1.7	73.8 ± 0.6
6	27.0 ± 0.4	18.3 ± 0.6	54.7 ± 0.5	73 ± 1.1	21.1 ± 3.3	18.0 ± 2.9	60.9 ± 5.1	78.9 ± 0.2
8	21.4 ± 3.8	17.2 ± 0.7	61.4 ± 2.2	78.6 ± 1.3	11.0 ± 1.0	25.1 ± 3.0	63.9 ± 2.1	88.9 ± 0.4
10	12.3 ± 0.9	17.6 ± 0.9	70.1 ± 0.9	87.7 ± 0.8	13.1 ± 1.3	14.1 ± 3.0	72.8 ± 2.2	86.9 ± 0.5

La gráfica de remoción muestra, por su parte, un máximo durante el primer día de cultivo, que disminuye al día 2. Este proceso pudiera deberse a una desorción de los HPAs adsorbidos al micelio del hongo en las primeras horas de cultivo, para comenzar posteriormente un proceso de degradación a partir del día 2. En el 2014, Iheanacho y colaboradores (Iheanacho-C *et al.* 2014), luego de analizar la degradación de hidrocarburos en una zona petrolífera en Nigeria, donde aislaron 9 especies de hongos entre los que se encontraba *Aspergillus japonicus*, reportaron que este hongo era capaz de degradar el 80% de los HPAs presentes en el medio al día 14. Wu y colaboradores (Wu-Y *et al.* 2008), por su parte, reportaron en el 2008 que el por ciento de degradación de hidrocarburos en otros ascomicetos estaba entre el 30 y el 60% a los 12 días de cultivo, mientras que los resultados obtenidos por Pernia y colaboradores en el 2012 (Pernia-B *et al.* 2012) mostraron que algunos hongos del género *Aspergillus* degradaban entre un 15 y un 45% de HPAs después de 20 días de cultivo. En nuestro estudio, se determinó que *A. sydowii-like* era capaz de degradar en 10 días hasta un 71 y un 73% de benzo [a] pireno y fenantreno respectivamente, lo cual lo hace un candidato prometedor para estudios de biorremediación.

Las gráficas de degradación de HPAs representadas en la figura 8 mostraron a su vez un carácter exponencial entre los días 2 y 4 de cultivo, lo cual se comprobó mediante un ajuste a una curva exponencial en los intervalos de tiempo mostrados en la tabla 2, siendo la región comprendida entre los días 2 y 4 de cultivo la que mejor se ajusta a este tipo de comportamiento, por lo que de acuerdo a estos resultados se seleccionó para la extracción del ARN el día 3, correspondiente a la mitad de la fase exponencial.

Tabla 2. Valores obtenidos del ajuste a una curva exponencial de la degradación de benzo [a] pireno y fenantreno en los intervalos de tiempo especificados.

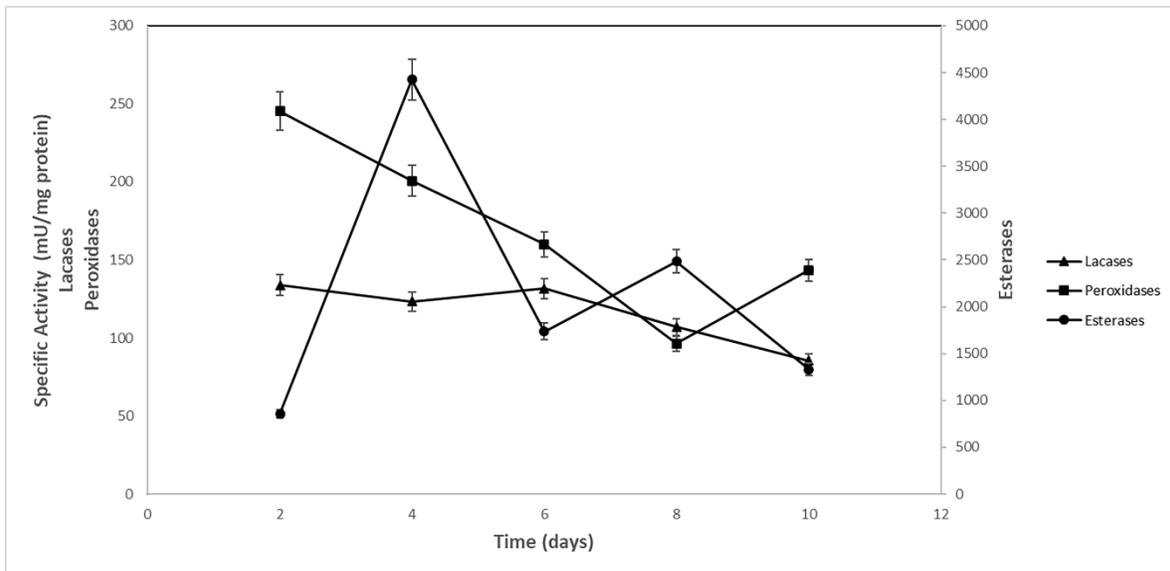
	Tiempo (días)	Ecuacion de la recta	R ²
Benzo [a] pireno	2-4	6.75e^{0.4904x}	1
	2-6	11.854e ^{0.2792x}	0.8399
	2-8	15.838e ^{0.1923x}	0.7711
	2-10	18.757e ^{0.15x}	0.7556
Fenantreno	0.5-2	5.4495e ^{0.9576x}	0.8542
	2-4	18.776e^{0.282x}	1
	2-6	26.441e ^{0.1536x}	0.8111
	2-8	31.415e ^{0.1019x}	0.7228
	0.5-10	15.104e ^{0.1922x}	0.6719
	2-10	33.701e ^{0.0843x}	0.7557

Esto concuerda con lo planteado por Zajc y colaboradores en el 2013 (Zajc-J. 2013) para la secuenciación del genoma y transcriptoma del hongo halófilo *Wallemia ichthyophaga*, así como lo reportado por Wang y colaboradores en el 2010 (Wang-B et al. 2010) para el análisis del transcriptoma de *Aspergillus oryzae*. Xie y colaboradores en el 2015 (Xie-B et al. 2015) analizaron el transcriptoma de este hongo filamentoso e igualmente afirmaron colectar el micelio transcurridas las primeras 72 horas de cultivo, para proceder a la extracción del ARN. 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 con la degradación de HPAs, por lo que, si se pretende realizar un análisis transcriptómico de *A. sydowii-like* en estas condiciones, es acertado seleccionar, para la extracción del ARN, un tiempo que se encuentre a la mitad de la fase exponencial, dado que, a diferencia de lo que ocurre en organismos procariotas, 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 eucariotas son dos procesos independientes separados en tiempo y

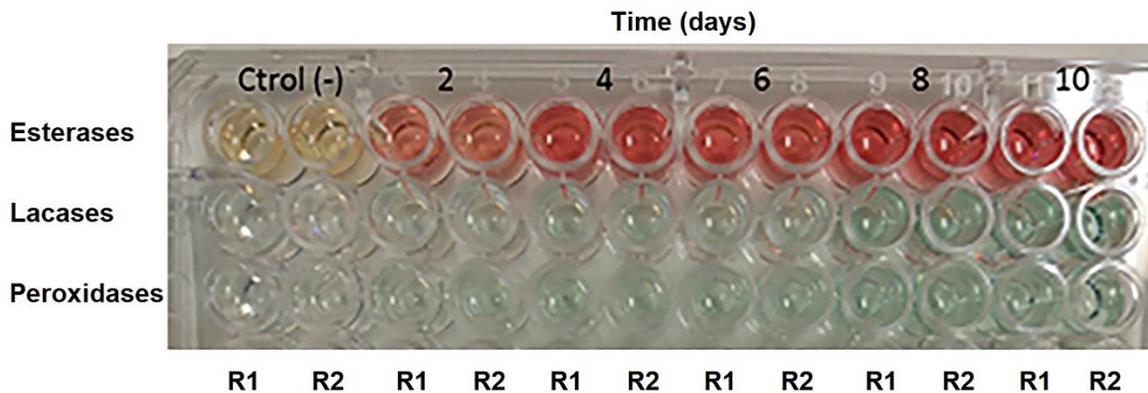
espacio, ya que la transcripción ocurre en el núcleo mientras que la traducción ocurre en el citoplasma de la célula.

Determinación de la actividad enzimática en *A. sydowii-like* en presencia de HPAs

En el presente estudio se midieron las actividades lacasas, peroxidasas y esterases en *A. sydowii-like* de acuerdo con lo descrito previamente en materiales y métodos. Los resultados obtenidos evidenciaron una mayor actividad específica de las esterases en relación con lacasas y peroxidasas en estas condiciones (figura 9).



A



B

Figura 9. Determinación de la actividad enzimática en *A.sydowii-like* en presencia de HPAs. A, Actividad enzimática específica de lacasas, peroxidadas y esterases; B, Ensayo de actividad lacasa, peroxidasa y esterasa. R1: réplica 1, R2: réplica 2.

En esta figura se puede observar que las esterases presentan un rango máximo de expresión en los tiempos 4 y 8 (figura 9). Esto se corresponde con lo planteado por Martínez y colaboradores en el 2004 (Martínez-M *et al.* 2014) donde plantea que las esterases están reportadas como enzimas activas en la hidrolización y mineralización de HPAs en las etapas tempranas de degradación de este tipo de compuestos. En relación a la expresión de lacasas, se observa un aumento paulatino entre los días 2 y 6 de cultivo, a diferencia de las peroxidadas, que disminuyen su expresión transcurridos los primeros 8 días cultivo. La determinación de estas enzimas corrobora lo planteado por Pozdnyakova y colaboradores en el 2010 (Natalia-N *et al.* 2010), en un estudio referente a la influencia de lo HPAs en la producción de enzimas ligninolíticas en el hongo *Pleurotus ostreatus* D1, donde afirmaron que el hecho de que la mayor actividad de estas enzimas sea observada a tiempos diferentes, podría estar relacionado con que las lacasas estén involucradas en las primeras etapas de degradación de los HPAs y que las peroxidadas pudieran ser necesarias para la oxidación de los productos que se obtienen de dicha degradación, ya que como se observa en la figura 9, la actividad peroxidasa comienza a aumentar luego del día 8, lo que se corresponde con lo planteado por estos autores donde mostraron que los valores de actividad peroxidasa aumentaban luego del décimo día de incubación y alcanzaban su máximo valor al día 19. Pozdnyakova y colaboradores en el 2010 (Natalia-N *et al.* 2010) plantearon, además, que la posterior disminución de las actividades enzimáticas en lacasas (luego del día 6) y esterases (luego del día 8) pudiera ser el resultado de la formación de productos tóxicos (quinonas), derivados de la degradación de los HPAs en estas condiciones.

Determinación del pH en cultivos del hongo *A. sydowii-like*

Se evaluaron los cambios de pH en MM y MM suplementado con HPAs en presencia o no del hongo *A. sydowii-like*, con el objetivo de determinar la influencia de este parámetro en los experimentos realizados en este trabajo. Como se observa en la figura 10, el pH se mantiene prácticamente constante en MM y MM suplementado con HPAs (5,5-5,8), con una ligera disminución a lo largo del tiempo, sin embargo, en MM+HPAs+ *A. sydowii-like*, el pH sufre una disminución en el tiempo llegando a ser de 4,8.

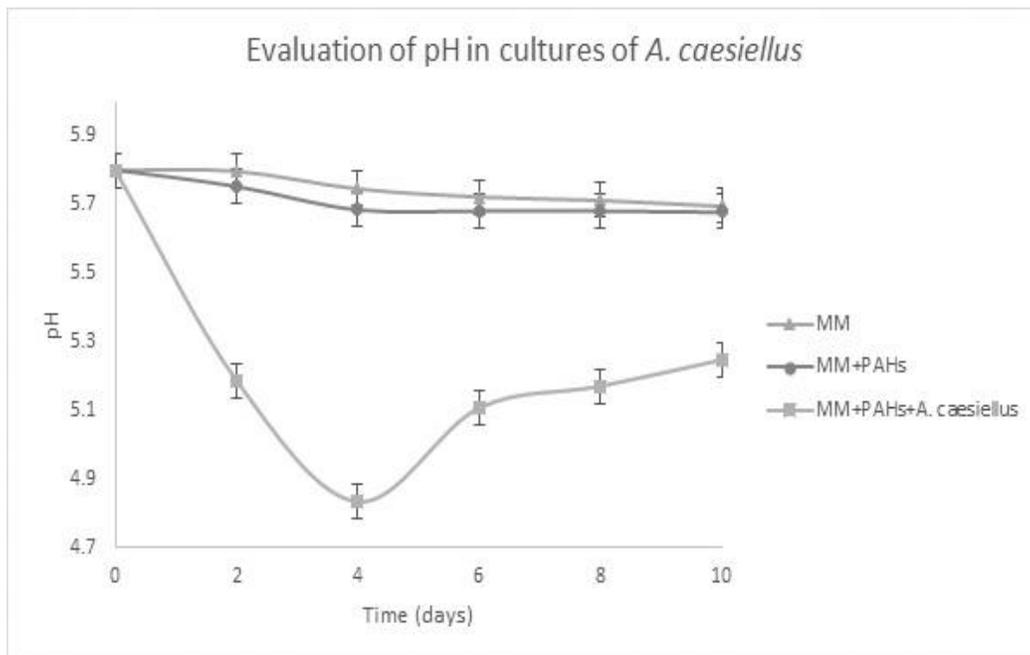


Figura 10. Evaluación del pH en presencia o no de HPAs y *A. sydowii-like*

Boldrin y colaboradores en 1993 (Boldrin-B *et al.* 1993) y Tiehm y colaboradores en 1994 (Tiehm-H. 1994) reportaron que la degradación del fenantreno por distintas especies bacterianas tiene como resultado una disminución del pH, especialmente entre los 3 a 6 días de cultivo y plantearon que esta disminución puede explicarse por la liberación de ácido 1-hidroxi 2-naftoico, un intermediario temprano del metabolismo del fenantreno. Los metabolitos del fenantreno, como el ácido ftálico o el ácido protocatequídico, provocaron una reducción del pH en el día 4 de cultivo, y a continuación un aumento de este en el día 5, debido a la asimilación de los

metabolitos por las bacterias, según plantearon. Esto pudiera explicar los resultados obtenidos en nuestro estudio (figura 10).

Evaluación del efecto de la presencia de HPAs en el crecimiento del musgo *Physcomitrella patens*

Se evaluó el crecimiento del musgo *Physcomitrella patens* en diferentes condiciones de cultivo con el objetivo de determinar si la presencia del hongo *A. sydowii-like* en el medio que contenía HPAs tenía un efecto positivo en el crecimiento de la planta. Se utilizó como control positivo al musgo crecido en medio rico Knop. Las muestras a evaluar que serían añadidas al medio de cultivo se extrajeron con hexano, al igual que ocurrió con la preparación de las muestras para HPLC descrito en el capítulo materiales y métodos: “Evaluación de la remoción de benzo [a] pireno y fenantreno por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). Elección del tiempo de extracción del ARN de *A. sydowii-like*”. Por este motivo, se evaluó el efecto del hexano en el crecimiento del musgo con respecto al control positivo (medio Knop) y se observó una disminución en el crecimiento del musgo asociada a la presencia del hexano (Figura 11).

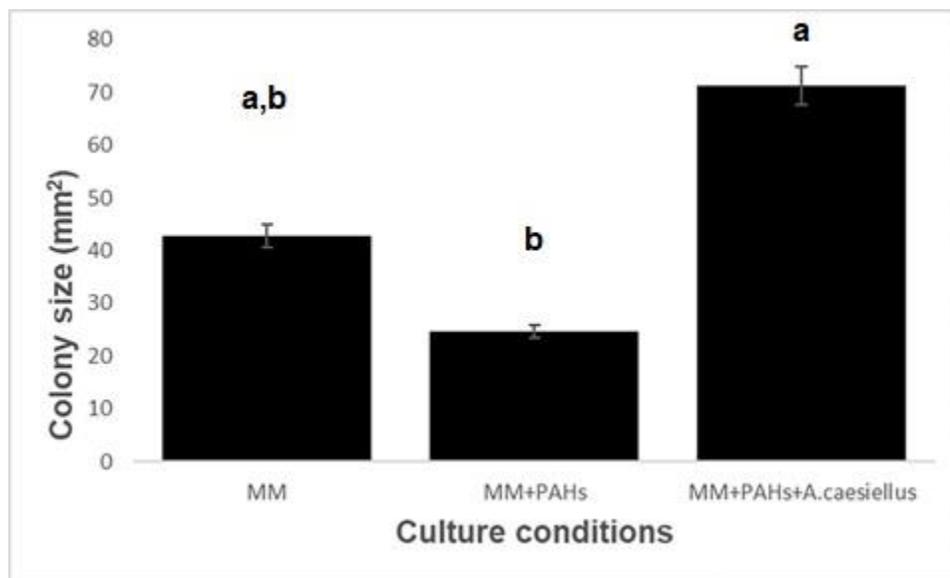


Figura 11. Evaluación del crecimiento del musgo *Physcomitrella patens* en presencia de diferentes condiciones de cultivo. Letras iguales, diferencias no significativas; letras diferentes, diferencias significativas.

Como se observa en la figura 11, se produce un aumento en el crecimiento de la planta cuando se añade *A. sydowii-like* al medio de cultivo, en relación a cuando sólo se cultiva el musgo en presencia de HPAs, lo que sugiere que *A. sydowii-like* es capaz de remover este tipo de compuestos y por tanto sería de gran utilidad para la biorremediación de sitios contaminados con HPAs, que pudieran causar una disminución del crecimiento de este tipo de plantas. La comparación del tamaño de la colonia acorde a las diferentes condiciones de cultivo, se realizó mediante un ANOVA de clasificación simple ($\alpha=0,05$; g.l.e.=24), el cual reveló que existen diferencias significativas en el tamaño de la colonia cuando el musgo es crecido en presencia vs en ausencia de *A. sydowii-like*.

Alkio y colaboradores en el 2005 (Alkio-M *et al.* 2005) estudiaron la respuesta al estrés inducido por la presencia de HPAs en el modelo *Arabidopsis thaliana*. Estos autores reportaron que las plantas tratadas con fenantreno presentaban una reducción del crecimiento de las raíces y del tamaño y número de hojas.

La frecuencia, el número de eventos de muerte celular y las lesiones en las hojas dependían de la concentración de fenantreno en el medio y de la duración de la exposición al mismo. Las plantas expuestas al fenantreno comenzaban a desarrollar síntomas después de 3-6 horas de exposición, y el número de plantas que presentaban síntomas aumentaba con el tiempo.

La disminución del tamaño en las plantas cultivadas con fenantreno podía atribuirse a una disminución de la tasa de división celular producto de la presencia de este compuesto en el medio de cultivo.

Extracción de ARN total

Se realizó la extracción de ARN del cultivo de *A. sydowii-like* crecido en presencia de benzo [a] pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas y se obtuvieron rendimientos entre 560 y 1600 ng/ul de ARN. Se pudo determinar el RIN en las muestras analizadas mediante electroforesis capilar, además en los electroferogramas se puede observar que las señales correspondientes a los fragmentos 28S y 18S son intensas y estrechas y en todos los casos la señal del ARN 28S es mayor que la del 18S (Figura 12b) lo cual indica poca degradación de la muestra. Se obtuvieron muestras de las siguientes condiciones en triplicados: En presencia de glucosa o en presencia de HPAs como fuente de carbono.

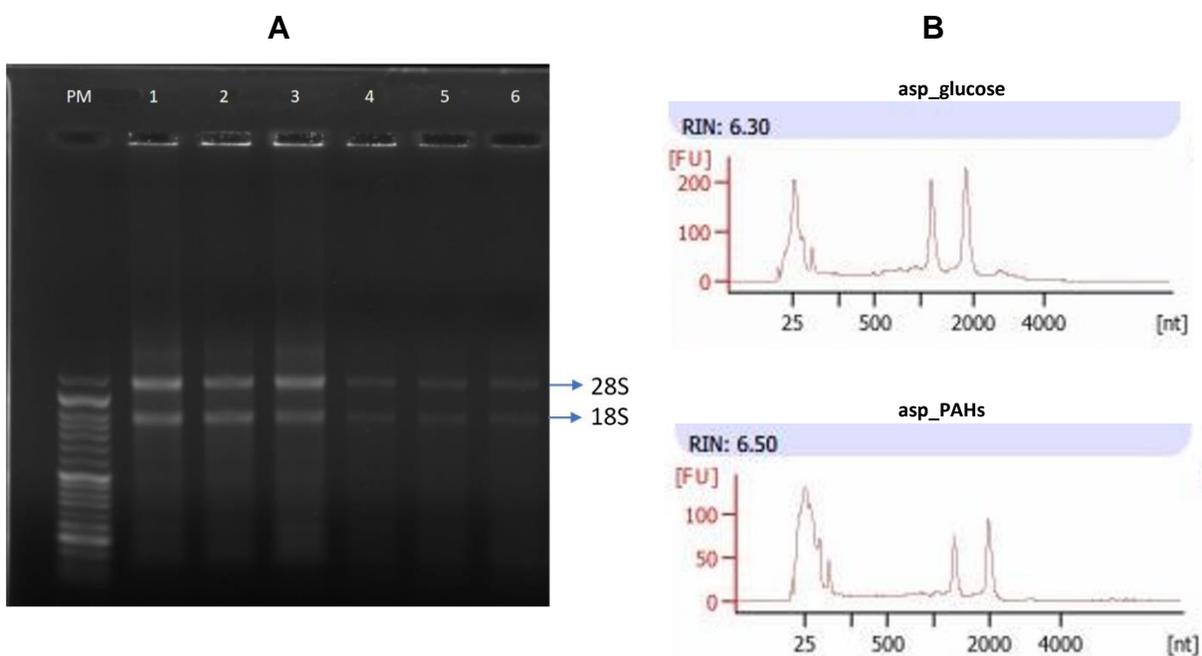


Figura 12. Extracción de ARN total del micelio de *A. sydowii-like* cultivado en paja de trigo. a) Evaluación de la calidad del ARN mediante electroforesis en agarosa (1%). 1, 2 y 3, MM+ glucosa+ *A. sydowii-like*, 4,5 y 6, MM+ HPAs+ *A. sydowii-like*. b) Electroferograma de las muestras de ARN total para la determinación del RIN.

Análisis de calidad de la secuenciación RNA-Seq

El control de calidad de las lecturas obtenidas mediante RNA-seq involucra ciertos parámetros entre los que se encuentran: el análisis de calidad de las secuencias, el contenido de GC en las muestras, la presencia de adaptadores, así como de secuencias sobrerrepresentadas con el objetivo de detectar posibles errores en la

secuenciación. Este análisis reveló que la calidad media de la secuenciación no disminuye por debajo de valores de 20 (escala Phred33: calidades de 0 a 41), los cuales son considerados como los mínimos para esta escala (Figura 13), asegurando así que no se requiere procesar las secuencias para eliminar regiones de baja calidad.

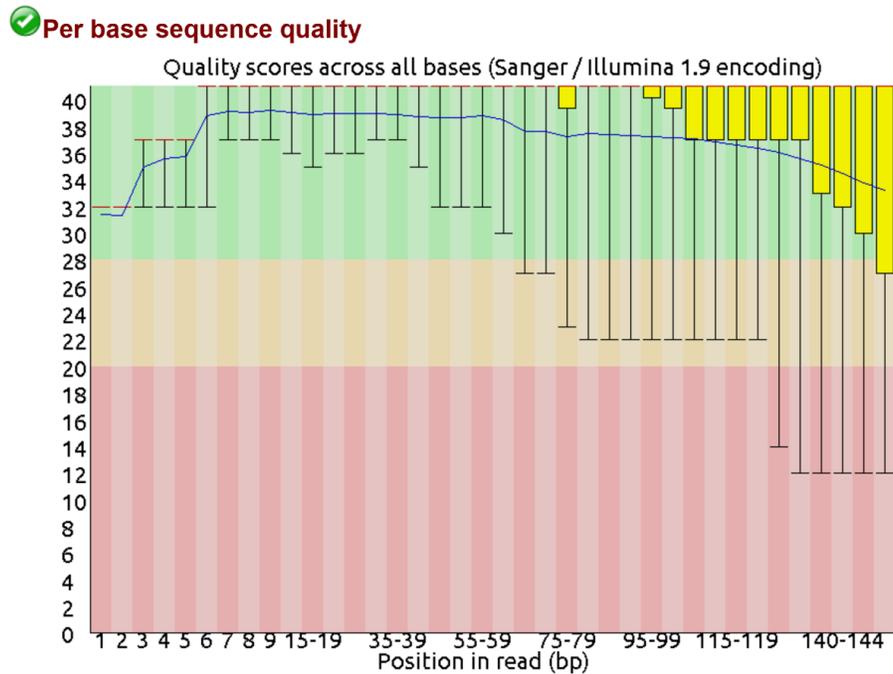


Figura 13. Evaluación de calidad de la secuenciación de las librerías. Calidad promedio de secuenciación por posición de las lecturas (Gráfica representativa de las 6 librerías secuenciadas) (FastQC Software).

Sin embargo, se encontraron un gran número de secuencias sobrerrepresentadas, así como adaptadores en las secuencias. Por este motivo se decidió realizar un preprocesamiento de las lecturas y de esta manera mejorar la calidad futura del alineamiento (Figura 14).

Overrepresented sequences

Sequence	Count	Percentage	Possible Source
ATCGAAGAGCGTGTGTAGGAAAGAGTGTAGATCTCGGTGCTCCCGT	585823	4.282778351518999	Illumina Single End PCR Primer 1 (100% over 50bp)
CTAACATCTACGCGAGTGTTCGGGTGTCAACCCGTACGCGCAGTGAAG	315734	0.836219879370004	No Hit
AGAAAGTGTGTGTGACGCAATGTGATTTCTCCCGAGTCTCTGATGTCA	91979	0.479015187065651	No Hit
GTCCTAACATCTACGCGAGTGTTCGGGTGTCAACCCGTACGCGCAGTGA	80996	0.5852247442640265	No Hit
GGGATACCCGCTGAACCTAAGCAATATCAATAGCGGAGGAAAGAAACCA	57382	0.41492221487255234	No Hit
CAGAAAGTGTGTGTGACGCAATGTGATTTCTCCCGAGTCTCTGATGTCT	53917	0.3838665744807879	No Hit
GCTGACCTAAGCATATCAATAGCGGAGGAAAGAAACCAACCGGATTT	49153	0.35514780797582224	No Hit
GGTAGGGATACCCGCTGACCTAAGCATATCAATAGCGGAGGAAAGAA	47523	0.3431704815257461	No Hit
GTCAAAGTGAAGAAATTCACCAAGCGCGGTAAACGCGGAGTAACTA	38678	0.27946222848837805	No Hit
GGGATACCCGCTGAGCAGGAGGCACTAGCCGGCAACCGCGCGCC	32147	0.23227341379791178	No Hit

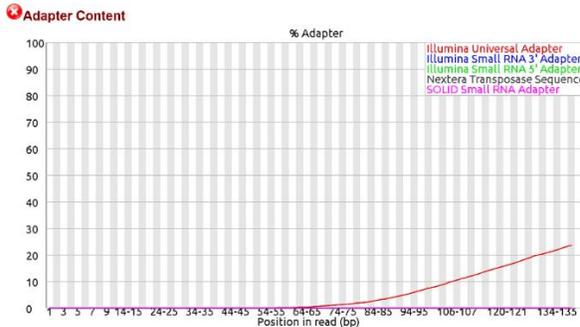


Figura 14. Evaluación de calidad de la secuenciación de las librerías. En el panel superior se muestra el número de secuencias sobrerrepresentadas, mientras que en el inferior se encuentran los gráficos del % de adaptadores en las secuencias. En el panel izquierdo se muestran las secuencias no procesadas y en el derecho las sometidas a procesamiento (FastQC Software).

Ensamblaje de novo y anotación funcional

Una vez llevado a cabo el análisis de calidad de las lecturas, junto con la respectiva depuración de estas, se procedió al ensamblaje de novo. El transcriptoma contiene 33560 fragmentos ensamblados (*contigs*) los cuales pertenecen a 28751 posibles estructuras génicas (Tabla 3), donde el 50% de las bases ensambladas se encuentran en contigs de al menos 2198 bases de longitud.

Tabla 3. Estadísticos de caracterización del ensamblaje de novo del transcriptoma (Trinity Software).

```
#####  
Total trinity 'genes': 28751  
Total trinity transcripts: 33560  
Percent GC: 51.55  
  
#####  
Stats based on ALL transcript contigs:  
#####  
  
Contig N10: 5978  
Contig N20: 4274  
Contig N30: 3404  
Contig N40: 2757  
Contig N50: 2198  
  
Median contig length: 508  
Average contig: 1118.36  
Total assembled bases: 37532214
```

Del total de transcritos codificantes, el 55% se pudo anotar funcionalmente mediante BLAST contra las bases de datos de UniProtKB (Swiss-Prot y TrEMBL). Esta pobre anotación funcional determina que posiblemente muchos de los mecanismos involucrados en los procesos biológicos estudiados no pueden ser descritos con precisión. De hecho, aproximadamente el 40-45% de los transcritos diferencialmente expresados (DE) no tienen anotación funcional, lo cual implica la pérdida de una gran cantidad de información, puesto que no se puede analizar en el contexto de los conocimientos actuales de la biología de hongos filamentosos. La anotación en términos GO de los transcritos reveló que los principales procesos biológicos regulados son los procesos metabólicos y celulares. A nivel de función molecular se encuentran reguladas principalmente las actividades catalíticas y de “unión”, mientras que a nivel de componente celular tenemos procesos celulares en general y a nivel de membrana (Figura 15)

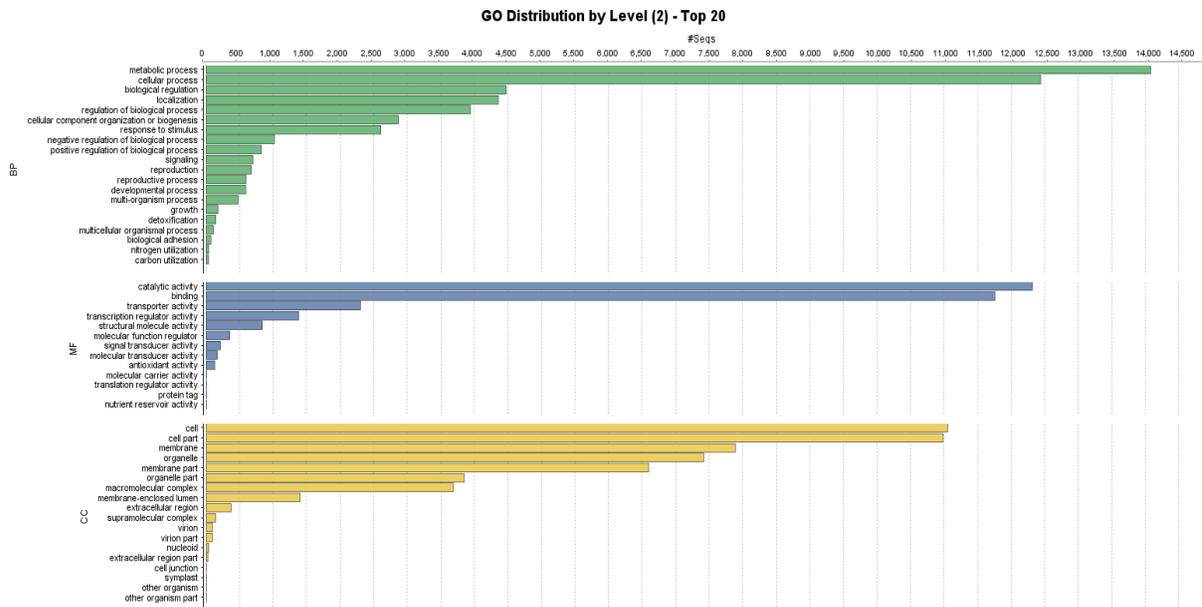


Figura 15. Distribución en términos GO de los transcritos anotados (Blast2GO Software).

Análisis de expresión diferencial de genes

Para realizar el análisis de expresión diferencial inicialmente se filtraron los transcritos con bajo número de conteos ($cpm < 1.5$) en al menos tres réplicas (Figura 16), para aumentar la fortaleza estadística de la predicción de genes diferencialmente expresados (Conesa *et al.* 2016). Como se observa en la Figura 16, la eliminación de estos transcritos permitió homogenizar los niveles de lecturas por transcrito en las muestras, reduciendo la variabilidad asociada al conteo, lo que previene la aparición de falsos positivos. La eliminación de estos transcritos no afecta los genes identificados como DE por los métodos utilizados posteriormente.

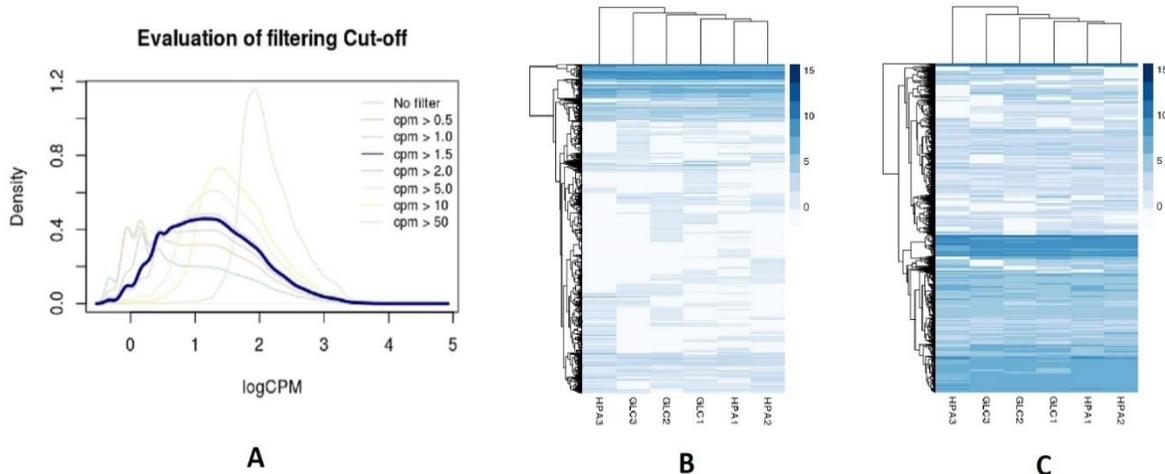


Figura 16. Filtrado de transcritos con bajo número de conteos en las librerías. Evaluación del cutoff para filtrar los transcritos con bajo número de conteos por millón (CPM) (A). Efecto de la eliminación de transcritos con bajo nivel de lecturas en las librerías en el perfil de expresión de genes y la discriminación entre grupos experimentales mediante clustering no supervisado (B, no filtrado; C, filtrado) (Bioconductor)

La normalización de los datos mediante el método RUVSeq permitió reducir la variabilidad experimental entre las muestras de un mismo grupo puesto que, como se puede observar en el gráfico del análisis de componentes principales (PCA), las muestras de un mismo grupo son más cercanas entre ellas que con muestras de otros grupos. Además, se mantuvo la variabilidad de los datos, dado que, aunque la variabilidad contenida en cada componente principal (PC) varía, la variabilidad acumulada entre los PC1 y PC2 se mantiene constante (Figura 17). Con este método se logra la normalización de la expresión relativa de los genes (RLE, del inglés Relative Log Expression), lo cual es necesario para la comparación de los valores de expresión entre diferentes muestras.

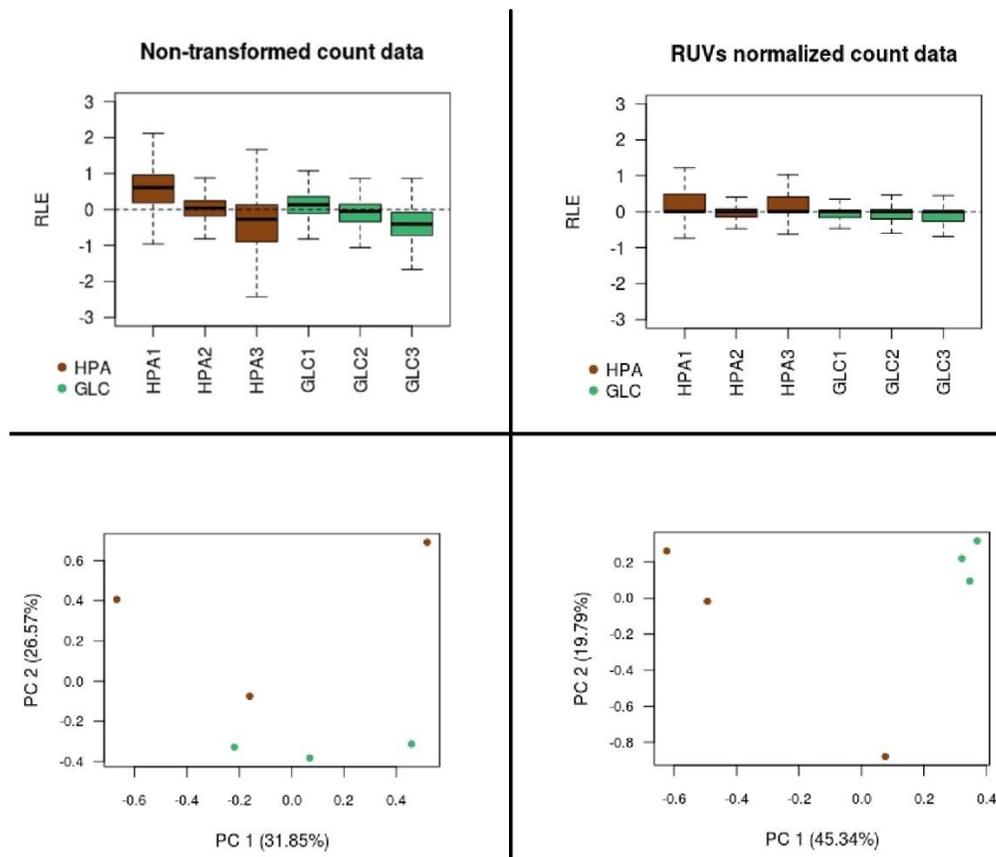


Figura 17. Normalización de los datos de expresión (conteos) mediante el método RUVs. En el panel superior se muestra la expresión relativa logarítmica (RLE) por librería, mientras que en el inferior se encuentran los gráficos del análisis de Componentes Principales (Bioconductor).

El algoritmo de estimación de la DE utilizado (DESeq2) realiza una normalización posterior que toma en cuenta el sesgo producido en la distribución de conteos por la expresión diferencial relativamente alta de un número pequeño de transcritos en las bibliotecas. Todos estos pasos de normalización permiten la comparación de los niveles de expresión entre transcritos de diferentes muestras.

Además de analizar el efecto de la normalización en los resultados de expresión diferencial de genes, se decidió seleccionar el algoritmo DESeq2 puesto que es mucho más conservador en la estimación de transcritos DE, lo cual resulta del hecho de que es más estricto en el control del FDR (Love-M *et al.* 2014).

Por este método se lograron identificar 170 transcritos regulados positivamente (up regulated) y 69 regulados negativamente (down regulated) ($\log_{2}FC > 1$; $padj < 0.1$) (Figura 18).

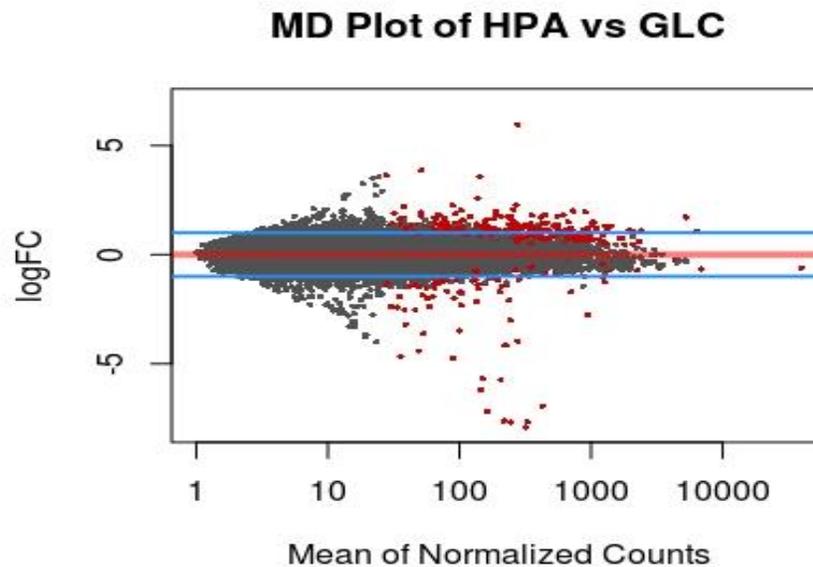


Figura 18. Identificación de transcritos DE mediante el método DESeq2 ($\logFC > 1$; $\text{padj} < 0.1$) (Bioconductor).

Enriquecimiento de términos GO y vías metabólicas

El enriquecimiento de términos GO para el conjunto de genes DE en presencia de HPAs vs en presencia de glucosa muestra que los principales procesos biológicos regulados son: el ensamblaje de componentes celulares (ensamblaje del complejo de citocromos, ensamblaje del proteasoma y ensamblaje de la cadena respiratoria mitocondrial), la organización de organelos (importe de proteínas a la matriz mitocondrial así como la organización de la membrana mitocondrial) y procesos celulares relacionados con el metabolismo del nitrógeno (biosíntesis de tiamina) (Figura 19).

A nivel de función molecular se observó la presencia de actividad catalítica en varias enzimas: isomerasas, transferasas y oxidorreductasas (Figura 20).

Adicionalmente se realizaron mapas de las diferentes rutas metabólicas (vía KEGG) en la que estuvieron involucrados los transcritos DE. Varias de las enzimas anotadas, correspondientes a aquellos transcritos regulados positivamente, estuvieron involucradas en el proceso de fosforilación oxidativa a nivel de membrana mitocondrial interna (Figura 21).

En este caso, la presencia de genes que se regulan positiva y negativamente apunta a que en *A. sydowii-like*, los procesos biosintéticos se encuentran desfavorecidos en presencia de HPAs, tal es el caso de la regulación positiva de la biosíntesis de metabolitos secundarios, así como la ruta de las pentosas fosfato, por solo citar algunos (Figura 22), mientras que los procesos relacionados con la respiración celular se encuentran favorecidos, de acuerdo a la evidencia mostrada anteriormente en relación a los procesos regulados positivamente a nivel de membrana mitocondrial. Esto se corresponde con lo planteado por Wolfgang-F y colaboradores en el 2005 (Wolfgang-F *et al.* 2005) refiriéndose a los mecanismos de degradación aeróbica de compuestos orgánicos recalcitrantes (Figura 23), donde en un caso, puede verse favorecida la biosíntesis de biomasa celular a partir de precursores del metabolismo central como es el caso del acetyl-CoA, el succinato y el piruvato, utilizados vía gluconeogénesis para la producción de azúcares, o como es el caso en nuestro experimento, se favorece la respiración aeróbica donde se degradan este tipo de compuestos orgánicos recalcitrantes hasta CO₂ y H₂O. Tiene sentido, además, que la ruta de las pentosas fosfato se encuentre desfavorecida puesto que mediante esta vía se obtiene el poder reductor en forma de NADPH, necesario para el metabolismo anabólico.

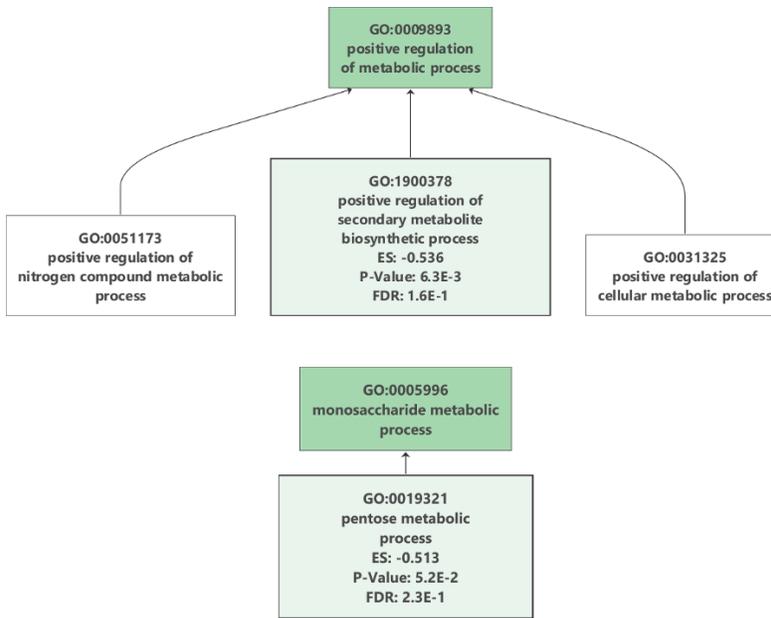


Figura 22. Enriquecimiento de términos GO en algunos genes DE (regulados negativamente) en presencia de HPAs, relacionados con procesos metabólicos de síntesis. Se muestran los términos GO enriquecidos a nivel de proceso biológico, con un valor $p < 0.1$ del método computacional GSEA en el software Blast2GO (Blast2GO Software).

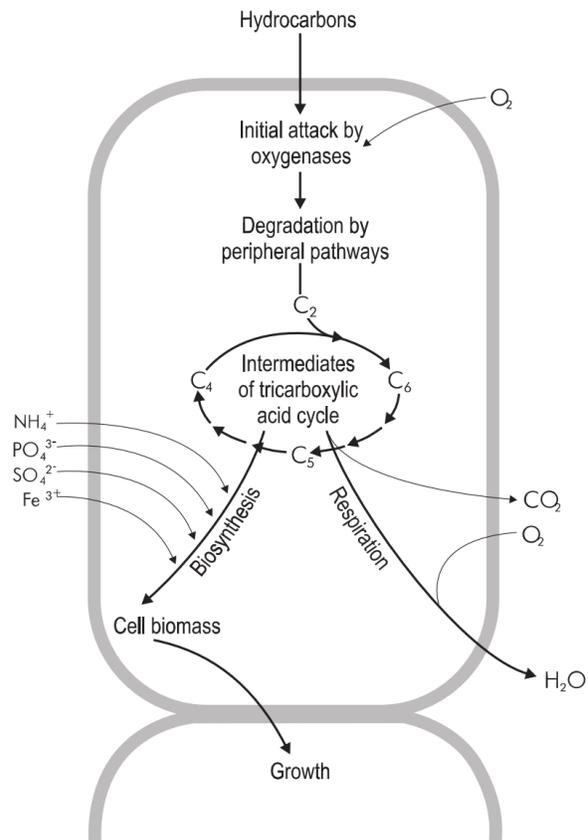


Figura 23. Ruta principal de degradación aeróbica de hidrocarburos (Wolfgang-F et al. 2005).

Transcritos relacionados con la degradación de HPAs en hongos.

En nuestro estudio se identificaron un conjunto de transcritos relacionados con la degradación de HPAs en hongos. En la figura 24 se observan los niveles de expresión en TPM en presencia de HPAs vs glucosa de aquellos transcritos seleccionados como “modelos”, ya que han sido implicados directamente con los mecanismos de degradación de HPAs en hongos. En este caso, se observaron diferencias significativas en la expresión de esterasas intracelulares, siendo este número mayor en presencia de HPAs que en presencia de glucosa. Como se verá en el siguiente capítulo, algunas de estas se encontraron DE expresadas en presencia de HPAs, lo que es de gran interés en nuestro estudio, ya que no existen reportes de este tipo de enzimas asociadas a la degradación de HPAs en hongos en condiciones hipersalinas. En la figura 24 se agruparon además el conjunto de enzimas de estudio en 2 grupos: extracelulares e intracelulares. A nivel extracelular se ha visto que las lacasas y las peroxidasas juegan un papel importante en la detoxificación de HPAs. Estas enzimas llevan a cabo la oxidación de este tipo de contaminantes produciendo radicales arilos con la consecuente generación de quinonas (Tayssir-K *et al.* 2016). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el conjunto de estas enzimas expresadas en HPAs vs glucosa, sin embargo, como veremos en el siguiente capítulo, se encontró una cloroperoxidasa DE en estas condiciones. En el caso del conjunto de enzimas intracelulares tampoco se encontraron diferencias significativas en presencia de HPAs vs glucosa, a excepción de las esterasas, como se mencionó anteriormente.

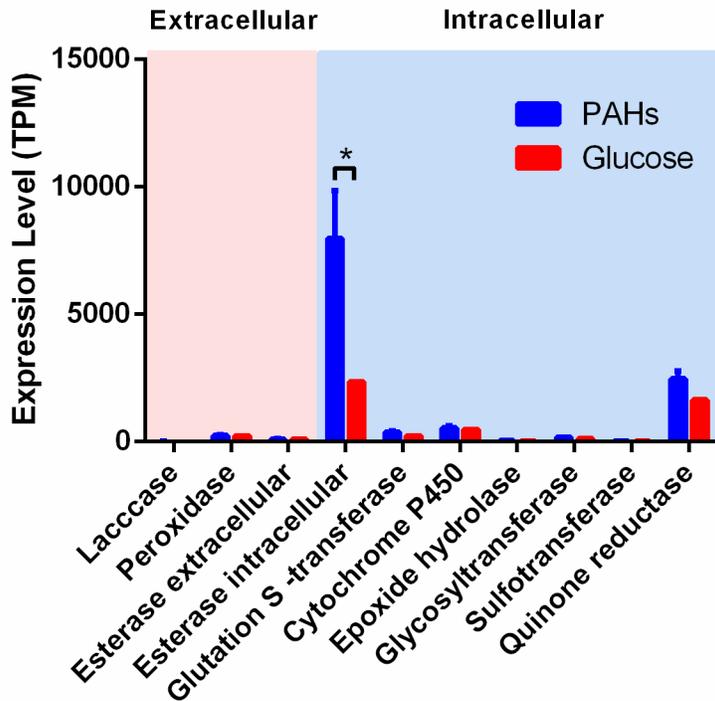


Figura 24. Niveles de expresión de los transcritos encontrados en el transcriptoma, relacionados con la degradación de HPAs en *A.sydowii like*.

Transcritos DE relacionados con la degradación de HPAs en hongos.

Del total de transcritos DE, varios de ellos se encuentran relacionados con la degradación de HPAs en hongos (Figura 25) (Aranda-E *et al.* 2016) (Vazquez-D *et al.* 2001), tal es el caso de la enzima Glutathión-S-transferasa (GSTs), involucrada en procesos de detoxificación. Este tipo de enzimas, al ser capaces de combinar el glutatión con otras moléculas previamente oxidadas, generan productos menos tóxicos y más solubles. Además, las GSTs son proteínas citosólicas, mitocondriales o microsomales involucradas en la defensa contra especies reactivas del oxígeno (ROS) debido a su actividad thioltransferasa y peroxidasa (Anne-T *et al.* 2011). Otra enzima relacionada es la NADH ubiquinona oxidorreductasa, NADH deshidrogenasa o complejo I, es un gran complejo enzimático que se encarga, entre otras funciones, de la degradación de HPAs transformando compuestos tóxicos como las quinonas en semiquinonas (Aranda-E *et al.* 2016). En un estudio realizado por Wang y colaboradores en el 2016 (Lingwen-W *et al.* 2016) se identificaron aproximadamente 6 genes relacionados

con la degradación de HPAs, cuando estudiaban la capacidad de una comunidad microbiana para degradar este tipo de compuestos en suelos contaminados con hidrocarburos; entre ellos se identificó la enzima 3-hidroxiantranilato 3,4-dioxigenasa, DE expresada en nuestro estudio.

Otra proteína DE en presencia de HPAs fue el citocromo c, la cual ha sido utilizada como biocatalizador en la oxidación de tiofenos y organosulfuros para formar sulfóxidos (Vazquez-D *et al.* 1993) y se ha comprobado que es capaz de catalizar reacciones oxidativas tipo citocromo P450, epoxidaciones, etc (Akasaka-R *et al.* 1993). De acuerdo con Torres y colaboradores en 1995, el citocromo c es capaz de oxidar PAHs tales como el antraceno y el pireno, para formar antraquinona y 1,8 pirenodiona, respectivamente, donde la accesibilidad del peróxido de hidrógeno al sitio catalítico de la enzima parece jugar un papel importante en la actividad y estabilidad de la biocatálisis (Eduardo-T *et al.* 1995), por lo que se ha reportado además como una enzima con actividad tipo peroxidasa (Vazquez-D *et al.* 1999).

Las quinonas, productos tóxicos de la degradación de HPAs pueden sufrir reducción enzimática de un electrón mediada por NADPH-CYP450 reductasa, NADH-citocromo b5 reductasa (microsomal) y NADH-ubiquinona oxidorreductasa (mitocondrial), resultando en la formación de semiquinonas. Las semiquinonas pueden ser tóxicas *per se* o pueden reaccionar con el oxígeno molecular formando un radical superóxido y regenerando la quinona parental, la cual está disponible entonces para ser reducida y atravesar nuevamente un ciclo redox futil. El resultado neto de este ciclo redox es un estrés oxidativo y la generación de ROS. Alternativamente se ha considerado la reducción enzimática de dos electrones como otra vía de detoxificación, donde la hidroquinona formada, puede conjugarse con ácido glucurónico o sulfato para su posterior excreción, evitando así la formación de ROS (Maser-S *et al.* 2007). En nuestro estudio se identificaron dos transcritos distintos DE expresados, ambos codificando deshidrogenasas reductasas de cadena corta (SDR), descrita como una de las enzimas capaces de catalizar este tipo de reacción. Se encontraron también, DE expresadas, varios tipos de esterasas tales como carboxylesterasas y acyl- tioesterasas que pudieran

estar involucradas igualmente en la degradación de HPAs. Aunque no existen prácticamente estudios en este tema, se ha visto que este tipo de enzimas son capaces de hidrolizar grupos ésteres en su correspondiente alcohol y ácido carboxílico (Jason-M *et al.* 2016), por lo que son capaces de detoxificar compuestos xenobióticos que contienen este tipo de grupo funcional. De acuerdo con Grunden y colaboradores en el 2013, la degradación de compuestos tóxicos como los generados en la producción de biocombustibles podría ser más eficiente si se empleasen este tipo de enzimas procedentes de un organismo halófilo, lo que favorecería la biorremediación de aquellos ambientes marinos contaminados con HPAs (Grunden-H *et al.* 2013).

En relación con la presencia de enzimas extracelulares con capacidad para degradar HPAs, se encontró expresada diferencialmente una cloroperoxidasa. Esta enzima extracelular es capaz de catalizar innumerables reacciones químicas tales como deshidrogenaciones tipo citocromo P450, peroxigenaciones, así como oxi y epoxigenaciones de dobles enlaces en compuestos aromáticos. Se ha comprobado que esta enzima es capaz de oxidar sulfuros heterocíclicos y remover HPAs como el dibenzotieno (Vazquez-D *et al.* 2001).

Otra enzima DE en nuestro estudio fue la nucleósido difosfato quinasa, en este caso, no asociada a los mecanismos de degradación de HPAs sino, de acuerdo a Liu y colaboradores en el 2014, relacionada con la respuesta al estrés oxidativo provocado por la exposición de *Arabidopsis thaliana* a HPAs tales como fenantreno (Hong-L *et al.* 2014). En respuesta al estrés oxidativo también se encontró una sobreexpresión de la enzima peptidilprolil isomerasa, cuya función fue reportada por Herbs y colaboradores en el 2013 al estudiar el proteoma del bacilo gram-negativo *Pseudomonas fluorescens* durante la degradación de naftaleno. Igualmente, en nuestro transcriptoma se encontró DE una tioredoxina. Esta enzima se ha asociado a diversos procesos celulares como la respuesta al estrés oxidativo en comunidades microbianas expuestas a fenantreno (Alexandre-D *et al.* 2012). En la figura 25 se pueden observar los niveles de expresión en TPM de las enzimas anteriormente referidas, divididas en 2 grupos: aquellas

relacionadas con los mecanismos de degradación de HPAs mencionados y aquellas asociadas a la respuesta al estrés de *A. sydowii-like* en estas condiciones.

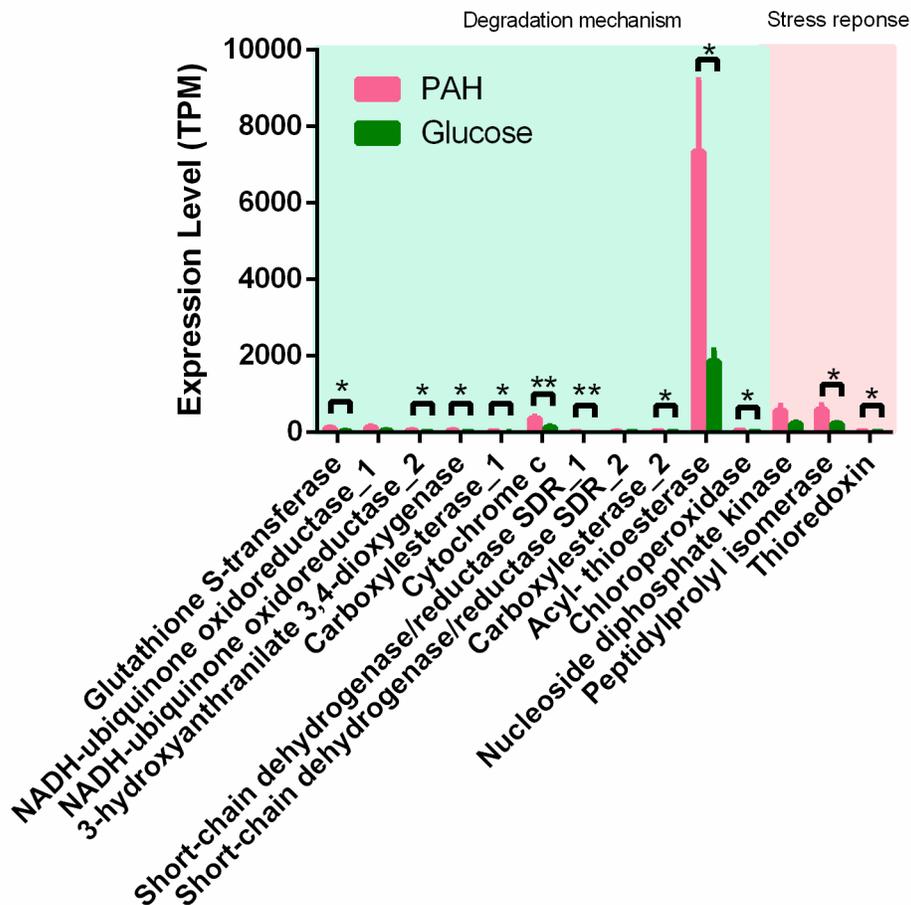


Figura 25. Niveles de expresión de los transcritos DE relacionados con la degradación y respuesta al estrés de *A. sydowii like* en presencia de HPAs.

En este estudio se detectaron un total de 19 genes DE asociados a estrés oxidativo en presencia de HPAs, de estos, 11 relacionados con la reparación y prevención de daño al genoma del hongo, como es el caso de las histonas H4 y H2A, el complejo ATR-ATRIP, los dominios DNAJ y TPR, así como la proteína mug134 para la estabilidad del ARNm, entre otras. Así mismo se encontraron 10 genes DE asociados al transporte intracelular de proteínas hacia mitocondria principalmente, lo que está en correspondencia con el incremento de la actividad

metabólica a nivel mitocondrial. Un total de 20 genes DE se asoció a la degradación de HPAs, anteriormente mencionamos aquellos que en la literatura se han relacionado directamente con la remoción de este tipo de compuestos.

Actualmente existen pocos estudios donde se describan las rutas de degradación más probables de HPAs en hongos, es por este motivo, que basados en las enzimas DE en nuestro estudio, relacionadas con la degradación de HPAs, recreamos sus posibles rutas de degradación, tanto a nivel intra como extracelular y tanto a nivel citoplasmático como mitocondrial, una vez que estos compuestos son capaces de penetrar al interior de la célula. Verdin y colaboradores en el 2004 estudiaron el proceso involucrado en la entrada de HPAs (antraceno, pireno y benzo [a] pireno) al interior de la célula del hongo *Fusarium solani* (Verdin-A *et al.* 2004). En este estudio se demostró que la entrada de los HPAs presentes en el medio fue un fenómeno pasivo, no dependiente de ATP ni correlacionado con un proceso específico de transporte. Estos resultados pudieran explicar el hecho de que en nuestro transcriptoma tampoco se encontraran transportadores a nivel de membrana extracelular expresados diferencialmente. En el medio extracelular, relacionadas con la degradación de HPAs, solo se encontró una cloroperoxidasa DE, enzima capaz de oxidar este tipo de compuestos llevando a cabo reacciones tipo citocromo P450, mientras que, a nivel intracelular, se encontraron un mayor grupo de enzimas DE (Figura 26), lo que señala que esta puede ser considerada como la vía principal de degradación de HPAs en *A.sydowii-like*, en las condiciones descritas en este estudio. En la figura 26, se muestran las rutas de degradación citoplasmática y mitocondrial de HPAs y los posibles intermediarios formados producto de la acción de las enzimas DE, mencionadas anteriormente en este trabajo, lo que a su vez se corresponde con las posibles rutas de degradación de HPAs descritas en hongos hasta el momento.

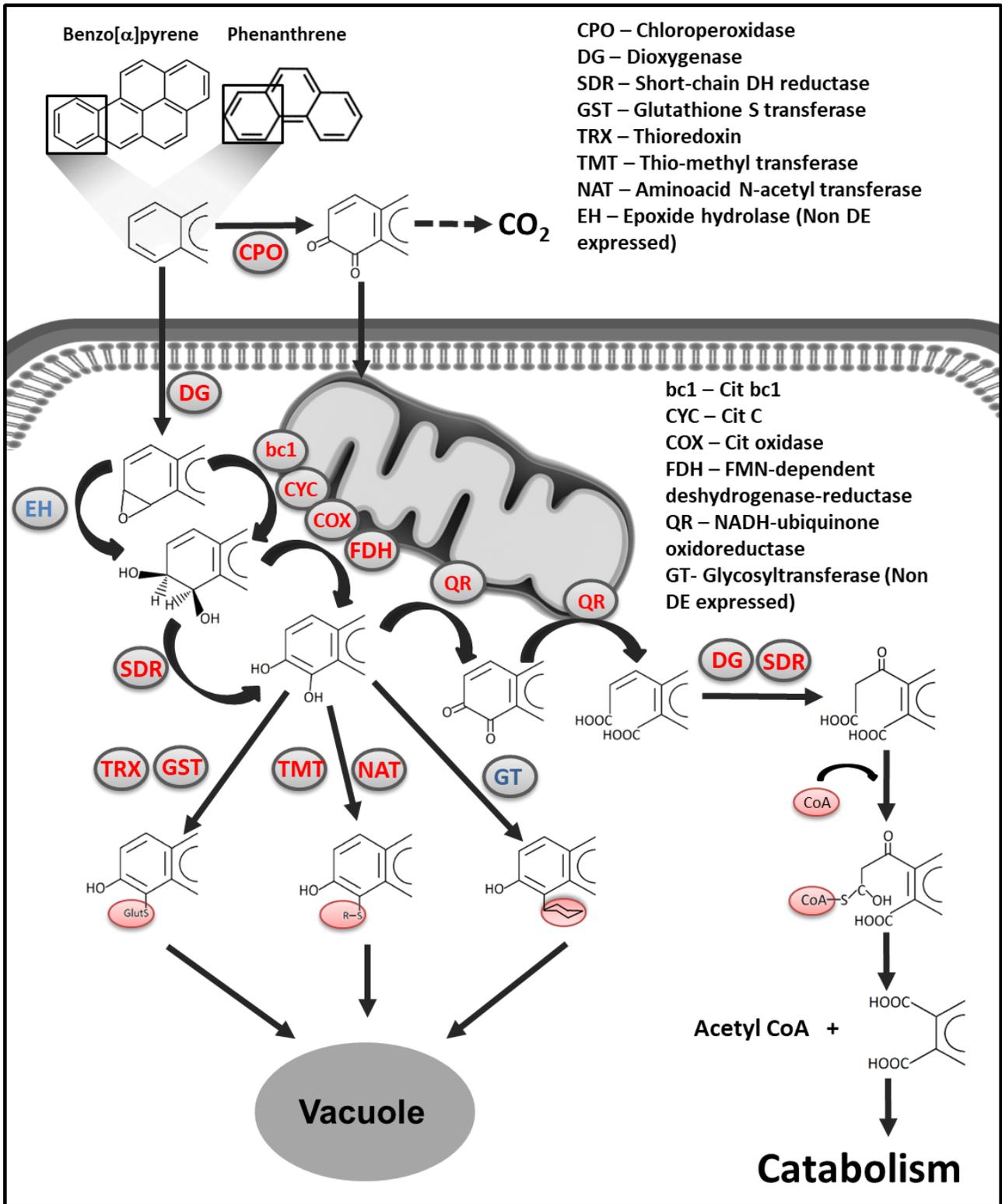


Figura 26. Posibles rutas de degradación de HPA en *A. sydowii-like*, en correspondencia con las enzimas DE expresadas en este transcriptoma.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio nos permitieron concluir que se cumplió la hipótesis mencionada, la cual plantea que, el hongo halófilo *A. sydowii-like* degradará benzo [a] pireno y fenantreno en condiciones hipersalinas (1.0 M NaCl) al expresar diferencialmente enzimas oxidativas en cultivos con benzo [a] pireno y fenantreno. Basándonos en los resultados obtenidos podemos resumir que *A. sydowii-like* mostró ser eficiente en la remoción de HPAs, siendo las enzimas oxidativas de la vía intracelular las principales responsables de la degradación de este tipo de compuestos xenobióticos.

Perspectivas

Los resultados obtenidos del análisis del transcriptoma de *A. sydowii-like* han permitido profundizar aún más en los mecanismos de degradación de HPAs en hongos y las enzimas oxidativas involucradas en dicho proceso, sin embargo, sería de gran utilidad el poder comparar los resultados obtenidos con el de otros hongos como es el caso de las levaduras, en las mismas condiciones en que se desarrolló este estudio. Para ello se seleccionó a *Rhodotorula mucilaginosa* como organismo de estudio.

A diferencia de otros hongos, las levaduras se pueden encontrar en cualquier ecosistema acuático, además, son capaces de tolerar un amplio rango de temperaturas, salinidad, y acidez en el medio circundante, (Silva-B *et al.* 2014) con una tasa de crecimiento superior a otros organismos, dada la adaptación de sus sistemas enzimáticos a diferentes fuentes de carbono (Silva-B *et al.* 2014). Producto de estas características se derivan su utilidad en la industria, la biotecnología y la biorremediación. Estudios previos han demostrado las ventajas de emplear las levaduras para el tratamiento de aguas residuales o contaminadas con HPAs, en lugar de utilizar bacterias con estos fines (Hesham-L *et al.* 2012). Durante décadas, miembros de los géneros *Rhodotorula*, *Candida* y *Rhodospiridium* han sido considerados como degradadores potenciales de contaminantes orgánicos nocivos

como los HPAs. En este sentido, se ha visto que especies como *Rhodotorula glutinis* y *Rhodotorula rubra* tienen la capacidad de degradar fenantreno, (MacGillivray-A *et al.* 1993) mientras que *Rhodotorula minuta* es capaz de degradar HPAs como el benzo (a) antraceno (MacGillivray-A *et al.* 1993). Sin embargo, en la actualidad no existen análisis transcriptómicos en este tipo de organismos en presencia de HPAs en condiciones hipersalinas. Es por este motivo que sería de gran utilidad el poder comparar los mecanismos de remoción de HPAs y las enzimas involucradas en este proceso en *Rhodotorula mucilaginosa* vs *A. sydowii-like* contando como antecedente con el estudio transcriptómico de este último.

Título: Análisis comparativo del transcriptoma de *Rhodotorula mucilaginosa* y *A. sydowii-like*, ambos crecidos en condiciones de hipersalinidad y en presencia de HPAs.

Objetivo general:

Analizar mediante transcriptómica comparativa, los mecanismos de remoción de HPAs de las cepas *A. sydowii-like* y *Rhodotorula mucilaginosa* en condiciones hipersalinas.

Objetivos específicos:

1. Analizar la tolerancia de *Rhodotorula mucilaginosa* a mezclas de benzo [a] pireno y fenantreno en presencia de 1.0M de NaCl.
2. Obtener el transcriptoma de *Rhodotorula mucilaginosa* crecido con los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno o glucosa, ambas condiciones suplementadas con 1.0 M de NaCl.
3. Analizar comparativamente el transcriptoma de *Rhodotorula mucilaginosa* crecido con los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno o glucosa, ambas condiciones suplementadas con 1.0 M de NaCl, para identificar genes involucrados en la degradación de HPAs.
4. Comparar los mecanismos de degradación de HPAs en *Rhodotorula mucilaginosa* vs *A. sydowii-like* basados en los resultados obtenidos del transcriptoma en iguales condiciones para ambos organismos.

5. Caracterizar y comparar los cambios morfológicos en la pared celular tanto de las hifas como de los conidios en *A. sydowii-like* y *Rhodotorula mucilaginosa* en respuesta a la presencia de HPAs en el medio de cultivo.

6. Identificar los productos de degradación de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno en *A. sydowii-like* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

7. Analizar toxicológicamente el efecto de la presencia de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno en el crecimiento del musgo *Physcomitrella patens* en *Rhodotorula mucilaginosa* y en embriones de pez cebra en *A. sydowii-like* y *Rhodotorula mucilaginosa*.

Metodología:

Objetivos 1, 2 y 3:

Los experimentos por realizar para cumplir con estos objetivos son los mismos descritos en este estudio para *A. sydowii-like*.

Objetivo 4:

Una vez analizados los resultados de los transcriptomas de *A. sydowii-like* y *Rhodotorula mucilaginosa*, analizaremos las semejanzas y diferencias de ambos, en cuanto a genes regulados positiva y negativamente DE, enzimas y posibles intermediarios que comparten las posibles rutas de degradación de HPAs en estos organismos.

Objetivo 5:

Caracterizar los cambios morfológicos de la pared celular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de contraste por interferencia diferencial (DIC).

Objetivo 6:

La identificación de los productos de degradación de los HAPs benzo [a] pireno y fenantreno se llevará a cabo mediante cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS) de las muestras al tercer día de cultivo, en correspondencia con el tiempo seleccionado para la extracción del ARN. El análisis GC-MS se llevará a

cabo empleando un equipo GC 7890A (Agilent Technologies) equipado con una columna HP-5MS (30 m x 0,25 mm, / 0,25 µm, Agilent Co., EE. UU.). Los datos se registrarán usando un software cromatográfico de Agilent Technologies. Se generarán cromatogramas de iones totales y se identificarán las señales mediante un patrón de fragmentación de masas (Anamika-S *et al.* 2016).

Objetivo 7:

Con el objetivo de analizar el efecto de la presencia de los HPAs benzo [a] pireno y fenantreno en el crecimiento del musgo *Physcomitrella patens* en presencia de *Rhodotorula mucilaginosa*, se realizará un experimento en las mismas condiciones que el descrito en este estudio para *A. sydowii-like*, así mismo, se prepararán las muestras de igual manera para el estudio toxicológico en embriones de pez cebra.

Cronograma de actividades:

Actividades	E	F	M	A	M	A	S	O	N
2018									
Preparación de los materiales						X			
Transcriptoma comparativo de las cepas <i>A. sydowii-like</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>						X	X		
Procesamiento y análisis de datos	X	X						X	X
Participación en Taller de micorremediación								X	
Participación en el Congreso Internacional de Extremófilos									X
2019									
Caracterización de los cambios morfológicos de la pared celular en	X	X							

presencia de HPAs de las cepas <i>A. sydowii-like</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>									
Identificación de los productos de degradación de los HPAs en las cepas <i>A. sydowii-like</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>			X	X					
Procesamiento y análisis de datos					X	X			
Participación en congresos							X	X	X
2020 - 2022									
Análisis toxicológico del efecto de los HPAs en varios organismos en presencia de las cepas <i>A. sydowii-like</i> y <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	X	X							
Escritura de borrador de tesis	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Publicar un artículo científico								X	
Participación en congresos		X					X		
Presentación de Tesis Doctoral					X				

Referencias

- (IARC), International Agency for Research on Cancer. 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), National Toxicological Program. 2002. *Report of the NTP on Carcinogens.* Washington,DC.: Tenth Report on Carcinogens.
- J. Schneider, R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, D. Warshawsky. 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. Mona. 2016. «A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation.» *Egyptian Journal of Petroleum* 107–123.
- A.K. Haritash, C.P. Kaushik. 2009. «Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review.» *Journal of Hazardous Materials* 1–15.
- A.K. Haritash, C.P. Kaushik. 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.*
- Alkio, M., Tabuchi, T.M., Wang, X., Sciences, O., Colón-Carmona, A. 2005. « Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms.» *J. Exp. Bot.*
- Anastasi, A. 2012. *The Bioremediation Potential of Different Ecophysiological Groups of Fungi.*
- Andrews, S., Krueger, F., Seconds-Pichon, A., Biggins, F., & Wingett, S. 2014. «FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.» <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- B. Ye, M.A. Siddiqi, A.E. Maccubbin, S. Kumar, H.C. Sikka. 1996. «Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by Sphingomonas paucimobili.» *Environ. Sci. Technol* 136–142.
- B.R.M. Vyas, S. Bakowski, V. Sasek, M. Matucha. 1994. «Degradation of anthracene by selected white rot fungi.» *FEMS Microbiol. Ecol* 65–70.

- Batista-García, R. A., Balcázar-López, E., Miranda-Miranda, E., Sánchez-Reyes, A., Cuervo-Soto, L., Aceves-Zamudio, D., Atriztán-Hernández, K., Morales-Herrera, C., Rodríguez-Hernández, R., and Folch-Mallol, J. 2014. «Characterization of lignocellulolytic activities from a moderate halophile strain of *Aspergillus caesiellus* isolated from a sugarcane bagasse fermentation.» *PLoS One*.
- Betancor L, Johnson GR, Luckarift HR. 2013. « Stabilized laccases as heterogeneous bioelectrocatalysts. .» *ChemCatChem* 46–60.
- Bin He, Long Ma, Zhihong Hu, Haoran Li. 2017. «Deep sequencing analysis of transcriptomes in *Aspergillus oryzae*.» *Appl Microbiol Biotechnol* .
- Bin Wang, Guangwu Guo, Chao Wang, Ying Lin. 2010. «Survey of the transcriptome of *Aspergillus oryzae* via massively parallel mRNA sequencing .» *Nucleic Acids Research*.
- Bin-Bin Xie, Dan Li, Wei-Ling Shi, Qi-Long Qin. 2015. «Deep RNA sequencing reveals a high frequency of alternative splicing events in the fungus *Trichoderma longibrachiatum*.» *BMC Genomics*.
- Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., and Krishan, D. 2015. «Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology.» *Brazilian J. Microbiol* 7–21.
- Boldrin, B., Tiehm, A., Fritzsche, C. 1993. «Degradation of Phenanthrene, Fluorene, Fluoranthene and Pyrene by a *Mycobacterium* sp.» *Applied environmental microbiology*.
- C.P. Kaushik, A.K. Haritash. 2006. «Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and environmental health.» *Our Earth* 1–7.
- Cerniglia CE, Kelly DW, Freeman JP, Miller DW. 1986. «Microbial metabolism of pyrene.» *Chem Biol Interact*.
- Cerniglia, E. 1992. «Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.» *Biodegradation* 351-368.
- Clar, E. 1964. «Polycyclic Hydrocarbons.» *Academic Press*.
- 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 Biology*.
- 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., J. Waterfall, y J. Lis. 2008. «Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters.» *Science* 1845-1848.
- D. Boyle, C. Wiesner, A. Richardson. 1998. «Factors affecting the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi.» *Soil Biol. Biochem* 873–882.
- D. Trzesicka-Mlynarz, O.P. Ward. 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.
- Daines, B., H. Wang, L. Wang, Y. Li, Y. Han, D. Emmert, W. Gelbart, y otros. 2011. «The Drosophila melanogaster transcriptome by Paired-End RNA Sequencing.» *Genome Research* 315-324.
- E, Aranda. 2016. «Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi.» *Current Opinion in Biotechnology* 1–8.
- Egan, A., J. Schlueter, y D. Spooner. 2012. «Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology.» *American Journal of Botany* 175-185.
- Esra, B. 2016. «Potential effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in marine foods on human health: a critical review.» *Journal Toxin Reviews* 3-4.
- Fenglan Lia, b, Xiaokang Zenga, Junda Yanga, Kai Zhouc, Qijie Zana. 2014. «Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments and plants of mangrove swamps in Shenzhen, China.» *Marine Pollution Bulletin* 590-596.
- Freedman, Adam. 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>.
- Gan, Q., I. Chepelev, G. Wei, L. Tarayrah, K. Cui, K. Zhao, y X. Chen. 2010. «Dynamic Regulation of Alternative Splicing and Chromatin Structure in Drosophila Gonads Revealed by RNA-seq.» *Cell Research* 763-783.
- Garber, M., M. Grabherr, M. Guttman, y C. Trapnell. 2011. «Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification Using RNA-seq.» *Nature Methods* 469-478.
- Gentleman, R., Carey, V., Bates, D., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., ... Zhang, J. 2004. «Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics.» *Genome Biology*.

- 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.
- Gulledge, A., A. Roberts, H. Vora, K. Patel, y A. Loraine. 2012. «Mining Arabidopsis thaliana RNA-Seq Data with Integrated Genome Browser Reveals Stress-Induced Alternative Splicing of the Putative Splicing Regulator SR45A.» *American Journal of Botany*.
- H. J. Heipieper, P. M. Martínez. 2010. *Toxicity of Hydrocarbons to Microorganisms*. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J.,. 2013. «De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis.» *Nat Protoc*.
- Han M, Choi H, Song H. 2004. «Degradation of Phenanthrene by Trametes versicolor and Its Laccase.» *The Journal of Microbiology* 94-98.
- Iheanacho C, Okerentugba P, Orji F, Ataikiru, T. 2014. «Hydrocarbon degradation potentials of indigeneous fungal isolates from a petroleum hydrocarbon contaminated soil in Sakpenwa community, Niger Delta. .» *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology*.
- Kai-Hui Liu, Xiao-Wei Ding, Manik Prabhu Narsing Rao, Bo Zhang. 2017. «Morphological and Transcriptomic Analysis Reveals the Osmoadaptive Response of Endophytic Fungus Aspergillus montevidensis ZYD4 to High Salt Stress.» *Frontiers in Microbiology*.
- L.L. Daane, I. Harjono, S.M. Barns, L.A. Launen, N.J. Palleroni, M.M. Haggblom. 2002. «PAH degradation by Paenibacillus spp. and description of Paenibacillus naphthalenovorans sp.» *Int. J Syst. Evol. Microbiol*.
- 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*.
- Li Y, Fu K, Gao S, Wu Q, Fan L, Li Y, Chen J. 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*.
- Li, B., & Dewey, C. N. 2011. « RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. .» *BMC Bioinformatics*.
- Lister, R., y B. Gregory: J. Ecker. 2009. «Next Is Now: New Technologies for Sequencing of Genomes, Transcriptomes and Beyond.» *Current Opinion in Plant Biology* 107-118.

- Lockhart, D., y E. Winzeler. 2000. «Genomics, Gene Expression and DNA Arrays.» *Nature* 827-836.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. 2014. «Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. .» *Genome Biology*.
- M. Hofrichter, K. Schneibner, I. Schneegab, W. Fritzche,. 1998. «Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*.» *Appl. Environ. Microbiol* 399-404.
- M.A. Providenti, H. Lee, J.T. Trevors. 1993. «Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds.» *J. Ind. Microbiol.* 379–395.
- M.C. Romero, M.C. Cazau, S. Giorgieri, A.M. Arambarri. 1998. «Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream.» *Environ. Pollut.* 355–359.
- M.D. Aitken, W.T. Stringfellow, R.D. Nagel, C. Kazunga, S.H. Chen. 1998. «Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons.» *Can. J. Microbiol.* 743–752.
- M.J. Smitha, T.H. Flowersb, H.J. Duncanb, J. Alderb. 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.
- Maher, C., C. Kumar-Sinha, X. Cao, S. Kalyana-Sundaram, B. Han, X. Jing, L. Sam, T. Barrette, N. Palanisamy, y A. Chinnaiyan. 2009. «Transcriptome Sequencing to Detect Gene Fusions in Cancer.» *Nature* 97-101.
- Mardis, E. 2011. «A Decade’s Perspective on DNA Sequencing Technology.» *Nature* 198-203.
- Marguerat, S., y J. Bahler. 2010. «RNA-seq: from technology to biology.» *Cellular and Molecular Life Sciences* 569-579.
- Martínez-Martínez Mónica, Iván Lores, Carlina Peña-García, Rafael Bargiela, Dolores Reyes-Duarte, María-Eugenia Guazzaroni, Ana Isabel Peláez, Jesús Sánchez and Manuel Ferrer. 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 Journal of Sustainable Development .» *European Journal of Sustainable Development* 57-66.
- McElroy, A.E., Farrington, J.W., Teal, J.M. 1989. «Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment.» *CRC Press Inc.*

- Metzker, M. 2010. «Sequencing technologies the next generation.» *Nature Reviews Genetics* 31-46.
- Meyers, B., D. Galbraith, T. Nelson, y V. Agrawal. 2004. «Methods for Transcriptional Profiling in Plants. Be Fruitful and Replicate.» *Plant Physiology* 637-652.
- Mochida, K., y K. Shinozaki. 2011. «Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analyses of Plant Functions.» *Plant and Cell Physiology* 2017-2038.
- Mortazavi, A., B. Williams, K. McCue, L. Schaeffer, y B. Wold. 2008. «Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq.» *Nature Methods* 621-628.
- N.F.Y. Tam, C.L. Guo, W.Y. Yau, Y.S. Wong. 2002. « Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong.» *Mar. Poll. Bull.* 316–324.
- Nagalakshmi, O U., Z. Wang, K. Waern, C. Shou, D. Raha, M. Gerstein, y M. Snyder M. 2008. «The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA 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 PV, Subrahmanyam VM, Rao JV. 2013. «Fungal chitinase production and its application in biowaste management.» *J Sci Ind Res* 393–399.
- Narro ML, Cerniglia CE, Van Baalen C, Gibson DT. 1992. «Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum*.» *Appl Microbiol Biotechnol* 1351-1359.
- Natalia N. Pozdnyakova, Svetlana V. Nikiforova, Olga V. Turkovskaya. 2010. «Influence of PAHs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus*.» *Central European Journal of Biology*.
- Neifar M, Maktouf S, Ghorbel RE, Jaouani A, Cherif A) In: Gupta VK, Tuohy MG, O'Donovan A, Lohani M. 2015. «Extremophiles as source of novel bioactive compounds with industrial potential.» *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*.
- 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.

- O.P. Ward, A. Singh, J. Van Hamme,. 2003. «Acclerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste.» *Microbiol. Biotechnol.* 260-270.
- Passarini MRZ, Rodrigues MVN, da Silva M, Sette LD. 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., Y. Cheng, B. Chin-Ming, L. Kang, Z. Tian, Y. Zhu, W. Zhang, y otros. 2012. «Comprehensive analysis of RNA-seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptoma.» *Nature Biotechnology.*
- 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., J. Marioni, A. Pai, J. Degner, B. Engelhardt, E. Nkadori, J. Veyrieras, M. Stephens, Y. Gilad, y J. Pritchard J. 2010. «Understanding Mechanisms Underlying Human Gene Expression Variation with RNA Sequencing.» *Nature* 768-772.
- Proudfoot, N., A. Furger, y M. Dye. 2002. «Integrating mRNA Processing with Transcription.» *Cell* 501-512.
- PS, Nigam. 2013. « Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications.» *Biomolecules* 597–611.
- R., Orłiski. 2002. «Multipoint moss passive samplers assessment of urban airborne polycyclic aromatic hydrocarbons: concentrations profile and distribution along Warsaw main streets.» *Chemosphere* 181-186.
- Risso, D., Ngai, J., Speed, T. P., & Dudoit, S. 2014. «Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples.» *Nature Biotechnology.*
- Schena, M., R. Heller, T. Theriault, K. Konrad, E. Lachenmeier, y R. Davis. 1998. «Microarrays: Biotechnology's Discovery Platform for Functional Genomics.» *Trends Biotechnology.*

- Schenk, P., L. Carvalhais, y K. Kazan. 2012. «Unraveling Plant-Microbe Interactions: Can Multi-Species Transcriptomics Help?» *Trends in Biotechnology* 177-184.
- Schmidt SN, Christensen JH, Johnsen AR. 2010. «Fungal PAH-metabolites resist mineralization by soil microorganisms.» *Environ Sci Technol*.
- Schneeberger, K., y D. Weigel. 2011. «Fast-Forward Genetics Enabled by New Sequencing Technologies.» *Trends in Plant Science* 282-288.
- Shalon, D., S. Smith, y P. Brown. 1996. «A DNA Microarray System for Analyzing Complex DNA Samples Using Two-Color Fluorescent Probe Hybridization.» *Genome Research* 639-645.
- Shimada H, Oginuma M, Hara A, Imamura Y. 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.
- Singh P, Raghukumar C, Parvatkar RR, Mascarenhas-Pereira MBL. 2013. «Heavy metal tolerance in the psychrotolerant *Cryptococcus* sp. isolated from deep-sea sediments of the Central Indian Basin.» *Yeast* 93–101.
- Sinha A, Sinha R, Khare SK. 2014. «Heavy metal bioremediation and nanoparticle synthesis by metallophiles.» *Geomicrobiology and biogeochemistry, soil biology*. 101–118.
- Stefan Gotz, Juan Miguel Garcia Gomez, Javier Terol, Tim D. Williams. 2008. «High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite.» *Nucleic Acids Research*.
- Strickler, S., A. Bombarely, y L. Mueller. 2012. «Designing a Transcriptome Next-Generation Sequencing Project for a Nonmodel Plant Species.» *American Journal of Botany* 257-266.
- T. Cajthaml, V. Pacakova, V. Sasek. 2001. «Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.» *Chem. Listy*.
- Tang L, Tang XY, Zhu YG, Zheng MH, Miao QL. 2005. «Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China.» *Environ Int*. 822-828.
- Tiehm. 1994. «Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the presence of syntetic surfactants.» *Applied and Environmental Microbiology*.
- U. Walter, M. Beyer, J. Klein, H.J. Rehm. 1991. «Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp.» *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 671–676.

- Wagner, G. P., Kin, K., & Lynch, V. J. 2012. «Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. .» *Theory in Biosciences* 281–285.
- Wang, Z., M. Gerstein, y M. Snyder. 2009. «RNA-Seq: a Revolutionary Tool for Transcriptomics.» *Nature Reviews, Genetics* 57-63.
- Ward, J., L. Ponnala, y C. Weber. 2012. «Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants.» *American Journal of Botany* 267-276.
- Wu Y, Luo Y, Zou D, Ni J, Liu W. 2008. « Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. .» *Biodegradation* 247–257.
- Zajc, J. 2013. « Genome and transcriptome sequencing of the halophilic fungus *Wallemia ichtyophaga*: haloadaptations present and absent.» *BMC Genomics* .