



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
APLICADA
CIBA-TLAXCALA**

**TESIS
ANÁLISIS PROTEÓMICO DE *T. aperellum* H15 DURANTE
UN PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS**

**Que para obtener el grado de:
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

**PRESENTA
NUVIA SOSA DÍAZ**

COMITÉ EVALUADOR

Dra. Diana Verónica Cortes Espinosa

Dra. Silvia Luna Suárez

Dra. María del Carmen Cruz López

Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo

Dr. César Augusto Barrales Cortes

Dr. Víctor Eric López Y López





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlax. siendo las 12:30 horas del día 30 del mes de mayo del 18 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:

ESTUDIO PROTEÓMICO DE *Trichoderma asperillum* H15 DURANTE UN PROCESO DE DEGRADACIÓN DE PAHs

Presentada por el alumno:

<u>SOSA</u>	<u>DÍAZ</u>	<u>NUVIA</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

A	1	6	1	0	3	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

DRA. DIANA VERÓNICA CORTES ESPINOSA

DRA. FABIOLA ELORSA JIMENEZ MONTEJO

DRA. MARIA DEL CARMEN CRUZ LOPEZ

DRA. SILVIA LUNA SUAREZ

DR. CESAR AUGUSTO BARRALES CORTES

DR. VICTOR RICARDO LOPEZ Y LOPEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DRA. MARIA MYRNA SOLIS OBA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Colegio de Investigaciones de Estudios de Posgrado e Investigación
CIBA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala; el día 01 el mes Junio del año 2018 , el (la) que suscribe Nuvia Sosa Díaz alumno (a) del Programa de MAestría en Biotecnología Aplicada con número de registro A161036 , adscrito a CIBA-Tlaxcala , manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa y cede los derechos del trabajo intitulado Estudio Protómico de T. asperellum H15 durante un proceso de degradación de PAHs , al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección dcortes@ipn.mx . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Nuvia Sosa Díaz

Nombre y firma



SIP-13

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS*

México, D.F. a 4 de Mayo del 2009

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 11 del mes de mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

SOSA
Apellido paterno

DÍAZ
Apellido materno

NUVIA
Nombre (s)

Con registro:

A	1	6	1	0	3	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
ESTUDIO PROTEÓMICO DE *Trichoderma asperellum* H15 DURANTE UN PROCESO DE DEGRADACIÓN DE PAHs.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

En este trabajo se realizarán análisis proteómicos de un hongo filamentoso capaz de degradar compuestos tóxicos bajo condiciones de cultivo sólido usando un soporte inerte.

2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:
Diana Verónica Cortés Espinosa

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
CIBA-IPN

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director(a) de Tesis


Diana Verónica Cortés Espinosa

Aspirante


Nuvia Sosa Díaz

Presidente del Colegio


María Myrta Solís Cebal
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
CIBA-IPN
Instituto Politécnico Nacional
Escuela



**Agradecimientos a los estímulos económicos de Consejo
Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento
de la beca número 746632; así como al Instituto Politécnico
Nacional mediante los programas: Beca de Estímulo Institucional
de Formación de Investigadores (BEIFI).**

DEDICATORIA

A mi esposo Daniel Fernández

A mi hijo Derek Fernández

Gracias por su amor incondicional

AGRADECIMIENTOS

A mis padres a mis hermanas y hermanos por el apoyo incondicional que siempre me ofrecieron.

A la Dra. Diana por haberme permitido entrar a su grupo de trabajo, por sus enseñanzas y el apoyo para la realización de este trabajo

A mi comité tutorial, por su apoyo y enseñanzas, en especial a la Dra. Carmen por sus tiempo y dedicación.

A Gina por todo su apoyo cuando más lo necesitaba, por no dejarme sola y estar en las buenas y en las malas a Nata y Rebe quienes siempre me sacaban una sonrisa y me ayudan a seguir adelante

A cada una de las personas que me ayudaron para poder realizar mi trabajo.

RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos políclicos por sus siglas en inglés PAHs, son compuestos orgánicos que existen de manera natural en el petróleo y pueden ser formados a partir de la combustión de diversos productos; estructuralmente poseen dos o más anillos aromáticos fusionados. Para la agencia de protección ambiental (EPA) de los Estados Unidos veinte de estos son considerados contaminantes prioritarios debido a sus efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, además de ser compuestos muy recalcitrantes y difícil de degradar, dentro de estos se ubica la molécula del pireno, que está constituida de cuatro anillos aromáticos, esta molécula es un sustrato modelo para estudiar el metabolismo y la persistencia en el medio ambiente.

Por ello, nuestro estudio se centra en estudiar la biodegradación del pireno en fermentación sólida usando como soporte inerte espuma de poliuretano (EPU), por *T. asperellum* H15, un hongo que ha mostrado la capacidad de adaptación y tolerancia a estos contaminantes. Es importante mencionar que parte de este trabajo fue dar seguimiento al estudio del secretoma de *T. asperellum* H15 que realizó Cortés-Ramírez en 2017. Se planteó estudiar el proteoma intracelular del hongo bajo las mismas condiciones de exposición a pireno, para establecer las enzimas implicadas y elucidar una posible ruta de degradación. Para ello se realizó una cinética de crecimiento de *T. asperellum* H15, incrementando el tiempo de monitoreo, en comparación con lo realizado por Cortés- Ramírez (2017)

Se llevó a cabo la extracción de proteínas mediante tres métodos y se hizo el análisis por electroforesis, encontrando que el método descrito por Gonzales-Fernández *et. al* (2010), permitió la obtención de mayor cantidad de proteína. Posterior, se analizaron en LC-MS/MS. Adicionalmente, se hizo un análisis por cromatografía en capa fina (TLC) y GC-MS para identificar los posibles intermediarios formados durante la cinética.

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), they are organic pollutants constituted by the fusion of two or more aromatic rings. For the Environmental Protection Agency of the United States (EPA), these components are priority pollutants due to their carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects, as well as being recalcitrant and difficult to degrade compounds, within these can be found the pyrene molecule, which is constituted of four aromatic rings, this molecule is a model substrate to study metabolism and persistence in the environment.

Therefore, our study focuses on studying the biodegradation of fire in fermentation as an inert support of polyurethane foam (PUF), by *T. asperellum* H15, a fungus that has demonstrated the ability to adapt and tolerance to these pollutants. Because the foregoing is important, part of this study was to follow up on what I do. Cortés-Ramírez in 2017, when studying the secretomy of *T. asperellum* H15. Why it was proposed to study now the intracellular protein of the same fungus under the same conditions to establish the mechanisms of degradation, the enzymes involved and establish a possible route of degradation. For this, a kinetic was made adding five more days to what is reported. Córtes - Ramírez (2017) in which results similar to those described were found.

Once the results were processed for standardization for protein extraction, a five-day kinetics was performed to test three different methods, from which the one by Gonzales-Fernández et al. Was chosen (2010). subsequent analysis in LC-MS / MS. In addition, this study was the standardization of potential intermediaries formed during kinetics, thin layer chromatography (TLC) and GC-MS analysis.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	vi
MARCO TEÓRICO	1
1.1 Características Generales de los PAHs	1
1.2 Propiedades físicas y químicas de los PAHs	1
1.3 Formación y Emisión	2
1.4 Actividad Biológica.....	2
2. PIRENO	4
3. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS EN MÉXICO	5
4. REMEDIACIÓN	6
4.1 BIORREMEDIACIÓN	7
4.2 METABOLISMO DE PAHs	7
4.3 METABOLISMO FÚNGICO	8
4.3.1 Hongos ligninolíticos	9
4.3.2 Hongos no-ligninolíticos	10
5. ENZIMAS	10
6. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)	12
7. EL CASO DE <i>Trichoderma sp.</i>	14
8. PROTEÓMICA	15
9. ESPECTROMETRIA DE MASAS	17
9.1 LC-MS/MS	17
10. FERMENTACIÓN EN SUTRATO SÓLIDO	18
11. ANTECEDENTES GENERALES	20
12. ANTECEDENTES DIRECTOS	21

13. JUSTIFICACIÓN	22
14. HIPOTESIS	23
15. OBJETIVOS	24
15.1 Objetivo General	24
15.2 Objetivos Particulares	24
16. Estrategia Experimental	25
17. MATERIAL Y MÉTODO	27
17.1 Tratamientos para aislamiento de proteínas intracelulares	28
17.1.1 Ruptura mecánica celular	28
17.1.2 Método Lisis alcalina	29
17.1.3 Método Sonicación	30
17.2 1D-SDS- Electroforesis en gel de poliacrilamida	30
17.2.1 Digestión con tripsina	31
17.3 Métodos analíticos	32
17.4 Análisis en LC-MS/MS	33
17.5 Búsqueda de bases de bases de datos e identificación de proteínas	33
18. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
18.1 Comparación de la extracción de proteínas intracelulares	38
18.2 ETAPA DOS IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS	41
18.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS POR GC-MS	42
19. CONCLUSIONES	45
20. BILIOGRAFIA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 16 contaminantes prioritarios para la EPA	3
Figura 2. Regiones relacionadas con la actividad biológica de los PAHs	3
Figura 3. Nomenclatura y bordes de la estructura del pireno.	4
Figura 4. Gráfica de emergencias ambientales reportadas en 2015 por PROFEPA. México.	6
Figura 5. Tres principales vías en la degradación de los PAHs por hongos y bacterias .	8
Figura 6. Microfotografía de <i>Trichoderma</i> sp.	15
Figura 7. Esquema de un proceso a microescala que ocurre durante la fermentación en estado sólido..	19
Figura 8. Metodología general para el análisis de las proteínas	31
Figura 9. <i>T. asperellum</i> H15 en cultivo sólido usando EPU	35
Figura 10. Gráfica de actividad heterotrófica	35
Figura 11. Gráfica del consumo de azúcares en <i>T. asperellum</i> H15..	36
Figura 12. Gráfica de la actividad enzimática lacasa durante la fermentación en cultivo sólido en EPU.	37
Figura 13. Gráfica de degradación de pireno	38
Figura 14. Extracción de proteínas de <i>T. asperellum</i> H15 en EPU.	39
Figura 15. Microscopia de <i>T. asperellum</i> .	39
Figura 16. Extracción de las proteínas intracelulares	40
Figura 17. TLC en fase móvil hexano/acetato de etilo	41
Figura 18. TLC, en fase móvil diclorometano/hexano (40:10).	42
Figura 19. Muestras controles	42
Figura 20. Cromatograma del pireno.	43
Figura 21. Cromatograma del cual se toma al ion molecular 256.	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de ROS	13
Tabla 2. Diseño experimental de cinética en EPU	25
Tabla 3. Diseño experimental para el aislamiento de proteoma intracelular .	25
Tabla 4. Diseño experimental para la identificación de intermediarios formados intracelularmente por la presencia de pireno.....	26
Tabla 5. Cuantificación de proteína total comparando el método de lisis alcalina y tratamiento TCA/acetona fenol.....	40
Tabla 6. Identificación de compuestos en T. asperellum H15	41

MARCO TEÓRICO

1. Hidrocarburos

El petróleo crudo es una mezcla compleja de hidrocarburos constituidos por carbono (C) e hidrógeno (H) que contienen más de 17 000 componentes, por lo que son clasificados en tres tipos generales: parafinas, naftalenos y aromáticos, siendo este último en donde ubicamos a los PAHs, que es considerada como la parte más persistente y difícil de degradar.

1.1 Características Generales de los PAHs

Los PAHs son un grupo de moléculas orgánicas, con estructuras que contiene al menos dos anillos de benceno insaturado, en arreglo lineal, angular o en grupo (racimos). Dependiendo del número de anillos presentes, han sido clasificado en dos categorías, es decir, los PAHs de bajo peso molecular (contienen hasta tres anillos) y los de alto peso molecular (contienen cuatro o más anillos) (Chauhan et al., 2008; Ravindra 2007). Su recalcitrancia se debe a la energía que estabiliza su sistema de anillos aromáticos, estos confieren un alto potencial de oxidación para reacciones de transferencia de electrones. Por consiguiente, solo enzimas específicas son capaces de escindir los anillos aromáticos (Aranda 2015).

1.2 Propiedades físicas y químicas de los PAHs

A temperatura ambiente los PAHs son cristalinos, con un alto punto de fusión y de ebullición, baja presión de vapor, excepto para los PAHs con dos y tres anillos aromáticos. Presentan una persistencia bioquímica debido a la baja solubilidad acuosa que presenta, lo que favorece su recalcitrancia (Johnsen 2005; Abdel-Shafy y Mansour, 2015)

Por otro lado, presenta características tales como sensibilidad a la luz, resistencia al calor, conductividad, capacidad de emisión, resistencia a la corrosión y la acción biológica. Los PAHs poseen espectros de absorbancia UV muy característicos, porque cada estructura en anillo tiene un espectro UV único (Abdel-Shafy y Mansour, 2015).

1.3 Formación y Emisión

Los PAHs son la forma más estable de los hidrocarburos por lo general se producen en mezclas complejas en lugar de compuestos únicos. Estos son encontrados en el alquitrán de hulla, crudo y creosota, aunque también son productos de las emisiones de la refinación del petróleo, de la destilación del alquitrán de los motores de gasolina y diésel, considerados como fuentes principales de emisión al medio ambiente (Ravindra *et al.*, 2007).

La combinación de fuentes naturales con antropogénicas de los PAHs, y en combinación con los fenómenos de transporte mundial resultan en su distribución y dispersión a la atmósfera, vegetación, y en última instancia a una bioacumulación en la cadena alimenticia. En general, la tasa de formación de estos compuestos depende de las condiciones de combustión (Cerniglia y Sutherland 2010, Ghosal *et al.*, 2016).

1.4 Actividad Biológica

Son considerados como un grupo prioritario de contaminantes orgánicos debido a sus propiedades teratogénicas, genotóxicas y carcinogénicas en los seres vivos, por ello la EPA ha enlistado a 16 de estos (figura 1), como contaminantes prioritarios que deben ser monitoreados en ecosistemas terrestres y acuáticos (Liu *et al.*, 2009; Steffen 2003).

Al ser considerados contaminantes y debido a que no se degradan con facilidad en condiciones naturales, su degradación depende de sus propiedades físicas y químicas, concentración, tasa de difusión en el suelo y agua, así como también su biodisponibilidad, estos pueden ser degradados por fotooxidación y oxidación química, pero la transformación biológica es probablemente la ruta predominante de pérdida de PAHs (Juhas y Naidu 2000; Steffen 2013)

Los PAHs no tienen actividad biológica como tal. Para exhibir sus propiedades peligrosas a la salud (actividad tumorigénica) requieren la transformación metabólica a especies metabólicas que son suficientemente reactivas para

modificar las macromoléculas celulares, tales como, ADN ARN y proteínas (Anyakora, 2007; Haritash y Kaushik, 2009).

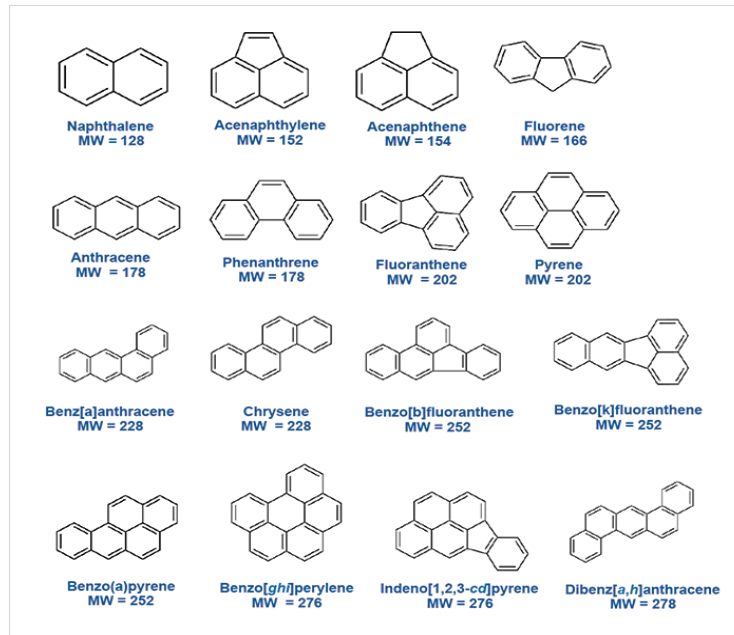


Figura 1. 16 contaminantes prioritarios para la EPA.

De las estructuras de los PAHs se identifican diferentes regiones relacionadas con su reactividad; siendo la estructura del Benzo [a] antraceno, la molécula representativa que detalla varias de estas regiones, figura [2]. La región “K “es definida como la esquina externa de la mitad del fenantreno, la región “L” consiste en un par de átomos de puntos antracénicos abiertos de manera opuesta; la región “bahía” es definida como una esquina abierta a la mitad de un fenantreno; la región bahía distal es también conocida como la región “M”; y la posición peri, corresponde al átomo carbón opuesto a la región bahía y al anillo angular adyacente (Ramesh *et al.* 2004).

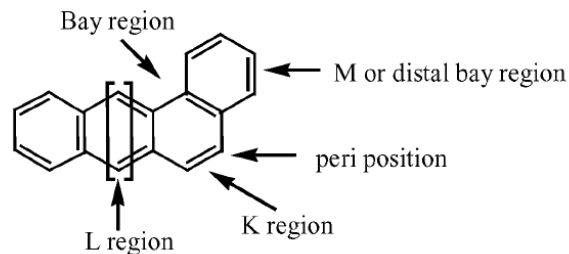


Figura 2. Regiones relacionadas con la reactividad de los PAHs (Ramesh et al. 2004)

2. PIRENO

Desde su descubrimiento en el siglo XIX, los PAHs han sido el centro de atención de investigaciones recientes. Dentro de estos PAHs se encuentra el pireno el cual fue aislado por el químico Auguste Laurent en 1837 en el alquitrán de hulla. Posee una masa molar de 202.2506 g/mol es soluble en etanol, éter etílico, benceno, tolueno, hexano, tiene un punto de fusión de 148°C y un punto de ebullición de 404°C.

Esta constituido de 16 átomos de carbono dentro de cuatro anillos; el pireno presenta dobles enlaces que exhiben reactividad hacia la oxidación **debido a una menor estabilización**. La posición 4,5,9 y 10 hacen referencia a la región K por estar involucradas principalmente en los efectos cancerígenos y en su oxidación figura [3].

Su geometría plana ofrece una deslocalización completa de electrones- π que se extienden por encima y por debajo del esqueleto del carbono. Ha sido ampliamente estudiado y es considerado como un recalcitrante termodinámicamente estable y muy difícil de degradar (Marco-Urrea *et al.*, 2015).

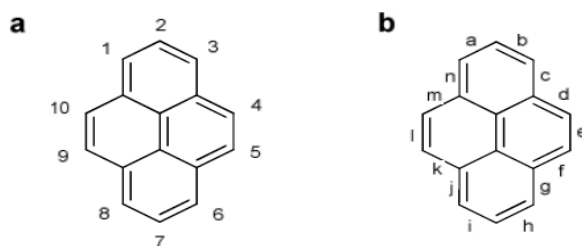


Figura 3. Nomenclatura y bordes de la estructura del pireno.

Para la EPA, el pireno es considerado como un indicador para monitoreo de sitios contaminados con PAHs, como un compuesto modelo para mediar la unión al ADN, y como molécula para estudiar la degradación fotoquímica y biológica de otros PAHs. Distintas bacterias y algunos hongos son importantes para la degradación de éste en el ambiente (Ravelet *et al.*, 2000; Saraswathy y Hallberg 2005).

3. CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS EN MÉXICO

La liberación de estos hidrocarburos dentro del ambiente ya sea de manera accidental o por las actividades humanas como son las fugas y derrames que ocurren regularmente durante la explotación y producción, es la principal causa de contaminación del suelo y del agua.

Las diversas actividades industriales han llevado a un creciente número de sitios contaminados, en particular la industria petroquímica en México, y uno de los principales exportadores de petróleo crudo, del cual derivan diferentes actividades llevadas a cabo por Petróleos Mexicanos (PEMEX), que contamina potencialmente el medio ambiente.

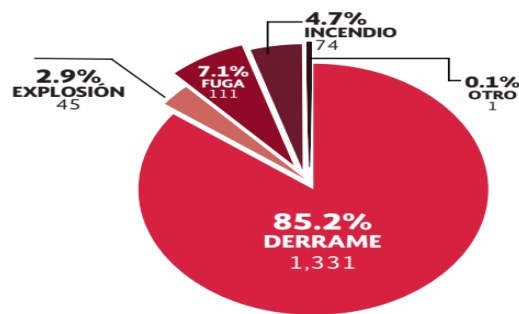
Aunado a lo anterior existen extensas áreas contaminadas por estos hidrocarburos, por la explotación, refinación, falta de mantenimiento y robo de combustible. Se estima que en los últimos 20 años han provocado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares, con mayor impacto en el aspecto ambiental y agrícola. (Arroyo *et al.* 2014)

De acuerdo con la información de PEMEX, dos de los lugares más contaminados por hidrocarburos a nivel nacional son la refinería “Lázaro Cárdenas” y el Pantano de Santa Alejandría, ambos ubicados en el sureste de México (Veracruz y Tabasco) (INECC 2016).

Históricamente en estas regiones ha habido derrames que afectan largas áreas del suelo y eventualmente ríos, arroyos y lagunas que es uno de los problemas centrales en México (Díaz-Ramírez *et al.*, 2013).

En 2015, PROFEPA reportó 1,562 emergencias ambientales, de las cuales 1,331 fueron provocadas por derrames de hidrocarburos como se observa en la figura 4; las entidades más afectadas por las emergencias ambientales son: Veracruz, Tamaulipas, Oaxaca, Hidalgo, Puebla, Guanajuato, San Luís Potosí, Jalisco, Tabasco, Coahuila (SEMARNAT 2010)

**EMERGENCIAS NOTIFICADAS
EN 2015 DISTRIBUCIÓN
POR CAUSANTE**



Total de emergencias: **1,562**

Figura 4. Gráfica de emergencias ambientales reportadas en 2015 por PROFEPA. México.

Aproximadamente 70% de los eventos de PEMEX afectan al suelo, 30% al agua y 10% aire (la suma no corresponde al 100% debido a que hay eventos que afectan a los tres recursos de forma simultánea. Entre 2008 y 2013, se identificaron 627 sitios contaminados de los cuales 127 (20.3%) correspondían a PEMEX. Semarnat. México. 2013

4. REMEDIACIÓN

La creciente toma de conciencia sobre los efectos nocivos de los PAHs en el ambiente y en la salud humana ha llevado a un marcado aumento en la investigación de diversas estrategias que podrían ser utilizadas para limpiar sitios contaminados (Bish *et al.*, 2015).

Las tecnologías de remediación buscan la remoción del contaminante y pueden clasificarse de diferentes maneras con base en los siguientes principios: (1) estrategia de remediación; (2) lugar en que se realiza el proceso de remediación, y (3) tipo de tratamiento, éste último se divide generalmente en: tratamiento fisicoquímico, tratamientos térmicos y tratamiento biológico. (Sepúlveda y Velasco 2012; Hamilton 2012).

Cabe resaltar que entre los tratamientos antes mencionados los biológicos requieren un mínimo o ningún tratamiento posterior, son benéficos para el medio

ambiente y son efectivos en cuanto a costos. Este tipo de tecnología se les denomina tecnologías de biorremediación (INECC 2016).

4.1 BIORREMEDIACIÓN

La descontaminación de suelo y agua usando microorganismos para transformar una sustancia nociva a un compuesto no tóxico es conocida como biorremediación. Bajo este enfoque la aplicación de los métodos de biorremediación en la degradación de hidrocarburos es una alternativa ampliamente usada para la recuperación de suelos contaminados. Sin embargo, el éxito de esta estrategia depende de la capacidad de degradación de los microorganismos nativos o exógenos aplicada como parte del tratamiento (Díaz-Ramírez *et al.*, 2013; USEPA, 1991)

En este contexto, las bacterias y hongos tienen un papel dominante en los procesos de biorremediación. Desde 1979, se ha descrito que bacterias, hongos y algas poseen habilidades catabólicas, que pueden ser utilizadas para la remediación de suelos y agua contaminados con PAHs (Hadibarata *et al.* 2007).

Los microorganismos transforman la sustancia a través de procesos metabólicos o enzimáticos. Las estrategias utilizadas por los microorganismos en la biorremediación pueden ser divididas en tres categorías: 1) el compuesto “blanco” puede ser usado como fuente de carbono y energía, este proceso resulta en una completa degradación (mineralización) del contaminante orgánico 2) el compuesto es atacado enzimáticamente pero no es usado como fuente de carbono (cometabolismo), que es definido como el metabolismo de un contaminante orgánico en presencia de un sustrato que es usado como fuente primaria de carbono y energía. y 3) el compuesto no es metabolizado, pero es absorbido y concentrado dentro del organismo (bioacumulación) (Joutey *et al.*, 2013).

4.2 METABOLISMO DE PAHs

Los microorganismos degradantes de PAHs están distribuidos en el medio ambiente de forma ubicua, como en el suelo (bacterias y hongo no-ligninolíticos) y bosques leñosos (hongos ligninolíticos) (Aishatu *et al.*, 2015).

La degradación de estos puede cumplir tres funciones diferentes. (i) biodegradación asimilativa que produce carbono y energía a los organismos degradantes y va junto con la mineralización del compuesto o parte de este. (ii) el proceso de desintoxicación intracelular donde el propósito es hacer estos más solubles en agua como un pre-requisito para la excreción de estos compuestos. (iii) Co-metabolismo el cual es la degradación de los PAHs sin la generación de carbono y energía para el metabolismo celular.

El metabolismo aeróbico de los PAHs por microorganismos específicamente detallado en bacterias y hongos (ligninolíticos y no-ligninolíticos) figura 5, es la base de los mecanismos de la oxidación del anillo aromático, seguido por el sistema de ruptura de los compuestos PAHs a metabolitos y/o a dióxido de carbono (Aishatu *et al.*, 2015).

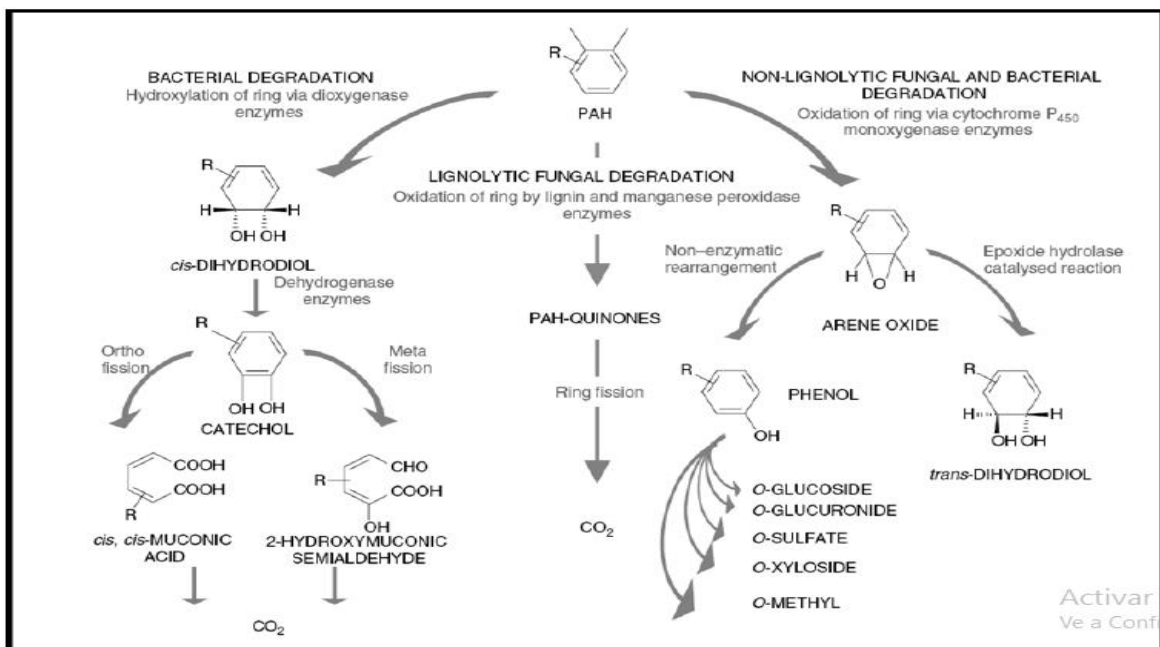


Figura 5. Tres principales vías en la degradación de los PAHs por hongos y bacterias (Bamforth & Singleton, 2005b).

4.3 METABOLISMO FÚNGICO

El atributo que distingue a los hongos de otras formas de vida determina porque ellos son buenos biodegradadores. Primero, el crecimiento micelial da una ventaja

a las células individuales tales como bacterias y levaduras, especialmente con respecto a la colonización de sustratos insolubles. Los hongos pueden ramificar rápidamente a través de sustratos, y digerir a lo largo del camino por la secreción de enzimas extracelulares degradativas.

Segundo la naturaleza extracelular de estas enzimas degradadoras permite a los hongos tolerar altas concentraciones de químicos tóxicos que de ser posible estos compuestos tuvieran que ser llevados a la célula.

Ocupan diversos ambientes donde son constantemente desafiados por factores tales como pH extremos, temperatura, exposición UV, y la privación de nutrientes.

Los hongos tienen la capacidad para degradar un amplio rango de contaminantes químicos orgánicos ambientales. Su extendida red micelial y la baja especificidad de sus enzimas catabólicas son, entre otras características, la base de su alto uso potencial en la biorremediación (Carvalho *et al* 2013).

Entre las diversas estrategias que pueden utilizar los hongos para contrarrestar a numerosos compuestos incluidos los PAHs, se encuentran procesos no enzimáticos como la bioadsorción, biomineralización (bioprecipitación) y biotransformación mediados por sistemas enzimáticos. Además, los hongos pueden producir biosurfactantes, compuestos anfifílicos de superficie funcionalmente diversos con porciones hidrofílicas e hidrófobas que interactúan entre fases de diferentes polaridades, lo que resulta en la reducción de la tensión superficial e incrementa la interacción entre moléculas. (Cicatiello *et al.*, 2006 Günther 2017). La estructura de esos biosurfactantes implica, soforolípidos, complejos proteína-lípido/polisacáridos, glicolípidos y glicoproteínas. Estas moléculas representan una importante herramienta para la biorremediación (Olicón-Hernández *et al.*, 2017).

4.3.1 Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos pueden causar la oxidación de los PAHs por su complejo enzimático no específico, que normalmente se utiliza para despolimerizar la lignina, incluyendo la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), lacasa y

varias enzimas que generan H₂O₂. Estas enzimas son secretadas extracelularmente (Capotorti *et al.* 2003; Bamfort y Singleton 2005).

Bajo condiciones ligninolíticas los hongos pueden oxidar los PAHs por la generación de radicales libres el cual oxida al anillo de los PAHs (Bamfort y Singleton 2005).

4.3.2 Hongos no-ligninolíticos

La gran mayoría de hongos que crecen sobre sustratos distintos a la madera y no producen lignina peroxidasa, metabolizan PAHs mediante otra vía. Los hongos no-ligninolíticos metabolizan los PAHs por el citocromo P450 monooxigenasa y el epóxido hidrolasa, formando *trans*-dihidrodiolés de manera altamente regio-y estereoselectiva. (Bamfort y Singleton 2005)

El principal mecanismo que conduce a la degradación de los PAHs incluye la acumulación intracelular del contaminante y su posterior transformación, que inicia con la oxidación del anillo aromático por el citocromo P450 enzima monooxigenasa que cataliza la reacción para producir un óxido de areno, como se muestra en la figura 4. Esto posteriormente es hidratado a través de un epóxido-hidrolasa que cataliza la reacción para formar un *trans*-dihidrodiol. Además, derivados de fenol pueden ser producidos a partir de óxidos de areno por un reordenamiento no-enzimático del compuesto el cual puede actuar como un sustrato para la sulfatación, metilación o conjugación con glucosa, xilosa o ácido glucorónico (Bamfort y Singleton 2005; Sutherland, 1992; Sutherland *et al.*, 1995; Marco-Urrea *et al.*, 2015).

Sin embargo, enzimas extracelulares tales como lacasas también son producidas por algunos de estos hongos, las cuales pueden contribuir en la degradación de los PAHs. De acuerdo con diferentes autores, estos metabolitos generados por los PAHs son generalmente más solubles y menos tóxicos que los PAHs originales (Marco-Urrea *et al.*, 2015).

5. ENZIMAS

Como se ha mencionado, una de las principales clases de contaminantes orgánicos son los productos petroquímicos, que son persistentes en el medio ambiente. Se

conoce que muchas enzimas fúngicas tales como las oxigenasas, deshalogenasas, reductasas, hidroxilasas y deshidrogenasas son capaces de llevar a cabo la escisión de los anillos aromáticos mediante reacciones de oxidación de estas moléculas (Arora, Srivastava, Singh 2010).

De acuerdo a la literatura las enzimas extracelulares involucradas en este proceso son: Peroxidasas que contienen grupo Hemo: lignino peroxidasa (LPs; EC 1.11.1.14), Manganeso peroxidasa (Mn-Ps; EC 1.11.1.13), y peroxidasas (EC 1.11.1.7) con un amplio espectro de especificidad.

También se han descrito otras enzimas clasificadas como ELAs (Enzimas ligninolíticas auxiliares) que son generadoras de H_2O_2 como la aril alcohol oxidasa (E.C.1.13.7) y glioxal oxidasa (E.C. 1.2.3.5). Otro grupo de enzimas importantes del complejo ligninolítico incluye el superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1). Estas enzimas, así como también la glioxal oxidasa, generalmente actúan en forma coordinada, trabajando con las enzimas ligninolíticas, celulasas y hemicelulasas. (Taylor 2014). También encontramos a la flavina oxidasa: gluocosa oxidasa (EC 1.1.3.4); piranosa 2-oxidasa (EC 1.1.3.10); metanol oxidasa (EC 1.1.3.13); y aril alcohol oxidasa, involucradas en la formación de derivados hidroxilados y metoxilados de los compuestos aromáticos, estas enzimas generan principalmente el H_2O_2 requerido por las peroxidasas ligninolíticas y al mismo tiempo, oxidan los hidroxilos a carbonilos. (Rabinovich *et al.*, 2004).

Otro grupo son fenol oxidasas (lacasa, tirosinasa), enzimas que contienen cobre que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos con dioxígeno (O_2) como aceptor de electrones y sin la necesidad de coenzimas adicionales. Mientras que la lacasa no incorpora directamente el oxígeno directamente en los sustratos, la tirosinasa puede hacerlo junto con la oxidación de fenol/catecol. Sin embargo, la lacasa puede oxifuncionalizar moléculas, por ejemplo, los PAHs o fenoles, a través de la oxidación seguida por la desorción y adición de agua (Karich 2017).

Algunas enzimas pueden incorporar oxígeno de manera indirecta a través de mecanismos de radicales libres y/o adición de agua (por ejemplo, celobiosa

oxidasa, lacasa). Muchas de estas reacciones pueden ocurrir intracelularmente (mono- y dioxigenasas), mientras que la tirosinasa y peroxidasas trabajan extracelularmente (Karich 2017).

Otro conjunto de enzimas son las hidrolasas alteran la estructura de moléculas orgánicas. Estas enzimas son una herramienta para la eliminación del derrame de petróleo, organofosfatos, organoclorados y carbamatos (Hadibarata y Kristanti, 2014).

La degradación intracelular de estos hidrocarburos es mediada principalmente por el citocromo P450 que incluye la epoxidación del doble enlace C=C y la hidroxilación de los compuestos aromáticos. La biotransformación generalmente se lleva a cabo en dos pasos conocidos como reacciones de la fase I y II. La reacción de la fase I son generalmente reacciones que modifican la estructura agregando un grupo funcional. Esta reacción implica la oxidación por el citocromo P450 que conduce a un nuevo intermediario que contiene un grupo químico reactivo (hidroxil, carboxil, o un grupo amina). Además de las oxidaciones, reducciones, las reacciones de hidrólisis también son comunes en la fase I. Las reacciones de la fase II son reacciones de conjugación, en el que el metabolito de fase I forma sulfatos, glucósidos, glucurónicos o conjugados de glutatión, que en general, son metabolito más soluble y **menos tóxicos** (Marco-Urrea y Reddy 2012).

6. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

Los seres vivos utilizan oxígeno en su metabolismo para obtener energía y dentro de estos procesos se generan diferentes especies altamente reactivas, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, Tabla 1). Éstas se generan principalmente en la mitocondria y funcionan como moléculas señalizadoras en procesos celulares como producción de hormonas de crecimiento, factores de transcripción, regulación de transportadores de iones, entre otros (Kroll *et al.* 2013).

En algunos casos, las ROS juegan un papel positivo en los organismos, en particular, a través de proporcionar energía destructiva. Por ejemplo, las ROS más

producidas y reactivas son los radicales hidroxilo que sirven para alterar la celulosa y la lignina en hongos que degradan la madera (Gessler *et al.*, 2007)

Las ROS también son generados como una clase de compuestos que pueden actuar como un mecanismo de autodefensa durante la eliminación de los xenobióticos. La producción de ROS en grandes cantidades resulta nociva para los organismos, ocasionando daño celular, de ahí que cada organismo posea sistemas enzimáticos que regulan la sobreproducción de ROS. Dentro de este sistema enzimático que constituye el sistema antioxidante intrínseco, se encuentra el superóxido dismutasa. Esta es una enzima clave en la protección de la célula fúngica contra el estrés oxidativo causado por ROS, tales como peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radicales anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($OH\cdot$). Este superóxido dismutasa cataliza la reacción de anión radical superóxido a oxígeno y peróxido de hidrogeno. Estos radicales anión superóxidos comúnmente aparecen durante el ciclo de reducción de quinonas y también durante la acción de lacasa, MnP y LiP. ROS puede actuar como un agente oxidante o reductor, reaccionando con otros radicales producidos por las enzimas, contribuyendo a los procesos como el rompimiento de anillos aromáticos o desmetoxilación de xenobióticos. (Tyalor 2014).

Otro grupo de enzimas son las tioredoxinas, reductasas disulfuro de proteínas pequeñas (12-13KDa) como la glutaredoxinas, con un grupo activo-redox ditiol y sirve como donantes de electrones para la peroxidasa de tioredoxina (peroxirredoxina) que degradan H_2O_2 . Después de la oxidación, el glutatión y la tioredoxina son reducidos por la glutatión transferasa y la tioredoxina reductasa respectivamente. (Sato *et al.*, 2009).

Tabla 1. Lista de ROS

Simbolo	Nombre
---------	--------

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
O_2^-	Anión Superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical Hidroxilo
$\text{ROO}\cdot$	Radical Peróxilo
H_2O_2	Peróxido de hidrogeno
LOOH	Hidróperoxido Lipídico

7. EL CASO DE *Trichoderma sp.*

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que pertenece a la división Eumycota. Los miembros del género son cosmopolitas y colonizadores ubicuitinosos ellos viven en suelo y crecen saprofiticamente sobre madera o material celulósico, así como también en las rizosferas de las plantas, es un género de reproducción asexual. Se ha visto que tiene varios impactos positivos en plantas cultivadas que incluye un aumento de la biodisponibilidad y absorción de nutrientes, la mejora en el rendimiento de cultivos y la degradación de compuestos xenobióticos (Harman, 2006).

También se les conoce como colonizadores exitosos de sus hábitats, ya que tiene una maquinaria enzimática muy potente que consiste en celulasas, quitinasas, glucanasas, proteasas entre otras, para la utilización y descomposición de sustratos presentes en el suelo, pero en especial para la degradación de material lignocelulósico (Zafra y Cortés-Espinosa 2015).

El micelio en su mayoría es ralo y fino. Los conidióforos son ramificados que terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales (conidios haploides) y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, Las esporas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio figura 5. (Harman, 2000; Suriyagamon *et al.*, 2018).

Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, y la humedad. Para su crecimiento tiene un intervalo de pH relativamente amplio, comprendidos entre

2.0 y 9.0 con un pH óptimo entre 4.0 y 7.0. Puede utilizar como fuente de carbono a una gran variedad de sustratos complejos como celulosa, quitina, pectina y almidón, aunque puede emplear también ácidos orgánicos y monosacáridos, como fuente de carbono. Asimismo, asimila fuentes de nitrógeno como aminoácidos, urea, nitritos, amoniac, y sulfato de amonio (Aparicio- Bello 2010).

El género *Trichoderma* tiene la capacidad de secretar una gran cantidad de proteínas, metabolitos y ácidos orgánicos dentro del medio, se encuentra frecuentemente en el suelo y crece en madera, corteza, e innumerables sustratos, lo que demuestra su alto potencial oportunista y su adaptabilidad a diversas condiciones ecológicas. Algunas especies de *Trichoderma* de vida libre son oportunistas, simbioses en plantas y otros son micoparásitos (Druzhinina *et al.* 2006)

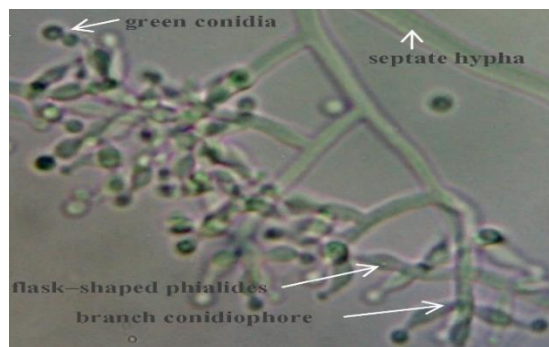


Figura 6. Microfotografía de *Trichoderma* sp.

Los miembros de este género han sido descritos como organismos de biocontrol eficaces, a través de la producción de metabolitos secundarios con aplicaciones potenciales como nuevos antibióticos (policétidos, pironas, terpenos, derivados de aminoácidos y polipéptidos). Por otro lado, estudios recientes han mostrado la habilidad y capacidad de *Trichoderma* a biotransformar contaminantes, incluyendo hidrocarburos (Zafra y Cortés-Espinosa 2015; Hadibarata *et al.*, en 2007; Argumedo-Delira *et al.*, en 2012; Zafra *et al.*, en 2014a; Zafra *et al.*, en 2014).

8. PROTEÓMICA

La proteómica es una de las nuevas tecnologías emergentes en función de la genómica. Esta representa el estudio holístico de todas las proteínas sintetizadas

como un resultado de la expresión de los genes de un organismo en un punto del tiempo y bajo un conjunto particular de condiciones fisiológicas (Crawford 2011).

El uso de la proteómica no solo es para identificar y cuantificar las proteínas expresadas diferencialmente, sino también para determinar su localización, modificaciones, interacciones, actividad y lo más importante su función (Loh y Cao 2008).

La investigación en proteómica fúngica está especialmente relacionada con hongos filamentosos, ya que ha progresado dramáticamente en los últimos 5 años. Esto debido a la disponibilidad de múltiples secuencias genómicas de hongos, y a las tecnologías proteómicas especialmente cromatografía líquida-espectrofotometría de masas en tándem (LC-MS), que han permitido la identificación y su asignación funcional (Doyle Sean 2011).

Recientemente la proteómica ha tenido un impacto en la degradación de compuestos xenobióticos debido a que: (1) implica un análisis comparativo que se centra en las enzimas de biodegradación y enzimas relacionadas (regulones) a partir de una mezcla de proteínas, (2) permite la separación y la identificación de isoenzimas o proteínas modificadas post- traduccionales, (3) caracterización del ciclo de vida de una proteína (degradación de proteínas), y (4) análisis de marcos de lectura abiertos (ORF) inducidos bajo condiciones específicas (Kim, Choi y Kahng 2007).

Por ello, la proteómica es una herramienta que se aplica para entender los mecanismos de biodegradación de diferentes tipos de compuestos en diversos organismos, por ejemplo, la biodegradación del insecticida N-metilcarbamato por *Burkholderia* sp. C3, o fenantreno por *Sinorhizobium* sp. C4, La degradación del 4-nonifenol por *Metarhizium robertsii*, la respuesta de *Mucor plumbeus* a pentaclorofenol, o la remoción de ácido benzoico por *Phanerochaete chrysosporium*.

9. ESPECTROMETRIA DE MASAS

Es una técnica de análisis usada para identificar componentes dentro de una muestra, y elucidar las propiedades químicas de diferentes moléculas. El proceso completo involucra la conversión de la muestra en iones gaseosos, con o sin la fragmentación, para ser caracterizados por su relación carga/masa (m/z) y su abundancia relativa. El instrumento consiste en tres principales componentes:

Fuente de iones: Para producir iones gaseosos a partir de la sustancia a que se estudia.

Analizador: Para resolver los iones en sus componentes característicos de acuerdo con su relación masa/carga.

Detector: Para la detección de iones y registrar la abundancia relativa de cada una de las especies iónicas resueltas.

Un procedimiento típico de MS consiste en:

- Ionización de la muestra (sólida, líquida, gaseosa)
- Los iones se separan según su relación masa/carga (m/z)
- Los espectros se muestran como espectros de abundancias relativa como función de la relación m/z .

A partir de los espectros, se utilizan la masa del ión molecular y los fragmentos para determinar la composición elemental o la firma isotópica de un compuesto. Esta información se utiliza para determinar las estructuras químicas de las moléculas, como los pesticidas o péptidos (Agilent 2018)

LC-MS/MS

La cromatografía líquida (LC) en combinación con tándem MS (LC/MS/MS), posibilita la identificación de múltiples proteínas de una compleja mezcla de péptidos. Los fragmentos son digeridos directamente por una proteasa sitio-específica, tal como la tripsina, seguido por una liberación de los péptidos y la separación en LC (Matsuzuki *et al.*, 2014).

Es la técnica básica para el análisis proteómico debido a su precisión, resolución y sensibilidad, y su alto rendimiento. La MS permite la identificación de las especies proteicas y la caracterización de modificaciones post-traduccionales. En la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), las secuencias de los péptidos se identifican por correlación de espectros adquiridos de fragmentos de iones con espectros teóricos previstos para cada péptido contenido en una base de datos de secuencias de proteínas o mediante la correlación de espectros adquiridos de fragmentos de iones con las bibliotecas de espectros de MS/MS construidas experimentalmente identificado en experimentos previos (González-Fernández *et al.*, 2014).

10. FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO

El término de fermentación sólida (FSS) se define como el proceso en el cual los microorganismos crecen en materiales sólidos sin la presencia agua. Se han usado dos tipos de sistemas de FSS. El sistema más comúnmente utilizado implica un material natural y con menor frecuencia un soporte inerte impregnado con medio líquido. La fermentación de este tipo, la cantidad de agua no puede exceder la capacidad de saturación del sólido, en el cual el microorganismo crece (Aguilar *et al.*, 2008; Bharvav *et al.*, 2008).

La FSS en muchos casos se caracteriza por lo bajos requerimientos de energía, la baja disponibilidad de agua reduce la posibilidad de contaminación por bacterias o levaduras. Condiciones similares a los hábitats naturales de los hongos, la inoculación con esporas facilita su dispersión uniforme a través del medio y la mayoría de las veces es medio es bastante simple.

La FSS ofrece mayores posibilidades cuando se utilizan hongos. Porque estos microorganismos tienen la habilidad para colonizar y penetrar en el sustrato sólido, sin embargo, una desventaja es la estrecha interacción entre el micelio y el sustrato sólido no permite una recuperación completa de la biomasa, lo que dificulta la estimación de la tasa de crecimiento y de rendimiento, pero se han idea métodos para medir de manera indirecta el crecimiento como es la producción del CO₂ (Bharvav *et al.*, 2008).

Los hongos filamentosos son los microorganismos más adecuados para FSS, debido a su relativa tolerancia a bajas actividades de agua, su alto potencial para excretar enzimas hidrolíticas y morfología. Su morfología permite que estos hongos colonicen y penetren en el sustrato sólido como se muestra en la figura 7 (Rahardjo, 2005; Hölker y Lenz 2005)

FSS puede ser llevada sobre un soporte inerte, tales como resinas intercambiadoras de iones, (amberlita) y espuma de poliuretano (EPU) donde los nutrientes de un medio líquido son absorbidos. El uso de soportes inertes permite la determinación biomasa como peso seco, la limpieza del extracto enzimático, y una aireación más homogénea.

El EPU se ha utilizado como un soporte adecuado para la fermentación FSS, ya que presenta una alta porosidad, baja densidad y una absorción relativa de agua. El EPU tiene un tamaño adecuado de poro que proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento fúngico (Marin-Cervante *et al.*, 2007).

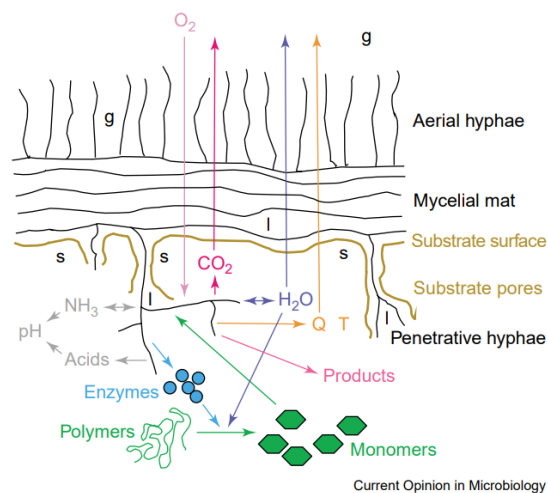


Figura 7. Esquema de un proceso a microescala que ocurre durante la fermentación en estado sólido. Después de la esporulación se desarrollan hifas fúngicas (negro), que se extienden sobre la superficie de las partículas que componen el sustrato (marrón). El desarrollo de calor (Q; naranja) conduce a un aumento rápido de la temperatura (T), que es un problema grave durante la SSF. El calor es por lo tanto eliminado del sustrato no solo por conducción sino también por evaporación, que es parte del complejo equilibrio de agua en el sistema (azul oscuro). Como otro factor importante, el pH local, podría cambiarse debido a la liberación de ácidos de carbono y el intercambio de amoníaco (gris). Los productos bioquímicos de interés (magenta) que se liberan en la matriz sólida y los llenos de líquido los espacios durante la fermentación podrían absorber al sólido y podrían tener que extraerse para un uso posterior al final del proceso (Hölker y Lenz 2005).

11. ANTECEDENTES GENERALES

Harrison en 2009 realizó un estudio con hongos no-ligninolíticos *Fusarium flocciferum* y *Trichoderma* spp., hongos ligninolíticos *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* en suelo contaminado con PAHs (fenantreno 250 mg kg⁻¹, criseno 150 mg kg⁻¹, benzo(a)antraceno 220 mg kg⁻¹, benzo(a)pireno 200 mg kg⁻¹ y benzo(a)fluorantreno 100 mg kg⁻¹) con presencia de cadmio y níquel durante diez semanas a dosis de 50, 100, 300 y 500 mg kg⁻¹. Lo cual demuestra la capacidad de los hongos a degradar los PAHs de bajo y alto peso molecular en especial en *Trichoderma* spp.

Argumedo-Delira *et al.*, en 2012 evaluó la tolerancia de 11 cepas de *Trichoderma* en hidrocarburos del petróleo (con dos, tres y cinco anillos aromáticos), se demostró que la cepa de *Trichoderma* fue viable para crecer en medios de cultivo sólido contaminado con fenantreno, naftaleno, y benzo[a]pireno, se observó cambios morfológicos en cuanto a su crecimiento dependiendo del tipo de contaminante en el medio de cultivo. *Trichoderma* fue capaz de tolerar dosis de 250 mg L⁻¹ de fenantreno o naftaleno, así como también de benzo[a]pireno.

Carvalho *et al.*, en 2012 estudiaron la respuesta de *Mucor plumbeus* a la presencia del pentaclorofenol (PCF), el cual es usado en la industria principalmente como herbicida e insecticida. Ellos observan que la presencia del PCF incrementa los niveles de energía, altera la arquitectura de la pared celular e induce una respuesta significativa de estrés; ubican a proteínas tales como HSP70, citocromo c peroxidasa a NAD y Zn dependiente de ADH, la cual es probable que participa en la degradación del PCF.

En una investigación por Kumari *et al.*, 2013 estudió la vía de degradación con pireno a 100mg kg⁻¹ con cepas bacterianas BP10, P2 y PSM11 por 14 días de incubación, se encontró que producen biosurfactantes, proteolipidos e identifican dos familias de proteínas implicadas: aldehído deshidrogenasa y la isocitrato liasa., seguida por la vía de degradación mediada a través de la formación de 2-carboxibenzaldehido, orto ácido ftálico y catecol como intermediarios.

En 2014 Szewczyk *et al.*, estudia el proteoma intracelular de *Metarhizium robertsii* un hongo capaz de degradar el 4-*n*-nonifenol, un compuesto que afecta al sistema endocrino, además de ser un contaminante ambiental. Ellos establecen una vía de degradación y los grupos principales de proteínas que se identifican son los sistemas de oxidación-reducción, proteínas relacionadas con nitrorreductasas, como sistemas de defensa ROS (peroxiredoxima y superóxido dismutasa) y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos sistema relacionados con la energía.

12. ANTECEDENTES DIRECTOS

En 2014 Zafra *et al.*, aisló un consorcio fúngico de 12 hongos para evaluar el potencial y la tolerancia a las altas concentraciones de diferentes PAHs como son el fenantreno, pireno y benzo[a]pireno. Al identificar y aislar a *T. asperellum* observa que es el organismo más tolerante a una concentración de 6,000 mg l⁻¹, aunque la esporulación llega solo hasta 4,000 mg l⁻¹.

Esto demuestra la capacidad de *T. asperellum* a ser un agente en la biorremediación debido a su elevada tolerancia para los PAHs de alto y bajo peso molecular y su habilidad para usar estos como fuente de carbono.

En un estudio posterior de Zafra *et al.*, en 2014 se demostró la capacidad y adaptación de *T. asperellum* H15 para degradar PAHs de bajo y alto peso molecular en un suelo contaminado, produciendo más CO₂. Observo que la degradación de la mezcla de PAHs fue un 74% para fenantreno, 63% pireno y un 81% de benzo[a]pireno. Encontró actividad enzimática de lacasas, peroxidasas y 1,2 dioxigenasas implicadas en la degradación de los PAHs.

Cortés-Ramírez, 2016 (datos sin publicar), estudió el proteoma extracelular de *T. asperellum* H15, en presencia de 1000 mg l⁻¹ de pireno, en fermentación en estado sólido usando el EPU, como soporte inerte.

13. JUSTIFICACIÓN

Se sabe que ciertos hongos no-ligninolíticos en especial *T. asperellum* H15 es un organismo que contribuyen a la oxidación de los PAHs. Lo cual es esencial para entender en un proceso de biorremediación, debido a que las vías metabólicas, los mecanismos bioquímicos y enzimas involucradas en el metabolismo de estos, son cruciales para llevar una completa remoción. Así la proteómica se integra como una técnica que permite un análisis del conjunto de las proteínas expresadas en un momento y bajo ciertas condiciones dadas, la cual nos puede proporcionar información cuando *T. asperellum* H15 se encuentra en presencia de pireno; que ayudaría probablemente a la elucidación de enzimas claves implicadas en la degradación de los hidrocarburos aromáticos.

14. HIPOTESIS

La exposición de *T. asperellum* H15 a pireno en induce cambios en su expresión génica, traducidos en cambios sobre la composición proteica que provoca la expresión o sobreexpresión de proteínas intracelulares implicadas en la remoción de pireno.

15. OBJETIVOS

15.1 Objetivo General

Analizar el proteoma intracelular de *T. asperellum* H15 durante un proceso de biodegradación con pireno, para identificar los intermediarios formados y establecer la posible ruta de degradación.

15.2 Objetivos Particulares

Determinar el perfil proteico intracelular de *T. asperellum* H15 en respuesta a pireno en cultivo sólido usando como soporte inerte espuma de poliuretano EPU

Identificar los intermediarios formados intracelularmente durante la degradación de pireno por *T. asperellum* H15 en cultivo sólido usando como soporte inerte EPU

Elucidación de la vía de degradación de pireno a través de la proteómica en *T. asperellum* H15 en cultivo sólido usando como soporte inerte EPU

16. Estrategia Experimental

Etap 1. Se evaluaron los procesos de biodegradación de pireno a través de una cinética de degradación con *T. asperellum* H15, sobre EPU, durante quince días, tabla 2. Las variables de respuesta que se analizarán serán cada 24 horas, cada vial será sacrificado cada 24 horas para medir degradación de pireno.

Unidad experimental: Botellas serológicas.

Variables: Cuantificación de CO₂, azúcares reductores, pH, degradación de pireno, y actividad enzimática lacasa.

Tabla 2. Diseño experimental de cinética en EPU

Tratamiento	Tiempo (d)													
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Trichoderma+Py	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Trichoderma-Py	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Control -inóculo+Py		xxx		xxx		xxx		xxx		xxx		xxx		xxx
Control-inóculo-Py		xx			xx				xx				xx	

Etap 2. Extracción de las proteínas intracelulares. Se evaluaron tres protocolos, para ello se realizó una cinética del cual al quinto día todas las unidades fueron sacrificadas y extraídas las proteínas. Posterior a la estandarización se realizó una cinética de la cual se tomaron diferentes tiempos como se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental para el aislamiento de proteoma intracelular

Tratamiento	Tiempo (d)				
	3	5	8	10	12
Trichoderma+Py	6 UE	6 UE	6 UE	6 UE	6 UE
Trichoderma-Py	6 UE	6 UE	6 UE	6 UE	6 UE
Control-inóculo+Py	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE
Control-inóculo-Py	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE

Diseño Experimental

Unidad experimental: Botellas serológicas.

Variable: Electroforesis 1-D y cuantificación de proteínas

Etapas 3. Para la extracción de intermediarios se realizó una cinética como se observa en la tabla 4 en cada tiempo se sacrificaron 3 unidades experimentales. El sobrenadante del EPU fue colocado en tubos falcón y este fue sometido a tres extracciones sucesivas con acetato de etilo, y dejados a temperatura ambiente por 24 horas en agitación, posteriormente se extrajo el solvente, se evaporó y el residuo se resuspendió en 1ml de acetato de etilo. Se llevó a cabo un análisis por cromatografía en capa fina (CCF).

Se usaron diferentes mezclas de disolventes como fase móvil

- 1) Mezcla butanol/ácido acético/agua
- 2) Mezcla hexano/acetato de etilo
- 3) Mezcla diclorometano/hexano
- 4) Hexano

Los spots fueron visualizados con una lámpara de UV.

Unidad experimental: Botellas serológicas.

Variable: Extracción y cuantificación de productos de la degradación de pireno

Tabla 4. Diseño experimental para la identificación de intermediarios formados intracelularmente por la presencia de pireno

Tratamiento	Tiempo (d)				
	3	5	8	10	12
Trichoderma+Py	3 UE	3 UE	3UE	3 UE	3 UE
Trichoderma-Py	3 UE	3 UE	3 UE	3 UE	3 UE
Control-inóculo+Py	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE
Control-inóculo-Py	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE	2 UE

17. MATERIAL Y MÉTODO

Inoculo

La cepa utilizada fue *T. asperellum* H15, el cual se encuentra conservado en el cepario de Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala-México.

Medios

Agar papa Dextrosa (PDA)

Este medio de cultivo se usó para la conservación, propagación y esporulación de la cepa *T. asperellum*. Esto se realizará en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50ml de medio PDA, los cuales serán inoculados e incubados a una temperatura de 30°C durante 4 días para la esporulación.

Medio Czapeck

Este medio es utilizado para la fermentación en estado líquido.

Solución de sales	
Cloruro de potasio (2x)	0.5g
Fosfato dipotásico (2x)	1g
Nitrato de sodio (2x)	2g
Sulfato ferroso (2x)	0.01g
Sulfato de magnesio (2X)	0.5g
Sacarosa	15 g

Pretratamiento de soporte inerte EPU

El EPU es cortado en cuadros de 1 x1 cm. Posterior a eso se le adiciona HCl al 10% (v/v) por 10 minutos, se elimina los restos del HCl con agua destilada, y se le adiciona NaOH al 4% (p/v) para nuevamente ser lavado con agua destilada y eliminar residuos y alcanzar un pH de 7. Este es colocado en una estufa a 60°C durante 24hrs, para ser usado.

Extracción de esporas

Los matraces con PDA se inocularon con la cepa *T. asperellum* H15 por un periodo de 4 días, a una temperatura de 30°C para obtener esporas y ser cuantificadas en la cámara de Neubauer, para tener una concentración final de 2×10^7 .

Cultivo sólido en soporte inerte

Se prepararon botellas serológicas a las cuales se les adiciono 0.5g de EPU pretratado. A cada botella se le adiciono pireno a una concentración de 1000ppm diluidos en 15ml de acetona. Posteriormente se dejaron en la campana de extracción para dejar volatilizar la cetona.

17.1 Tratamientos para aislamiento de proteínas intracelulares

Protocolos realizados para la lisis celular.

17.1.1 Ruptura mecánica celular

Método propuesto por Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2010

Para la extracción de proteínas, se sigue lo siguiente:

- 1.- El EPU es suavemente lavado con PBS para eliminar la parte extracelular y se coloca en tubos falcon.
- 2.- Se añade 10% (p/v) TCA/ acetona
- 3.- Sonicar por 20 minutos (50 W, amplitud 60) a 4°C.
- 4.- Llenar el tubo con 10% (w/v) TCA/acetona, mezcla y vortexear.
- 5.- Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos (4°C) y eliminar el sobrenadante por decantación.
- 6.- Llenar el tubo con 0.1 M de acetato de amonio en 80% (v/v) de metanol. Mezclar bien en vortex.
- 7.- Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos (4°C) y descartar el sobrenadante.
- 8.- Llenar el tubo con 80% (v/v) de acetona. Mezclar bien en vortex.

9. Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos (4°C) y descartar el sobrenadante.
- 10.- Dejar secar a temperatura ambiente para eliminar la acetona residual.
- 11.-Adicionar 1.2mL de 1:1 fenol (pH 8,) / SDS buffer. Mezclar bien usando una pipeta y vortex. Incubar por 5 minutos en hielo.
- 12.- Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos. Transferir la fase superior de fenol dentro de un nuevo tubo de 1.5 mL.
- 13.- Llenar el tubo con 0.1 M de acetato de amonio en 100% (v/v) de metanol, mezclar bien y permitir que la precipitación dure toda la noche a -20°C.
14. Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos (4°C) y descartar el sobrenadante.
- 15.- Lavar el sedimento con 100% de metanol y mezclar en vortex.
- 16.- Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos (4°C) y descartar el sobrenadante.
17. Lavar el sedimento con 80% (v/v) de acetona y mezclar en vortex.
- 18.- Centrifugar a 16,000 x g por 5 minutos (4°C) y descartar el sobrenadante.

Ruptura con lisis vía ebullición con una fuerte solución alcalina

17.1.2 Método Lisis alcalina

Propuesto por Chourey *et al.*, 2010

- 1.- El EPU es suavemente lavado con PBS para eliminar la parte extracelular
- 2.-Posteriormente se colocan en tubos falcon
- 3.- Se adiciona un buffer , 5% SDS, 2% β mercaptoetanol, 0.15 M de NaCl, 0.1mM de $MgCl_2$, 100mM de Tris-HCl,
- 4.- La solución se calienta por 10 minutos a 90°C, después se eliminan los materiales insolubles por centrifugación (15,000g por 10 minutos).
- 5.- Se añaden 100% de TCA hasta llegar a una concentración del 20% se deja toda a (-20°C) y la solución se incuba toda la noche.

6.-Después es centrifugada (15,000g por 10 minutos) el precipitado se lava con acetona fría (-20°C).

*El procedimiento se repitiendo nuevamente variando el tiempo de calentamiento de la solución, por 20 minutos.

Ruptura celular mediante sonicación

17.1.3 Método Sonicación

Propuesto por Kim *et al.*, 2004

1.- El EPU es suavemente lavado con PBS para eliminar la parte extracelular, se coloca en tubos falcon.

2.- Se adiciona buffer de lisis que contiene 0.5 M de Tris-HCl pH 8.3, 2% de triton X-100, 20mM, MgCl₂, 2% β mercaptoetanol y 1mM PMSF.

3.- Se añade a las muestras en iguales y dobles cantidades en relación con el micelio respectivamente.

4.- Posteriormente es sonicado por 20 minutos a 4°C.

5.- Después es centrifugado a 12 000xg por 14 minutos a 4°C el sobrenadante es precipitado con 4 volúmenes de acetona fría.

6.- Se centrifuga a 3000xg por 10 minutos y el pellet es lavado nuevamente con acetona.

*Se repitió nuevamente el procedimiento, solo cambiando la variable de tiempo de sonicación por 30 minutos.

17.2 1D-SDS- Electroforesis en gel de poliacrilamida

Esta se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 12% SDS-PAGE precast gel (BIO-RAD) (v/v), en SDS-PAGE. Cada pozo tenía 100 µg de proteína que estaba disuelta en 25 µl de Lammeli Sample Buffer (BIO-RAD) que previamente habían sido calentadas a 95°C por cinco minutos para su posterior separación en un Bio-Rad 1000/500 a 150 V por 1.5 horas. Después fueron teñidas con azul de coomassie al 0.25 % (p/v).

17.2.1 Digestión con tripsina

Las bandas de las proteínas teñidas fueron cortadas en tres fracciones en igual tamaño. Cada fracción se volvió a dividir en cuadro más pequeños y colocados en tubos eppendorf, como se observa en la figura 7.

Las proteínas fueron reducidas con 10mM de ditioneitol (DDT) en 100mM de bicarbonato de amonio (ambic) por una hora a 57°C. Después se procedió a eliminar el DDT, las proteínas reducidas se alquilaron con 55mM de yodoacetamida en 10 mM de bicarbonato de amonio por 1una hora a temperatura ambiente en oscuridad.

Las proteínas alquiladas fueron lavadas con 100 mM de bicarbonato de amonio, hidratadas con acetonitrilo y se llevó a sequedad con una centrifuga de vacío por 45 minutos. La digestión de las proteínas fue hecha por la adición de tripsina (Promega) en una tasa de 1µg por cada 50µg de proteína e incubada a 37°C toda la noche. Los péptidos fueron lavados con una solución de 50% acetonitrilo, 49.9% de agua y 0.1% de ácido fórmico. Los fragmentos de los péptidos se recuperaron por tres lavados secuenciales. Los péptidos fueron filtrados por una columna C-18 y llevados a sequedad en una centrifuga de vacío para su análisis.

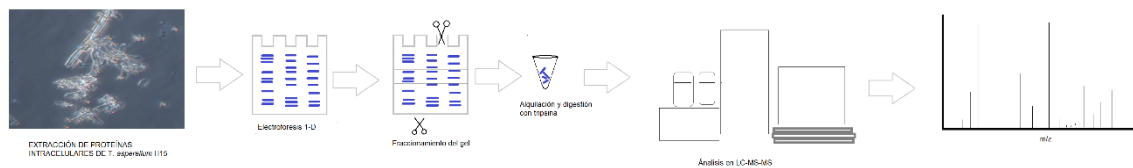


Figura 8. Metodología general para el análisis de las proteínas en LC/MS-MS EN *T. asperellum* H15

17.3 Métodos analíticos

Cuantificación de CO₂

Con la concentración de CO₂ se mide indirectamente la tasa de crecimiento de la población de *T. asperellum*. En cada una de las botellas serológicas, se colocó un sistema de aireación, por 15 minutos para capturar el CO₂ que, mediante una titulación de HCl, proporciona la concentración.

Medición de pH

El pH será medido en la cinética de PUF cada 48 horas, tomando una muestra de EPU de cada matraz, exprimirlo y al extracto resultante se le medio el pH, con un potenciómetro.

Extracción y cuantificación de Pireno

De cada cinética se sacrificará una unidad experimental en los días programados, se colocarán en una estufa para eliminar la humedad.

Después se tomarán los 1.5g del EPU y serán colocados en un tubo falcón y se adicionara una mezcla de hexano/acetona 1:1 de 40ml, posteriormente se agitarán de 30min a una hora, y centrifugados 6000rpm para recuperar el pireno residual, que se determinará mediante análisis por cromatografía líquida (HPLC)

Condiciones. Columna de fase reversa C18 (1.50x4.6mm) bajo lo siguiente: Flujo: 1ml/min, volumen de inyección: 5µl, T°25°C, presión de columna: 230 psi, durante 7 minutos en un gradiente 100% acetonitrilo. Los resultados se comparan con una curva de calibración.

Condiciones de GC/MS.

Las muestras obtenidas de la cinética de identificación de intermediarios fueron analizadas en Cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS), las condiciones fueron las siguientes: Columna HP-5ms (12-60 metro de largo, 0.18-0.22 mm de diámetro, y un espesor de 0.10-10µm), las condiciones. La temperatura fue: 80 °C (2minutos isotérmico), 80-150°C, (150-270°C) a 30°C. La tasa de flujo del helio fue de 1mL/min). Los resultados fueron comparados con una biblioteca.

17.4 Análisis en LC-MS/MS

Los péptidos fueron disueltos en 20µl de solución A (100mM formato de amonio) y con 0.1 % de ácido. Las muestras se depositaron en un cartucho de polipropileno contenido en un vial de HPLC, para ser insertadas en un Sistema Ultimate 3000 LC (Thermo Scientific Dionex). Se unió un LC capilar Agilent 1100 (Palo Alto, CA) en el espectrómetro de masas, utilizando una columna C18 (Rainin, Woburn, MA), empaquetada en un capilar de sílice (10,5 cm x 100 micras) a menos de 1000 psi de presión utilizando nitrógeno gaseoso. El tiempo de análisis de las muestras fue de 3 h para cada una.

La fase móvil era el buffer A, y la fase estacionaria, el buffer B (99.9% de ACN / 10 mM formato de amonio con 0.1% de ácido fórmico). Los péptidos separados por la columna se inyectaban directamente al espectrómetro de masas con trampa de iones LTQ lineal a través de una fuente de electrospray (Thermo Fisher, San Jose, CA) usando un voltaje de 2500 V.

El instrumento se ajustó para adquirir los espectros MS/MS de los 9 iones precursores más abundantes de cada análisis.

17.5 Búsqueda de bases de bases de datos e identificación de proteínas

Los espectros de masas en tándem en bruto se convirtieron en archivos mzXML, y en formato .PKL (peak list). Los archivos PKL se buscaron usando Mascot (Matrix Scientific, Boston, MA) contra la base de datos blancos que fue tomada de la NCBI para el género *Trichoderma*. Los ajustes de Mascot fueron los siguientes: escisión enzimática trípica que permite hasta dos divisiones omitidas, tolerancia a péptidos de 800ppm, tolerancia a iones fragmentados 0.8Da, modificación fija debido a carboxi aminometilación de cisteína (+57 Da) y modificaciones variables de oxidación de metionina (+16Da) y desaminación de asparagina o glutamina (+0.98Da)

18. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera etapa consistió en llevar a cabo la cinética de crecimiento de *T. asperellum* H15 en EPU. Como se puede observar en la figura 9 se muestra la formación de CO₂ como medida indirecta de crecimiento. Se puede observar que la máxima producción de CO₂ instantáneo se llevó a las 48 horas, tanto del grupo control con 26.4 mgCO₂*g_{PUF} (línea punteada anaranjada) como en presencia de pireno con 34.32 mgCO₂*g_{FUF} (línea azul continúa) presentando mayor actividad en pireno, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ambos tratamientos (ANOVA de dos vías α 0.05%). Mientras que la curva del CO₂ acumulado es la suma de las actividades instantáneas, se observa que tanto en presencia de pireno (línea amarilla continúa) como en ausencia (línea verde punteada) es el mismo comportamiento a lo largo del tiempo. Lo que demuestra que el crecimiento y el metabolismo no se ve influenciado por la presencia del pireno, esto refleja su capacidad de adaptación y tolerancia a este hidrocarburo como lo cita Zafra et al., 2014, y los datos concuerdan con lo reportado por Cortés-Ramirez 2017.

Se tomaron microfotografías, al tercer día de la fermentación en EPU, con un microscopio Zeiss a 40x, como se observa en la figura 10 tanto en presencia como en ausencia de pireno, del cual podemos visualizar que el crecimiento en presencia y ausencia de pireno morfológicamente

Por otra parte, la actividad metabólica se encuentra ligada a la descomposición del sustrato y como se puede observar en la figura 10, se muestra la gráfica del consumo de sacarosa, por *T. asperellum* H15, la línea punteada anaranjada es en ausencia de pireno (control de crecimiento) en la cual observamos que las primeras 24 horas después de haberse llevado la inoculación se había consumido alrededor del 43%, mientras que en presencia de pireno (línea azul), se observó que se había consumido el 52%. Esto demuestra que *T. asperellum* se encuentra fisiológicamente activo; por el mayor consumo de glucosa. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (ANOVA de dos vías α 0.05%), por lo que ambos grupos presentan el mismo patrón de consumo. Esto significa que la

presencia de pireno no afecta el crecimiento y metabolismo de *T. asperellum*, confirmándose su capacidad de adaptación a este compuesto.

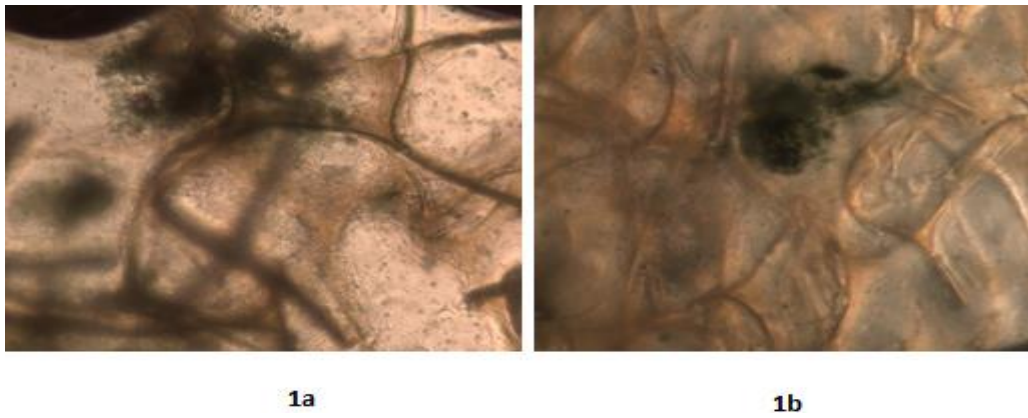


Figura 10. *T. asperellum* H15 en cultivo sólido usando EPU control (1a), y en presencia de pireno (2b), las observaciones fueron hechas con un microscopio óptico al 40x.

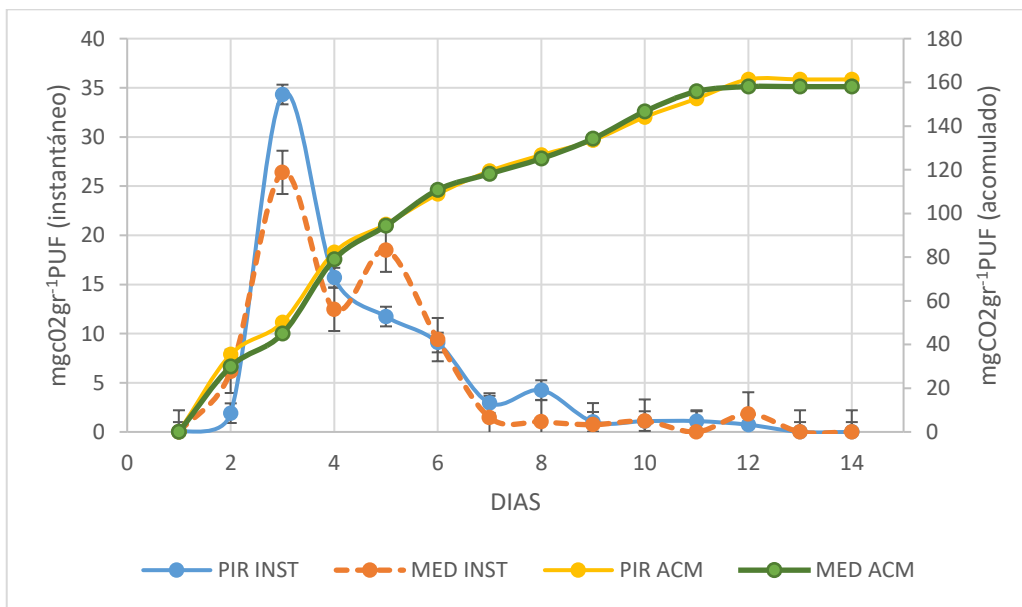


Figura 9. Gráfica de actividad heterotrófica de *T. asperellum* H15 en cultivo sólido en EPU con 1000mg L⁻¹ de pireno.

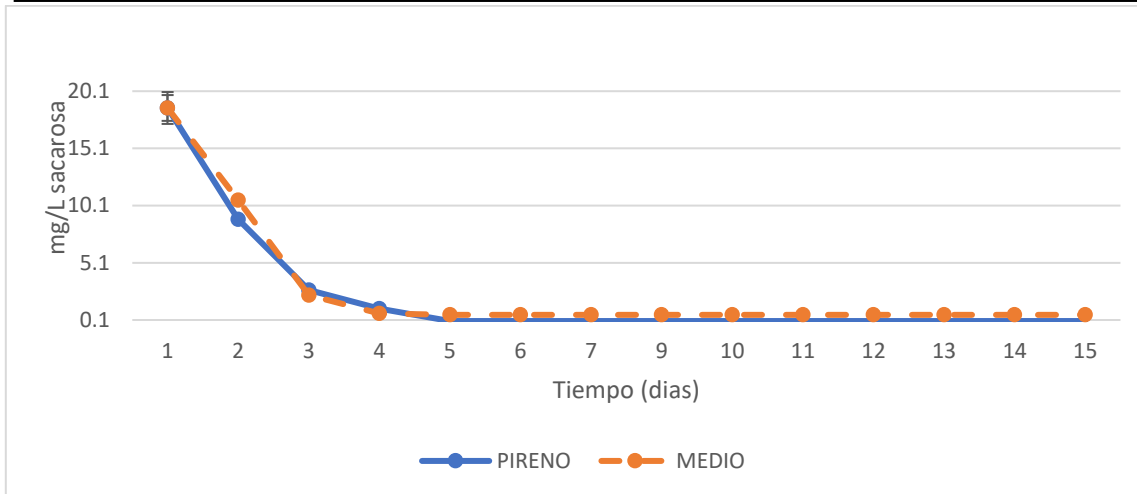


Figura 11. Gráfica del consumo de azúcares en *T. asperellum* H15. La línea azul es en presencia de pireno y la naranja en ausencia del pireno en EPU.

El pH fue otra variable a medir cada 24 horas, el medio Czapek se ajustó a un pH inicial de 5.5, sin embargo, este fue incrementando conforme al tiempo llegando a un pH final de 8.5 esto posiblemente a las actividades de metabolismo fúngico que pueden incrementar la alcalinidad del medio, debido al consumo de agua, la oxidación de ácidos orgánicos, la mineralización de la urea y la asimilación del nitrato. Siendo este último, posiblemente el causante del incremento del pH, ya que su asimilación de convertir el nitrato, en amonio, dará como resultado un aumento en el pH, (Hou et al., 2012; Guggiari et al., 2011). Se sabe que en un proceso de biorremediación este es un factor importante, aunque Tahri et al., 2013 menciona que la biodegradación puede ocurrir bajo un amplio rango de pH; sin embargo, aunque un pH de 6.5 a 8.5 es generalmente el óptimo en muchos sistemas acuáticos y terrestres.

Por otra parte, se midió la actividad enzimática lacasa, una enzima implicada en la oxidación de los PAHs, se ha reportado que esta enzima puede oxidar a un amplio grupo de sustratos con un alto potencial redox; estudios *in vitro*, han mostrado que esta enzima es capaz de oxidar una amplia gama de PAHs incluido el pireno (Pozdnyakova et al., 2006; Fernando et al., 2015). Como se puede observar en la figura 12, presento su mayor actividad en presencia de pireno (línea azul punteada)

en los días 2, 5, 9, y 13, aunque esta enzima es producto del metabolismo secundario, su mayor actividad la presenta a las 24 horas, esto posiblemente por la presencia del pireno, la cual podría tener un papel clave durante el proceso de biodegradación.

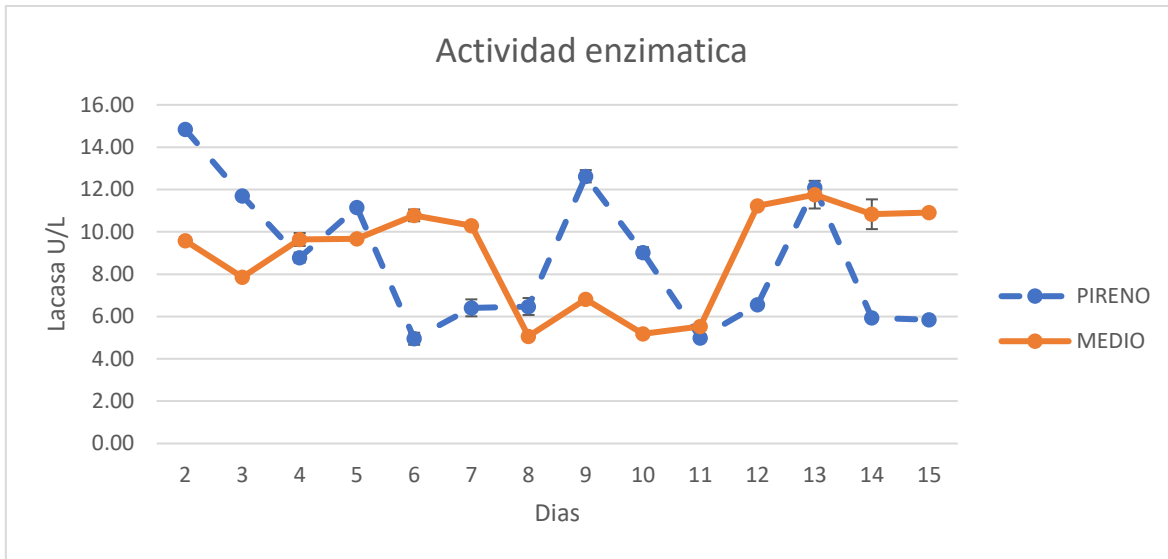


Figura 12. Gráfica de la actividad enzimática lacasa durante la fermentación en cultivo sólido en EPU.

Los hongos no-ligninolíticos como es el caso de *T. asperellum* pueden crecer en un amplio espectro de fuentes de carbono como la glucosa, celulosa, proteínas, lípidos, así como hidrocarburos incluidos los PAHs, los cuales pueden utilizar como fuente de carbono o co-metabolizar sin la obtención de energía (Morelli *et al.*, 2010). Como podemos observar en la figura 13, en los primeros días es cuando encontramos una mayor remoción de hasta un 26%, lo cual puede ser indicio de un co-metabolismo ya que en estos días hay una mayor producción de CO₂, y consumo de sacarosa, sin embargo, no se observa un incremento en la remoción de pireno, esto posiblemente al pH, ya que se ha observado que el mejor pH para un proceso de biodegradación es alrededor de 5, otro indicativo se debe a que la enzima lacasa presenta actividad óptima a pH ácido (Pawar 2015).

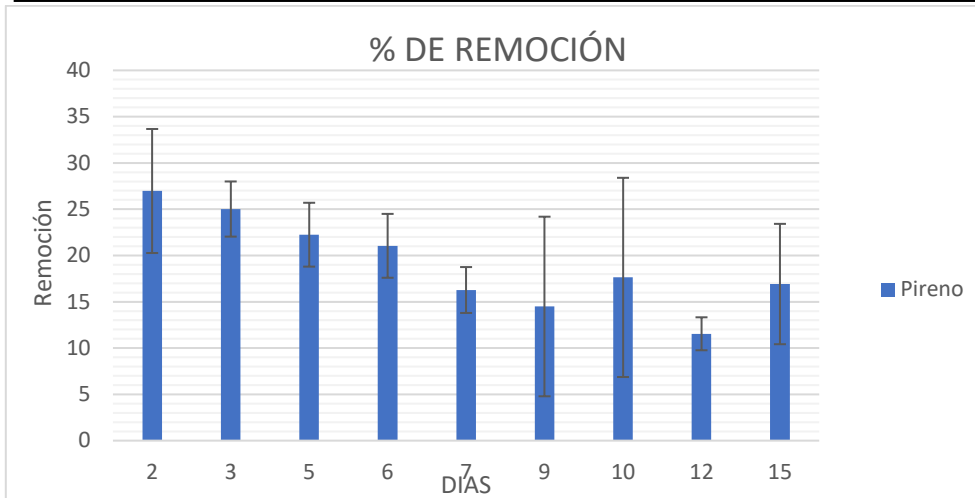


Figura 13. Gráfica de degradación de pireno, usando soporte inerte EPU, por *T. asperellum* H15

18.1 Comparación de la extracción de proteínas intracelulares

Para la extracción de proteínas en *T. asperellum* H15 de los tres métodos propuestos el primero Chourey *et al.*, 2010, el segundo por Kim *et al.*, 2014 y tercero por Gonzales-Fernández *et al.*, 2010 se obtuvieron los siguientes resultados. En la figura 13 se muestran los tres métodos de lisis llevados a cabo, en la figura IA, IB, las muestras fueron calentadas por 10 minutos en la figura II A, II B, las muestras fueron calentadas por 20 minutos, en las figuras III A, III B, las muestras fueron sometidas a sonicación por 20 minutos y en la figura IV A, IV B, por 30 minutos. Por último, en la figura V A y V B, fue el tratamiento TCA/Acetona-fenol. De los protocolos realizados el tratamiento con TCA/acetona-fenol, se observa bandas y un mayor número de estas con respecto a los otros tratamientos antes descritos, los cuadros rojos muestran aquellas bandas que no están presentes en ninguno de los tratamientos anteriores. También se tomaron microfotografías en un microscopio Zeiss a 100x, donde fue posible observar la desintegración de las hifas de *T. asperellum*, al tercer día de la fermentación figura 14.

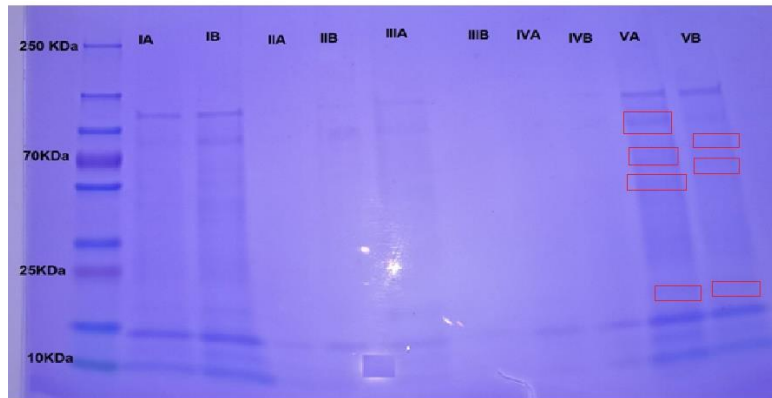


Figura 14. Extracción de proteínas de *T. asperellum* H15 en EPU. En los tres tratamientos (IA), (IIA), (IIIA), (IVA), (VA), ambos tratamientos en ausencia de pireno y (IB), (IIB), (IIB), (IVB), (VB), tratamientos en presencia de pireno, los recuadros rojos son aquellas bandas que están presentes en la lo anteriores tratamientos.

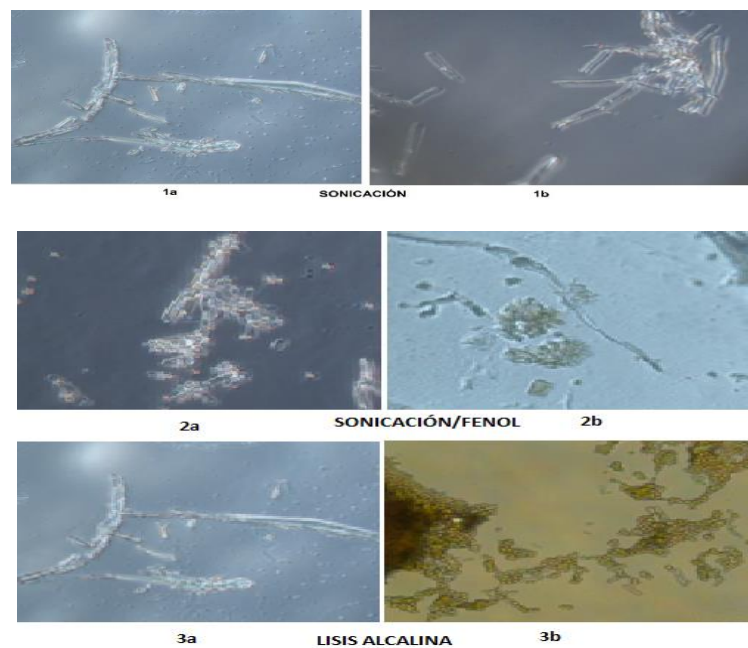


Figura 15. Microscopia de *T. asperellum* después de haberse llevado a cabo la ruptura celular de los tres tratamientos descritos. (2a) sin la presencia de pireno, (2b), (3a) sin pireno (3b) en presencia de pireno. Las observaciones microscópicas fueron hechas en un microscopio óptico al 100x.

Posterior a ello se repitió el procedimiento para lisis alcalina y el tratamiento con TCA/acetona-Fenol, para cuantificar la proteína total por BCA, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Tabla 5. Cuantificación de proteína total comparando el método de lisis alcalina y tratamiento TCA/acetona fenol

Tratamiento lisis alcalina
Pireno: 125.166 μg
Medio: 270.166 μg
Tratamiento con fenol
Pireno: 238.5 μg
Medio: 808.5 μg

De lo anterior se concluyó que el mejor tratamiento para la extracción de proteínas era el de Gonzalez-Fernandez *et al.*, 2010, ya que se obtiene una mayor cantidad de proteínas y número de bandas, esto se debe posiblemente a que este método elimina algunos contaminantes que son abundantes en material fúngico (como polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, o compuestos fenólicos) desde un inicio (Nandakumar, 2002).

Posterior a los resultados obtenidos se prosigió a extraer las proteínas de cada uno de los tiempos establecidos, en la figura 16 se puede observar el perfil electroforetico de cada tratamiento, se muestran las diferencias entre bandas presentes y ausentes remarcadas con rojo.

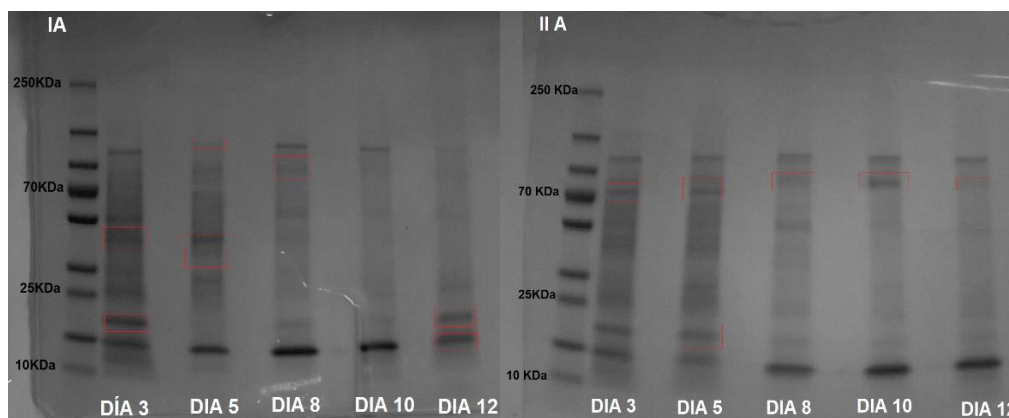


Figura 16. Extracción de las proteínas intracelulares en los distintos tiempos en presencia de pireno (IA) y en ausencia (IIA).

18.2 ETAPA DOS IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS

Los productos de la degradación fueron analizados por TLC con diferentes mezclas de disolventes. En la figura 16, se observan los posibles compuestos formados por el metabolismo de *T. asperellum* H15 en presencia de pireno, con una fase móvil de hexano/acetato de etilo (50:50), mientras que en la figura 17 la fase móvil fue una mezcla de hexano/diclorometano (40:10) y en la figura 18 se observa a los controles con una fase móvil de hexano/diclorometano (40:10). Se calculó el Rf (factor de retención) de las marcas dejadas de la figura 6 y 7, los resultados se observan en la tabla 3.

Tabla 6. Identificación de compuestos en *T. asperellum* H15

	Rf en presencia de pireno	Rf en ausencia de pireno
PIRENO	0.76	-
Compuesto I	0.44	0.44
Compuesto II	0.310	0.310
Compuesto III	0.27	
Compuesto IV	0.13	
Compuesto V	0.172	

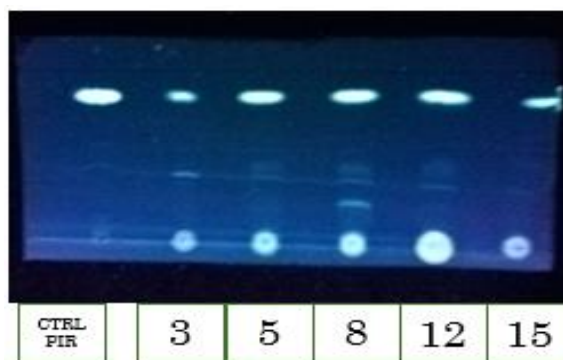


Figura 17. TLC, en fase móvil hexano/acetato de etilo, en la parte izquierda se observa el control de pireno con un Rf= 0.76, ya que el Rf en este caso los compuestos menos polares tienen un Rf mayor y los de menor Rf resultan ser más apolares.

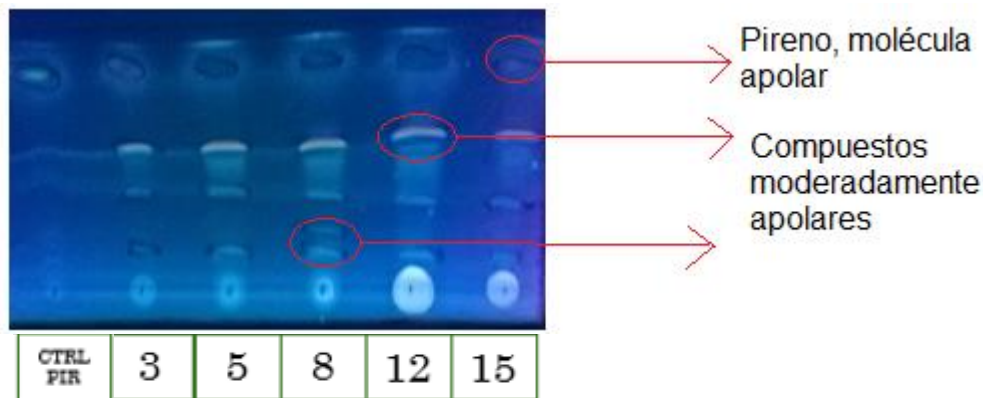


Figura 18. TLC, en fase móvil diclorometano/hexano (40:10), en la parte izquierda se observa el control de pireno, en todos los tiempos es posible observar la molécula del pireno, además de la presencia de al menos otros 5 compuestos.

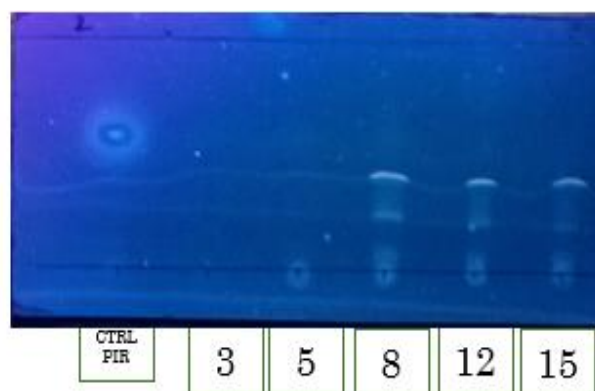


Figura 19. Muestras controles, en la parte superior izquierda se visualiza el pireno, mientras que en los siguientes tiempos no se encuentra esta molécula, es posible visualizar al menos dos posibles compuestos.

De la diferente mezcla de disolventes probados observamos que la mezcla hexano-diclorometano (40:10) es en donde identificamos al menos seis compuestos al que se incluye al pireno. Se puede inferir que los compuestos observados son de mayor polaridad que el pireno, lo cual podría ser indicativo que estos compuestos sean productos del pireno ya que sus posibles intermediarios, serían moderadamente polares por grupos hidroxilos agregados por la posible oxidación.

18.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS POR GC-MS

Posteriormente los extractos fueron analizados por GS-MS. Se observa en la figura 19 el cromatograma de la muestra del día 3 en el cual se visualiza que el ion

molecular 202, corresponde a la molécula del pireno, se comparó en la biblioteca del equipo, junto con el estándar el cual corresponde a los iones fragmentados.

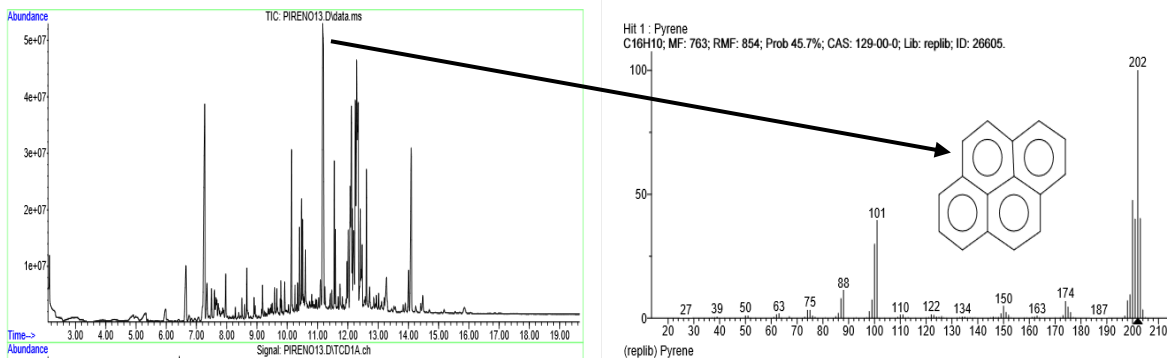


Figura 20. Cromatograma del pireno que corresponde al ión molecular 202 y su patrón de fragmentación, día 3 de la cinética.

Mientras que en la figura 20, se observa el cromatograma de la muestra del día 5, en la cual se visualiza el ión molecular del pireno, además de un metabolito producido de metabolismo secundario en hongos. Sin embargo no se pudo llegar a identificar ningún intermediario como producto del metabolismo del pireno.

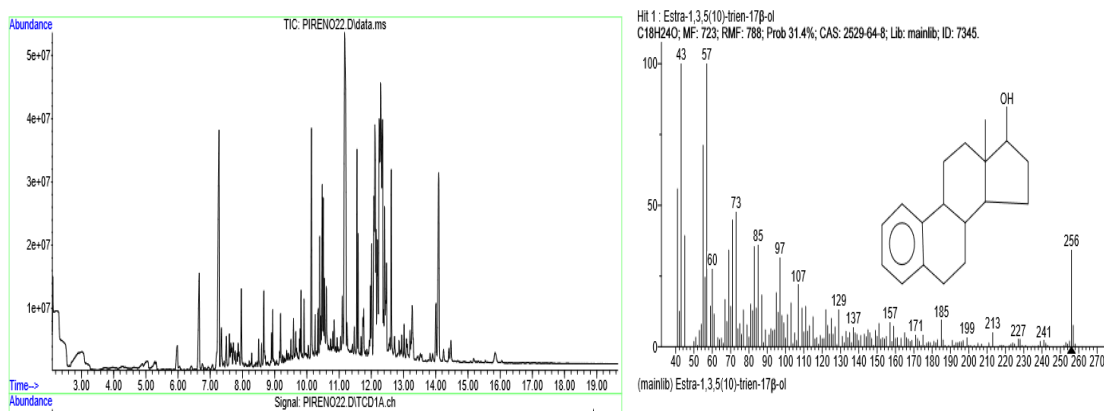


Figura 21. Cromatograma del cual tomamos al ion molecular 256, que corresponde al Estra-1,3,5(10)-trien-17β-ol, y su patrón de fragmentación.

La determinación de intermediarios mediante TLC, se identificó al menos tres metabolitos en presencia de pireno, lo cual sugiere que posiblemente se encuentren implicados en la degradación de pireno, ya que los grupos controles no se encuentran estos compuestos. Sin embargo, el análisis mediante GC-MS, no fue

posible encontrar algún producto de la degradación del pireno. Aunque si fue posible identificar el ion molecular de pireno a 202, considerando un estándar y la librería del equipo. Los resultados obtenidos muestran que el disolvente en este caso el acetato de etilo posiblemente extraiga además del pireno otros compuestos que forman parte del EPU, por ello se consideró usar dos solventes distintos, el acetonitrilo y hexano/acetona, pero no marco ninguna diferencia.

19. CONCLUSIONES

- Se realizó la cinética de crecimiento de *T. asperellum*, confirmando que su metabolismo no se ve afectado por la presencia de pireno. El método descrito por González –Fernández, permitió la obtención de mayor cantidad de proteína intracelular para llevar a cabo el análisis por LC-MS/MS.
- Se detectaron 5 compuestos probablemente derivados del pireno mediante TLC, aunque se requiere hacer el análisis de los resultados obtenidos por GC-MS, para confirmar su estructura. Por el momento se logró identificar el pico cromatográfico correspondiente al pireno.

20. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Shafy, H. and Mansour, M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), pp.107-123.

Aishatu UM, Maryam UM. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Int J Eng Sci* 2015; 6: 1449-58

Agilent.com. (2018). [online] Available at: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/59915857_Agilent_MS_Theory_ES.pdf [Accessed 14 Jun. 2018].

Aparicio-Bello A.J. (2010). Manejo agroecológico de plagas y enfermedades (tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional.

Argumedo Delira, R. (2012). Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos. Tesis de Doctorado. Institución de Enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas.

Bamforth, S. and Singleton, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80(7), pp.723-736.

Bhargava, Samir, Sanjrani, Mumtaz, Javed, Saleem (2008). Solid-State Fermentation: An Overview. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*.

Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V. and Sharma, K. (2015). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), pp.7-21.

Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A. and Guglielmetti, G. (2004). Pyrene and benzo(a)pyrene Metabolism by an *Aspergillus Terreus* Strain Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Polluted Soil. *Biodegradation*, 15(2), pp.79-85.

Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A. and Guglielmetti, G. (2004). Pyrene and benzo(a)pyrene Metabolism by an *Aspergillus Terreus* Strain Isolated from a Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Polluted Soil. *Biodegradation*, 15(2), pp.79-85.

Carvalho, M., Martins, I., Medeiros, J., Tavares, S., Planchon, S., Renaut, J., Núñez, O., Gallart-Ayala, H., Galceran, M., Hursthouse, A. and Silva Pereira, C. (2013). The response of *Mucor plumbeus* to pentachlorophenol: A toxicoproteomics study. *Journal of Proteomics*, 78, pp.159-171.

Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J. G., & Jain, R. K. (2008). Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 48(1), 95–113.

Chourey, K., Jansson, J., VerBerkomes, N., Shah, M., Chavarrita, K.L., Tom, L.M., Brodie, E.L., Hettich, R.L., 2010. Direct cellular lysis/protein extraction protocol for soil metaproteomics. *Journal of Proteome Research* 9, 6615-6622.

Cicatiello, P., Gravagnuolo, A. M., Gnani, G., Varese, G. C., and Giardina, P. (2016). Marine fungi as source of new hydrophobins. *Int. J. Biol. Macromolec.* 92, 1229–1233.

Cortes-Ramirez S. G. (2017). Estudio del secretoma e intermediarios formados durante la degradación de pireno por *T. asperellum* H15 en fermentación en estado sólido usando soporte inerte.

Díaz-Ramírez, I., Escalante-Espinosa, E., Schroeder, R.A., Fócil-Monterrubio, R and Hugo Ramírez-Saad (2013). Hydrocarbon Biodegradation Potential of Native and Exogenous Microbial Inocula in Mexican Tropical Soils. *Biodegradation of Hazardous and special products*. <http://dx.doi.org/10.5772/56233>.

Druzhinina, I., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B., Kenerley, C., Monte, E., Mukherjee, P., Zeilinger, S., Grigoriev, I. and Kubicek, C. (2011). Erratum: *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology*, 9(12), pp.896-896.

Gessler, N., Aver'yanov, A. and Belozerskaya, T. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry (Moscow)*, 72(10), pp.1091-1109.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. and Ahn, Y. (2016). Corrigendum: Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Günther, M., Zibek, S. and Rupp, S. (2017). Fungal Glycolipids as Biosurfactants. *Current Biotechnology*, 6(3).

Hadibarata, T. and Kristanti, R. (2014). Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of fluorene. *Fungal Biology*, 118(2), pp.222-227.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 43–56 (2004).

Harrison, I. (2009). Biodegradation of PAHs by fungi in contaminated-soil containing cadmium and nickel ions. *African Journal of Biotechnology*, 8(21), pp.5780-5789.

Hou, Z Gao, L Heimann, M Roelcke, W Ma, R Nieder (2012) Nitrogen balances of smallholder farms in major cropping systems in a peri-urban area of Beijing, China *Nutrient Cycling Agroecosystems*, 92 (2012), pp. 347-361

Johnsen, A., Wick, L. and Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1), pp.71-84.

Juhas, A. and Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45(1-2), pp.57-88.

Karich, A., Ullrich, R., Scheibner, K. and Hofrichter, M. (2017). Fungal Unspecific Peroxygenases Oxidize the Majority of Organic EPA Priority Pollutants. *Frontiers in Microbiology*, 8.

Kumari B, Singh SN, Farah D, Sharma M, Pandey V, Singh DP (2013) Elucidation of pyrene degradation pathway in bacteria. *Adv Bioresour* 4(2):151–160

Kusum Dhakar and Anita Pandey, "Laccase Production from a Temperature and pH Tolerant Fungal Strain of *Trametes hirsuta* (MTCC 11397)," *Enzyme Research*, vol. 2013, Article ID 869062, 9 pages, 2013.

Liu, Y., Chen, L., Huang, Q., Li, W., Tang, Y. and Zhao, J. (2009). Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Huangpu River, Shanghai, China. *Science of The Total Environment*, 407(8), pp.2931-2938.

Marco-Urrea, E. and Reddy, C. (2011). Degradation of Chloro-organic Pollutants by White Rot Fungi. *Environmental Science and Engineering*, pp.31-66.

Marco-Urrea, E., García-Romera, I. and Aranda, E. (2015). Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology*, 32(6), pp.620-628.

Matsuzaki, F., Shimizu, M. and Wariishi, H. (2008). Proteomic and Metabolomic Analyses of the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Exposed to Exogenous Benzoic Acid. *Journal of Proteome Research*, 7(6), pp.2342-2350.

Mohamed I. A. Ali (2012). Biodegradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus terreus*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(16).

Morelli, I., Saparrat, M., Panno, M., Coppotelli, B. and Arrambari, A. (2012). Bioremediation of PAH-Contaminated Soil by Fungi. *Soil Biology*, pp.159-179.

Nandakumar MP, Marten MR. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis*. 2002; 23:2216-2222.

Olicón-Hernández, D., González-López, J. and Aranda, E. (2017). Overview on the Biochemical Potential of Filamentous Fungi to Degrade Pharmaceutical Compounds. *Frontiers in Microbiology*, 8.

P. K. Arora, A. Srivastava, and V. P. Singh, "Application of Monooxygenases in dehalogenation, desulphurization, denitrification and hydroxylation of aromatic compounds," *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, vol. 1, pp. 1–8, 2010.

Pawar, R. (2015). The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 06(03).

Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J, Turkovskaya OV, et al. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons and their derivatives catalyzed directly by the yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1. *J Mol Catal B: Enzym*. 2006;41:8–15.

Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (2018). Pyrene. [online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/pyrene#section=Top> [Accessed 5 Jun. 2018].

R. González-Fernández, J.V. Jorrín Novo. Protomics protocols for the study of filamentous fungi V.K. Gupta, M.G. Tuohy, M. Ayyachamy, K.M. Turner, A.

Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasilchenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl. Biochem. Microbiol*. 40, 1e17

Ramesh, A., Walker, S., Hood, D., Guillén, M., Schneider, K. and Weyand, E. (2004). Bioavailability and Risk Assessment of Orally Ingested Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *International Journal of Toxicology*, 23(5), pp.301-333.

Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L. and Steiman, R. (2000). Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 40(5), pp.557-563.

RAVINDRA, K., SOKHI, R. and VANGRIEKEN, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42(13), pp.2895-2921.

Saraswathy A, Hallberg R (2005) Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene. *Microbiol Res* 160(4):375–383

Saraswathy, A. and Hallberg, R. (2002). Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2), pp.227-232.

Sato, I., Shimizu, M., Hoshino, T. and Takaya, N. (2009). The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), pp.8042-8053.

Semarnat. Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. Semarnat. México. 2012.

Semarnat. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales. Edición 2008. México. 2009

Steffen, K., Schubert, S., Tuomela, M., Hatakka, A. and Hofrichter, M. (2006). Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation*, 18(3), pp.359-369.

Sutherland J B, Rafii F, Khan A A, Cerniglia C E. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In: Young L Y, Cerniglia C E, editors. *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. New York, N.Y: Wiley-Liss; 1995. pp. 269–306. 93.

Szewczyk, R., Soboń, A., Sylwia, R., Dzitko, K., Waidelich, D. and Długoński, J. (2014). Intracellular proteome expression during 4-n-nonylphenol biodegradation by the filamentous fungus *Metarhizium robertsii*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 93, pp.44-53.

T Volke-Sepulveda, D Salgado-Bautista, C Bergmann, L Wells, G Gutierrez-Sanchez, E Favela-Torres. 2016. Secretomic insight into glucose metabolism of *aspergillus brasiliensis* in solid-state fermentation . *J Proteome Res* 15(10): 3856-3871.

Tachibana, S., Hadibarata, T. and Itoh, K. (2007). Biodegradation of Phenanthrene by Fungi Screened from Nature. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(15), pp.2535-2543.

Tahri, N., Bahafid, W., Sayel, H. and El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms. *Biodegradation - Life of Science*.

USEPA (1991) "Understanding Bioremediation: A Guidebook for Citizens," EPA/540/2-91/002, Office of Research and Development, Washington, D.C.

Volke Sepúlveda, T. and Velasco Trejo, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. 1st ed. México: SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología.

Www2.inecc.gob.mx. (2016). Instituto Nacional de Ecología. [online] Available at: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/gacetitas/422/restauracion.html> [Accessed 23 Jun. 2016].

Www2.inecc.gob.mx. (2016). Instituto Nacional de Ecología. [online] Available at: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnolog.html> [Accessed 15 Nov. 2016].

Zafra G, Moreno-Montano A, Absalon AE, Cortes-Espinosa DV (2015a) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ Sci Pollut Res* 22:1034–1042.

Zafra, G. and Cortés-Espinosa, D. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(24), pp.19426-19433.

Zafra, G., Absalón, Á., Cuevas, M. and Cortés-Espinosa, D. (2014). Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(2).

Zafra, G., Moreno-Montaña, A., Absalón, Á. and Cortés-Espinosa, D. (2014). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), pp.1034-1042.

Zafra, G., Moreno-Montaña, A., Absalón, Á. and Cortés-Espinosa, D. (2014). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), pp.1034-1042.

Zôpel Julian L., (2012). Chemical transformation of the pyrene K-region for functional materials. Tesis Doctoral. Johannes Gutenberg-Universität Mainz.