



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE ASFALTENOS E HIDROCARBUROS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS DE ALTO PESO MOLECULAR EN *Neosartorya fischeri*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M.C. EDNA LORENA HERNÁNDEZ LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. RAFAEL VAZQUEZ DUHALT
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA -UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. ROSARIO VERA ESTRELLA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA-UNAM
Dr. WILHEM HANSBERG
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR-UNAM

Cuernavaca, Morelos. Mayo, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Rafael Vázquez Duhalt en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología y en el Departamento de Bionanotecnología del Centro de Nanociencias y Nanotecnología, ambas instituciones de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los estudios de doctorado fueron posibles gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICO ESTE TRABAJO,

A mis padres Adán y Alba Ruth, a mi hermanita Marian Lizeth, mi sobrino Juan David y a mis abuelos, Ruby, Gildardo, Adán y Josefina.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial al **Dr. Rafael Vázquez Duhalt**, por ser mi tutor durante estos siete años de formación en el posgrado, y por su apoyo constante para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del comité tutor, **Dra. Rosario Vera Estrella** y **Dr. Wilhem Hansberg** por su importante contribución durante la realización de este trabajo.

Al comité jurado conformado por la **Dra. Marcela Ayala Aceves**, **Dra. Katy Juárez López**, **Dra. Sylvie Le Borgne**, **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez** y el **Dr. Edmundo Castillo Rosales**, por su disposición para revisar la tesis y sus aportes para la conclusión de este trabajo.

A la **Biól. Rosa Román** por el apoyo técnico en los diferentes experimentos realizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

A la **Dra. Katrin Quester** por la asistencia técnica durante el desarrollo del trabajo en el Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM.

A la **Dra. Lucia Perezgasga** por sus apoyo en los análisis de microarreglos.

A la **Dra. Rosa Mouriño** y **Dra. Olga Callejas** por su asistencia en los estudios de microscopía confocal en el CICESE.

Al **Dr. Emilio Bucio Carrillo** por las mediciones de espectroscopía de infrarrojo en el Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado en el programa de Doctorado y Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM. Número de beca CONACYT: 296732.

De igual manera agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (**PAEP**) por el apoyo recibido para la asistencia al Congreso BIOTRANS 2015 en Viena-Austria, donde se presentaron los resultados de este trabajo de tesis.

AGRADEZCO,

Primero que todo a Dios por iluminar mi camino día a día para alcanzar la meta propuesta.

A todos los miembros de mi familia en Colombia por apoyarme siempre en la distancia.

A Frank por su apoyo incondicional.

A mis amigos en Colombia, y a mis amigos en México, por todos los momentos vividos durante esta etapa de mi vida.

A todos los que fueron miembros del laboratorio RVD en Cuernavaca, y los nuevos compañeros en Ensenada del laboratorio de Bionano, por mantener siempre un ambiente agradable y de compañerismo.

RESUMEN

El hongo *Neosartorya fischeri*, fue evaluado en su capacidad para transformar hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (HPAs-APM) y asfaltenos de petróleo. *N. fischeri* creció en HPAs-APM tales como coroneno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-c,d)pireno y asfaltenos de petróleo como única fuente de carbono y energía. Se evaluó la transformación de los HPAs-APM mediante cromatografía de alta presión, espectrometría de masas y espectrometría de infrarrojo. La aparición de grupos hidroxilo y cetonas en las moléculas de HPAs-APM sugieren la biotransformación mediada por monooxigenasas tales como los citocromos P450. Mediante el análisis de microarreglos, tres genes de citocromo P450 y uno de flavin monooxigenasa, mostraron estar regulados positivamente cuando el hongo fue crecido en asfaltenos de petróleo.

Todos estos resultados junto con la evaluación mediante microscopía de la posible internalización de aromáticos y la transformación de HPAs-APM por la fracción microsomal del hongo, sugieren la importancia de la participación de los citocromos P450 en la oxidación de este tipo de compuestos altamente recalcitrantes.

ABSTRACT

The fungus *Neosartorya fischeri*, was evaluated in its ability to transform high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (HMW-PAHs) and petroleum asphaltenes. *N. fischeri* grew up in HMW-PAHs such as coronene, benzo (g, h, i) perylene, indeno (1,2,3-c, d) pyrene and asphaltenes as sole carbon and energy source. The biotransformation of PAHs-APM was evaluated by high pressure liquid chromatography, mass spectrometry and infrared spectrometry. The appearance of hydroxyl and ketone on PAHs-APM molecules, suggest biotransformation mediated by monooxygenases such as cytochromes P450. A microarray analysis showed three cytochrome P450 genes and one flavin monooxygenase, they showed to be upregulated when the fungus was grown in oil asphaltenes.

All these results, together with the evaluation of the possible internalization of aromatic into the cell and transformation of PAHs-APM by the microsomal fraction of the fungus, suggest the importance of the involvement of cytochromes P450 in the oxidation of these recalcitrant compounds.

ABREVIATURAS

CIP450: Citocromo P450

HPAs: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos

HPAs-APM: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos de Alto Peso Molecular

HPAs-BPM: Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos de Bajo Peso Molecular

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

nLC-MS: nano Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

N. fischeri: *Neosartorya fischeri*

MS: Mass Spectrometry – Espectrometría de masas

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS ASFALTENOS	8
2.3. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	11
2.4. BIODEGRADACIÓN	13
2.5. CITOCROMOS P450.....	14
3. ANTECEDENTES.....	16
3.1. BIODEGRADACIÓN DE ASFALTENOS	16
3.1.1. <i>Degradación por consorcios microbianos.....</i>	<i>16</i>
3.1.2. <i>Degradación por cultivos axénicos de bacterias</i>	<i>18</i>
3.1.3. <i>Degradación por hongos.....</i>	<i>19</i>
3.2. TRANSFORMACIÓN DE ASFALTENOS MEDIANTE ENZIMAS.....	21
3.3. BIODEGRADACIÓN HIDROCARBUROS DE ALTO PESO MOLECULAR	23
3.4. METABOLISMO DE ASFALTENOS Y DE HIDROCARBUROS DE ALTO PESO MOLECULAR.....	26
4. HIPOTESIS.....	32
5. OBJETIVOS	32
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	32
5.1.1. <i>Objetivos particulares</i>	<i>32</i>
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1. REACTIVOS.....	33
6.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ASFALTENOS LIBRES DE PETROPORFIRINAS	33
6.3. ORGANISMO Y MEDIO DE CULTIVO.....	34
6.4. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO.....	34
6.5. PRODUCCIÓN DE ERGOSTEROL.....	35
6.6. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	36
6.7. TRANSFORMACIÓN POR MICROSOMAS DE HPAS-APM.....	38
6.8. ESTUDIOS DE MICROSCOPIA.....	38
6.9. ANÁLISIS DE MICROARREGLOS.	39
7. RESULTADOS.....	42
7.1. CRECIMIENTO DE <i>N. FISCHERI</i> SOBRE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS DE ALTO PESO MOLECULAR.....	42
7.2. TRANSFORMACIÓN DE HPAS-APM POR <i>N. FISCHERI</i>	43
7.3. ANÁLISIS DE MICROARREGLOS	50
7.3.1. <i>Análisis global de todos los genes regulados positiva y negativamente en N. fischeri durante su crecimiento en asfaltenos como única fuente de carbono.....</i>	<i>50</i>
7.3.2. <i>Expresión de genes relacionados con actividad enzimática</i>	<i>54</i>

7.4. TRANSFORMACIÓN <i>IN VITRO</i> (FRACCIÓN MICROSOMAL).....	59
7.5. ESTUDIOS MICROSCÓPICOS	60
8. DISCUSION.....	64
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	72
10. BIBLIOGRAFIA.....	74
11. ANEXOS.....	82
11.1. TABLAS DE GENES REGULADOS POSITIVA Y NEGATIVAMENTE	82
11.1.1. Anexo 1: Genes regulados positivamente	82
11.1.2. Anexo 2: Genes regulados negativamente.	86
11.1.3. Anexo 3 Rutas metabólicas en las que podrían estar participando algunos de los genes regulados positiva o negativamente en <i>N. fischeri</i>	87
11.2. ARTICULOS PUBLICADOS.....	88

TABLA DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELO DE LA MOLÉCULA DE ASFALTENO PROPUESTA POR STRAUZ Y COLABORADORES EN 1992 (7).	9
FIGURA 2. MODELO DE LA MOLÉCULA DE ASFALTENO PROPUESTA POR SPEIGHT Y COLABORADORES EN 1999 (6).	10
FIGURA 3. MODELO DE MOLÉCULA DE ASFALTENO PROPUESTO POR GROENZIN Y MULLINS EN EL 2000 (8).	10
FIGURA 4. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS DE ALTO PESO MOLECULAR; LOS CUALES SON DEFINIDOS ASÍ POR PRESENTAR MÁS DE CUATRO ANILLOS AROMÁTICOS FUSIONADOS. ADAPTADO DE (15).	12
FIGURA 5. HIDROCARBUROS DE ALTO PESO MOLECULAR USADOS COMO MOLÉCULAS MODELO PARA EVALUAR LA CAPACIDAD DE	12
FIGURA 6. CINÉTICA DE EVOLUCIÓN DE CO ₂ EN CULTIVOS DE <i>N. FISCHERI</i> CRECIENDO EN ASFALTENOS COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO. CULTIVOS A 37°C CON 20 MG DE ASFALTENOS EN 30 ML DE MEDIO CZAPEK INOCULADOS CON <i>N. FISCHERI</i> (CÍRCULOS). CULTIVOS CONTROL, INOCULADOS CON <i>N. FISCHERI</i> PERO SIN ASFALTENOS (CUADRADOS), Y MEDIO CZAPEK CON ASFALTENOS SOLAMENTE (TRIÁNGULOS) (2).	21
FIGURA 7. ADAPTADO DE HARMS ET AL. PRINCIPALES MÉTODOS USADOS POR LOS HONGOS PARA DEGRADAR QUÍMICOS ORGÁNICOS. EL ESQUEMA DESCRIBE DE MANERA GENERAL, COMO LOS CONTAMINANTES PUEDEN SER DEGRADADOS YA SEA A NIVEL INTRACELULAR O EXTRACELULAR, O EN AMBOS LUGARES. ADAPTADO DE (66).....	27
FIGURA 8. RUTAS GENERALIZADAS PARA EL METABOLISMO DE HPAs POR HONGOS Y BACTERIAS. EL ESQUEMA DESCRIBE LA PARTICIPACIÓN DE DISTINTAS ENZIMAS DEPENDIENDO DEL MICROORGANISMO. ADAPTADO DE (9).	30
FIGURA 9. RUTAS PARA EL METABOLISMO DE BENZO(A)PIRENO POR VARIOS HONGOS. EL ESQUEMA REPRESENTA LOS DIFERENTES TIPOS DE PRODUCTOS GENERADOS A PARTIR DE UN MISMO COMPUESTO, PERO METABOLIZADO POR DIFERENTES MECANISMOS. ADAPTADO DE (9).	31
FIGURA 10. CURVA DE CALIBRACIÓN USADA PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE ERGOSTEROL EN LAS MUESTRAS. LA CURVA SE OBTUVO AL MEDIAR MEDIANTE HPLC EL ÁREA CORRESPONDIENTE A SOLUCIONES DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE ERGOSTEROL, PREPARADAS EN METANOL.	36
FIGURA 11. CULTIVOS DE <i>N. FISCHERI</i> EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO, COMO LO SON ASFALTENOS DE PETRÓLEO, E HIDROCARBUROS DE ALTO PESO MOLECULAR TALES COMO CORONENO, BENZO (G,H,I) PERILENO E INDENO (1,2,3-CD) PIRENO RESPECTIVAMENTE, Y UN CONTROL SIN FUENTE DE CARBONO ADICIONADA.	42
FIGURA 12. CARACTERIZACIÓN DE HPAs-APM ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON <i>N. FISCHERI</i> . MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE INFRARROJO, EN DONDE SE PUEDEN EVIDENCIAR GRUPOS FUNCIONALES QUE INDICAN LA PRESENCIA DE UN PROCESO OXIDATIVO.	46
FIGURA 13. PRODUCTOS DEL METABOLISMO DEL CORONENO, IDENTIFICADOS DESPUÉS DEL CRECIMIENTO DE <i>N. FISCHERI</i> MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	47
FIGURA 14. PRODUCTOS DEL METABOLISMO DEL BENZO (G,H,I) PERILENO, IDENTIFICADOS DESPUÉS DEL CRECIMIENTO DE <i>N. FISCHERI</i> MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	48
FIGURA 15. PRODUCTOS DEL METABOLISMO DEL INDENO (1,2,3 C-D) PIRENO, IDENTIFICADOS DESPUÉS DEL CRECIMIENTO DE <i>N. FISCHERI</i> MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.	49
FIGURA 16. DISTRIBUCIÓN DE SECUENCIAS SEGÚN SU FUNCIÓN REGULADAS POSITIVA Y NEGATIVAMENTE EN <i>N. FISCHERI</i> CUANDO FUE CRECIDA EN ASFALTENOS.	53

FIGURA 17. DISTRIBUCIÓN DE LAS SECUENCIAS SOBREEXPRESADAS QUE CORRESPONDEN A ENZIMAS.	55
FIGURA 18. MAPAS KEEG OBTENIDOS DESPUÉS DEL ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS SOBREEXPRESADAS EN <i>N. FISCHERI</i> CUANDO CRECIÓ EN ASFALTENOS COMO FUENTE DE CARBONO. EL DIAGRAMA REPRESENTA ALGUNOS GENES QUE CORRESPONDEN A PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA OXIDORREDUCTASA (MARCADAS EN COLORES ROJO, NARANJA Y AMARILLO).	57
FIGURA 19. MICROSCOPIA CONFOCAL DE LAS HIFAS DE <i>N. FISCHERI</i> CRECIDO EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE ASFALTENOS, EN DONDE SE OBSERVAN DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS Y RESALTA LA FLUORESCENCIA AZUL LA CUAL ESTÁ PRESENTE SÓLO EN PRESENCIA DE ASFALTENOS, LO QUE PODRÍA SUGERIR LA POSIBLE INTERNALIZACIÓN DE DICHO COMPUESTO.	62
FIGURA 20. IMAGEN CONFOCAL DE LA LOCALIZACIÓN INTRACELULAR. A SOBREPOSICIÓN DE FLUORESCENCIA Y CONTRASTE DE INTERFASE DIFERENCIAL. B. FLUORESCENCIA A 405 NM. ESCALA=10 M.	63
FIGURA 21. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA TOMADA DE LAS HIFAS DE <i>N. FISCHERI</i> , CRECIDAS EN A)ASFALTENOS DE PETRÓLEO Y EN B) GLUCOSA- PEPTONA RESPECTIVAMENTE, COMO FUENTES DE CARBONO. SE TOMÓ UNA GOTTA DE CADA UNO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y SE DEPOSITÓ EN LAMINAS PORTAOBJETOS.	63

1. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) están ampliamente distribuidos en el medio ambiente como contaminantes y como agentes potenciales para causar toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Es justamente su recalcitrancia y bioacumulación lo que los hace un tema de interés ambiental. Aunque los HPAs pueden sufrir volatilización, fotólisis y degradación química, es la degradación microbiológica la más importante; el éxito de esta dependerá de las condiciones ambientales, la estructura química del compuesto y el número y tipo de microorganismos con la habilidad para degradarlo (1). La importancia de la degradación microbiológica radica en el hecho de que los microorganismos pueden transformar estos compuestos en metabolitos de fácil metabolización o incluso llevarlos a la mineralización con la consecuente producción de CO₂.

Una de las dificultades planteadas durante el desarrollo de este trabajo es la escases de microorganismos capaces de degradar compuestos aromáticos complejos, como lo son los hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (HPAs-APM) así como los asfaltenos que son considerados la fracción más recalcitrante del petróleo.

Teniendo en cuenta que recientemente fue caracterizado un hongo identificado como *Neosartorya fischeri* que demostró ser capaz de usar asfaltenos de petróleo como única fuente de carbono (2); el presente trabajo se enfocó en responder a la pregunta de ¿cuáles

son los sistemas enzimáticos que le permiten a dicho microorganismo utilizar estos compuestos considerados recalcitrantes a la acción microbiana?

Vale la pena mencionar que al igual que los hidrocarburos alifáticos, ya hay una gran cantidad de estudios sobre la degradación de hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular (HPAs-BPM) en donde se ha descrito la participación de los citocromos P450 (CIP450). Por otra lado la estructura química de los asfaltenos presenta grupos aromáticos, alifáticos y heterocíclicos, que los hace similares a los HPAs.

El trabajo de tesis se enfocó en explorar la participación de CIP450 como enzimas importantes en la oxidación de asfaltenos y HPAs-APM en el hongo *N. fischeri*.

Por su parte los CIP450, que son una superfamilia de proteínas enzimáticas, realizan una gran diversidad de reacciones. Dichas proteínas contribuyen a procesos vitales tales como la asimilación de fuentes de carbono, biosíntesis de hormonas y componentes estructurales de organismos vivos, además de participar en la degradación de xenobióticos(3).

En este proyecto se tiene como objetivo entender el metabolismo de los asfaltenos y los HPAs-APM en el hongo *N. fischeri*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Asfaltenos

Los asfaltenos representan la fracción más difícil de degradar del petróleo y su proporción es mayor en los crudos pesados. Se pueden definir operacionalmente como la fracción del petróleo que no es soluble en alcanos de cadena corta, tales como el pentano o heptano (4).

La importancia de estos compuestos en la industria del petróleo se resalta en el impacto negativo sobre varias operaciones petroleras, tales como la explotación, la producción, el transporte y el refinamiento del petróleo; los cuales pueden causar deterioro en el depósito, taponamiento de pozos y deposición a través de las líneas de flujo, dificultades en la separación y encrustamiento en las instalaciones, además de los problemas medio ambientales que causa su acumulación en los ecosistemas (4, 5). La solución a estos problemas es compleja; uno de los métodos usados para solucionar parcialmente la situación es el uso de disolventes, sin embargo, esto representa altos costos para la industria petrolera y tiene efectos negativos en el ambiente.

Los asfaltenos están presentes en la mayoría de los petróleos, sobretodo en aquellos petróleos pesados y en tierras bituminosas. La concentración de asfaltenos en un petróleo crudo ligero puede ser inferior al 1% (p/p), mientras que la concentración en los pesados puede llegar a ser más del 20% del peso total. La composición de los asfaltenos incluye moléculas aromáticas de muy alto peso molecular, las cuales son consideradas recalcitrantes al ataque microbiano (1). La susceptibilidad de los hidrocarburos a la biodegradabilidad puede ser generalmente ordenada de mayor a menor de la siguiente manera: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos pequeños > alcanos cíclicos>

HPAs-APM. Sin embargo, algunos componentes como los HPAs-APM no pueden ser degradados del todo. En el caso de los asfaltenos, su estructura molecular compleja los hace resistentes a la biodegradación.

2.2. Estructura química de los asfaltenos

El peso molecular de los asfaltenos ha sido un tema difícil de resolver, debido a la diversidad y complejidad de moléculas presentes en la fracción asfáltica. Aunque las características químicas de los asfaltenos, tales como el número de anillos aromáticos fusionados, la longitud de las cadenas alifáticas, heteroátomos y varios grupos funcionales, ya ha sido elucidado, el hecho de que los asfaltenos son una población de cientos de moléculas químicamente diferentes dificulta la definición de una estructura única y precisa. La clasificación y cuantificación de la distribución de las estructuras químicas está limitada por la escasa disponibilidad de técnicas analíticas apropiadas para estas estructuras complejas (6). Hace más de 20 años, Strausz y colaboradores (1992) reportaron un modelo de la molécula de asfalto. De acuerdo al modelo hipotético, la fórmula química propuesta fue $C_{420}H_{496}N_6S_{14}O_4$, con un peso molecular de 6191 Da, el cual coincidió con el tamaño obtenido experimentalmente por osmometría de presión de vapor. Ahora se sabe que ese peso molecular tan alto, correspondía al peso de un agregado, es decir varias moléculas de asfaltenos juntas (Figura 1) (7).

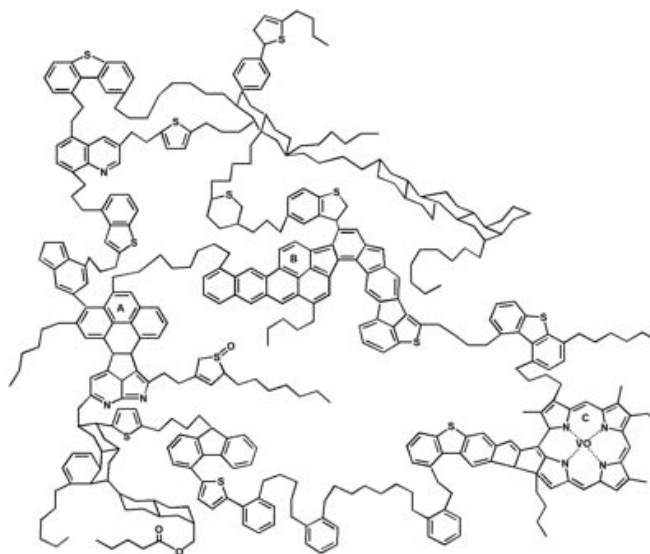


Figura 1. Modelo de la molécula de asfalteno propuesta por Strausz y colaboradores en 1992 (7).

Varios años después, estudios espectroscópicos realizados por Speight y colaboradores indicaron la presencia de nitrógeno de carbazol y nitrógeno de amida como parte de la estructura molecular de los asfaltenos (6). Además, la titulación potenciométrica no acuosa confirmó la presencia de diferentes tipos de nitrógeno y además, proporcionó evidencia de la presencia de piridina y de nitrógenos de indol en los asfaltenos. Las fracciones de oxígeno incluyen: oxígenos de fenoles, polihidroxifenoles, quinonas y oxígenos de amidas, evidencias que indican que los asfaltenos tienen estructura más abierta.

De acuerdo a estas investigaciones, una característica estructural clave de los asfaltenos del petróleo es la presencia de sistemas de aromáticos polinucleares, benzotiofenos, dibenzotiofenos y n-parafinas dentro de la molécula (Figura 2) (6).

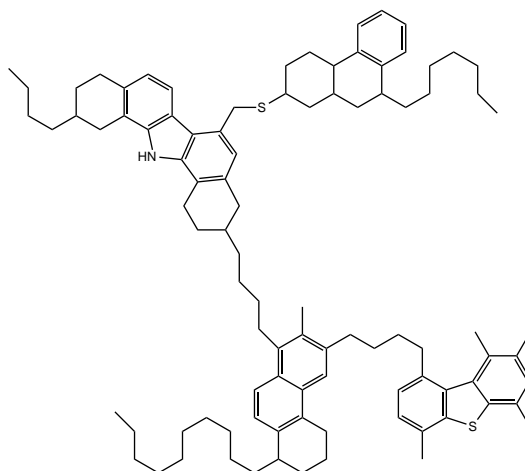


Figura 2. Modelo de la molécula de asfalteno propuesta por Speight y colaboradores en 1999 (6).

Finalmente y de acuerdo a estudios recientes por Groenzin y Mullins en el 2000 (8) se propuso que en promedio el peso de una molécula de asfalteno es de 750 Da y que de acuerdo a esto la estructura tiene en promedio 7 anillos aromáticos fusionados, entre 4 a 10, con un diámetro molecular entre 10 y 20 Å (Figura 3) (8). El sistema de anillos aromáticos fusionados lleva sustituyentes alquilo, generando lo que se llama una arquitectura de isla molecular.

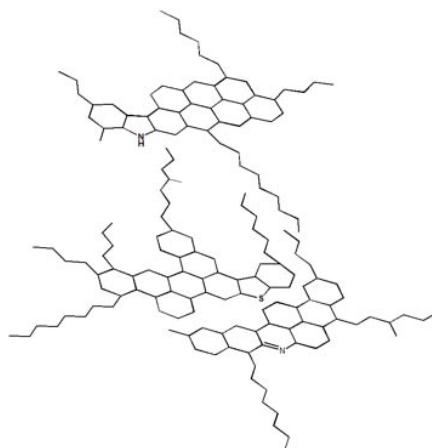


Figura 3. Modelo de molécula de asfalteno propuesto por Groenzin y Mullins en el 2000 (8).

2.3. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los HPAs (Hidrocarburos policíclicos aromáticos) son moléculas con dos o mas anillos bencénicos fusionados. Las fuentes comunes de HPAs en el medio ambiente son tanto naturales como antropogénicas; dentro de las naturales se pueden encontrar los incendios forestales, filtraciones de petróleo, erupciones volcánicas y exudados de los arboles, y dentro de las antropogénicas se incluyen la combustión del petróleo, el carbón, la madera y de la basura entre otros. Estos compuestos son considerados contaminantes principalmente por sus efectos carcinogénicos y mutagénicos (9) lo cual representa un riesgo para la salud pública. Algunos estudios han indicado que HPAs con uno, dos o tres anillos que se denominan de bajo peso molecular (HPAs-BPM) generan toxicidad aguda (10), mientras que los HPAs de alto peso molecular (HPAs-APM) son considerados genotóxicos (11-14).

Los HPAs-APM son aquellos que contienen 4 o más anillos aromáticos fusionados (Figura 4) lo que los convierte en un problema ambiental, ya que son recalcitrantes al ataque microbiano (5) limitando así su biodegradación en diferentes ecosistemas. La recalcitrancia de los HPAs a la degradación microbiana aumenta directamente con el peso molecular y la hidrofobicidad (coeficiente partición octanol-agua). El metabolismo microbiano de los HPAs que contienen menos de 4 anillos (naftaleno, fenantreno, antraceno y fluoreno) ha sido estudiado extensivamente; sin embargo a la fecha la información sobre la degradación microbiana de aquellos HPAs con más de 5 anillos es escasa(1).

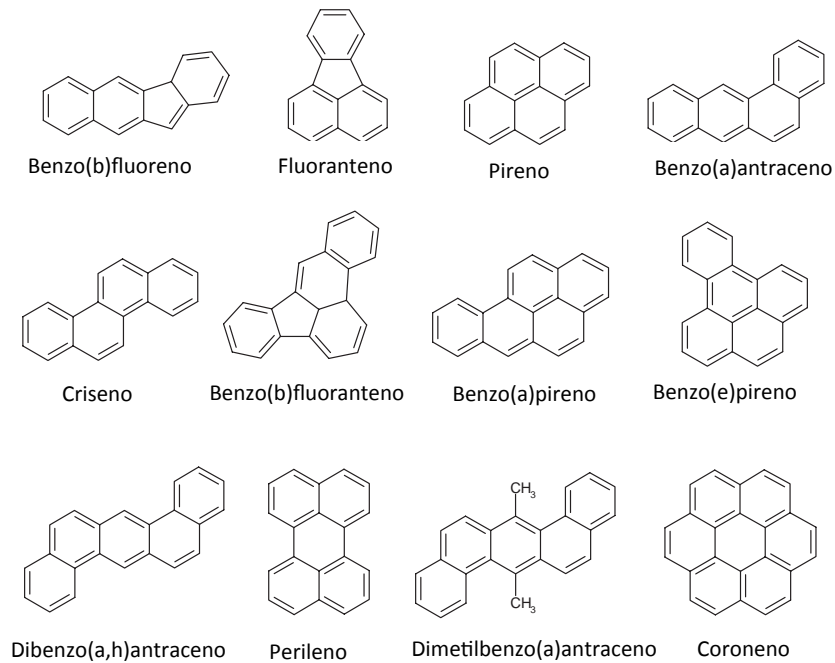


Figura 4. Hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular; los cuales son definidos así por presentar más de cuatro anillos aromáticos fusionados. Adaptado de (15).

En este trabajo de tesis se usaron tres HPAs-APM para evaluar la biotransformación de estos compuestos por parte de *N. fischeri* (Figura. 5)

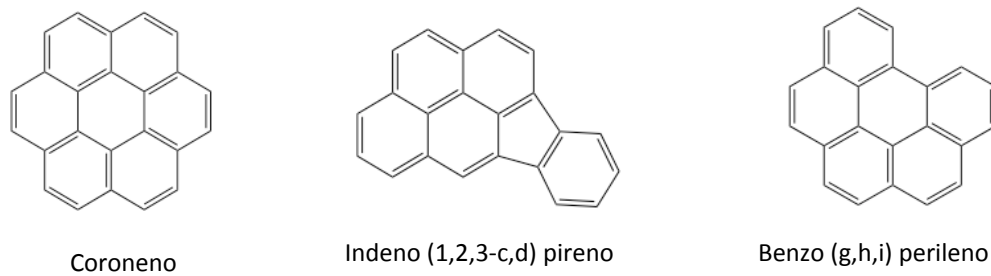


Figura 5. Hidrocarburos de alto peso molecular usados como moléculas modelo para evaluar la capacidad de *N. fischeri* para degradarlos.

2.4. Biodegradación

La biodegradación es la habilidad metabólica de los microorganismos para transformar o mineralizar contaminantes orgánicos en sustancias menos dañinas, las cuales son luego integradas dentro de los ciclos naturales biogeoquímicos. Por su parte la biorremediación es un término usado para describir metodologías de limpieza de contaminantes en el medio ambiente, y se empezó a utilizar como un sustituto mejorado de los métodos fisicoquímicos usados para descontaminar, los cuales han sido poco eficientes y costosos (16, 17).

La generación de nuevo conocimiento en esta área ha ido en aumento desde mediados de los 70's; sin embargo, la implementación de microorganismos para la descontaminación depende del conocimiento de los factores que controlan el crecimiento y el metabolismo de éstos. Cabe resaltar que la biodegradación por parte de los microorganismos representa el principal medio por el cual el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes son eliminados del medio ambiente. De esta forma, debido al interés sobre conocer y encontrar alternativas, surgen estudios dirigidos a la biodegradación de compuestos altamente recalcitrantes.

Por otra parte es importante saber que los hidrocarburos del petróleo están divididos en cuatro clases: los saturados, los aromáticos, las resinas y los asfaltenos (SARA) (18). De ahí que las velocidades de biodegradación varían, ya que dependen de muchos factores ambientales y de la clase de hidrocarburos; algunos de ellos son más susceptibles de ser degradados. Los resultados de varios estudios han indicado que los componentes del petróleo aunque podrían ser degradados simultáneamente, son degradados a diferentes velocidades. La degradación secuencial resultaría en un retraso en la degradación de los componentes que no son usados preferencialmente (19, 20). De esta manera la

susceptibilidad al ataque microbiano y la degradación de los hidrocarburos puede ser estratificada de la siguiente forma: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos pequeños > alcanos cíclicos > aromáticos policíclicos > resinas > asfaltenos. Uno de los factores importantes que limitan la biodegradación de los contaminantes del petróleo en el medio ambiente es su limitada disponibilidad a los microorganismos. Los hidrocarburos que conforman el petróleo, debido a su naturaleza hidrofóbica, se unen a componentes del suelo, este fenómeno reduce su biodisponibilidad y por ende su remoción o degradación.

2.5. Citocromos P450

Los citocromos P450 (CIP450) son proteínas hemotiolatos que se encuentran en todas las formas de vida, arqueas, procariotes (bacterias) y eucariotes (hongos, plantas, animales, humanos). Esta súper familia de proteínas está involucrada en el metabolismo de diversos compuestos endógenos y xenobióticos o exógenos.

Estas enzimas catalizan conversiones regio y estereoespecíficas de un amplio rango de compuestos lipofílicos a derivados más hidrofílicos al introducir un átomo de oxígeno proveniente de oxígeno molecular. La participación de estas proteínas ha sido evidenciada en el metabolismo de moléculas alifáticas, alicíclicas y aromáticas, en donde se producen reacciones de hidroxilación, epoxidación y desalquilación (21).

La nomenclatura de los CIP450 está basada en la identidad de la secuencia de aminoácidos; por convención las letras CYP (por sus siglas en inglés CytochromeP450) son seguidas por un número que indica la clasificación de la enzima en una familia (más del 40% de identidad), luego una letra para la subfamilia (más del 55% de identidad) y finalmente un número para cada proteína individual (22).

Los CIP450 de hongos, están involucrados en varios procesos celulares esenciales y

juegan papeles diversos. Las enzimas catalizan la conversión de intermediarios hidrofóbicos de rutas metabólicas primarias y secundarias, descontaminan el ambiente y le permiten al hongo crecer bajo diferentes condiciones. Los diferentes proyectos de secuenciación han permitido la anotación de miles CIP450 nuevos, la mayoría pertenecientes a nuevas familias (23).

Por otra parte, la participación de CIP450 ha sido reportada en el metabolismo de dioxinas, disruptores endocrinos, plaguicidas y HPAs (9, 24-27), y son justamente los hongos no ligninolíticos los que usan este tipo de actividad para oxidar estos compuestos. Hongos, tales como los zigomicetos, ascomicetos, hifomicetos y otros, poseen diferentes géneros degradadores de HPAs (9).

3. ANTECEDENTES

3.1. Biodegradación de asfaltenos

Hace más de treinta años, existían sólo unos pocos reportes sobre biodegradación de petróleo, los cuales describieron la degradación de la fracción de asfaltenos por diferentes bacterias, sin embargo ninguno de estos informes mostró análisis de los materiales extraíbles y no se llevaron a cabo controles estériles apropiados. Por otro lado el grado de degradación de los asfaltenos se ha determinado usando mediciones gravimétricas; al no considerar el efecto de la presencia de moléculas oxidadas o la producción de biosurfactantes en el comportamiento de precipitación de la fracción de asfaltenos, los resultados generados podrían no ser confiables (20, 28-30).

3.1.1. Degradación por consorcios microbianos

En la microbiología ambiental se sabe que la biodegradación de compuestos recalcitrantes es más rápida y efectiva cuando se usan consorcios microbianos, comparado con el uso de cultivos microbianos puros (31, 32). Las múltiples interacciones entre las poblaciones microbianas, les permite realizar funciones complicadas que son difíciles o incluso imposibles para una sola especie. La capacidad para mineralizar compuestos recalcitrantes, está basado en el co-metabolismo, debido a la diversidad enzimática que le permite al consorcio biodegradar diferentes compuestos (33). Es por esto que en la presencia de un sustrato biodegradable, otro compuesto puede ser incidentalmente transformado por la maquinaria enzimática del organismo que está creciendo, generando un producto que puede ser susceptible para una posterior degradación o incluso mineralización por especies microbianas diferentes presentes en el consorcio.

En 1989, Pendrys (34) estudió bacterias con capacidad de degradar una mezcla

asfáltica o concreto bituminoso. De esta mezcla de cultivo enriquecida, ellos aislaron bacterias aeróbicas pertenecientes a 5 géneros (*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavimonas* sp., y *Flavobacterium* sp.). En este estudio se obtuvieron diferentes fracciones de asfalto mediante técnicas cromatográficas; y se evaluó la predilección de las cepas bacterianas por una u otra fracción (34). La fracción polar aromática y la fracción asfáltica fueron capaces de mantener cierta viabilidad en el cultivo bacteriano, pero no se detectaron más de 4×10^4 UFC/mL, lo que indicó poca sostenibilidad del crecimiento bacteriano. Es importante resaltar que la mezcla asfáltica es rica en asfaltenos pero además contiene otras fracciones de petróleo, es decir otros hidrocarburos que pudieran estar soportando el crecimiento de los microorganismos (30).

Después un consorcio microbiano aislado de efluentes altamente contaminados de una refinería fue evaluado para la cometabolización de asfaltenos en presencia de n-alcanos (29). Los autores reportaron una pérdida de peso en la fracción asfáltica después del cultivo microbiano. Sin embargo, esos resultados deberían ser considerados cuidadosamente debido a que el contenido de asfaltenos fue determinado gravimétricamente después de la precipitación de los n-alcanos; una solubilización de hidrocarburos debido a la producción de surfactantes durante el crecimiento bacteriano podría ocurrir y por ende la disrupción de los agregados asfálticos. Además, la mayoría de la pérdida de asfaltenos durante la actividad microbiana podría estar relacionada a pérdidas abióticas (30).

Pineda-Flores y colaboradores en el 2004 (35) reportaron un consorcio microbiano capaz de mineralizar asfaltenos. El cultivo contenía medio mínimo mineral suplementado con asfaltenos como única fuente de carbono y energía. La concentración de CO_2 reportada del consorcio microbiano crecido en asfaltenos fue de 800 μmol en 13 días. Sin embargo,

los dos experimentos control, cultivos sin asfaltenos y cultivos sin microorganismos, mostraron una producción de CO₂ de 200 y 300 μmol, respectivamente (35). El inóculo de estos experimentos provenía de cultivos crecidos en petróleo crudo, por lo tanto es probable que las altas concentraciones de CO₂ en los controles se deban a la presencia de residuos de petróleo en el inóculo, además de que las condiciones de esterilidad no hayan sido las adecuadas (30).

Recientemente, Jahromi y colaboradores en el 2014 (36) estudiaron la biodegradabilidad de asfaltenos usando cuatro consorcios diferentes. Desafortunadamente, ellos cuantificaron la biodegradación de los asfaltenos por absorción en el UV en soluciones de tolueno a 280 nm, antes y después del crecimiento bacteriano. Aunque una curva estándar de cantidades conocidas de asfaltenos en tolueno fue usada, el simple hecho de que la presencia de productos de degradación u otros metabolitos microbianos pueda alterar la estimación hace a éste un método muy simple y no apropiado para la determinación de la degradación de asfaltenos. Además, el medio de cultivo para el crecimiento, contenía extracto de levadura como fuente de nitrógeno, lo cual podría proveer también carbono al consorcio (30).

3.1.2. Degradación por cultivos axénicos de bacterias

Existen pocos reportes sobre la degradación de asfaltenos por cultivos axénicos de bacterias. Sin embargo, algunos trabajos han reportado que cepas microbianas puras son capaces de degradar este tipo de compuestos. Pero como en la mayoría de los estudios de este tipo, usaron determinaciones gravimétricas para evaluar la degradación de los asfaltenos.

Unas cepas de bacterias halotolerantes (7.5–10% NaCl) y termofílicas (45–50°C),

identificadas como *Bacillus* sp. (Asph1), *Pseudomonas aeruginosa* (Asph2) y *Micrococcus* sp. (Asph 3), fueron aisladas de agua contaminada con petróleo, la selección se hizo usando cultivos enriquecidos con asfaltenos como única fuente de carbono (37). Varias cepas fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad para degradar asfaltenos, lo cual fue evaluado por pérdidas gravimétricas. Una disminución de 34-42% en el promedio del peso molecular en los asfaltenos, fue observado por cromatografía de permeación en gel (37); por otra parte los datos del espectro de IR sugirieron que las bacterias fueron capaces de oxidar los enlaces tioeter de estas estructuras macromoleculares a su forma de sulfóxido y sulfona. Entre los aislamientos, la cepa Asph 2(*Pseudomonas aeruginosa*) presentó la mayor tasa de biodegradación, alcanzando un porcentaje de 83%, 89% y 96% después de 7, 14 y 21 días de incubación, respectivamente (37).

Diferentes estudios de consorcios microbianos han permitido el aislamiento de cepas de bacterias con potencial para degradar asfaltenos. *Acinetobacter calcoaceticus* por ejemplo, fue aislado de un consorcio crecido en una mezcla asfáltica (34). La bacteria crecida, generó un debilitamiento y deterioro visible de la superficie del asfalto. *Pseudomonas aeruginosa* degradó también el asfalto, pero esta degradación fue localizada en el área cubierta por la colonia (34). Desafortunadamente en este reporte no se hizo una cuantificación apropiada de la degradación de los asfaltenos.

3.1.3. Degradación por hongos

Algunos hongos han sido evaluados para la degradación de los asfaltenos. Uno de los estudios realizados comprende un extensivo tamizaje que involucró mas de 750 cepas de hongos filamentosos (38).. Se seleccionaron seis cepas que fueron capaces de modificar asfaltenos extraídos de carbón. El hongo que presentó mayor actividad fue *Panus tigrinus*,

el cual después de crecer sobre aserrín junto con asfaltenos de carbón, generó una disminución en el promedio del peso molecular del asfalteno (38). Es importante notar que en este experimento no se usó el asfalteno como única fuente de carbono. Por otro lado, se detectó 2-hidroxibifenil como producto después del tratamiento con el hongo *Coprinus sclerotigenis*, el cual llevó a los autores a sugerir que la liberación de 2-hidroxibifenil se debió a un ataque enzimático, pero ninguna caracterización fue realizada (30).

El primer reporte sobre utilización de asfaltenos como única fuente de carbono y energía fue publicado en el 2011 por Uribe y colaboradores (2).. En este trabajo se obtuvieron preparaciones de manera rigurosa, evitando la presencia de fracciones no asfálténicas y además trabajaron con asfaltenos libres de petroporfirinas para garantizar que el crecimiento del hongo fuera a base de los asfaltenos solamente y no otras moléculas que también pudieran ser fuente de carbono. La cepa del hongo fue aislada de un consorcio microbiano, que se encontraba creciendo en un lago natural de asfalto del Orinoco en Venezuela. Este hongo fue capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbono y energía. Dicha cepa fue identificada como *N. fischeri* gracias a la secuenciación de sus genes de RNA ribosomal 18S y β -tubulina (2). Después de once semanas de crecimiento, el hongo metabolizó 15.5% del carbón asfálténico, del cual un 13.2% se transformó a CO₂ (Figura 6). Los resultados obtenidos en este trabajo son los antecedentes del actual trabajo de tesis con *N. fischeri*.

N. fischeri pertenece a la sección Fumigati del género *Aspergillus*. Se denomina teleomorfo de *Aspergillus*, lo que significa que también posee reproducción sexual. Aunque está estrechamente relacionado con *A. fumigatus* rara vez ha sido identificado como patógeno invasivo, por lo tanto se considera saprófito. El genoma de *N. fischeri* cepa

NRRL 181 fue secuenciado (32.6 Mb)(39, 40).

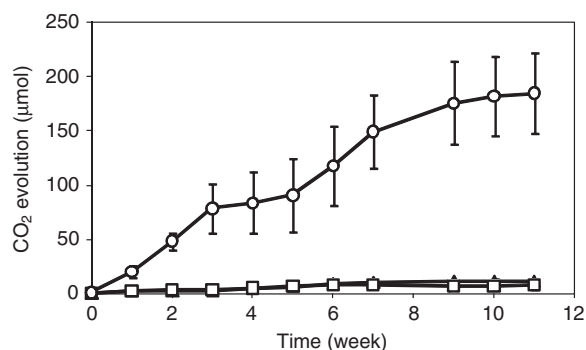


Figura 6. Cinética de evolución de CO₂ en cultivos de *N. fischeri* creciendo en asfaltenos como única fuente de carbono. Cultivos a 37°C con 20 mg de asfaltenos en 30 mL de medio Czapek inoculados con *N. fischeri* (círculos). Cultivos control, inoculados con *N. fischeri* pero sin asfaltenos (cuadrados), y medio Czapek con asfaltenos solamente (triángulos) (2).

Finalmente, otro hongo del género *Pestalotiopsis* sp. NG007 fue reportado como degradador de asfaltenos como única fuente de energía (41). Este hongo halotolerante degradó 21.4% de asfaltenos después de 15 días de incubación en agua (41).

3.2. Transformación de asfaltenos mediante enzimas

La transformación de asfaltenos mediante reacciones enzimáticas *in vitro* ha sido estudiada. Se han identificado algunas enzimas con actividad peroxidasa principalmente. La cloroperoxidasa, una enzima versátil del hongo *Caldariomyces fumago* ha sido evaluada para la transformación de asfaltenos (42, 43). La reacción fue llevada a cabo en una microemulsión o solución ternaria, de diferentes proporciones de tolueno, isopropanol y agua. Se usó una fracción asfáltica rica en petroporfirinas como sustrato, y el grado de transformación fue medido mediante la desaparición de la banda Soret, indicando la destrucción de la petroporfirina. El vanadio y el níquel los cuales están presentes en las moléculas de petroporfirinas fueron encontrados como especies solubles en agua después

de la transformación enzimática. Este hallazgo con la cloroperoxidasa fue la primera evidencia de que hay un sistema enzimático capaz de reaccionar con los asfaltenos (42).. Una de las limitaciones para la transformación de los asfaltenos, es su alta hidrofobicidad, es por esto que la reacción sólo ocurre cuando la enzima y el sustrato están en la misma fase, de allí que se tenga que hacer uso de sistemas ternarios o microemulsiones.

Recientemente, la cloroperoxidasa fue nuevamente evaluada para la transformación de asfaltenos libres de petroporfirinas (44). Para esta ocasión se hicieron dos tipos de preparaciones de la enzima, una como bioconjugado con quitosano y otra como un liofilizado que contenía sacarosa. Las reacciones fueron realizadas en un sistema ternario de bajo contenido de agua (6.3%). El conjugado covalente con quitosano aumentó el número total de recambio 10 veces. Por otra parte, la fluorescencia debida a los aromáticos, disminuyó en un 24% en los asfaltenos tratados, indicando cambios moleculares significativos después de la biotransformación (44).

Otras proteínas como el citocromo c han mostrado la habilidad para transformar asfaltenos. Un citocromo c químicamente modificado en su superficie y en su sitio activo (grupo prostético), cambió su actividad catalítica y la especificidad de sustrato. A su sitio activo se le aumentó la hidrofobicidad, y su superficie modificada con polietilenglicol le permitió una mejor solubilidad en disolventes orgánicos (45). De 20 HPAs evaluados, el citocromo c modificado logró transformar 17, mientras que el no modificado solamente oxidó 8 compuestos (45). Esta proteína modificada posteriormente fue capaz de transformar una fracción asfáltica rica en petroporfirinas. La reacción llevada a cabo con la enzima en un sistema ternario compuesto de diclorometano-metanol-agua y 100 mM de tert-butil hidroperóxido, generó cambios espectrales notables en las petroporfirinas, evidenciado por la pérdida de la banda Soret, la cual se debe principalmente a la presencia de vanadio,

sugiriendo así la disrupción del anillo porfirínico. Con adiciones secuenciales del citocromo c modificado, se logró la pérdida completa de la señal de la banda Soret. Las petroporfirinas perdieron un 95% de V y un 74% de Ni.

La remoción enzimática de metales pesados de los asfaltenos se considera una alternativa interesante para reducir el envenenamiento de los catalizadores en el proceso de hidrotratamiento y cracking (46). Ninguna de estas preparaciones han sido usadas a nivel industrial, sólo han sido evaluadas en el laboratorio.

3.3. Biodegradación hidrocarburos de alto peso molecular

A diferencia de los asfaltenos, hacia los años 90 ya se hablaba de casi 80 años de estudio de la biodegradación de los HPAs; una amplia variedad de bacterias, hongos y algas ya habían sido descritas por su habilidad para metabolizar HPAs (47). Sin embargo, estos estudios han estado principalmente enfocados a la biodegradación de HPAs-BPM tales como naftaleno, acenafteno y fenantreno (1). Esto concuerda con el hecho de que la velocidad de degradación de los HPAs es directamente proporcional a el número de anillos, al igual que su hidrofobicidad, siendo los de mayor peso menos solubles en agua y menos disponibles a los microorganismos, por lo tanto menos biodegradables.

Uno de los HPAs-APM ampliamente estudiado ha sido el benzo(a)pireno (Figura 4) que contiene 5 anillos aromáticos (9, 14, 15, 47-56). Una de las razones por la cuales su biodegradación ha sido estudiada es por que ha sido clasificado por la Agencia de Protección del Ambiente de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), como un contaminante prioritario, debido a que se ha demostrado que es carcinogénico en animales y que en células de mamíferos y procariotas, causa genotoxicidad. Pocos géneros microbianos han sido capaces de degradar HPAs-APM, tales como benzo(a)pireno (1) por

ende cuando se hablan de HPAs de más de 5 anillos, el número de microorganismos capaces de degradarlos es aún más escaso, sin embargo existen algunos reportes.

Juhasz y colaboradores en 1996 (57) reportaron tres cepas de *Pseudomonas cepacia* capaces de degradar HPAs-APM, como el benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno y coroneno. El porcentaje de degradación fue de entre 20 y 30% para benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno, y para el coroneno fue entre un 65 a 70 % con las tres cepas. La incubación se llevó a cabo durante 63 días y observaron periodos de latencia de alrededor de 21 días (57). Aunque se evidencia el aumento de proteína durante la disminución de la concentración del hidrocarburo, lo que nos indica crecimiento del microorganismo, no se hizo alguna caracterización de los subproductos del metabolismo.

Más adelante otro trabajo del mismo grupo reportó una cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* la cual fue evaluada en su capacidad para degradar y detoxificar hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular (58). Según los resultados reportados, la concentración de diferentes hidrocarburos disminuyó en un periodo de 5 a 42 días de incubación (58). *S. maltophilia* logró disminuir en un 22% la concentración de benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno ambos de 5 anillos y en un 55% el coroneno el cual posee 7 anillos aromáticos. Se midieron los metabolitos por cromatografía de gases usando como estándar resorcinol y así se calculó el porcentaje de degradación (58). Es importante resaltar que en este trabajo no se realizó la caracterización de los compuestos producidos durante el metabolismo microbiano. Por otra parte el crecimiento fue determinado por el método del número más probable y la cuenta viable, la cual fue estimada por métodos estadísticos.

Como ya se ha mencionado, los consorcios microbianos favorecen la degradación de compuestos recalcitrantes debido a la presencia de múltiples enzimas con diferentes

funciones y especificidades. Un estudio llevado a cabo por Boonchan y colaboradores en el 2000 con microorganismos aislados de suelos contaminados (59) demostró que los cultivos del consorcio bacteriano (VUN 10,009) con *S.maltophilia* (VUN 10.010) o con *Penicillium janthinellum* (VUN 10,201) pueden degradar un número de HPAs tetracíclicos y pentacíclicos, que incluyen criseno, dibenzo(a,h)antraceno y benzo(a)pireno como única fuente de carbón y energía. Sin embargo, una de las dificultades reportada por los autores es el escaso crecimiento microbiano soportado por los aromáticos de 5 anillos (59).

Un estudio reciente evaluó la remoción y transformación de 7 HPAs de 4 a 6 anillos aromáticos en presencia de microalgas muertas y vivas, y con diferentes tipos de luz (60). La mezcla de hidrocarburos los cuales son comunes contaminantes de agua y suelos, incluía: benzo(a)antraceno (BaA), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno (BkF), benzo(a)pireno (BaP), dibenzo(a,h)antraceno (DA), indeno(1,2,3-c,d)pireno (IP) y benzo(g,h,i)perileno (BghiP) (60). BaA y BaP fueron fácilmente transformados tanto en células vivas como muertas de microalgas, además tuvieron pérdidas abióticas bajo la irradiación con luz blanca o de oro. Esto correlaciona con lo que ya se ha reportado acerca de estos dos compuestos los cuales son más fotorreactivos (61, 62). Su comportamiento es similar a los HPAs-BPM, entre más ligero sea el peso molecular del HPA, mayor será su degradación (63). Para el caso de BbF, BkF e IP, los cuales consisten de 5 anillos (pentacíclicos), se sabe que los enlaces carbono-carbono están bajo mayor tensión, y tienen un mayor contenido energético y una menor estabilidad (64), por lo tanto, los autores sugieren que esta podría ser la explicación de que estos HPAs pudieran ser atacados más fácilmente por las células vivas (60). Este trabajo es interesante, pues es de los pocos que incluye varios HPAs, y además evalúa la importancia de la combinación de métodos químicos y biológicos para remover y transformar estos contaminantes.

Recientemente una cepa de una bacteria aislada de suelo contaminado con HPAs fue caracterizada como *Kocuria rosea* (65). Esta cepa demostró ser capaz de degradar HPAs-APM, tales como fluoreno en un 83.2%, fluoranteno en un 76.5% e indeno (1, 2, 3-cd)pireno con 59.6%, después de 14 días de incubación a 25°C. Aunque es evidente que si hay una actividad importante de la bacteria, el uso de extracto de levadura en el medio de cultivo nos indica que no usa solamente los HPAs como fuente de carbono y energía. Sin embargo, es importante resaltar que en este mismo trabajo ya se hicieron algunos estudios de biorremediación los cuales mostraron un 24% de remoción de HPAs, y ese porcentaje se vió mejorado con la adición de nutrientes al suelo (65).

3.4. Metabolismo de asfaltenos y de hidrocarburos de alto peso molecular

Como ya se ha mencionado, la biodegradación de asfaltenos ha sido recientemente descrita, y la cantidad de microorganismos que degradan HPAs-APM son escasos, por lo tanto muchas rutas metabólicas aún son desconocidas. Sin embargo, la información sobre la degradación de HPAs-BPM puede dar una idea de las posibles rutas que usan los microorganismos capaces de degradar estos compuestos altamente recalcitrantes (30).

La transformación microbiana de los compuestos hidrofóbicos, tales como HPAs, podría ocurrir ya sea dentro o fuera de la célula. Los compuestos transformados afuera de la célula por enzimas extracelulares pueden luego ser metabolizados intracelularmente. De igual manera, los metabolitos generados dentro de la célula, pueden ser excretados y transformados por enzimas extracelulares (Figura 7). Otra opción es la excreción de sustratos aromáticos como conjugados, los cuales pueden persistir o ser intracelularmente transformados, llevando a la mineralización completa o la excreción en diferentes etapas de oxidación, si es que las consecuentes oxidaciones no son posibles (66).

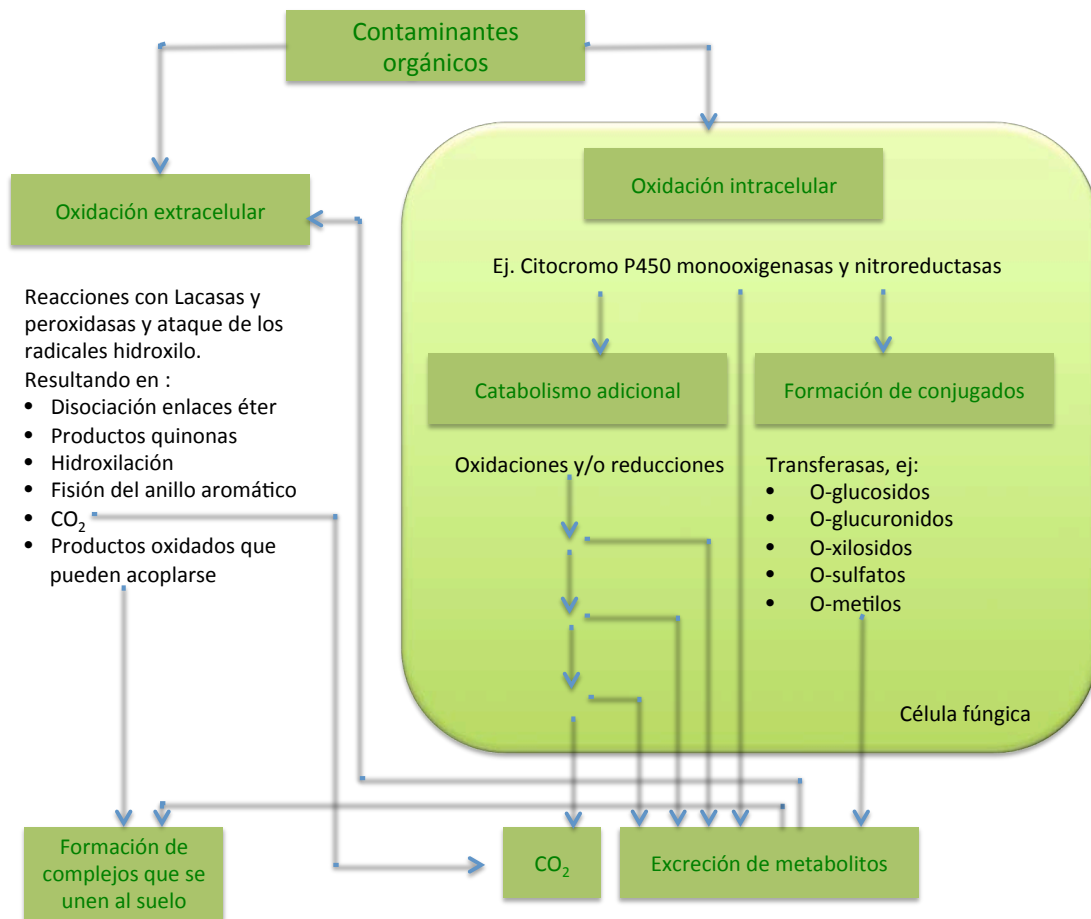


Figura 7. Adaptado de Harms et al. Principales métodos usados por los hongos para degradar químicos orgánicos. El esquema describe de manera general, como los contaminantes pueden ser degradados ya sea a nivel intracelular o extracelular, o en ambos lugares. Adaptado de (66)

La mayoría de hongos no pueden usar HPAs como única fuente de carbono y energía, sin embargo, en condiciones de co-metabolización, ellos pueden metabolizar un amplio rango de HPAs produciendo una variedad de productos oxidados y en algunos casos llegar a mineralizarlos a CO₂ (48). Es necesario que una oxidación inicial se dé para la consecuente degradación. Se ha establecido que en la degradación de HPAs se realiza la

incorporación de oxígeno antes del rompimiento del anillo aromático, y esta podría ser mediante la acción enzimática de dioxigenasas, principalmente en bacterias, y monooxigenasas, peroxidasa y lacasa en hongos (Figura 8) (48, 66).

Varias enzimas extracelulares fúngicas han sido reportadas como capaces para oxidar una variedad de HPAs, incluyendo lignino peroxidasa, lacasa, manganeso peroxidasa y versátil peroxidasa (48, 49, 67). Este tipo de enzimas son producidas por hongos ligninolíticos (un grupo compuesto principalmente de basidiomicetos que producen enzimas para degradar la lignina en la madera) (9)..

Por otra parte, la participación de CIP450 ha sido reportada en el metabolismo de dioxinas, disruptores endocrinos, plaguicidas y HPAs (9, 24-27). Y son justamente los hongos no ligninolíticos los que usan este tipo de actividad para oxidar estos compuestos. Tales hongos, los cuales incluyen zigomicetos, ascomicetos, hifomicetos y otros, poseen degradadores de HPAs (9). En especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cunninghamella* la transformación inicial de HPAs involucra la participación de un citocromo P450 con actividad monooxigenasa y O_2 para producir un óxido de areno y agua. Este inestable óxido de areno el cual es un intermediario, puede ser hidratado por una epóxido hidrolasa para formar trans-dihidrodiol o es subsecuentemente rearrreglado no enzimáticamente para formar un fenol (Figura 8) (50). Los HPA trans-dihidrodiol y fenoles pueden ser metilados o convertidos a sulfatos, glucósidos, glucuronidos o xilósidos (68).

Es por esto que es evidente que los hongos tienen una extraordinaria capacidad para degradar y mineralizar HPAs-APM los cuales son altamente recalcitrantes. A pesar de varias décadas de investigación, que demuestran la participación de CIP450 en el metabolismo fúngico de HPAs, las monooxigenasas tipo P450 específicas y responsables de la oxidación de esos compuestos no son conocidas todavía.

Recientemente, un análisis de microarreglos identificó seis genes de CIP450 inducidos por HPAs de diferente peso molecular en el hongo *P. chrysosporium* (69).

Dentro de los HPAs-APM, los cuales han sido ampliamente estudiados, se encuentra el benzo(a)pireno. A través de varios estudios se han podido establecer las rutas en diferentes hongos por las cuales pueden transformar éste compuesto carcinogénico, ya que los subproductos han sido caracterizados y la participación de algunos CIP450 ha sido demostrado (Figura 9) (9).

Cunninghamella elegans produce trans-4,5-, 7,8-, y 9,10-dihidrodiol, 3- y 9-hidroxi benzo(a)pirenos, 1,6- y 3,6-quinonas, diol epóxidos, y tetraoles (50). *Aspergillus ochraceus* produce al menos trans-4,5- dihidrodiol (70). *Aspergillus terreus* oxida benzo(a)pireno a benzo(a)pirenil sulfato vía monooxigenación de CIP450 y conjugación con sulfato (51, 52). *P. chrysogenum* produce 1,6-quinona, trans-7,8- dihidrodiol, y 3-hidroxi benzo(a)pireno (9, 53). Por su lado, *Fusarium solani* mineraliza benzo(a)pireno, parcialmente transformándolo a dos productos oxidados, benzo(a)pireno 1,6-and 3,6-quinonas, en medio líquido y en un reactor (54, 55). Otra cepa de *Fusarium sp.* transforma benzo(a)pireno a dihidrodiol y quinona (9, 56).

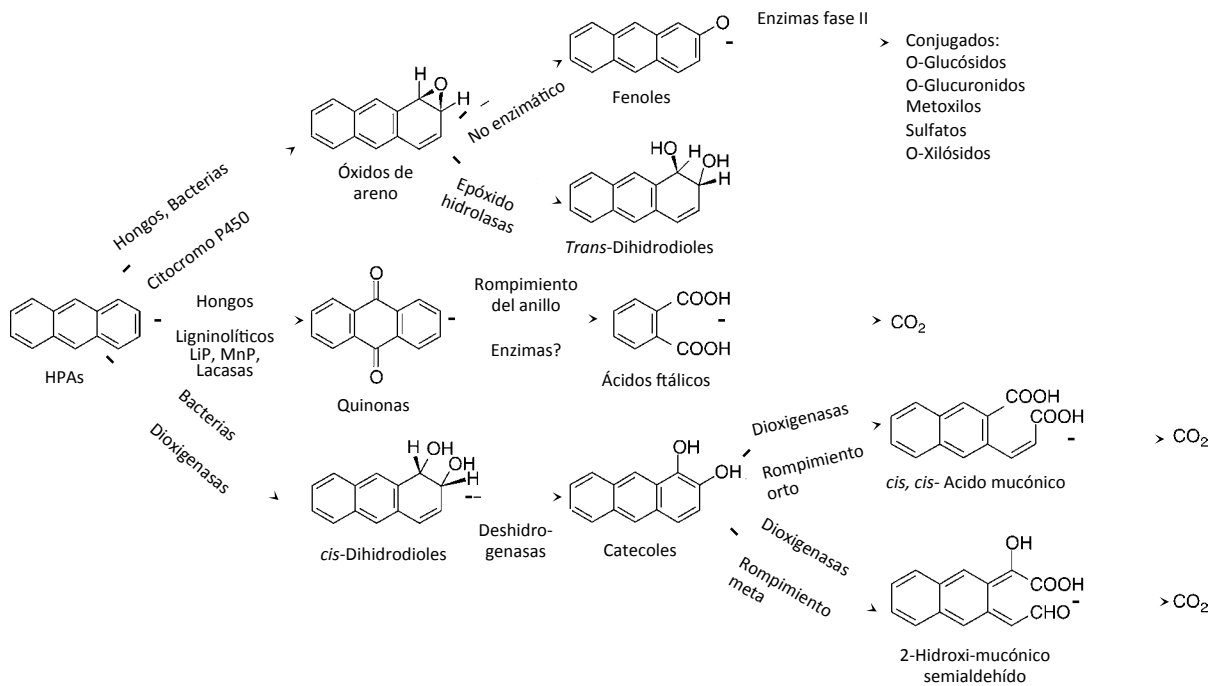


Figura 8. Rutas generalizadas para el metabolismo de HPA por hongos y bacterias. El esquema describe la participación de distintas enzimas dependiendo del microorganismo. Adaptado de (9).

Dentro de los hongos ligninolíticos *Phanerochaete chrysosporium* produce una lignina peroxidasa (LiP) que oxida benzo(a)pireno, especialmente en la presencia de alcohol veratrílico, a 1,6-, 3,6-, y 6,12- quinonas y eventualmente a CO₂ (9, 71-75). La fracción microsomal y citosólica de *P. chrysosporium* contienen CIP450 los cuales oxidan el HPA a 3-hidroxi-benzo(a)pireno. Por otra parte, en presencia de Mn y ácido linoleico, *Pleurotus pulmonarius* hidroxila a benzo(a)pireno a 3-hidroxibenzo(a)pireno. La hidroxilasa involucrada fue purificada y se encontró que era un CIP450 (9, 24, 76)

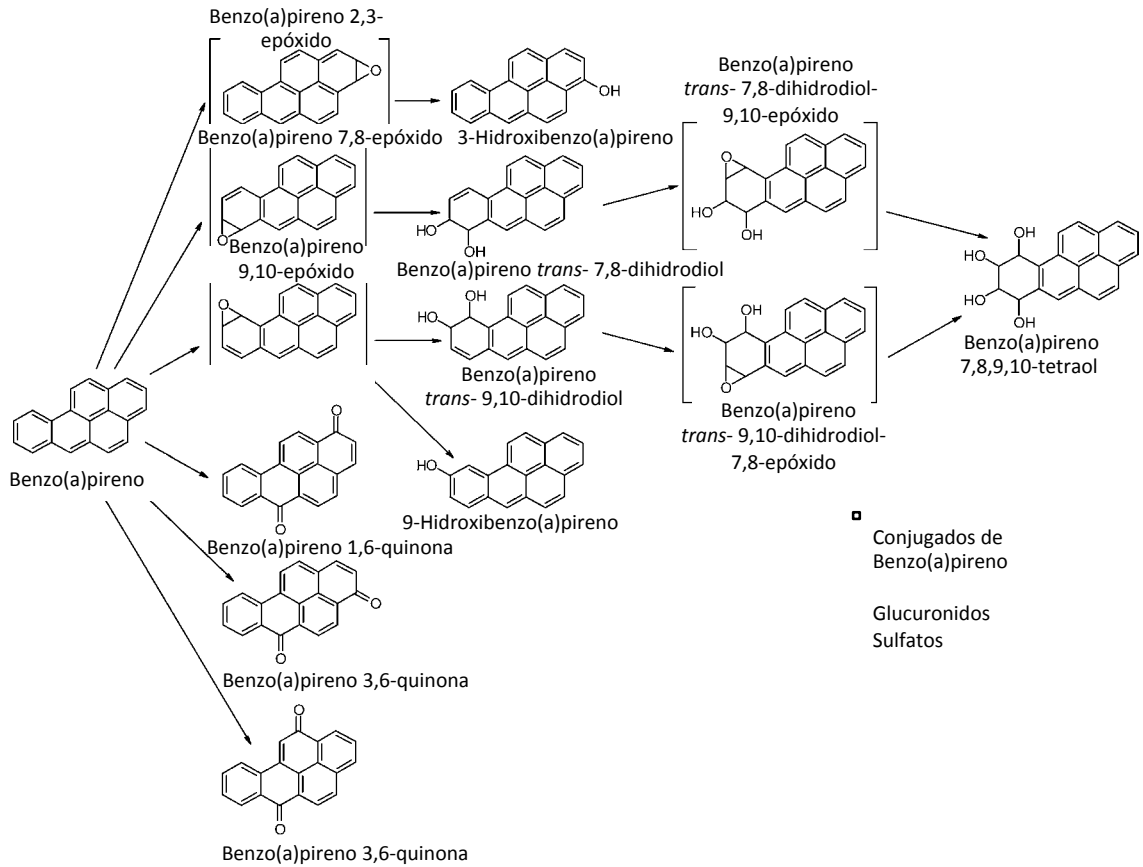


Figura 9. Rutas para el metabolismo de benzo(a)pireno por varios hongos. El esquema representa los diferentes tipos de productos generados a partir de un mismo compuesto, pero metabolizado por diferentes mecanismos. Adaptado de (9).

4. HIPOTESIS

La degradación por *N. fischeri* de moléculas recalcitrantes como los asfaltenos y HPAs - APM involucra monooxigenasas tipo CIP450.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Explorar la participación de enzimas con actividad monooxigenasa utilizadas por *N. fischeri* para catalizar la primera oxidación a los asfaltenos y de los HPAs de 6 o más anillos aromáticos.

5.1.1. Objetivos particulares

- Estudiar la expresión diferencial de genes que codifican para CIP450 mediante el uso de microarreglos de DNA en *N. fischeri* bajo dos condiciones de crecimiento, en presencia y ausencia de asfaltenos
- Estudiar la biotransformación de HPAs-APM por *N. fischeri*.
- Estudiar por microscopía la posible internalización de metabolitos aromáticos en las hifas de *N. fischeri* cultivadas en asfaltenos como única fuente de carbón y energía.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivos

Coroneno (99%), benzo(g,h,i)perileno (98%) e indeno(1,2,3-cd)pireno (98.8%), TRI reagent[®] RNA para purificación de ARN, etanol y ácido trifluoroacético fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄•7H₂O, KCl, FeSO₄•7H₂O y dextrosa anhidra en polvo fueron adquiridos de J.T. Baker (Center Valley, PA). Bacto peptona, caldo y agar papa dextrosa (PDA) se obtuvieron de DIFCO (Sparks, MD). Diclorometano, metanol, hexano, ácido clorhídrico y KOH fueron adquiridos de la marca Fermont (Monterrey, México).

Los asfaltenos libres de petroporfirinas fueron purificados de petróleo crudo Maya (México), como ya había sido descrito previamente (2).

6.2. Obtención y purificación de asfaltenos libres de petroporfirinas

Los asfaltenos se obtuvieron por precipitación con n-pentano. 100 g de petróleo crudo fueron suspendidos en 5 L de n-pentano y agitados por una hora. La mezcla fue dejada en reposo toda la noche a 20°C en un matraz, luego la suspensión fue centrifugada a 10 000 x g y el precipitado fue redisoluto en 100 mL de diclorometano. La solución de asfaltenos fue reprecipitada con 5 L de n-pentano, se mantuvo toda la noche en reposo y posteriormente fue centrifugado. Este procedimiento fue repetido una vez más y el precipitado fue lavado con n-pentano, obteniendo así la fracción asfáltica. Para la obtención de los asfaltenos libres de petroporfirinas, se tomaron 6 g de asfaltenos diluidos en 300 mL de tolueno y agitados durante 2 horas a 20°C. Después 3 L de acetona, se adicionaron y la mezcla se agitó durante 3 horas a 20°C y se mantuvo en reposo por 48

horas. Posteriormente, esta mezcla se centrifugó a 12 000 x g por 30 minutos y el precipitado fue lavado 3 veces con acetona. El sobrenadante marrón y los lavados subsecuentes contenían las petroporfirinas, y el precipitado contenía los asfaltenos libres de petroporfirinas (2).

6.3. Organismo y medio de cultivo

N. fischeri la cepa usada en este estudio fue aislada en el cinturón petrolero del Orinoco en Venezuela y caracterizada microbiológica y genéticamente (2). La cepa se mantuvo en medio PDA o Sabouraud (peptona y dextrosa). Para evaluar el crecimiento en hidrocarburos (HPAs-APM o asfaltenos) como única fuente de carbono, se usó un medio mínimo mineral (Czapek) modificado sin la fuente de carbono original, el cual está compuesto de (3.0 g L⁻¹ NaNO₃; 1.0 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0.5 g L⁻¹ MgSO₄•7H₂O; 0.5 g L⁻¹ KCl and 0.01 g L⁻¹ FeSO₄•7H₂O) y suplementado con asfaltenos, coroneno, benzo(g,h,i)perileno o indeno(1,2,3-cd)pireno. Los asfaltenos fueron triturados en mortero para obtener un polvo fino y luego fueron adicionados al medio. Para evitar crecimiento sobre fuentes de carbono residuales del medio rico donde se obtiene el inóculo, los micelios fueron lavados tres veces con agua destilada estéril, homogenizados y posteriormente inoculados para ser cultivados durante 20 días en presencia de HPAs-APM o asfaltenos. Se mantuvieron a 37°C y agitados a 100 rpm.

6.4. Determinación del consumo de oxígeno

La metabolización del sustrato por parte del hongo fue monitoreado por la medición del consumo de oxígeno en un sistema de medición OxiTop® equipado con una trampa de KOH que atrapa el CO₂. Este método se basa en el monitoreo de los cambios de presión a

través de sensores de presión electrónicos. *N. fischeri* fue inoculado en 40 mL de medio Czapek con 10 mg de coronene, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno o asfalto. Los cultivos control fueron mantenidos sin ninguna fuente de carbono. Las botellas se incubaron a 37°C a 100 rpm por 17-30 días. Todos los cultivos y controles se realizaron por triplicado.

6.5. Producción de ergosterol

El contenido de ergosterol en la biomasa del hongo fue medida, usando una metodología previamente reportada (77). *N. fischeri* fue inoculado en matraces en 20 mL de medio Czapek con 5 mg de coroneno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno o asfaltos como única fuente de carbono y los controles sin fuente de carbono. Los cultivos fueron incubados a 37°C y agitados a 100 rpm por 14 días, luego fueron centrifugados para eliminar el medio de cultivo. A la biomasa obtenida se le adicionó metanol (10 mL) en tubos de teflón de 50 mL, posteriormente la suspensión fue sonicada por 3 minutos (1 min x 3) en un vaso de precipitado plástico de 50 ml, sumergido en hielo todo el tiempo. La muestra sonicada, fue centrifugada a 9000 g por 15 min a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado tres veces con 10 mL de metanol. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos de 50 mL de teflón, y 5 mL de etanol absoluto y 2 g de KOH fueron adicionados. La mezcla fue saponificada en un baño de agua a 80°C por 1 hora. Los tubos fueron removidos del baño de agua y se dejaron enfriar; posterior a esto se les adicionaron 10 mL de hexano a cada uno, se cerraron y se agitaron vigorosamente. Esto permitió la formación de dos fases y la capa superior correspondiente a la del hexano fue removida y transferida a balones de destilación. La fase alcohólica fue lavada dos veces más con 10 ml de hexano. Las fases recuperadas y combinadas de hexano se secaron y evaporaron en un rotavapor a 40°C bajo

vacío. El ergosterol extraído fue redissuelto en 1 ml de metanol grado-HPLC y transferido a un vial ámbar y almacenado a -20 °C hasta el análisis en el HPLC (High performance liquid chromatography).

Los extractos fueron analizados en un HPLC (Agilent 1100 series) equipado con una columna de fase reversa C₁₈ (Phenomenex Kinetex) de 5 µm, 100 Å, 150 x 4.60 mm. Las muestras fueron eluidas con una solución de metanol/agua 97:3 con 0.1% de ácido trifluoroacético con un flujo de 0.5 mL min⁻¹ y monitoreado a 282 nm por 20 min. El contenido de ergosterol fue estimado contra una curva estándar de soluciones de ergosterol en metanol de 0 a 1000 µg ml⁻¹ (Figura 10) las cuales también fueron medidas en el HPLC bajo los mismos parámetros usados en la medición de las muestras.

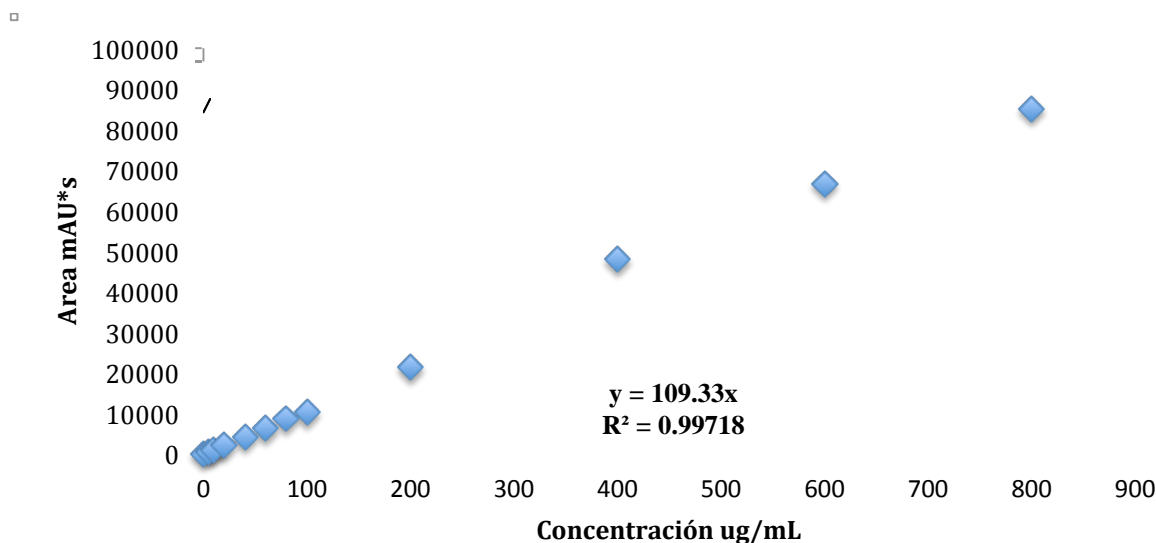


Figura 10. Curva de calibración usada para determinar la concentración de ergosterol en las muestras. La curva se obtuvo al medir mediante HPLC el área correspondiente a soluciones de concentración conocida de ergosterol, preparadas en metanol.

6.6. Identificación de metabolitos

Los metabolitos de la transformación de los HPAs-APM fueron analizados mediante HPLC y espectrometría de masas. *N. fischeri* fue inoculado en 20 mL de Czapek

con 5 mg de coroneno, indeno(1,2,3-cd)pireno o benzo(g,h,i)perileno e incubado durante 17 días a 37°C y 100 rpm. Posteriormente, el medio de cultivo fue acidificado con unas gotas de HCl y se extrajo 3 veces con 10 mL de diclorometano. La mezcla fue agitada y centrifugada, y la fase orgánica fue colectada y concentrada por destilación al vacío y analizada por HPLC. El cromatógrafo (Agilent 1100 series) fue equipado con detector de luz UV y una columna de fase reversa C₁₈ de 5µm, 100Å (150 x 4.6 mm) obtenida de Phenomenex (Los Angeles, CA). La elución se hizo con un gradiente de metanol hasta llegar a un 40% de diclorometano en metanol durante un periodo de 15 min, a un flujo de 0.4 mL min⁻¹. Los sustratos y los metabolitos fueron monitoreados a 280 nm.

Los productos de transformación fueron además analizados por nLC-MS (nano Liquid chromatography–mass Spectrometry) en la Queen’s Mass Spectrometry and Proteomics Unit (MSPU) en Queen’s University en Kingston, Ontario. Se usó una nLC (Agilent capillary HPLC 1100 system) acoplada a espectrometría de masas (MS) (Orbitrap Velos Pro) con una resolución de masa de 100,000 Da y una exactitud de 1ppm RMS (Root mean square) para compuestos orgánicos. Las muestras fueron eluidas con un gradiente de metanol a diclorometano en 25 min a un flujo de 300 nL min⁻¹.

Los espectros de espectroscopía de infrarrojo de la transformada de Fourier con reflexión atenuada total (FTIR-ATR) fueron realizados en un espectro Perkin-Elmer 100 (Perkin Elmer Cetus Instruments, Norwalk CT) desde 650 a 4000 cm⁻¹, usando un accesorio Universal ATR y una punta de diamante. El software del espectro fue usado para la sustracción de la línea base.

6.7. Transformación por microsomas de HPAs-APM

Los microsomas fueron obtenidos de acuerdo a Jauregui et al.(25). El micelio (10 mg de peso seco) fue molido en nitrógeno líquido en un mortero junto con inhibidor de proteasas y posteriormente resuspendido en 25 mL de solución amortiguadora Tris-HCl pH 7.0 20 mM con 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT y 10% de glicerol. Posteriormente la mezcla fue homogenizada en una licuadora (Dremel Moto-tool). La fracción microsomal fue aislada por centrifugación diferencial. Primero se centrifugó a 600 g por 5 min y después el sobrenadante a 12,000 g por 10 min. Posteriormente, se adicionó CaCl_2 a una concentración final de 8 mM en la muestra, esto con el fin de permitir la completa sedimentación de los microsomas a 27,000 g por 15 min. El precipitado fue lavado dos veces con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM pH 7.0 con CaCl_2 8 mM.

Los microsomas fueron evaluados para la oxidación de NADH en presencia de cada uno de los HPAs-APM; coroneno, benzo(g,h,i)perileno o indeno(1,2,3-cd)pireno. Las reacciones fueron llevadas a cabo en 1 mL de mezcla de reacción que contenía 10 μM de HPA y 0.4 mM de NADH en 100 mM de solución amortiguadora de fosfatos pH 5.0, 10% de acetonitrilo y 20 ng de proteína microsomal. La transformación de HPA fue monitoreada espectrofotométricamente por la oxidación de NADH a 340 nm.

6.8. Estudios de microscopía

Microscopía laser confocal de barrido. Se realizó microscopía de fluorescencia de la cepa bajo dos condiciones de cultivo (asfaltenos y glucosa-peptona). Se usó un microscopio invertido con laser de barrido FV1000 FluoView™ (Olympus, Japan) equipado con un laser de Argón con una longitud de onda de excitación a 405 nm para los asfaltenos y 488 nm para FM4-64 y Sybergreen (SYBRG) y 543 nm para BODIPY. El

objetivo usado fue un UPlanFLN 60X, 1.42 NA para aceite de inmersión. Las imágenes fueron capturadas simultáneamente por fluorescencia y por canales de contraste por interferencia diferencial (DIC, por sus siglas en inglés; Differential Interference Contrast) con un software FluoView™ (Olympus, Japan). Las figuras fueron organizadas usando Adobe Photoshop CS5 Extended (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

Métodos de tinción celular. Para la tinción de los diferentes compartimientos celulares, los micelios cultivados en asfaltenos o glucosa-peptona, fueron incubados en ensayos separados con 2.5 μM FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR), para marcar la membrana plasmática y las membranas de los organelos, SYBR® Green I 1:10,000 (Molecular Probes, Eugene, OR) para marcar los núcleos y las mitocondrias, y 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de BODIPY (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) para marcar los lípidos.

Microscopía de fuerza atómica (AFM atomic force microscopy). Después de 5 días de crecimiento ya sea en medio Czapek con asfaltenos o medio glucosa-peptona, una gota del cultivo fue colocado sobre una lámina portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Las células fúngicas fueron examinadas directamente por AFM en un microscopio con sonda de barrido (SPM: scanning probe microscope) equipado con un AFM XE-70 Park system. El método usado fue con una punta de no contacto (cantilever) denominada cantilever NC non-contact de Park system.

6.9. Análisis de microarreglos.

La expresión diferencial de CIP450 se analizó mediante microarreglos. Varias preparaciones de ARN total se hicieron a partir de micelios cultivados durante 24 horas en medio rico (glucosa-peptona) Sabouraud y 17 días en medio Czapek con asfaltenos. Los

datos de los microarreglos están disponibles en la página de Gene Expression Omnibus (GEO) con el número GSE68146 (78)..

La impresión de los microarreglos. fue realizada por MYcroarray Company (Ann Arbor, MI) utilizando sondas específicas diseñadas a nivel genómico. Estas fueron de 45-47 nucleótidos de longitud y se sintetizan directamente en la placa. El genoma de *N. fischeri* estuvo representado tres veces en cada placa. Para la pre-hibridación, los portaobjetos se rehidrataron con vapor de agua a 60° C, y se fijaron con dos ciclos de luz UV (1200J). Después de hervir durante dos minutos a 92° C. los portaobjetos se lavaron con etanol al 95% durante un minuto y prehibridaron en 5X SSC, 0,1% SDS y 1% de BSA durante una hora a 42° C. Las láminas se lavaron y se secaron para su posterior hibridación.

Para la preparación de la sonda e hibridación de los microarreglos. se usaron 10 µg de ARN total para la síntesis de ADNc incorporando Cy3-dUTP- o Cy5-dUTP usando el kit de marcaje CyScribe First-Strand cDNA (Amersham). La incorporación del fluoróforo se midió mediante absorbancia a 555 nm para Cy3 y 655 nm para Cy5. Cantidades iguales de ADNc marcado se hibridaron usando una solución de hibridación UniHyb (TeleChem International Inc), para los microarreglos durante 14 h a 42° C. Para los experimentos, se usó el ARN de al menos tres preparaciones de ARN total obtenido de micelios de *N. fischeri*. Los micelios fueron cultivados durante 24 horas en medio Saboraud y 17 días para los cultivados en Czapek con asfaltenos. La extracción de ARN se realizó utilizando el reactivo TRI (Sigma). La calidad del ARN se evaluó en un gel de agarosa. Dos fluoróforos se utilizaron dUTP-Cy3 y Cy5-dUTP para etiquetar los ARN obtenidos en las dos condiciones de crecimiento diferentes.

La adquisición de datos y análisis de imágenes de microarreglos.se realizó en GenePix 4100A con un software del equipo. Todas las imágenes fueron capturados

utilizando láser de potencia óptima y resolución de 5µm. Para cada punto el valor medio de intensidad de Cy3 y Cy5 y el valor medio del fondo Cy3 y Cy5 se calcularon con el software ArrayPro analyzer, usado en el Instituto de fisiología celular de la UNAM.

Los datos fueron analizados con GenArise software, desarrollado en la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise lleva a cabo una serie de transformaciones: la corrección de fondo, la normalización, filtro de intensidad, replica del análisis y la selección de genes expresados diferencialmente. El objetivo de GenArise es identificar cuál de los genes muestran una buena evidencia de ser expresado diferencialmente. El software identifica los genes expresados diferencialmente al calcular el puntaje z (z score) el cual depende de la intensidad. Se usó un algoritmo de ventana desplazada para calcular la media y la desviación estándar dentro de la ventana alrededor de cada punto de datos, la cual define un puntaje z, donde z mide el número de desviaciones estándar de su media en un punto de datos.

$$z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$$

Dónde z_i es la puntuación z para cada elemento, R_i es el log-razón para cada elemento, y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar de el log-razón. Con este criterio, los elementos con un $z\text{-score} > 2$ desviaciones estándar serían los genes expresados diferencialmente de manera significativa.

7. RESULTADOS

7.1. Crecimiento de *N. fischeri* sobre hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular

Para evaluar la habilidad de *N. fischeri* para metabolizar HPAs-APM, se inoculó el hongo en medio Czapek con coroneno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno o asfaltenos de petróleo como única fuente de carbono (Figura 11). El consumo de oxígeno fue monitoreado durante el crecimiento del hongo, siendo el valor más alto en presencia de asfaltenos ($138 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$), por su parte coroneno e indeno(1,2,3-cd)pireno mostraron un promedio de consumo de oxígeno con valores de 82 y $81 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$ respectivamente (Tabla 1), y sin diferencias significativas estadísticamente ($p < 0.05$) entre ellos. El benzo(g,h,i)perileno soportó el menor consumo de oxígeno por parte del hongo con $62 \text{ mg L}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Los controles inoculados pero sin ninguna fuente de carbono no mostraron un consumo significativo.

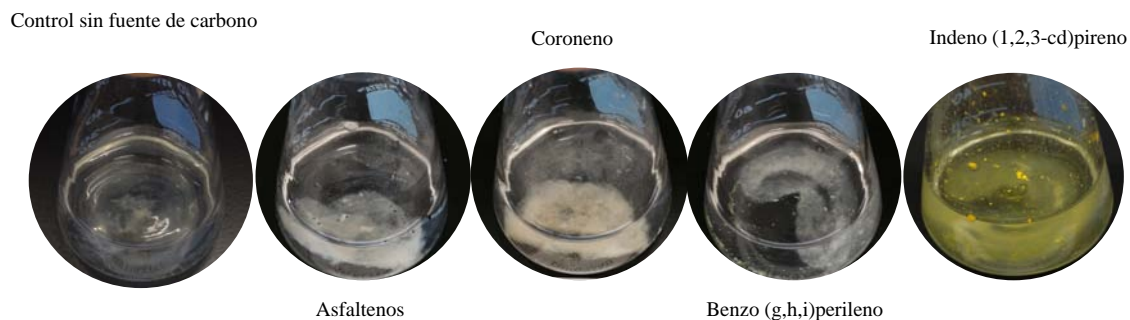


Figura 11. Cultivos de *N. fischeri* en diferentes fuentes de carbono, como lo son asfaltenos de petróleo, e hidrocarburos de alto peso molecular tales como coroneno, benzo (g,h,i) perileno e indeno (1,2,3-cd) pireno respectivamente, y un control sin fuente de carbono adicionada.

Para cuantificar el crecimiento del hongo, se realizó la medición de la producción de ergosterol (Tabla 1). Los resultados mostraron que la producción diaria de ergosterol en el hongo cuando creció en asfaltenos y en coroneno fue mayor con valores de 34 y $31 \mu\text{g L}^{-1}$

día⁻¹, respectivamente. En los cultivos con indeno(1,2,3-cd)pireno y benzo(g,h,i)perileno, la producción de ergosterol fue menor de 22 y 27 µg L⁻¹ día⁻¹, respectivamente. Los controles sin fuente de carbono, no mostraron producción de ergosterol, como era de esperarse, de hecho se observó una ligera disminución del contenido con respecto al inicial, probablemente ocasionado por una metabolización endógena (Tabla 1). El consumo de oxígeno y la producción de ergosterol mostraron una correlación lineal de 0.81.

Tabla 1. Velocidad máxima de consumo de oxígeno en cultivos de *Neosartorya fischeri* con HPA-APM y asfaltenos como única fuente de carbono y determinación de la producción de ergosterol durante el crecimiento del hongo.

Fuente de carbono	Consumo de oxígeno (mg L ⁻¹ día ⁻¹) ^a	Producción de Ergosterol ^b (µg L ⁻¹ día ⁻¹)
Asfaltenos	138 (± 26)	34.2 (±6.0)
Coroneno	82 (± 19)	30.9 (±2.7)
Benzo(g,h,i)perileno	62 (± 28)	27.0 (±5.0)
Indeno(1,2,3-cd)pireno	81 (±9)	22.4 (±5.2)
Glucosa-Peptona	492 (± 22)	2023.6 (±76.2)
Control sin fuente de carbono	0 (± 9)	-2.3 (±0.6)

^a *N. fischeri* fue inoculado en botellas de OxiTop® con 40 mL de medio mínimo mineral Czapek suplementado con 10 mg de HPA-APM y asfaltenos respectivamente. Se incubaron a 37°C y se agitaron a 100 rpm por 14 días. Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicados independientes.

^b *N. fischeri* fue inoculado en 20 ml de medio Czapek con 5 mg of coroneno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno o asfaltenos y un cultivo control sin fuente de carbono. Se incubaron a 37°C y se agitaron a 100 rpm por 14 días. Los experimentos fueron llevados a cabo en triplicados independientes

7.2. Transformación de HPAs-APM por *N. fischeri*

Los productos metabólicos fueron extraídos de cultivos de 17 días de crecimiento de *N. fischeri*, usando como fuente de carbono y energía diferentes HPAs-APM. Los

productos extraídos se analizaron por HPLC, espectroscopía de infrarrojo de masas para así poder determinar su naturaleza química. Se pudo detectar la presencia de compuestos polares en el HPLC en los cultivos crecidos con coroneno sin embargo, en los otros dos compuestos (indeno(1,2,3-cd)pireno y benzo(g,h,i)perileno) estos no fueron detectables con la metodología usada. Ningún producto fue detectado en los cultivos control no inoculados.

Los productos oxidados fueron confirmados mediante espectrofotometría de infrarrojo (Figura 12), en donde se pudo observar la presencia de algunos grupos funcionales, tales como O-H y C=O. Los compuestos puros, es decir coroneno, indeno(1,2,3-cd)pireno y benzo(g,h,i)perileno mostraron bandas características a 3044-3024 (C-H estiramiento), 1610-1598 (C=C estiramiento), 1340-1318 (C-C estiramiento), y 840-675 cm^{-1} (vibraciones C-H fuera del plano). Las vibraciones C-C producen generalmente picos intensos a 1569 y 1309 cm^{-1} , mientras que los picos cercanos a 1200 cm^{-1} son principalmente contribuidos por vibraciones C-H en el plano. Esas señales están asociadas a la presencia de hidrocarburos aromáticos. Después del tratamiento con *N. fischeri* de coroneno y benzo(g,h,i)perileno aparecieron bandas débiles en el rango de 3730-3700 cm^{-1} y entre 1400-1100 cm^{-1} , las cuales pueden ser asignadas a estiramientos O-H y vibraciones O-H en el plano, respectivamente. Por otra parte, el producto de transformación del indeno(1,2,3 c-d) pireno, mostró nuevas bandas fuertes localizadas a 3350-3200 (estiramiento O-H), 1460-1360 (vibraciones O-H en el plano) y 1050-950 cm^{-1} (estiramiento C=O), indicando que las reacciones de oxidación ocurrieron en mayor extensión en este compuesto.

Los productos de metabolización también fueron analizados por espectrometría de masas híbrida, acoplada a nLC de alta resolución. De la metabolización del coroneno (Figura 13) se detectó hidroxicoroneno ($\text{C}_{24}\text{H}_{12}\text{O}$, $[\text{M}+\text{H}]^+ = 317.09652 \text{ Da}$),

dihidroxicoroneno ($C_{24}H_{12}O_2$, $[M+H]^+ = 333.09721$ Da) y coronenodiona ($C_{24}H_{10}O_2$, $[M+H]^+ = 331.07612$ Da). En los cultivos con benzo(g,h,i)perileno (Figura 14) se detectaron los siguientes derivados; monohidroxibenzo(g,h,i)perileno ($C_{22}H_{12}O$, $[M+H]^+ = 293.09609$ Da), dihidroxibenzo(g,h,i)perileno ($C_{22}H_{12}O_2$, $[M+H]^+ = 309.09028$ Da), monocetona ($C_{22}H_{11}O$, $[M+H]^+ = 292.08752$ Da) y benzo(g,h,i)perilenodiona ($C_{22}H_{10}O_2$, $[M+H]^+ = 307.07536$ Da). Y finalmente en la metabolización de indeno(1,2,3 c-d) pireno (Figura 15) se encontraron dihidroxindeno(1,2,3 c-d)pireno ($C_{22}H_{12}O_2$, $[M+H]^+ = 309.09101$ Da), indeno(1,2,3-c-d)pirenona ($C_{22}H_{11}O$, $[M+H]^+ = 292.08758$ Da), e indeno(1,2,3 c-d)pirenodiona ($C_{22}H_{10}O_2$, $[M+H]^+ = 307.07470$ Da). Todos estos productos del metabolismo sugieren fuertemente la participación de una enzima con actividad monooxigenasa tipo CIP450,. Este tipo de metabolitos son generados por la actividad de enzimas tipo CIP450 en hongos no ligninolíticos como *N. fischeri*, donde la transformación inicial genera productos hidroxilados.

La caracterización de los metabolitos formados durante la oxidación de los compuestos xenobióticos, es una manera indirecta de demostrar la participación de una determinada enzima. Sutherland y colaboradores propusieron la participación de P450 en la degradación de fenantreno por *P. chrysosporium*, al identificarse los siguientes metabolitos, fenantreno trans-9,10-dihidrodiol, fenantreno trans-3,4- dihidrodiol, 9-phenantrol, 3-fenantrol, 4-fenantrol, y el conjugado 9- fenantril β -D-glucopiranosido (79, 80).

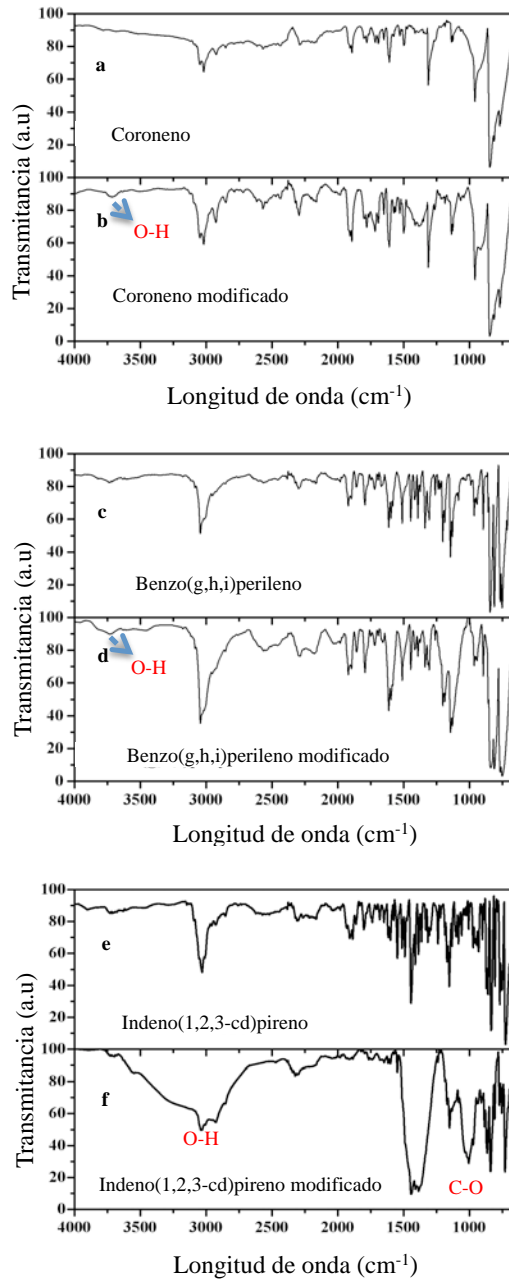


Figura 12. Caracterización de HPAs-APM antes y después del tratamiento con *N.fischeri*. mediante espectrofotometría de infrarrojo, en donde se pueden evidenciar grupos funcionales que indican la presencia de un proceso oxidativo.

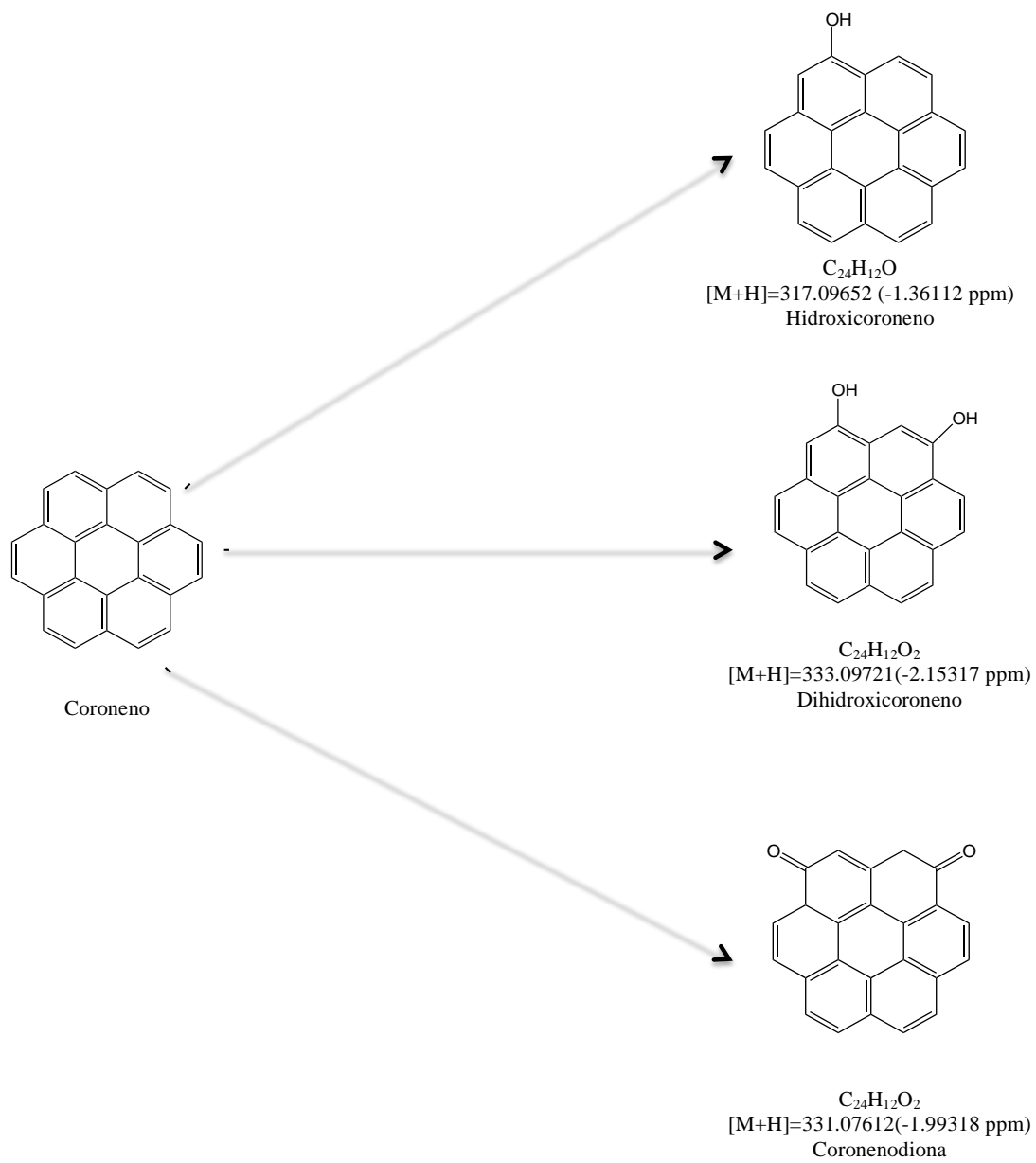


Figura 13. Productos del metabolismo del coroneno, identificados después del crecimiento de *N. fischeri* mediante espectrometría de masas

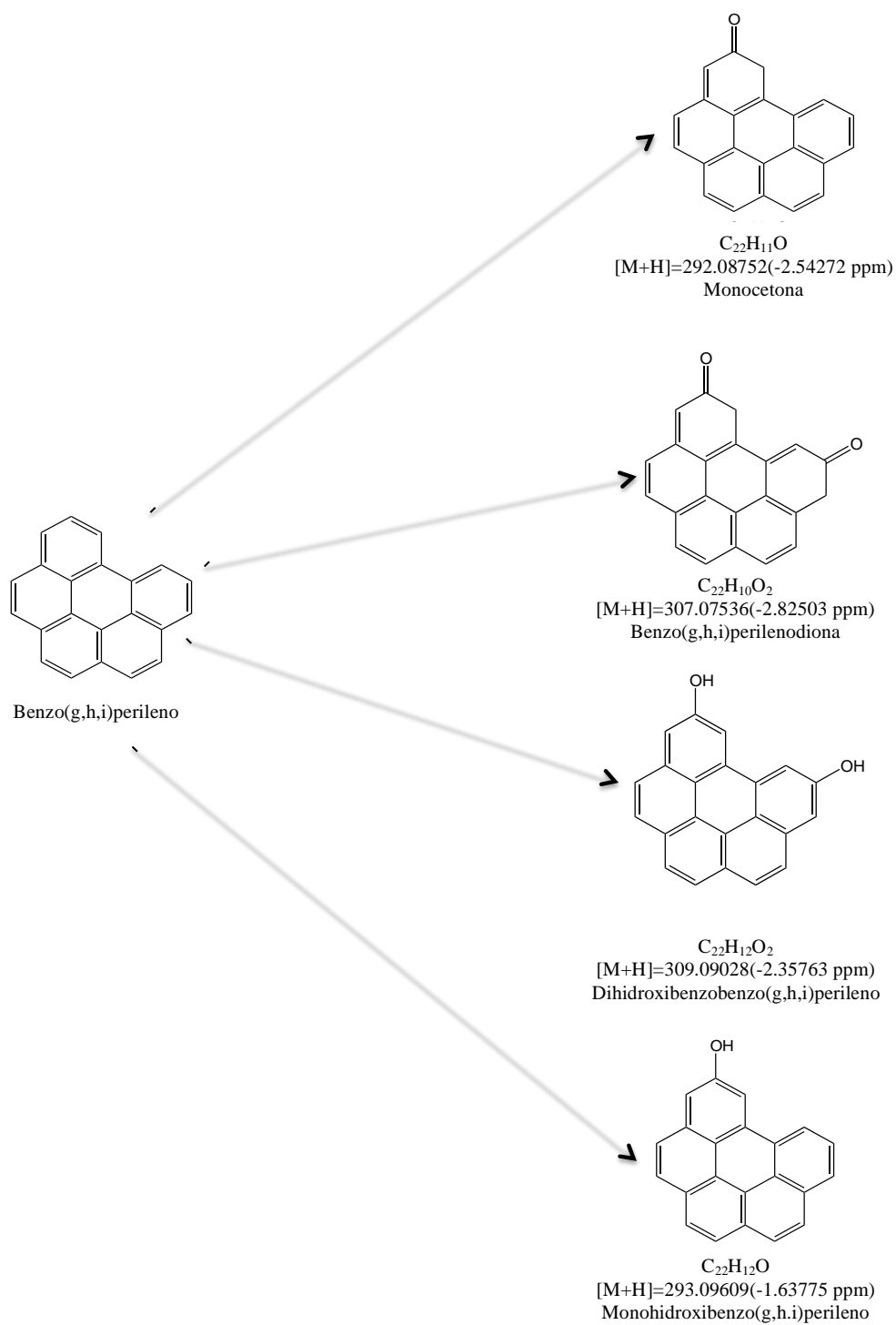


Figura 14. Productos del metabolismo del benzo (g,h,i) perileno, identificados después del crecimiento de *N. fischeri* mediante espectrometría de masas

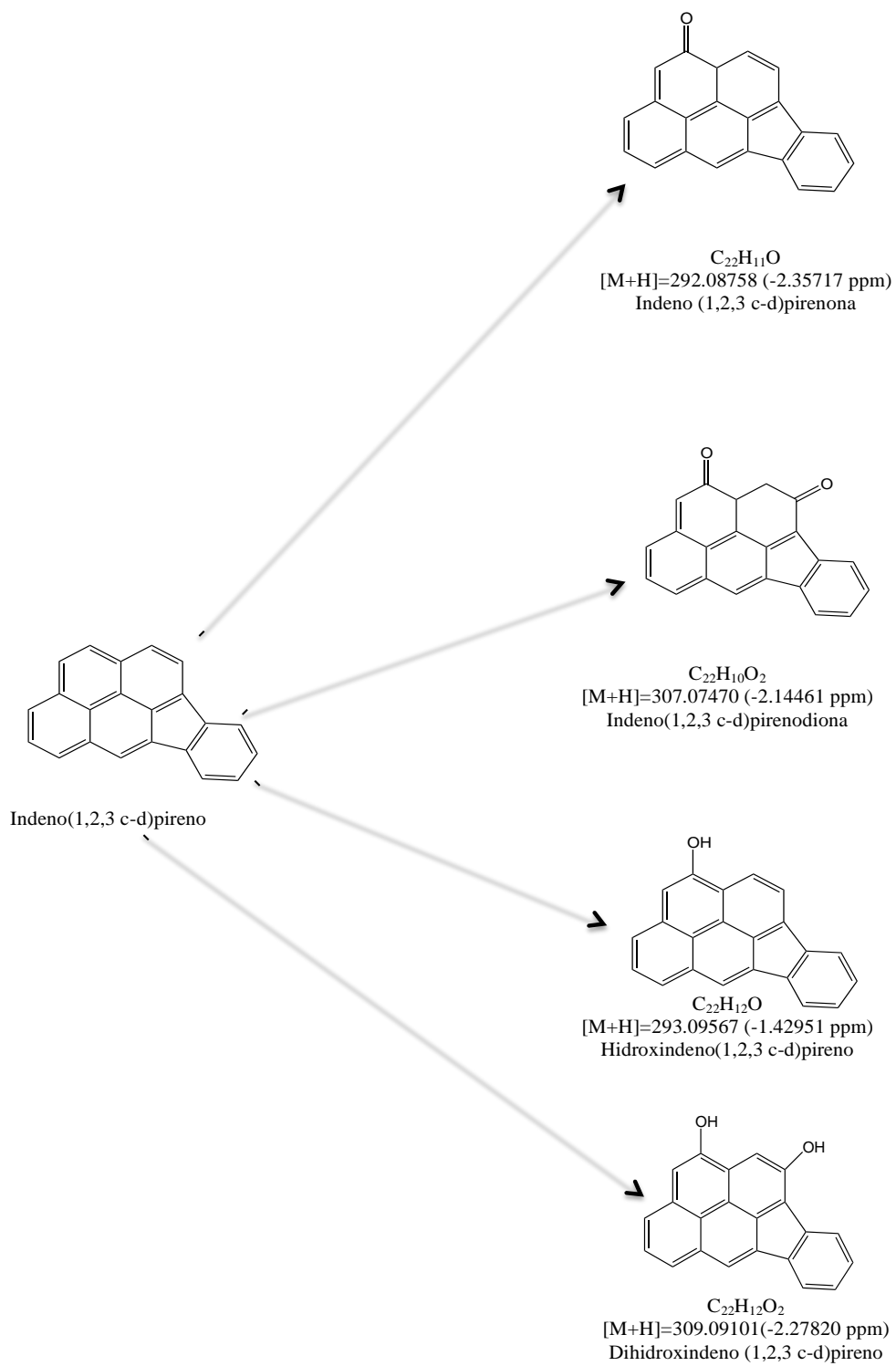


Figura 15. Productos del metabolismo del indeno (1,2,3 c-d) pireno, identificados después del crecimiento de *N. fischeri* mediante espectrometría de masas.

7.3. Análisis de microarreglos

7.3.1. Análisis global de todos los genes regulados positiva y negativamente en *N. fischeri* durante su crecimiento en asfaltenos como única fuente de carbono.

Durante el crecimiento de *N. fischeri* en asfaltenos de petróleo, muchos genes fueron regulados tanto positiva como negativamente. Por lo tanto, vale la pena mencionar que los microarreglos revelaron un número importante de genes que participan en varios procesos de la célula, y que nos dan una idea del estado fisiológico de la misma bajo las condiciones en las que fue evaluada.

De los 287 genes que fueron regulados positivamente, 111 pudieron ser anotados mediante blast2go y relacionados con alguna función en particular. En (Anexo 1) se muestran los 111 genes y los niveles de expresión, allí se incluyen todos los datos de expresión mayor a dos veces duplicado con respecto al control.

De igual manera en (Anexo 2) se presentan 29 genes de 118 que fueron regulados negativamente. Estos 29 genes corresponden a aquellos que pudieron ser anotados. El genoma de *N. fischeri* no se encuentra anotado en su totalidad, por esto se desconoce la función de muchas secuencias. Con las secuencias anotadas, se hizo una agrupación de acuerdo a su función; ésta organización permitió visualizar de manera global los diferentes cambios en la célula al crecer en un sustrato de difícil degradación como lo son los asfaltenos de petróleo.

La figura 16 representa la distribución de dichas secuencias agrupadas según su función. Se puede observar que los cambios principales se dieron en la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en procesos activados en condiciones de estrés. Dentro de este grupo se incluyeron aquellos relacionados con la señalización para la

degradación de proteínas, sistemas de ubiquitinación para proteínas mal plegadas y otros de choque térmico. Es importante tener en cuenta que las proteínas Hsps, responden tanto a condiciones de estrés como a otras condiciones biológicas. Algunas juegan papeles importantes en la morfogénesis y dimorfismo. Otras se expresan en condiciones de frío o calor, estrés osmótico y cambios de pH. Uno de los genes que se encontró sobre expresados fue la Hsp40, la cual ayuda en la reactivación y agregación de proteínas desnaturalizadas (81). La limitación nutricional en la que se encontraba el hongo, puede ser la principal causa del aumento en la expresión de este tipo de genes(82).

El aumento en la expresión de transportadores de membrana, denominados MFS por sus siglas en inglés (Major facilitator superfamily) y glutatión transferasas implicadas en la biogénesis de la pared celular, podrían estar relacionados con la adaptación a un compuesto externo o xenobiótico, que en algunos casos han sido estudiados en presencia de medicamentos o drogas, sin embargo en el caso de este estudio podrían sugerir alguna función relacionada con el transporte de hidrocarburos aromáticos (83).

No obstante la expresión de genes que tienen que ver con procesos de endocitosis, específicamente aquellos que codifican para proteínas transmembranales de cadenas ligeras de clatrina, sugiere la importancia de este mecanismo para la internalización de nutrientes a la célula, lo cual podría estar asociado con el posible mecanismo que usa este hongo para ingresar hidrocarburos a su interior. Es importante mencionar que se requieren de estudios más específicos que permitan identificar y proponer un mecanismo de internalización de moléculas aromáticas al interior de la hifa (83).

Algunas otras secuencias, que principalmente fueron identificadas con dominios tales como el dominio HORMA, podrían estar involucradas en procesos de autofagia o como respuesta a daños en el DNA como es el caso de RAD51 o similares. De igual forma

ciertos genes relacionados con procesos de señalización que inhiben el ciclo celular, se vieron regulados positivamente. Sin embargo con los datos presentados en este trabajo no se podría establecer de manera contundente la importancia de la regulación de estos genes en la condición evaluada, pues muchos de ellos aún no han sido caracterizados en *N. fischeri* (84). Este trabajo nos ha permitido establecer principalmente la importancia de este hongo en la transformación de compuestos aromáticos, ya que los diferentes resultados obtenidos lo afirman, sin embargo el entendimiento de la fisiología del hongo en estas condiciones de crecimiento es un tema aún por explorar.

Por otra parte algunos inhibidores de la transcripción fueron regulados positivamente, y la contraparte se ve reflejada en que algunos factores de transcripción fueron regulados negativamente de manera considerable, esto podría indicar que la célula inactiva algunos procesos para poder sobrevivir a las condiciones a las cuales fue sometida. Lo cual podría indicar una relación con la sobreexpresión de genes que codifican para proteínas que participan en procesos de señalización en respuesta a condiciones de nutrición y factores de crecimiento, indicando precisamente que la limitación nutricional desencadena una serie de eventos que pueden llevar a la célula a la muerte (85).

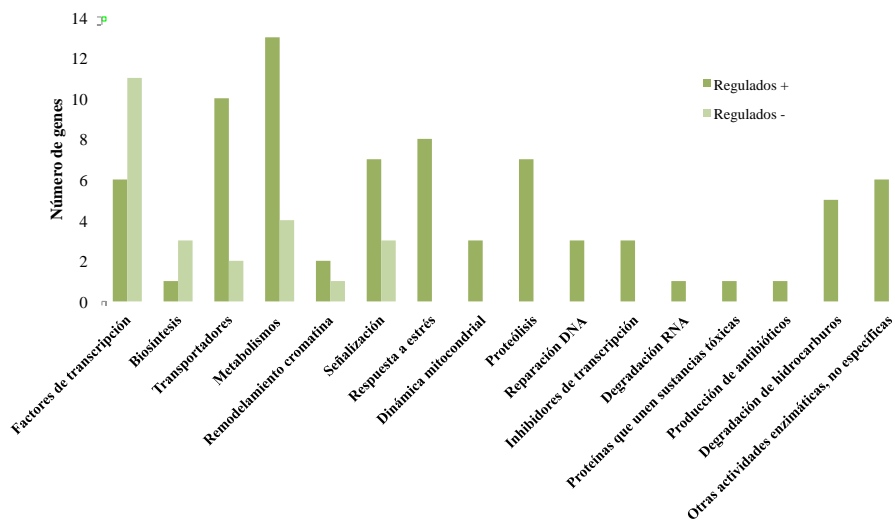


Figura 16. Distribución de secuencias según su función reguladas positiva y negativamente en *N. fischeri* cuando fue crecida en asfaltenos.

Aunque se requieren estudios particulares y más detallados para entender la fisiología de *N. fischeri* cuando crece en HPAs, se puede inferir que ante la limitación nutricional, y específicamente ante la ausencia de glucosa, el hongo aumenta la actividad enzimática relacionada con la gluconeogénesis, y por lo tanto el metabolismo de carbohidratos se ve regulado negativamente. En (Anexo 3) se resumen las rutas metabólicas que se afectaron positiva o negativamente en *N. fischeri*, siendo de gran importancia para este trabajo la presencia de rutas relacionadas con la oxidación de compuestos aromáticos con la participación de CIP450.

Como se puede observar los microarreglos son una herramienta útil para entender de manera global cambios diferenciales bajo una condición determinada con respecto a una condición control, sin embargo se necesitan de estudios particulares para cada grupo de genes o incluso de manera individual para poder establecer la importancia de ese gene dentro del proceso global.

7.3.2. Expresión de genes relacionados con actividad enzimática

Se hizo un análisis comparativo de expresión diferencial de genes en *N. fischeri* bajo dos condiciones de crecimiento, células crecidas en asfaltenos de petróleo o en glucosa como única fuente de carbono. Los resultados mostraron que 287 genes fueron regulados positivamente, cuando el hongo creció en asfaltenos y 118 fueron regulados negativamente. Los genes sobreexpresados mostraron una inducción de 2^2 y 2^7 veces, este mismo criterio fue usado para determinar genes regulados negativamente ($>4x$). Para determinar este valor de expresión se calculó el logaritmo en base dos de la razón de expresión de un mismo gene en las dos condiciones de crecimiento. Normalmente se utiliza un punto de corte arbitrario de un cambio de dos veces en la expresión del gene (86), sin embargo, en este estudio se consideró como una expresión diferencial, cuando el valor fue de 4 veces o más.

El uso de la herramienta Blast2GO permitió la asignación de función a cada uno de los genes (87). De los 287 genes regulados positivamente, 38 fueron identificados como enzimas, las cuales estuvieron distribuidas en todos los grupos de enzimas existentes (Figura 17). Es importante resaltar que de esas 38 secuencias, 14 fueron oxidoreductasas y dentro de estas 3 se identificaron como monooxigenasas tipo CIP450 y 1 como flavin monooxigenasa (FMO), las cuales podrían estar involucrados en la oxidación de los asfaltenos en *N. fischeri* (Tabla 2) (78).

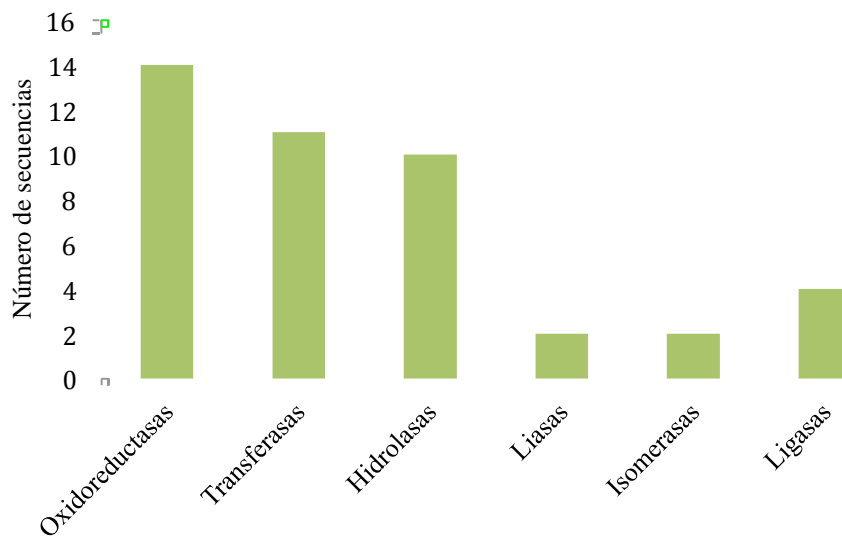


Figura 17. Distribución de las secuencias sobreexpresadas que corresponden a enzimas.

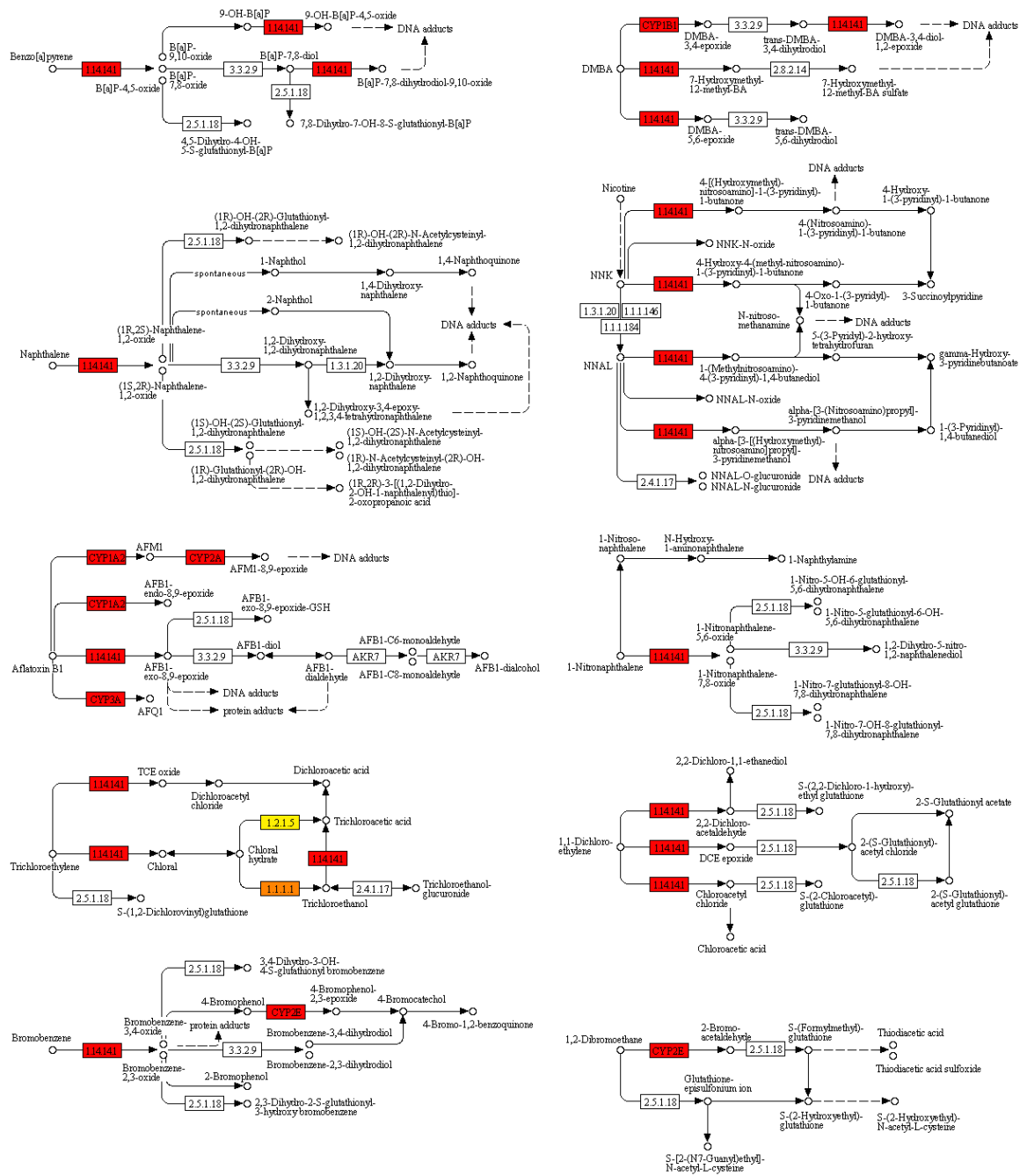
Los CIP450 con actividad monooxigenasa se refieren a una función mezclada de oxidasas, pertenecientes a una superfamilia de proteínas hemotiolatos que pueden catalizar una variedad de reacciones enzimáticas para transformar xenobióticos a derivados más polares y/o menos tóxicos (21, 88-90). En nuestro trabajo las secuencias pertenecientes a enzimas con actividad monooxigenasa fueron encajadas en rutas metabólicas que han sido descritas para algunos compuestos tales como benzo(a)pireno y naftaleno. Mediante el uso de los mapas KEEG y los datos de sobreexpresión se pudo observar la posible participación de estas enzimas en la primera oxidación de compuestos aromáticos. Las actividades enzimáticas en rojo corresponden a las que se vieron sobreexpresadas en los microarreglos de *N. fischeri* realizados en este trabajo (Figura 18). Vale la pena mencionar que los mapas KEEG se construyen con base a mapas universales de reacciones enzimáticas que ocurren en diferentes organismos; es por esto que esta base de datos puede relacionar una enzima individual en una vía al tener la secuencia del gen de esa enzima.

En el 2010 Syed y colaboradores (69) realizaron un microarreglo de los genes de CYP450 del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, y esto les permitió identificar 6 genes inducidos por HPAs. Los 6 genes fueron clonados y expresados en *Pichia pastoris* y se demostró actividad con variación en la especificidad hacia los sustratos HPAs de 3 a 5 anillos aromáticos (69). El mismo grupo demostró que el CYP63A2 clonado tenía la única capacidad catalítica de oxidar el HPA benzo(g,h,i)perileno de 6 anillos aromáticos (88). Los citocromos identificados en *N. fischeri* fueron comparados con los 6 genes de *P. Chrysosporium*, no se encontró similitud significativa entre las secuencias de nucleótidos y un bajo porcentaje de identidad (20-30%), fue encontrado entre las secuencias de aminoácidos de dichos genes.

Los 4 genes de *N. fischeri* correspondientes a enzimas con actividad monooxigenasa (Tabla 2), presentan porcentajes de identidad altos (97-80%) con secuencias de monooxigenasas pertenecientes a *Aspergillus fumigatus*. Con un porcentaje (70-50%) con otras especies de *Aspergillus* sp. y géneros de hongos como *Penicillium* sp. Sin embargo ninguna de estas secuencias han sido caracterizadas y evaluadas en la transformación de HPAs-APM o asfaltenos de petróleo.

El análisis de estas secuencias fue complementado con el uso de la herramienta I-TASSER, la cual es una plataforma unificada para predecir de manera automatizada la estructura y función de una proteína de la cual no se conocen dichos parámetros. Partiendo de

METABOLISM OF XENOBIOTICS BY CYTOCHROME P450



00980 12/1/11
© Kanehisa Laboratories

Figura 18. Mapas KEEG obtenidos después del análisis de las secuencias sobreexpresadas en *N. fischeri* cuando creció en asfaltenos como fuente de carbono. El diagrama representa algunos genes que corresponden a proteínas con actividad enzimática oxidorreductasa (marcadas en colores rojo, naranja y amarillo).

la secuencia de aminoácidos que se quiere analizar, se genera un modelo atómico 3D que viene de múltiples alineamientos y simulaciones de ensamblaje para generar una estructura y así poder inferir una función al comparar con estructuras de proteínas ya conocidas. Este análisis permitió identificar algunas similitudes de las 4 proteínas de *N. fischeri* con otras proteínas en cuanto estructura. Los resultados indicaron identidad con proteínas con actividad monooxigenasa pertenecientes a bacterias tales como *Bacillus megaterium*. Otras secuencias con las que se encontró identidad de plegamiento fue con citocromos humanos. Estas secuencias presentaron un TM-score de 0.5 a 0.7; este parámetro describe la diferencia absoluta entre el modelo y la estructura nativa y va de 0 a 1, donde 1 indica un perfecto acople entre las proteínas comparadas (91). Vale la pena mencionar que de igual manera ninguna de las proteínas con las que se encontró identidad han sido evaluadas en la transformación de HPAs-APM. Estos resultados demuestran una relación de las proteínas ya mencionadas, sin embargo se requiere de una caracterización in vitro para afirmar que poseen dicha actividad.

Tabla 2. Resultados obtenidos después de un análisis comparativo de expresión diferencial de genes en *N. fischeri*, bajo dos condiciones de crecimiento, asfaltenos o glucosa como fuente de carbono. La tabla presenta específicamente los genes de monooxigenasas, que se encontraron sobreexpresados en la condición de asfaltenos con respecto a glucosa.

Código EC	Nombre	Código CYP	ID	Glu	Asf	Asf/Glu	log base 2	Veces de cambio
1.14.13.8	Flavin monooxigenasa		NFIA_048080	720.7	15429	21.41	4.42	16
1.14.14.1	Alcano citocromo P450	CYP539D8	NFIA_054110	332.8	6553.3	19.69	4.30	16
1.14.14.1	NADPH citocromo P450	CYP505E1	NFIA_004540	316.5	2086.2	6.59	2.72	8
1.14.14.1	Citocromo P450	CYP547C2	NFIA_096320	615.1	13529.5	22.00	4.46	16

7.4. Transformación *in vitro* (fracción microsomal)

Se obtuvieron fracciones microsomales de *N. fischeri* crecido en dos medios diferentes, PDB (caldo papa dextrosa) y medio mínimo mineral Czapek, ambos suplementados con fenantreno. Los microsomas fueron evaluados para la oxidación de NADH en presencia de HPA-APM. La fracción microsomal obtenida del hongo crecido en Czapek fue capaz de oxidar NADH con una velocidad de 25 nmol $\mu\text{g prot}^{-1} \text{min}^{-1}$ en indeno (1,2,3 c-d)pireno, 20 nmol $\mu\text{g prot}^{-1} \text{min}^{-1}$ en coroneno y 6 nmol $\mu\text{g prot}^{-1} \text{min}^{-1}$ en benzo(g,h,i)perileno. Ninguna oxidación de NADH pudo ser detectada con los microsomas obtenidos del hongo crecido en medio PDB y en los controles sin la adición algún HPAs-APM. Los CIP450 requieren una molécula de oxígeno y dos electrones de NADH para transformar un compuesto, es por esto que la oxidación de NADH indica la pérdida de esos electrones necesarios para la actividad enzimática del CIP450. De esta manera estos resultados sugieren que en la presencia de HPAs como única fuente de carbono, los CIP450 son inducidos y es por esto que los microsomas presentan actividad en presencia de los HPAs.

Los microsomas o fracción microsomal hace referencia a un conjunto heterogéneo de vesículas que se forman a partir del retículo endoplásmico cuando las células se rompen. Estas vesículas se pueden aislar por centrifugación diferencial. Las células que no se rompen, los núcleos y las mitocondrias se sedimentan a 10.000 g, mientras que las enzimas solubles y el retículo endoplásmico fragmentado que contiene CIP450 permanecen en solución. La participación de los CIP450 en la oxidación de xenobióticos tales como benzo (a) pireno, dimetilnilina, hexobarbitol y p-nitroanisol fue evaluada y demostrada con fracciones microsomales de *Aspergillus fumigatus* (92).

Otros estudios demostraron la inducción de P450s en *P. chrysosporium* en respuesta a compuestos policíclicos aromáticos cuando crecieron en medios ricos con extracto de malta (93). Un aumento de 2 veces en el contenido microsomal de P450s fue observado en respuesta a 10 ppm de pireno (93).

Ning y colaboradores ((94)mostraron la inducción de enzimas del sistema P450 en *P. chrysosporium* en respuesta a la adición exógena de hidrocarburos más simples como ácido benzoico, ácido clorobenzoico y hexano. Los CIP450 fueron detectados únicamente en la presencia de un inductor (94).

El papel de los P450 en la degradación de xenobióticos ha sido demostrado de manera directa e indirecta, por diferentes grupos de investigación (9, 24-27, 50, 68, 69). Algunos estudios han empleado inhibidores de enzimas P450 y han observado la disminución o desaparición de la biodegradación de compuestos xenobióticos, en presencia de tales inhibidores como butóxido de piperonilo (PB) y 1-aminobenzotriazol (1-ABT) (95).

7.5. Estudios microscópicos

Es probable que la participación de los CIP450 en la transformación de los HPAs-APM y los asfaltenos requiera que haya una internalización del sustrato a la célula, ya que los CIP450 de hongos se encuentran en el retículo endoplásmico, por ende son proteínas intracelulares. Para estudiar este aspecto, se hicieron observaciones comparativas de las hifas crecidas en dos condiciones, asfaltenos y glucosa-peptona respectivamente. Aprovechando la propiedad de fluorescencia de los asfaltenos, ningún colorante fue usado para determinar la presencia de estos compuestos al interior de la célula. Las imágenes del confocal mostraron una intensa fluorescencia en las hifas crecidas en presencia de

asfaltenos, lo cual difiere de las crecidas en glucosa-peptona, que no presentaron fluorescencia alguna (Figura 19). El mismo fenómeno se observó en hifas crecidas en coroneno (Figura 20). Este hallazgo podría atribuirse la acumulación de compuestos aromáticos dentro de la célula. Adicional a esto, las hifas fueron teñidas con FM4-64 para membranas celulares, con BODIPY para cuerpos lipídicos, y con SYBR Green para los núcleos y las mitocondrias. De acuerdo a las imágenes del confocal, la fluorescencia de los asfaltenos no coincide con las membranas celulares o con cuerpos lipídicos.

El almacenamiento de HPAs dentro de la célula fue previamente observado en *Fusarium solani* (96). Sin embargo, en este caso la acumulación de benzo(a)pireno se vió en cuerpos lipídicos, lo cual fue confirmado después y se sugirió un mecanismo pasivo para la toma de los HPAs (96-98). Los autores observaron la misma fluorescencia azul observada en la Figura 18. Posteriormente, Fayeulle y colaboradores (99) también encontraron fluorescencia al interior de la hifa en presencia de benzo(a)pireno, y los cuerpos lipídicos detectados fueron denominados como sitios de almacenamiento de HPAs a nivel intracelular, pero a diferencia de los reportes previos, los autores demostraron un mecanismo de internalización dependiente de energía (100).

Los cultivos de *N. fischeri* en asfaltenos y en glucosa-peptona fueron además observados por microscopía de fuerza atómica (AFM) (Figura 21). Las hifas crecidas en glucosa-peptona mostraron ser más lisas que aquellas crecidas en asfaltenos como fuente de carbono, además de que se detectaron algunas protuberancias sobre la superficie de las hifas crecidas en asfaltenos. La rugosidad de las hifas fue determinada, encontrándose que aquellas crecidas en asfaltenos presentaron un promedio de rugosidad entre 22.932 nm comparado con 0.112 nm en las hifas crecidas en glucosa-peptona. También se encontraron diferencias de tamaño. Las hifas provenientes de glucosa-peptona eran de 10

μm de ancho, mientras que aquellas que venían de crecer sobre asfaltenos, median alrededor de 5 μm de ancho solamente. Wu y colaboradores (97) encontraron diferencias morfológicas en la superficie de una cepa de *Aspergillus* sp. BAP14 crecida en dos sustratos diferentes, glucosa y benzo(a)pireno, respectivamente (97).

De igual manera los autores observaron mediante AFM que la hifa crecida en glucosa era más lisa en comparación con aquella que creció en benzo(a)pireno, la cual presentaba grandes protuberancias, probablemente debido a la presencia vesículas lipídicas que fueron observadas en el microscopio de fluorescencia después de una tinción con Sudan III. Este fenómeno ya había sido reportado por Verdin en el 2005 para *Fusarium solani* con benzo(a)pireno (100).

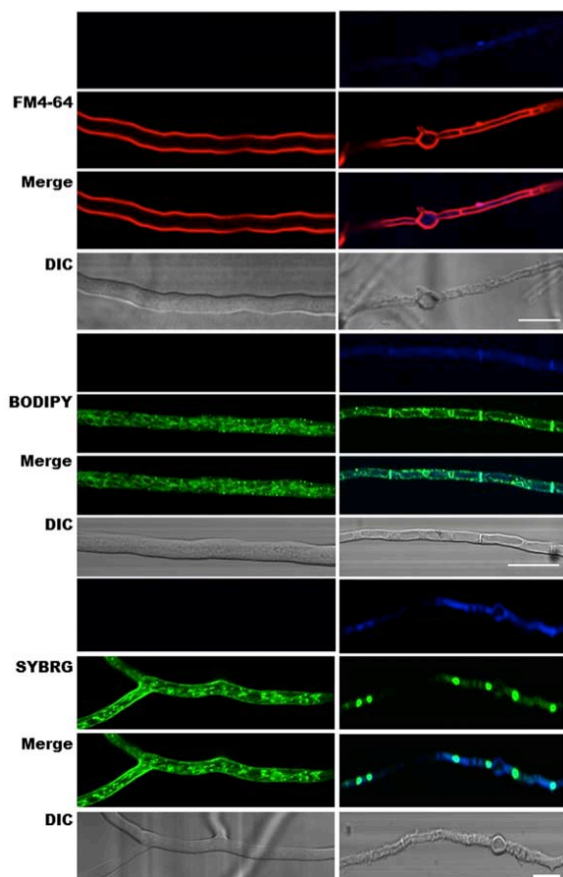


Figura 19. Microscopía confocal de las hifas de *N. fischeri* crecido en ausencia y presencia de asfaltenos, en donde se observan diferencias morfológicas y resalta la fluorescencia azul la cual está presente sólo en presencia de asfaltenos, lo que podría sugerir la posible internalización de dicho compuesto.

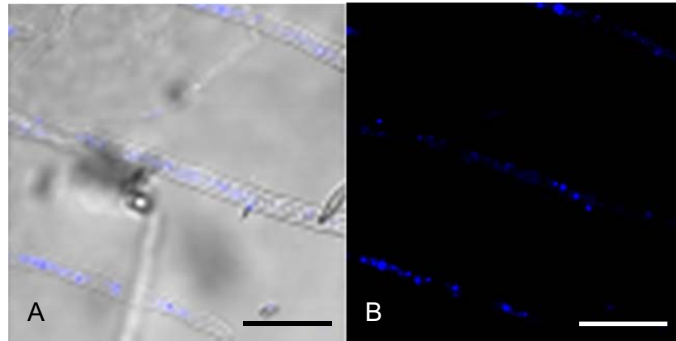


Figura 20. Imagen confocal de la localización intracelular. **A** Sobreposición de fluorescencia y contraste de interfase diferencial. **B.** Fluorescencia a 405 nm. Escala=10 μ .

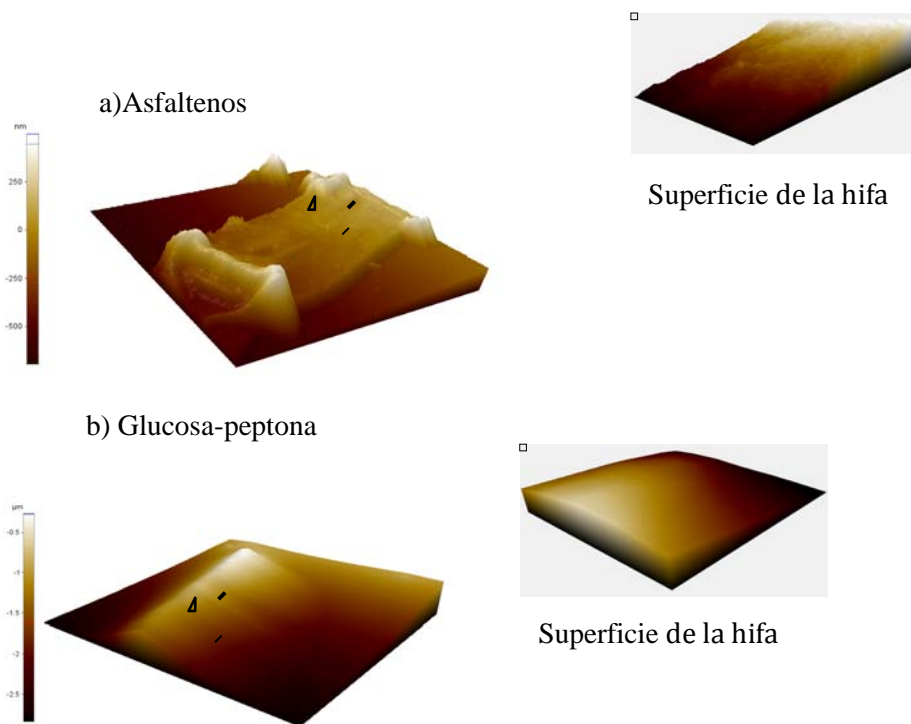


Figura 21. Microscopía de fuerza atómica tomada de las hifas de *N. fischeri*, crecidas en **a)**asfaltenos de petróleo y en **b)** glucosa- peptona respectivamente, como fuentes de carbono. Se tomó una gota de cada uno de los medios de cultivo y se depositó en laminas portaobjetos.

8. DISCUSION

N. fischeri es un hongo que previamente había sido reportado como capaz de crecer en asfaltenos de petróleo como única fuente de carbono; y se estimó que al menos el 15.5% de los asfaltenos fue mineralizado a CO₂ (2). Pocos microorganismos han demostrado la habilidad de transformar asfaltenos y HPAs-APM. Esto se debe a que la recalcitrancia de estos compuestos es directamente proporcional a su peso molecular, por ende entre mayor sea su peso son menos solubles en agua y menos biodisponibles; lo que conlleva a que pocos microorganismos, incluyendo bacterias y hongos pueden metabolizarlos.

La biodegradación de asfaltenos específicamente ha sido recientemente revisada y se sabe que existen pocos estudios contundentes sobre microorganismos capaces de metabolizar asfaltenos de petróleo (30). La composición de los asfaltenos incluye aproximadamente 7 anillos aromáticos o más, y por su parte los HPAs-APM incluyen todos aquellos compuestos hidrocarbonados con mas de 4 anillos; es por esto que tanto asfaltenos como HPAs-APM son recalcitrantes al ataque microbiano, y de ahí que la mayoría de los estudios sobre biodegradación de hidrocarburos aromáticos se han realizado con HPAs-BPM (58). El benzo(a)pireno es uno de los pocos HPAs-APM que ha sido ampliamente evaluado; con 5 anillos aromáticos, este compuesto ha podido ser metabolizado por algunos microorganismos, tanto bacterias como hongos (48, 96, 99, 100). En nuestro trabajo se evaluaron tres HPAs-APM de más de 5 anillos aromáticos, dos de 6 y uno de 7 anillos. *N. fischeri* el cual es un hongo no-ligninolítico fue capaz de metabolizar los tres; coroneno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)perileno. Otros hongos no-ligninolíticos como *Cunninghamella elegans* han sido reportados como capaces de degradar HPAs de 2 a 5 anillos aromáticos (101-103), y *Fusarium solani* y una cepa de *Aspergillus* sp.

metabolizaron benzo(a)pireno (96, 98, 99). Otros hongos basidiomicetos ligninolíticos como *Kuehneromyces mutabilis* y *Stropharia rugoso-annulata*, y el ascomiceto no ligninolítico *Morchella conica* fueron reportados como capaces de degradar coroneno, sin embargo, en estos estudios no se llevo a cabo la caracterización los productos (104). El benzo(g,h,i)perileno pudo ser degradado por *P. ostreatus* pero en cultivos con paja de trigo, es decir que el aromático no era la única fuente de carbono (105). De igual manera en presencia de Tween 80 *Stropharia coronilla* pudo oxidar al benzo(g,h,i)perileno y al indeno (1,2,3-cd)pireno (106). Recientemente, una cepa bacteriana aislada de suelo contaminado con HPAs, fue identificada como *Kocuria rosea*. Esta cepa demostró ser capaz de degradar HPAs-APM, tales como fluoreno en un 83.2%, fluoranteno en un 76.5% e indeno(1,2,3-cd)pireno con 59.6% (48). Aunque es evidente que si hay una actividad importante de la bacteria, el uso de extracto de levadura en el medio de cultivo nos indica que no usa solamente los HPAs como fuente de carbono y energía. Una de las ventajas de *N. fischeri* es poder crecer en HPAs-APM como única fuente de carbono y energía, ya que la mayoría de los hongos requieren de una co-metabolización para poder degradar ciertos contaminantes (48).

Los análisis de IR y espectrometría de masas (Figuras 12-15), claramente mostraron la presencia de compuestos hidroxilados, producidos durante el metabolismo de *N. fischeri* sobre los HPAs-APM. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en otros HPAs-APM y con otros hongos no ligninolíticos como por ejemplo, *C. elegans* transformó fluoranteno a varios metabolitos los cuales incluyen trans-2,3-dihidrodiol, 9-hidroxi y 8 hidroxi-trans-2,3-dihidrodiol y 3-hidroxifluoranteno (102, 103, 107). La incorporación de oxígeno antes del rompimiento del anillo aromático involucra la participación de oxigenasas. Dos mecanismos han sido propuestos para llevar a cabo este proceso

enzimático en los microorganismos; uno de ellos involucra las dioxigenasas, el cual es usado principalmente por las bacterias, y el otro es de las monooxigenasas usado por los hongos. Varios sistemas enzimáticos podrían estar involucrados en el metabolismo de los HPAs por parte de los hongos, y esto incluye citocromos P450 a nivel intracelular y enzimas extracelulares como la lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa. La transformación inicial de los HPAs por hongos no basidiomicetos resulta en la producción de dihidrodioles, fenoles, quinonas y epóxidos dihidrodioles (48, 49, 67, 108). Este tipo de compuestos fueron encontrados en el metabolismo de los HPAs-APM evaluados con *N. fischeri* (Figuras 13-15).

De los microorganismos que se han reportado como capaces de degradar HPAs-APM de mas de 5 anillos, poco se sabe de los productos generados durante el metabolismo. Juhasz y colaboradores (57) reportaron tres cepas de la bacteria *Pseudomonas cepacia*, capaces de degradar HPAs-APM, como el benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno y coroneno. El porcentaje de degradación fue de entre 20 y 30% para benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno, y para el coroneno fue entre un 65 a 70 % con las tres cepas (40). Sin embargo, no se hizo alguna caracterización de los productos del metabolismo. En nuestro trabajo se encontraron compuestos oxidados derivados del metabolismo del hongo sobre el coroneno, los cuales fueron caracterizados, al igual que los productos de la degradación del benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd) pireno (Figuras 13-15). La caracterización de estos permite inferir el tipo de actividad enzimática responsable de la transformación. *N. fischeri* es un hongo no-ligninolítico, no produce peroxidases extracelulares y solamente una muy baja actividad tipo lacasa fue detectada (2). Por el tipo de productos encontrados durante el metabolismo del hongo, nuestro trabajo sugirió la participación de enzimas CIP450 en la primera oxidación de los HPAs-APM, ya que estas

enzimas pueden hidroxilar compuestos aromáticos. Esta sugerencia fue apoyada con un análisis de microarreglos, el cual mostró tres genes CIP450 monooxigenasas y un gene de una FMO regulados positivamente, cuando el hongo creció en asfaltenos como única fuente de carbono. Además, preparaciones microsomales obtenidas del hongo cultivado en medio mínimo con HPAs, oxidaron NADH en presencia de los tres HPAs-APM respectivamente. Ninguna actividad fue encontrada en los microsomas obtenidos de los cultivos sin HPAs, sugiriendo que hay una inducción específica de CIP450 por la presencia de HPAs. Otros hongos filamentosos como *Aspergillus ochraceus* TS, han demostrado la presencia de una actividad microsomal tipo CIP450 inducible, la cual cataliza la hidroxilación de esteroides e hidrocarburos como el benzo(a)pireno muy eficientemente (109). Preparaciones microsomales de *C. elegans* presentaron actividad CIP450 monooxigenasa al hidroxilar una variedad de aromáticos (110). También se demostró que *P. ostreatus* oxida estereoselectivamente al fenantreno mediante una actividad microsomal monooxigenasa tipo CIP450 (111).

La participación de CIP450 ha sido reportada en el metabolismo de dioxinas, disruptores endocrinos, pesticidas y HPAs (9, 24-27). Este tipo de actividad CIP450 es usada por los hongos no ligninolíticos para oxidar estos compuestos xenobióticos. Algunos de estos hongos, los cuales incluyen zigomicetos, ascomicetos, hifomicetos y otros, pueden degradar HPAs (9). En especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cunninghamella*, la transformación inicial de HPAs involucra la participación de un CIP450 con actividad monooxigenasa y O₂ para producir un óxido de arena y agua (50). Por ejemplo, *Aspergillus terreus* oxidó el pireno a 1-pirenil sulfato y benzo(a)pireno a benzo(a)pirenil sulfato mediante la actividad monooxigenasa del CIP450 y la conjugación con sulfatos (51, 52). Por su parte los hongos ligninolíticos que incluyen especies tales como *Phanerochaete*,

Pleurotus, y *Trametes* pueden producir CIP450 que participan en la oxidación inicial de HPAs (24). De igual manera que en nuestro trabajo, otros estudios han demostrado la participación de CIP450 mediante la expresión diferencial de genes que codifican para estas enzimas. En *Phanerochaete chrysosporium* fueron identificados tres genes de CIP450 (CYP63A1, A2 y A3) como posibles enzimas involucradas en la primera oxidación tanto de HPAs-BPM como de HPAs-APM (86, 112). En este trabajo se han identificado tres CIP450 monooxigenasas y una FMO, los cuales podrían estar involucrados en la oxidación de asfaltenos (Tabla 2). Estas monooxigenasas mostraron una inducción (entre 8 y 16 veces) cuando el hongo fue cultivado en la presencia de asfaltenos. Syed y colaboradores (69) identificaron 6 genes de CIP450 inducidos por HPAs, tales como naftaleno, fenantreno, pireno y benzo (a) pireno. Las secuencias de aminoácidos de estos 6 genes presentaron baja homología entre 20% y 30% con los encontrados en *N. fischeri*. En secuencias de nucleótidos no se encontró una similaridad significativa. No obstante, los 4 genes de *N. fischeri* correspondientes a enzimas con actividad monooxigenasa (Tabla 2), presentaron porcentajes de identidad altos (97-80%) con secuencias de monooxigenasas pertenecientes a *Aspergillus fumigatus*, lo cual era de esperarse ya que *N. fischeri* se encuentra estrechamente relacionado con este hongo, sólo difieren en un 10% de su genoma, sin embargo ninguna de estas secuencias han sido caracterizadas y evaluadas en la transformación de HPAs-APM o asfaltenos de petróleo

Otros estudios más específicos han demostrado el papel de CYP63A2 de *P. chrysosporium* sobre la transformación de benzo(g,h,i)perileno, el cual evidenció una especificidad para HPAs-APM (113). La inducción de CIP450 por diversos HPAs de bajo y mediano peso molecular ya ha sido reportada durante la actividad biodegradadora de diferentes microorganismos (114). Además, la participación de CIP450 en la

transformación de HPAs ha sido descrita en hongos que carecen de enzimas extracelulares con actividad oxidoreductasa (9). Recientemente, una cepa de *Pestalotiopsis* sp. NG007 fue evaluada en su habilidad para biodegradar hidrocarburos de petróleo, y algunos de los productos generados tales como alcoholes grasos, aldehídos grasos y ácidos grasos (mono y di-carboxílicos) sugieren la participación de enzimas P450 (41).

Por su parte, las flavin monooxigenasas (FMOs) son una familia de enzimas dependientes de NADPH y oxígeno que fácilmente N-y S-oxigenan una diversidad de xenobioticos y ciertas aminos endogenas. Cada isoforma se expresa específicamente por especie y tejido, pero la especificidad de sustrato se sobrelapa con otras FMOs y con CIP450 (115). El basidiomiceto *P. chrysosporium* fue investigado en su respuesta celular contra vanilina. De acuerdo a un ensayo de proteómica, se demostró que dos FMOs (PcFMO1 y PcFMO2) son reguladas positivamente en respuesta a la adición exógena de vanilina. PcFMO1 fue clonada y heterológamente expresada en *E. coli* para elucidar sus funciones catalíticas. La bacteria clonada mostró actividad contra fenoles monocíclicos tales como fenol y 4-clorofenol. Interesantemente, el producto de la hidroquinona fue identificado como 1,2,4-trihidroxibenceno, un importante intermediario en la ruta metabólica de compuestos aromáticos en el cual el anillo aromático puede romperse adicionalmente por oxigenasas de hongos para su posterior mineralización. Los autores sugieren que la ruta de rompimiento orto de compuestos fenólicos probablemente esté asociada con PcFMO1 (116).

De esta forma se puede ver que varios estudios se han enfocado en tratar de demostrar que las enzimas P450 pueden ser utilizadas como un sistema alternativo en la degradación de xenobióticos; algunos de los trabajos se dirigen sobre la identificación del tipo de metabolitos y otros proveen evidencia directa sobre el papel de los CIP450,

cuantificando su expresión a nivel genético (88). En este trabajo la caracterización de los metabolitos, la expresión diferencial de los genes de monooxigenasas y la actividad microsomal sugieren la participación de estas proteínas en la oxidación de HPAs-APM.

El papel de los CIP450 ha sido, además, estudiado de manera directa mediante ensayos de inhibición, usando inhibidores de CIP450. Principalmente se han usados dos; butóxido de piperonilo (PB) (90) y 1-aminoaminobenzotriazol (1-ABT) (117). Durante el metabolismo del fenantreno en *P.chryso sporium* se usó butóxido de piperonilo, el cual pudo inhibir significativamente la transformación de fenantreno a trans-9,10-dihidrodiol indicando el papel importante que cumplen los CIP450 al catalizar la oxidación inicial en el metabolismo de los HPAs (118).

Como se ha venido discutiendo, la participación de los CIP450 en la oxidación de compuestos xenobióticos, ha sido ampliamente demostrada en trabajos anteriores y en este trabajo. La participación de los CIP450 implica un metabolismo intracelular, debido a la localización intracelular de estas proteínas. Es por esto que tomando ventaja de la fluorescencia intrínseca de los asfaltenos, se realizó microscopia confocal (Figura 19 y 20) de las hifas del hongo *N. fischeri*. Se observó una intensa fluorescencia en la hifa del hongo cuando este creció en asfaltenos, la cual estuvo ausente en aquellas hifas crecidas en glucosa-peptona. Este hallazgo sugirió una internalización de los asfaltenos por parte del hongo. Resultados similares fueron encontrados por Verdin y colaboradores (96), quienes observaron la misma fluorescencia azul en *F. solani* cuando lo crecieron en benzo(a)pireno, y propusieron un mecanismo pasivo para la entrada del compuesto a la célula fúngica (96). Fayeulle y colaboradores (99) determinaron la fluorescencia al interior de la hifa en vesículas lipídicas en la presencia de benzo(a)pireno, sugiriendo a estas como sitios de almacenamiento y además propusieron un mecanismo dependiente de energía para la

entrada de HPAs al interior de la célula (99). En este trabajo, no se encontraron vesículas que indicaran sitios de almacenamiento, sin embargo, es evidente que la hifa en su interior presenta una acumulación de compuestos aromáticos.

9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De esta manera, con los resultados obtenidos se puede concluir que *N. fischeri* es capaz de crecer en medios que contienen HPAs-APM (6 y 7 anillos) como única fuente de carbono y energía, esto constituye el primer reporte para este hongo en su habilidad para degradar este tipo de compuestos. Los metabolitos producidos durante la biodegradación incluyeron hidroxilos y derivados cetónicos, lo cual sugiere la participación de oxidorreductasas. Además de la naturaleza química de los productos metabólicos, las preparaciones microsomales provenientes de los cultivos crecidos en medio mínimo con HPAs como única fuente de carbono, mostraron ser activas al oxidar NADH en presencia de HPAs de alto peso molecular, y la identificación de al menos 3 genes de CIP450 que fueron regulados positivamente en presencia de asfaltenos, apoyan la hipótesis planteada en este trabajo. Sin embargo una de las perspectivas importantes para continuar con este estudio es realizar la caracterización de los CIP450 de *N. fischeri*, lo cual permitiría identificar las propiedades catalíticas únicas de dichas enzimas y su potencial uso en la oxidación de compuestos recalcitrantes. Por otra parte, la participación de los CIP450 en la oxidación de asfaltenos y HPAs-APM podría ser estudiada más a fondo mediante la interferencia de los genes propuestos en este trabajo, para determinar su papel crucial en la transformación de estos compuestos. Por otra lado el análisis de otras actividades enzimáticas podrían llevar a establecer más adelante una posible ruta metabólica para la degradación de los asfaltenos y HPAs-APM.

Este trabajo permitió evaluar la posible internalización mediante microscopía confocal de sustratos altamente hidrofóbicos a la célula fúngica, lo que apoya aún más la participación de proteínas intracelulares como lo son los CIP450. En este sentido, se abre un panorama interesante en el estudio de los mecanismos de transporte que pudiera estar usando *N.*

fischeri para poder internalizar estos compuestos. De esta forma, podrían realizarse estudios que permitan establecer si se trata de un mecanismo pasivo o dependiente de energía, además de que también se podría medir los niveles de transcritos relacionados con proteínas de transporte.

10. BIBLIOGRAFIA

1. **Juhász AL, 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**:57-88.
2. **Uribe-Alvarez C, Ayala M, Perezgasga L, Naranjo L, Urbina H, Vazquez-Duhalt R.** 2011. First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology* **4**:663-672.
3. **Werck-Reichhart D, Feyereisen R.** 2000. Cytochromes P450: a succes story. *Genome Biology* **1**:3003.3001-3003.3009.
4. **Speight JG.** 1998. The chemistry and technology of petroleum, James G. Speight ed. Marcel Dekker, Inc, New York-Basel.
5. **Sheu EY.** 1998. Self-association of asphaltenes, p 115-144, Structures and dynamics of asphaltenes, Oliver C. Mullins, Eric Y. Sheu ed. Plenum New York.
6. **Speight JG.** 1999. Refining heavy feedstocks, p 641-678. *In* Heinemann H (ed), The chemistry and technology of petroleum, Third edition ed. Marcel Dekker, Inc.
7. **Strausz O, Mojelsky T, Lown E.** 1992. The molecular structure of asphaltene: an unfolding story. *Fuel* **71**:1355-1363.
8. **Groenzin H, Mullins OC.** 1999. Asphaltene molecular size and structure. *The Journal of Physical Chemistry A* **103**:11237-11245.
9. **Cerniglia C, Sutherland J.** 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi, p 2079-2110. *In* Timmis K (ed), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology doi:10.1007/978-3-540-77587-4_151. Springer Berlin Heidelberg.
10. **Sims R, Overcash M.** 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs in soil plant systems). *Residue Reviews* **88**:1-68.
11. **Lijinsky W.** 1991. The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food. *Mutation Research* **259**:251-262.
12. **Mersch-Sundermann V, Mochayedi S, Kevekordes S.** 1992. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Escherichia coli* PQ37. *Mutation Research* **278**:1-9.
13. **Nylund L, Heikkla P, Hameila M, Pyy L, Linnainmaa K, Sorsa M.** 1992. Genotoxicity effects and chemical composition of four creosotes. *Mutation Research* **265**:223-236.
14. **Philips D.** 1983. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature* **303**:472-486.
15. **Kanally RA, Harayama S.** 2010. Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Microbial Biotechnology* **3**:136-164.
16. **Chauhan A, Jain RK.** 2010. Biodegradation: gaining insight through proteomics. *Biodegradation* **21**:861-879.
17. **Margesin R, Schinener F.** 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied and Environmental Microbiology* **56**:650-663.

18. **Colwell R, Walker J, Cooney J.** 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Critical Reviews in Microbiology* **5**:423-445.
19. **Walker J, Colwell R, Petrakis L.** 1976. Biodegradation rates of components of petroleum *Can J Microbiology* **22**:1209-1213.
20. **Bertrand J, Rambeloarisoa E, Rontani J, Giusti G, Mattei G.** 1983. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnology Letters* **5**:567-572.
21. **Sono M, Roach M, Coulter E, Dawson J.** 1996. Heme-containing oxygenases. *Chemical Reviews* **96**:2841-2888.
22. **Nelson DR.** 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369**:1-10.
23. **Črešnar B, Petrič S.** 2011. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta* **1814**:29-35.
24. **Masaphy S, Levanon D, Henis Y, Venkateswarlu K, Kelly SL.** 1996. Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a) pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiology Letters* **135**:51-55.
25. **Jauregui J, Valderrama B, Albores A, Vazquez-Duhalt R.** 2003. Microsomal Transformation of Organophosphorus Pesticides by White Rot Fungi. *Biodegradation* **14**:397-406.
26. **Subramanian V, Yadav JS.** 2009. Role of P450 Monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:5570-5580.
27. **Kasai N, Ikushiro S-i, Shinkyō R, Yasuda K, Hirosue S, Arisawa A, Ichinose H, Wariishi H, Sakaki T.** 2010. Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:773-780.
28. **Rontani J, Bossier-Joulak F, Rambeloarisoa E, Bertrand J, Giusti G, Faure R.** 1985. Analytical study of Asthart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere* **14**:1413-1422.
29. **Lacotte D, Mille G, Acquaviva M, Bertrand J.** 1996. Arabian light asphaltene biotransformation with n-alkanes as co-substrates. *Chemosphere* **32**:1755-1761.
30. **Hernández-López EL, Ayala M, Vazquez-Duhalt R.** 2015. Microbial and enzymatic biotransformations of asphaltenes. *Petroleum Science and Technology* **33**:1017-1029.
31. **Das N, Chandran P.** 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International* **2011**:1-13.
32. **Leahly J, Colwell R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* **54**:305-315.
33. **Brenner K, You L, Arnold F.** 2008. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in Biotechnology* **26**:483-489.
34. **Pendryś JP.** 1989. Biodegradation of asphalt cement-20 by aerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:1357-1362.

35. **Pineda-Flores G, Boll-Argüello G, Lira-Galeana C, Mesta-Howard AM.** 2004. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation* **15**:145-151.
36. **Jahromi H, Fazaelpoor MH, Ayatollahi SH, Niazi A.** 2014. Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel* **117**:230-225.
37. **Ali HR, El-Gendy NS, Moustafa YM, Mohamed I, Roushdy MI, Hashem AI.** 2012. Degradation of asphaltenic fraction by locally isolated halotolerant bacterial strains. *ISRN Soil Science* **ID 435485**.
38. **Hofrichter M, Bublitz F, Fritsche W.** 1997. Fungal attack on coal: I. Modification of hard coal by fungi. *Fuel Processing Technology* **52**:43-53.
39. **Fedorova ND, Khaldi N, Joardar VS, Maiti R, Amedeo P, Anderson MJ, Crabtree J, Silva JC, Badger JH, Albarraq A.** 2008. Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Plos Genetics* **4**:1-13.
40. **Fedorova ND, Nierman WC.** 2010. Comparative genomics of *Aspergilli*. In Machida M, Gomi K (ed), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press, Great Britain.
41. **Yanto D, Tachibana S.** 2013. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. *International Biodeterioration & Biodegradation* **85**:438-450.
42. **Fedorak PM, Semple KM, Vazquez-Duhalt R, Donald WS.** 1993. Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme and Microbial Technology* **15**:429-437.
43. **Mogollón R, Rodríguez W, Larrota C, Ortiz R.** 1998. Biocatalytic removal of nickel and vanadium from petroporphyrins and asphaltenes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **70-72**:765-777.
44. **Ayala M, Hernández-López EL, Perezgasga L, Vazquez-Duhalt R.** 2012. Reduced coke formation and aromaticity due to chloroperoxidase-catalyzed transformation of asphaltenes from Maya crude oil. *Fuel* **92**:245-249.
45. **Tinoco R, Vazquez-Duhalt R.** 1998. Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme and Microbial Technology* **22**:8-12.
46. **García-Arellano H, Buenrostro González E, Vazquez Duhalt R.** 2004. Biocatalytic transformation of petroporphyrins by chemical modified cytochrome c. *Biotechnology and Bioengineering* **85**:790-798.
47. **Cerniglia CE.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**:351-368.
48. **Cerniglia CE.** 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**:324-333.
49. **Haritash AK, Kaushik CP.** 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**:1-15.
50. **Cerniglia C, Sutherland J.** 2001. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi, p 136-187. In Gadd GM (ed), *Fungi in bioremediation*. University Press, Cambridge, UK.
51. **Capotorti G, Gesti P, Lombardi A, Guglielmetti G.** 2005. Formation of sulfate conjugates metabolites in the degradation of phenanthrene, anthracene, pyrene and

- benzo(a)pyrene by the ascomycete *Aspergillus terreus*. Polycyclic Aromatic Compounds **25**:197-213.
52. **Capotorti G, Digianvincenzo P, Cesti P, Bernardi A, Guglielmetti G.** 2004. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. Biodegradation **15**:79-85.
 53. **Zang S-Y, Li P-J, Yu X-C, Shi K, Zhang H.** 2007. Degradation of metabolites of benzo (a) pyrene by coupling *Penicillium chrysogenum* with KMnO₄. Journal of Environmental Sciences **19**:238-243.
 54. **Rafin C, Potin O, Veignie E, Lounes-Hadj AS, Sancholle M.** 2000. Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. Polycyclic Aromatic Compounds **21**:311-329.
 55. **Veignie E, Rafin C, Woisel P, Lounès-Hadj Sahraoui A, Cazier F.** 2002. Metabolización of the polycyclic aromatic hydrocarbons benzo(a)pyrene by a non-white rot fungus (*Fusarium solani*) in a batch reactor. Polycyclic Aromatic Compounds **22**:87-97.
 56. **Chulalaksananukul S, Gadd GM, Sangvanich P, Sihanonth P, Piapukiew J, Vangnai AS.** 2006. Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. FEMS Microbiology Letters **262**:99-106.
 57. **Juhasz AL, Britz ML, Stanley GA.** 1996. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. Biotechnology Letters **18**:577-582.
 58. **Juhasz AL, Stanley GA, Britz ML.** 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,300. Letters in Applied Microbiology **30**:396-401.
 59. **Boonchan S, Britz ML, Stanley GA.** 2000. Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures. Applied and Environmental Microbiology **66**:1007-1019.
 60. **Luo L, Wang P, Lin L, Luan T, Ke L, Yee Tam NF.** 2014. Removal and transformation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in water by live and dead microalgae. Process Biochemistry **49**:1723-1732.
 61. **Gogou A, Stratigakis N, Kanakidou M, Stephanou EG.** 1996. Organic aerosols in eastern mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories. Organic Geochemistry **25**:79-96.
 62. **Perraudin E, Budzinski H, Villenave E.** 2007. Kinetic study of reactions of ozone with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on atmospheric model particles. Journal of Atmospheric Chemistry **56**:57-82.
 63. **Nadal M, Wargent JJ, Jones KC, Paul ND, Schumacher M, Domingo JL.** 2006. Influence of UV-B radiation and temperature on photodegradation of PAHs: preliminary results. Journal of Atmospheric Chemistry **55**:241-252.
 64. **Blumer M.** 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. Scientific American **234**:35-45.
 65. **Guang-Dong S, Jing-Hua J, Yang X, Zhi-Ping Z, Ying L, Zhi-Pei L.** 2014. Isolation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading strain and its enhancing the removal of HMW-PAHs from heavily contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation **90**:23-28.

66. **Harms H, Schlosser D, Wick LY.** 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology* **9**:177-192.
67. **Vazquez-Duhalt R.** 1998. Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons, p 183-207. *In* Galindo E, Ramirez OT (ed), *Advances in bioprocess engineering II*. Kluwer Academic Publisher, Amsterdam.
68. **Cerniglia CE.** 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**:324-333.
69. **Syed K, Doddapaneni H, Subramanian V, Lam YW, Yadav JS.** 2010. Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **399**:492-497.
70. **Datta D, Samanta TB.** 1988. Effect of inducers on metabolism of benzo(a)pyrene in vivo and in vitro: analysis by high pressure liquid chromatography. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **155**:493-502.
71. **Barclay CD, Farquhar GF, Legge RL.** 1995. Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **42**:958-963.
72. **Bumpus JA.** 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:154-158.
73. **Bumpus J, Tien M, Wright D, Aust S.** 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* **228**:1434-1436.
74. **Haemmerli S, Leisola M, Sanglard D, Fiechter A.** 1986. Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*: veratryl alcohol and stability of ligninase. *The Journal of Biological Chemistry* **6900**-6903.
75. **Hammel K.** 1995. Mechanism for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi. *Environmental Health Perspectives* **103 (Suppl. 5)**:41-43.
76. **Masaphy S, Lamb D, Kelly S.** 1999. Purification and characterization of a benzo(a)pyrene hydroxylase from *Pleurotus pulmonaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **226**:326-329.
77. **Barajas-Aceves M, Hassan M, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R.** 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods* **50**:227-236.
78. **Hernández-López EL, Ramírez-Puebla ST, Vazquez-Duhalt R.** 2015. Microarray analysis of *Neosartorya fischeri* using different carbon sources, petroleum asphaltenes and glucose-peptone. *Genomics Data* **5**:235-237.
79. **Cerniglia C, Campbell W, Freeman J, Evans F.** 1989. Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**:2275-2279.
80. **Sutherland J, Selby A, Freeman J, Evans F, Cerniglia C.** 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**:3310-3316.
81. **Tiwari S, Thakur R, Shankar J.** 2015. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungus. *Biotechnology Research International* **2015**:1-11.

82. **Momany M, Breakspear A.** 2007. The first fifty microarray studies in filamentous fungi. *Microbiology* **153**:7-15.
83. **Read N, Kalkman E.** 2003. Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal genetics and biology* **39**:199-203.
84. **He C, Klionsky D.** 2009. Regulation mechanism and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics* **43**:67-93.
85. **Banuett F.** 1998. Signalling in the yeast: An informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:249-274.
86. **Doddapaneni H, Yadav J.** 2005. Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Molecular Genetics and Genomics* **274**:454-466.
87. **Götz S, García -Gómez J, Terol J, Williams T, Nagaraj S, Nueda M, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A.** 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* **36**:3420-3435.
88. **Syed K, Yadav J.** 2012. P450 monooxygenases (P450ome) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Critical Reviews in Microbiology* **38**:339-363.
89. **Bernhardt R.** 2006. Cytochrome P450 as versatile biocatalyst. *Journal of Atmospheric Chemistry* **124**:124-128.
90. **Isin E, Guengerich F.** 2007. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1770**:314-329.
91. **Roy A, Kucukural A, Zhang Y.** 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* **5**:725-738.
92. **Baillie G, Hitchcock C, Burnet F.** 1996. Increased cytochrome P-450 activity in *Aspergillus fumigatus* after xenobiotics exposure. *Journal of Medical & Veterinary Mycology* **34**:341-347.
93. **Yadav J, Loper J.** 1997. Cytochrome P450 enzymes from microbial degraders of aromatic and aliphatic hydrocarbons, abstr Proceedings of the superfund basic research program (SBRP), Chapel Hill, NC,
94. **Ning D, Wang H, Zhuang Y.** 2010b. Induction of functional cytochrome P450 and its involvement in degradation of benzoic acid by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation* **21**:297-308.
95. **Murray M, Reidy G.** 1990. Selectivity in the inhibition of mammalian cytochromes P-450 by chemical agents. *Pharmacological Reviews* **42**:85-101.
96. **Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Newsam R, Robinson G, Durand R.** 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution* **133**:283-291.
97. **Wu Y-R, He T-T, Lun J-S, Maskaoui K, Huang T-W, Hu Z.** 2009. Removal of benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**:1395-1401.
98. **Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C.** 2012. PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *International Biodeterioration & Biodegradation* **68**:28-35.
99. **Fayeulle A, Veignie E, Slomianny C, Dewailly E, Munch J-C, Rafin C.** 2014. Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent

- intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. Environmental Science and Pollution Research **21**:3515-3523.
100. **Ullrich R, Hofrichter M.** 2007. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. Cellular and Molecular Life Sciences **64**:271-293.
 101. **Sutherland J.** 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. Journal of Industrial Microbiology **9**:53-61.
 102. **Pothuluri JV, Freeman JP, Evans FE, Cerniglia CE.** 1993. Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. Applied and Environmental Microbiology **59**:1977-1980.
 103. **Cerniglia CE, Gibson DT, Dodge RH.** 1994. Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. Applied and Environmental Microbiology **60**:3931-3938.
 104. **Gramss G, Voigt K, Kirsche B.** 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. Biodegradation **10**:51-62.
 105. **Wolter M, Zadrazil F, Martens R, Bahadir M.** 1997. Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus* sp. Florida in solid wheat straw substrate. Applied Microbiology and Biotechnology **48**:398-404.
 106. **Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M.** 2003. Degradation of benzo(a)pyrene by the litter decomposing basidiomycete *Stropharia coronilla*: Role of manganese peroxidase. Applied Microbiology and Biotechnology **69**:3957-3964.
 107. **Salicis F, Krivibok S, Jack M, Benoit-Guyod J-L.** 1999. Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. Chemosphere **38**:3031-3039.
 108. **Cerniglia CE, Yang SK.** 1984. Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. Applied and Environmental Microbiology **47**:119-124.
 109. **Dutta D, Ghosh DK, Mishra AK, Samanta TB.** 1983. Induction of benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: Evidences of multiple forms of cytochrome P-450. Biochemical Biophysical Research Communications **115**:692-699.
 110. **Zhang D, Yang Y, Leakey JEA, Cerniglia CE.** 1996. Phase I and phase II enzymes produced by *Cunninghamella elegans* for the metabolism of xenobiotics FEMS Microbiology Letters **138**:221-226.
 111. **Bezalel L, Hadar Y, Fu PP, Freeman JP, Cerniglia CE.** 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology **62**:2554-2559.
 112. **Doddapaneni H, Yadav JS.** 2004. Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology **65**:559-565.
 113. **Syed K, Porollo A, Lam Y, Grimmett P, Yadav J.** 2013. CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes. Applied Environmental Microbiology **79**:2692-2702.

114. **da Silva M, Esposito E, Moody JD, Canhos VP, Cerniglia CE.** 2004. Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp. *Chemosphere* **57**:943-952.
115. **Furnes B, Schlenk D.** 2004. Evaluation of xenobiotic N- and S-oxidation by variant flavin containing monooxygenase 1 (FMO1) enzymes. *Toxicological Sciences* **78**:196-203.
116. **Nakamura T, Ichinose H, Wariishi H.** 2012. Flavin containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. *Biodegradation* **23**:343-350.
117. **Ortiz de Montellano P, Reich N.** 1986. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. Plenum Press, New York.
118. **Ning D, Wang H, Ding C, Lu H.** 2010. Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. *Biodegradation* **21**:889-901.

11. ANEXOS

11.1. Tablas de genes regulados positiva y negativamente

11.1.1. Anexo 1: Genes regulados positivamente.

Identificación gene NCBI	Nombre proteína(Interproscan)	Función y/o descripción	GLU	ASF	ASF/GLU	Log en base 2
NFIA_091010	cell wall biogenesis glutathione transferase (Gto1),	Respuesta a estrés	97.7	7287.7	74.59	6.22
NFIA_067790	prefoldin subunit 6,	Respuesta a estrés, proteína de choque térmico	160.5	8000.5	49.85	5.64
NFIA_105240	Aha1 domain family	Activador de HSP90 ATPasa, choque térmico	288.6	13601	47.13	5.56
NFIA_005290	salicylate synthetase	Liasa, metabolismo de metabolitos secundarios	394.6	17029	43.15	5.43
NFIA_071610	chitin synthase activator (Chs3),	Regulador negativo de proteína extracelular	107	4534	42.37	5.41
NFIA_083260	leukotriene A4 hydrolase	Peptidasa, metabolismo de lípidos, metabolismo del ácido araquidónico	406.8	17171	42.21	5.40
NFIA_073650	transmembrane GTPase fzo1	Dinámica mitocondrial, factores de fisión y fusión	489.2	20319	41.53	5.38
NFIA_077890	RNA-directed RNA polymerase,	Implicada en el silenciamiento postranscripcional	664.3	24660	37.12	5.21
NFIA_109410	SUMO conjugating enzyme (),	Proteólisis mediada por ubiquitina	425.1	13576	31.94	5.00
NFIA_016750	hypothetical protein NFIA_016750	Proteína hipotética	511	16217	31.74	4.99
NFIA_080700	acetamidase formamidase family	Activada enzimática, amidohidrolasa, metabolismo del nitrógeno	94	2890	30.74	4.94
NFIA_062320	short-chain dehydrogenase reductase	Proteína hipotética	403.8	11351	28.11	4.81
NFIA_081330	alcohol dehydrogenase	oxidorreductasa, actúa sobre los grupos alcoholes CH-OH	233.6	6564.2	28.10	4.81
NFIA_015260	DNA repair RAD51,	Recombinación homóloga, reparación del DNA	244.6	6504.1	26.59	4.73
NFIA_056940	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--glycosyltransferase subunit OST4	Proteína hipotética	871.6	22181	25.45	4.67
NFIA_020590	C6 finger domain	Proteína hipotética	111	2646	23.84	4.58
NFIA_043980	anhydro-N-acetylmuramic acid kinase	Función desconocida, proteína no caracterizada	527.3	12381	23.48	4.55
NFIA_096320	cytochrome P450 monooxygenase	Familia de los P450.	615.1	13530	22.00	4.46
NFIA_048080	flavin-binding monooxygenase	Proteína hipotética	720.7	15429	21.41	4.42
NFIA_062160	nitrite reductase, copper-containing	Multicobre oxidasa	584.7	11822	20.22	4.34
NFIA_014510	adhesion regulating molecule	Proteosoma	281.5	5622.8	19.97	4.32
NFIA_113300	aldehyde dehydrogenase	Proteína hipotética	1419.9	28275	19.91	4.32
NFIA_054110	cytochrome P450 alkane hydroxylase,	Familia de los P450	332.8	6553.3	19.69	4.30
NFIA_101830	C6 transcription factor ()	Factor de transcripción específico de hongos, regulación de aflatoxinas en Aspergillus sp.	446.2	8606.3	19.29	4.27
NFIA_069980	Pc20g02140 [Penicillium rubens Wisconsin 54-1255]	Implicada en la segregación de los cromosomas	958.3	18200	18.99	4.25
NFIA_017720	sex determining	Proteína hipotética	234.9	4437.2	18.89	4.24
NFIA_066170	Golgi complex component Cog3,	Relacionado a transporte en el complejo de golgi. Familia de complejos involucrados en múltiples pasos del tráfico en la membrana	341	6425.8	18.84	4.24
NFIA_035050	hypothetical protein NFIA_035050	Proteína hipotética. Proteínas que unen calmodulina	312.6	5812.2	18.59	4.22
NFIA_041900	Pc13g04300 [Penicillium rubens Wisconsin 54-1255]	Mantiene la integridad de mTor. Relacionado a procesos de señalización frente a nutrientes y factores de crecimiento	327.7	6045.4	18.45	4.21
NFIA_043700	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	Relacionado a la ruta metabólica del shikimato	764.6	12753	16.68	4.06

Identificación gene NCBI	Nombre proteína(Interproscan)	Función y/o descripción	GLU	ASF	ASF/GLU	Log en base 2
		Metabolismo de glicerosfolipidos. Inlcuye fosfatasas ácidas y proteínas				
NFIA_010810	lipin Smp2	de almacenamiento vegetativo	1498.7	23629	15.77	3.98
NFIA_084070	ubiquitin C-terminal hydrolase,	Degradación de proteínas	229.7	3529.9	15.37	3.94
NFIA_044950	phosphatase 2C family	Señalización	546.9	8233.9	15.06	3.91
NFIA_067870	glycosyl hydrolase, family 92	Proteína hipotética	493.7	7217.7	14.62	3.87
NFIA_108170	formation of crista junctions 1	Mitofilina controla la morfología de crestas mitocondriales	2326.7	33937	14.59	3.87
NFIA_106030	Clathrin light chain	Participación en procesos de endocitosis	228.2	3275.1	14.35	3.84
NFIA_080860	AT hook motif	Unión al DNA. Proteína hipotética	386.5	5331.4	13.79	3.79
NFIA_068860	structural maintenance of chromosomes 1	Función exacta es incierta. Organización de los cromosomas	349.1	4683.2	13.42	3.75
NFIA_032320	probable catechol O- methyltransferase 2	Involucradas en producción de antibióticos	466.4	6251.2	13.40	3.74
NFIA_045700	3-keto-steroid reductase	Protéina hipotética, hidrogenasa de cadena corta	284.5	3555.3	12.50	3.64
NFIA_092820	Pfs and NB-ARC domain	Superfamilia de las fosforilasas	385.2	4793.4	12.44	3.64
NFIA_036700	mitochondrial 54S ribosomal 7 5	Proceso de traducción	137.1	1679.9	12.25	3.62
NFIA_023530	MFS transporter,	Transportador de membrana	394.2	4805.1	12.19	3.61
NFIA_016410	DUF1000 domain	Proteosoma	1228	14942	12.17	3.60
NFIA_013940	inositol monophosphatase	Clathrin light chain	1313.7	15813	12.04	3.59
NFIA_021380	Major facilitator superfamily domain, general substrate transporter	Transportador transmembrana	599.4	7181.4	11.98	3.58
NFIA_011520	short-chain oxidoreductase,	Oxidorreductasa	264.8	3084.8	11.65	3.54
NFIA_049620	aspartic endopeptidase (AP1),	Proteasas	181.4	2054	11.32	3.50
NFIA_039170	lysophospholipase,	Proteína hipotética	553.4	6226.2	11.25	3.49
NFIA_004450	facilitator of iron transport 3 precursor, Pc21g00020 [Penicillium rubens Wisconsin 54-1255]	Proteína hipotética participación en la secreción de vesículas	2468.7	27707	11.22	3.49
NFIA_008420	dihydroxy-acetone synthase,	Metabolismo del carbono	384.5	4231.1	11.00	3.46
NFIA_004690	hypothetical protein ALT_5341	Proteína hipotética	93.5	991	10.60	3.41
NFIA_107530	FAD-dependent monooxygenase	Monooxigenasa	175.5	1819	10.36	3.37
NFIA_112250	aldo-keto reductase (AKR13), putative	Putativa	223.4	2280.5	10.21	3.35
NFIA_073800	MFS monocarboxylic acid transporter,	Transportador transmembran, transportador de ácido monocarboxílico	318.4	3235.8	10.16	3.35
NFIA_022900	t-complex 1, beta subunit,	Respuesta a estrés, familia HSP60, chaperonina	5193.5	52191	10.05	3.33
NFIA_050520	GAS2 domain	Growth-Arrest-Specific Protein 2 Domain	2116.9	20720	9.79	3.29
NFIA_062960	HORMA domain	Respuesta a daño de DNA	2694.7	26069	9.67	3.27
NFIA_023300	carboxylesterase family	Peptidasa	216.7	2059.2	9.50	3.25
NFIA_094620	C6 transcription factor, dolichol-phosphate	Factor de transcripción específico de hongos	463.7	4355.3	9.39	3.23
NFIA_066870	mannosyltransferase	Biosíntesis y metabolismo de glicanos	213.5	1953.2	9.15	3.19
NFIA_003250	C6 transcription factor,	Factor de transcripción específico de hongos	432.6	3939.5	9.11	3.19
NFIA_100270	nonribosomal peptide synthase	Proteína hipotética	687.1	6004.1	8.74	3.13
NFIA_049330	short chain dehydrogenase reductase,	Proteína hipotética	205.4	1777.3	8.65	3.11

Identificación gene NCBI	Nombre proteína(Interproscan)	Función y/o descripción	GLU	ASF	ASF/GLU	Log en base 2
NFIA_068580	short-chain dehydrogenase reductase family	Proteína hipotética	122.9	1042.9	8.49	3.09
NFIA_085720	SH3 domain	Señalización relacionada a la organización del citoesqueleto	3878.5	32832	8.47	3.08
NFIA_074490	ankyrin repeat-containing	Proteína hipotética	105.3	867.1	8.23	3.04
NFIA_093800	levodione reductase	Proteína hipotética, relacionado a sistemas de lisis	348.5	2843.4	8.16	3.03
NFIA_104210	lanosterol synthase	Transferasa. Biosíntesis de esteroides, biosíntesis metabolitos secundarios	415.4	3387.5	8.15	3.03
NFIA_089150	tafazzin. hypothetical protein	Proteína hipotética, metabolismo				
NFIA_019090	monolysocardiolipin acyltransferase [EC:2.3.1.-]	glicerofosfolípidos.	287.4	2316.1	8.06	3.01
NFIA_052500	Proteína hipotética NT-C2	Regula el reciclaje endocítico	170.2	1356.3	7.97	2.99
NFIA_091630	DUF647 domain	Proteína hipotética homeostasis	179.1	1415.8	7.91	2.98
NFIA_003730	pseudouridine synthase	Isomerasa, Biogénesis RNA	6420.5	50364	7.84	2.97
NFIA_065090	citriin biosynthesis oxydoreductase	Proteína hipotética	159.4	1214.6	7.62	2.93
NFIA_088390	carboxypeptidase Y,	Peptidasa	260.8	1943.8	7.45	2.90
NFIA_084260	HSP40 / DNAJ	Respuesta a estrés, proteína de choque térmico	112.2	834.8	7.44	2.90
NFIA_017030	RING finger membrane	Respuesta a estrés, señalización para degradación de proteínas	1919.8	14104	7.35	2.88
NFIA_042090	MFS monosaccharide transporter	Transportador de membrana	386.3	2837	7.34	2.88
NFIA_021800	Cytochrome P450	Proteína hipotética	306.4	2233	7.29	2.87
NFIA_115150	endoplasmic reticulum and nuclear membrane c Npl4,	Respuesta a estrés, ubiquitinación de proteínas mal plegadas	173.3	1232.4	7.11	2.83
NFIA_105860	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	Deshidrogenasas	399.1	2825.3	7.08	2.82
NFIA_004540	NAD binding Rossmann fold oxidoreductase	Función no descrita	215.8	1445.5	6.70	2.74
NFIA_017960	NADPH cytochrome P450	Monooxigenasa	316.5	2086.2	6.59	2.72
NFIA_035220	histone acetyltransferase Spt10	Señalización relacionada a la organización del citoesqueleto	207.3	1292	6.23	2.64
NFIA_089520	serine threonine kinase,	Cinasa, proteína hipotética	154.5	955.7	6.19	2.63
NFIA_056750	AT DNA binding ,	Factor de transcripción específico de hongos	143.2	874.6	6.11	2.61
NFIA_016220	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase Pc16g02550 [Penicillium rubens	Degradación de aminoácidos	173.8	1055	6.07	2.60
NFIA_025250	Wisconsin 54-1255]	Motivos de unión, regulación genética	110.9	668.8	6.03	2.59
NFIA_032640	U6 snRNA-associated Sm LSm5	Degradación RNA	281.4	1671.3	5.94	2.57
NFIA_011160	RTA1 domain	Proteínas que se unen a sustancias tóxicas	94.2	554.4	5.89	2.56
NFIA_110250	ion channel	Canal dependiente de voltaje	255.2	1481	5.80	2.54
NFIA_054930	NADH-ubiquinone oxidoreductase kDa subunit	Proteína hipotética	499.8	2658.9	5.32	2.41
NFIA_012630	glucan 1,3-beta-glucosidase D	Metabolismo de carbohidratos	214.8	1097.2	5.11	2.35
NFIA_006510	glycogen phosphorylase Gph1,	Proteína hipotética, metabolismo de carbohidrato	166.2	835.7	5.03	2.33
NFIA_084160	lipase serine esterase,	Proteína hipotética	306	1501.4	4.91	2.29
NFIA_094110	peptidyl-prolyl cis trans isomerase	Factor de terminación de la transcripción. Maquinaria de transcripción. Proteínas catalizadoras del plegamiento	303.7	1475.9	4.86	2.28
NFIA_025790	integral membrane	Transportadores de azúcares	712.4	3407	4.78	2.26
NFIA_025790	carbohydrate-binding module family 1	Proteína hipotética	103	487	4.73	2.24

Identificación gene NCBI	Nombre proteína(Interproscan)	Función y/o descripción	GLU	ASF	ASF/GLU	Log en base 2
NFIA_084650	C-5 cytosine-specific DNA methylase	Reparación del DNA, regulación de la transcripción	121.7	569.3	4.68	2.23
NFIA_088140	peroxisomal membrane anchor ,	Participación en señalización redox y homeostasis de lípidos	161.3	753.3	4.67	2.22
NFIA_033890	transcriptional regulator	Proteína hipotética	114	521	4.57	2.19
NFIA_040320	striatin Pro11	Señalización, diferenciación celular	121.9	547.7	4.49	2.17
NFIA_008350	udp-glucose 6-dehydrogenase	Metabolismo de carbohidratos	205.8	912.1	4.43	2.15
NFIA_077060	zinc-binding dehydrogenase family oxidoreductase,	Proteína hipotética	163.4	723.9	4.43	2.15
NFIA_103950	Alkaline phytoceramidase,	Metabolismo de esfingolípidos	153.5	639.3	4.16	2.06
NFIA_113790	proline permease	Transportadores conducidos por potencial electroquímico	332.3	1376.1	4.14	2.05
NFIA_021950	actin-related 2 3 complex subunit 2	Proteína hipotética	354.7	1454.8	4.10	2.04
NFIA_059570	endo-1,4-beta-xylanase,	Hidrolasa	141.4	578.7	4.09	2.03
NFIA_112820	cytochrome P450 monooxygenase	benzoate 4-monooxygenasa citocromo P450	376.1	1520	4.04	2.01
NFIA_024050	ferulic acid decarboxylase 1	Proteína hipotética, reacciones asociadas a membrana en la biosíntesis de ubiquinona	249.5	988.7	3.96	1.99

11.1.2. Anexo 2: Genes regulados negativamente.

Identificación gene NCBI	Nombre proteína(Interproscan)	Función y/o descripción	GLU	ASF	ASF/GLU	Log en base 2
NFIA_000730	c6 finger domain	Proteína hipotética, factor de transcripción	9289.4	385.7	0.04	-4.59
NFIA_036670	c6 finger domain	Factor de transcripción específico de hongos	29566.3	1618.1	0.05	-4.19
NFIA_022100	rna-binding	Proteína de unión a RNA	23490.5	1537.2	0.07	-3.93
NFIA_052570	methionyl-trna formyltransferase family	Biosíntesis aminoacil tRNA	15504.1	1182.9	0.08	-3.71
NFIA_002030	telomere-associated helicase	Proteína hipotética	13633.7	1047.4	0.08	-3.70
NFIA_076350	dna repair helicase	Dominio involucrado en regulación de la transcripción, reparación de DNA.	17306.6	1410.7	0.08	-3.62
NFIA_037140	at hook motif protein	Motivo de unión al DNA	17164.5	1506.2	0.09	-3.51
NFIA_094640	hexose carrier protein	Transportador de azúcares, MSF1	17829.8	1592.2	0.09	-3.49
NFIA_102930	c-x8-c-x5-c-x3-h type zinc finger protein	Proteína hipotética	8226.8	882.4	0.11	-3.22
NFIA_082760	nad+ dependent glutamate	Proteína hipotética, metabolismo de aminoácidos	1966	253.3	0.13	-2.96
NFIA_114920	meiotic recombination protein dmc1	Activador transcripcional	2607.8	348.1	0.13	-2.91
NFIA_085830	prephenate dehydrogenase	Biosíntesis de metabolitos secundarios	1669.7	238.2	0.14	-2.81
NFIA_099990	c6 transcription	Factor de transcripción específico para hongos.	986.5	154.4	0.16	-2.68
NFIA_026570	structure-specific recognition	Factor de transcripción.	2685.7	451.9	0.17	-2.57
NFIA_001490	c6 transcription	Factor de transcripción específico de hongos	2459.6	414.8	0.17	-2.57
NFIA_015600	hmg box protein	Remodelamiento de la cromatina	2433.7	412.6	0.17	-2.56
NFIA_103670	rgs domain protein	Activadores de GTPasas	785.1	139.6	0.18	-2.49
NFIA_016810	septin	Proteínas del citoesqueleto	1735.1	324.6	0.19	-2.42
NFIA_038420	hypothetical protein NFIA_038420 [Neosartorya fischeri NRRL 181]	Proteína hipotética	797	150.6	0.19	-2.40
NFIA_103240	glutamine synthetase	Biosíntesis de aminoácidos	2504.7	486.3	0.19	-2.36
NFIA_013590	50s ribosomal subunit protein l15	Responsables de la síntesis de ribosomas	2989.5	587.7	0.20	-2.35
NFIA_041640	maltose permease	Transportador de azúcares, MFS1	1530.1	302.6	0.20	-2.34
NFIA_056430	atp citrate lyase subunit putative	Proteína hipotética, TCA	841.2	179.9	0.21	-2.23
NFIA_087080	60s ribosomal protein l3	Biogénesis del ribosoma	741.9	163.2	0.22	-2.18
NFIA_026930	siroheme synthase	Proteína hipotética, metabolismo de metabolitos secundarios. Metabolismo de cofactores y vitaminas	870.1	192.1	0.22	-2.18
NFIA_012960	rna-binding la domain protein	Motivo de reconocimiento de RNA	1223.3	286.1	0.23	-2.10
NFIA_112720	tubulin beta chain	Formación de polímero, implicado en la división celular	689	169	0.25	-2.03
NFIA_072730	c6 finger domain	Factor de transcripción, dominio conservado en hongos	1308	330.8	0.25	-1.98
NFIA_074900	ribonucleotide reductase small subunit	Proteína hipotética, metabolismo de nucleótidos	482	125	0.26	-1.95

11.1.3. Anexo 3 Rutas metabólicas en las que podrían estar participando algunos de los genes regulados positiva o negativamente en *N. fischeri*.

	Negativa	Positiva
Metabolismo cofactores y vitaminas	<p>biosíntesis de pantotenato y CoA(1)(EC:2.2.1.6 acetolactate large transferasa Acetolactate synthase)</p> <p>metabolismo de porfirinas y clorofila (1) (EC:2.1.1.107 siroheme synthase trans</p>	<p>metabolismo retinol en animales (3)(1.14.13.8 Monooxigenasa 1.14.14.0 Monooxigenasa inespecifica 1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica</p> <p>biosíntesis de ubiquinona y otros quinona terpenoides (1)(5.4.4.2 isocorismato sintasa -isomerasa)</p>
Biosíntesis metabolitos secundarios	biosíntesis novobiocina (1)(EC:1.3.1.12; EC:1.3.1.13 prephenate dehydrogenas	metabolismo cafeína (1) (1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica - Oxidorreductasa)
metabolismo de aminoácidos	<p>biosíntesis valina, leucina e isoleucina (1) (EC:2.2.1.6 acetolactate large transferasa Acetolactate synthase)</p> <p>metabolismo alanina, aspartato y glutamato (2) (EC:1.4.1.2 nad+ dependent glutamate oxidoreductasa)(EC:6.3.1.2 glutamine synthetase ligasa Glutamate-ammonia ligase)</p>	<p>degradación de valina, leucina e isoleucina(1) (1.3.99.3 Acil CoA deshidrogenasa- oxidorreductasa)</p> <p>degradación lisina (1) (2.1.1.43 Proteinmetil transferasa II - transferasa)</p> <p>metabolismo fenilalanina (2)(1.2.1.5 Aldehído deshidrogenasa-oxidoreductasa)(3.5.1.4 Amidasa-hidrolasa)</p> <p>metabolismo histidina (1) (1.2.1.5 Aldehído deshidrogenasa-oxidorreductasa)</p>
metabolismo carbohidratos	<p>ciclo del citrato (1)atp citrate lyase subunit putatibe (ligasa Succinate--CoA liga</p> <p>metabolismo butanoato (1) (EC:2.2.1.6 acetolactate large transferasa Acetolac</p> <p>metabolismo de fosfato de inositol (1) (EC:3.1.4.3 phosphoesterase superfamily protein hidrolasa Phospholipase C)</p> <p>metabolismo de glioxilato y dicarboxilato (1)(EC:6.3.1.2 glutamine synthetase ligasa Glutamate--ammonia ligase)</p> <p>metabolismo del ácido dibásico c5 ramificado (2)(EC:2.2.1.6 acetolactate large transferasa Acetolactate synthase)(EC:6.2.1.5 atp citrate lyase subunit putatibe ligasa Succinate--CoA ligase (ADP-forming))</p>	<p>Gluconeogenesis (2)(1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa)(1.2.1.5 Aldehído deshidrogenasa)</p> <p>metabolismo aminoazúcares (1)(1.1.1.22 UDP-glucosa 6 deshidrogenasa-oxidorreductasa)</p> <p>metabolismo ascorbato y aldarato (1)(1.1.1.22 UDP-glucosa 6 deshidrogenasa)</p>
metabolismo de lípidos	<p>metabolismo de esfingolípidos (1)(EC:3.2.1.18 cch zinc finger domain protein hidrolasa Exo-alpha-sialidase)</p> <p>metabolismo de glicerosfolípidos (2)(EC:3.1.1.5 gpi anchored serine-threonine rich protein hidrolasa Lysophospholipase)</p> <p>EC:3.1.4.3 phosphoesterase superfamily protein hidrolasa Phospholipase C)</p> <p>metabolismo de lípidos éter (1)(EC:3.1.4.3 phosphoesterase superfamily protein hidrolasa Phospholipase C)</p>	<p>biosíntesis de hormona esteroidea (2)(2.1.1.6 Catecol metil transferasa)(1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica)</p> <p>metabolismo de ácidos grasos (3)(1.3.99.3 Acil CoA deshidrogenasa)(1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa)(1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica)</p> <p>metabolismo del ácido linoleico (1)(1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica-oxidorreductasa)</p>
metabolismo de otros aminoácidos	<p>metabolismo glutatión (2) (EC:1.11.1.9 glutathione peroxidase oxidoreductasa)(EC:1.17.4.1 ribonucleotide reductase small subunit oxidoreductasa)</p> <p>metabolismo taurina e hipotaurina (1) (EC:1.4.1.2 nad+ dependent glutamate</p>	<p>metabolismo ácido cianoamino (1) (3.5.1.4 Amidasa-hidrolasa)</p> <p>metabolismo beta alanina(2) (1.2.1.5 Aldehído deshidrogenasa-oxidoreductasa)(1.3.99.3 Acil CoA deshidrogenasa-oxidorreductasa)</p>
metabolismo de nucleótidos	metabolismo pirimidinas (2)(EC:2.7.7.6 phd finger domain transferasa DNA-directed Rna polymerase) (EC:1.17.4.1 ribonucleotide reductase small subunit oxidoreductasa)	
metabolismo energía	ruta de fijación del carbono en procariones (1)(EC:6.2.1.5 atp citrate lyase subunit putatibe ligasa Succinate--CoA ligase (ADP-forming))	<p>fosforilación oxidativa(1) (1.6.5.3 Ubiquinona reductasa)</p> <p>metabolismo metano (1)(1.14.13.8 Monooxigenasa - oxidorreductasa)</p>
transducción de señales	ruta de señalización mTor (1) (ERK 1/2 Regulación de la autofagia) mTor inhibe autofagia (EC:2.7.11.24 mitogen-activated protein kinase transferasa)	
traducción		biosíntesis aminoácil trna (1) (6.1.1.21 Histidina trna ligasa-ligasa)
metabolismo de terpenoides y policétidos		biosíntesis de péptidos del grupo de sideróforos no ribosomales(1) (5.4.4.2 Isocorismato sintasa-isomerasa)
biodegradación y metabolismo de xenobióticos		<p>degradación aminobenzoato (3)(1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica-oxidorreductasa)</p> <p>degradación cloroalcano y cloroalqueno (1)(1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa-oxidorreductasa)(3.3.2.10 Epóxido hidrolasa-hidrolasa)</p> <p>degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (1) (1.14.13.8 Monooxigenasa)</p> <p>degradación estireno (2) (3.5.1.4 Amidasa-hidrolasa)</p> <p>degradación naftaleno (3) (1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa-oxidorreductasa)(1.14.13.8 Monooxigenasa)</p> <p>metabolismo de drogas citocromo P450 (4) (1.14.13.8 Monooxigenasa) (1.1.1.1 Alcohol deshidrogenasa)(1.14.14.0 Monooxigenasa inespecifica)(1.2.1.5 Aldehído deshidrogenasa)</p> <p>metabolismo de drogas y otras enzimas (2)((1.14.13.8 Monooxigenasa)(1.14.14.0 Monooxigenasa inespecifica)</p> <p>metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 (3)(1.14.13.8 Monooxigenasa 1.14.14.0 Monooxigenasa inespecifica 1.14.14.1 Monooxigenasa inespecifica</p>

11.2. ARTICULOS PUBLICADOS

1. **Hernández-López EL**, Perezgasga L, Huerta-Saquero A, Mouriño-Perez R, Vazquez-Duhalt R. 2016 Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*. Environmental Science and Pollution Research doi: 10.1007/s11356-016-6277-1.
2. **Hernández-López EL**, Ramírez-Puebla ST, Vazquez-Duhalt R. Microarray analysis of *Neosartorya fischeri* using different carbon sources, petroleum asphaltenes and glucose-peptone. Genomics Data 5: 235-237
3. **Hernández-López EL**, Ayala M, Vazquez-Duhalt R. 2015. Microbial and enzymatic biotransformations of asphaltenes. Petroleum Science and Technology **33**:1017-1029.

Biotransformation of petroleum asphaltenes and high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Neosartorya fischeri*

E. Lorena Hernández-López¹ · Lucia Perezgasga¹ · Alejandro Huerta-Saquero² · Rosa Mouriño-Pérez³ · Rafael Vazquez-Duhalt²

Received: 23 November 2015 / Accepted: 11 February 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract *Neosartorya fischeri*, an *Aspergillaceae* fungus, was evaluated in its capacity to transform high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (HMW-PAHs) and the recalcitrant fraction of petroleum, the asphaltenes. *N. fischeri* was able to grow in these compounds as sole carbon source. Coronene, benzo(g,h,i)perylene, and indeno(1,2,3-c,d)pyrene, together with the asphaltenes, were assayed for fungal biotransformation. The transformation of the asphaltenes and HMW-PAHs was confirmed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), nano-LC mass spectrometry, and IR spectrometry. The formation of hydroxy and ketones groups on the PAH molecules suggest a biotransformation mediated by monooxygenases such as cytochrome P450 system (CYP). A comparative microarray with the complete genome from *N. fischeri* showed three CYP monooxygenases and one flavin monooxygenase genes upregulated. These findings, together with the internalization of aromatic substrates into fungal cells and the microsomal transformation of HMW-PAHs, strongly support the role of CYPs in the oxidation of these recalcitrant compounds.

Keywords Asphaltenes · Biotransformation · Cytochrome P450 · *Neosartorya fischeri* · Polycyclic aromatic hydrocarbons

Introduction

The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are molecules with two or more fused benzene rings. The common sources of PAHs in the environment include natural as well as anthropogenic. Natural sources are forest and rangeland fires, oil seeps, volcanic eruptions, and exudates from trees, while anthropogenic sources of PAHs include burning of fossil fuel, coal tar, wood, garbage, and used lubricating oil, among others. PAHs are considered priority pollutants due to their carcinogenic and mutagenic effects (Cerniglia and Sutherland 2010) and thus represent a public health risk. High molecular weight PAHs (HMW-PAHs), containing six or more fused aromatic rings, are recalcitrant to microbial attack (Das and Chandran 2011) limiting their biodegradation in different ecosystems. Recently, the term “recalcitrant” has been revisited and suggested that solubility is more important than molecular complexity in determining compound persistence in nature (Marín-Spiotta et al. 2013). This has been proved for the enzymatic transformation of asphaltenes in which the transformation was carried out in a one-phase ternary medium constituted of different proportions of toluene, isopropanol, and water. According to the reaction media used, it seems that a main limiting factor for the asphaltene transformation is its high hydrophobicity, and thus the biotransformation may occur only when the asphaltenes and the enzyme are in the same phase, reducing the mass transfer limitations (Fedorak et al. 1993). Some authors consider HMW-PAHs compounds with more than four aromatic rings; however, several reports are available in literature describing the

Responsible editor: Robert Duran

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11356-016-6277-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Rafael Vazquez-Duhalt
rvd@cny.unam.mx

¹ Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California, Mexico

³ Centro de Investigaciones Científicas y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, Mexico

microbial transformation of compounds with four and five aromatic rings. Here, we consider as HMW-PAHs those compounds containing six or more aromatic rings. The recalcitrance of PAHs to microbial degradation increases directly with their molecular weight and their hydrophobicity (octanol-water partition). Microbial metabolism of low molecular weight PAHs containing up to three rings (naphthalene, phenanthrene, anthracene and fluorene) has been extensively studied. However, information about the microbial degradation of PAHs with more than five benzene rings is scarce (Juhász and Naidu 2000). In spite of abundant information in the literature about the biodegradation of PAHs containing less than five aromatic rings, to our knowledge, there are very few reports with HMW-PAHs of six or more aromatic rings. Recently, the conferred capacity to metabolize a six-ring PAH, benzo(g,h,i)perylene, in a yeast expressing the cytochrome P450 (CYP)63A2 gene from *Phanerochaete chrysosporium* has been reported (Syed et al. 2013).

Asphaltenes are present in most petroleum materials and in all heavy oils and bitumens from oil sands. This material is defined by solubility as the components that dissolve in toluene and precipitate from crude oil in n-alkane solvents (either n-pentane or n-heptane). The asphaltene concentration in a light crude oil may be less than 1 %, while the concentration in heavy bitumen can be more than 20 % of the total weight. The low solubility of the asphaltene fraction in the crude oil poses challenges during the production and processing of petroleum (Scotti and Montanari 1998). The asphaltene composition includes aromatic molecules of very high molecular weight (Mullins 2011), and their complex molecular structure and high hydrophobicity makes them resistant to biodegradation. Very few microorganisms able to degrade asphaltenes have been reported (Hernández-López et al. 2015a). Some old reports on oil biodegradation claimed the degradation of the asphaltene fraction by mixed bacteria (Bertrand et al. 1983; Rontani et al. 1985; Lacotte et al. 1996). Nevertheless, none of these reports described the analytical results of extractable materials recovered from appropriate sterile controls. The complex nature of asphaltenes possesses challenges to the biodegradation studies. Unfortunately, in the majority of studies, the extent of asphaltene degradation has been determined using gravimetric measurements, without considering the effect of the presence of oxidized molecules or the production of biosurfactants in the precipitation behavior of the asphaltene fraction.

Recently, *Neosartorya fischeri* was the first microorganism that evidenced the mineralization of petroleum asphaltenes with rigorous substrate preparation and controls (Uribe-Alvarez et al. 2011). After 11 weeks of growth in a medium containing asphaltenes as a sole source of carbon and energy, the fungus was able to metabolize 15.5 % of the asphaltenic carbon, including 13.2 %

mineralization to CO₂. *Pestalotiopsis* sp., a fungus from another genus, was also reported able to degrade asphaltenes as a sole carbon source. This fungus, which is halotolerant, was able to degrade 21.4 % of asphaltenes after 15-day incubation (Yanto and Tachibana 2013, 2014). The results obtained in these works clearly demonstrated that there are microorganisms capable to metabolize and mineralize asphaltenes, which is considered the most recalcitrant petroleum fraction.

Beside its capacity to metabolize asphaltenes, here, we report the capacity of *N. fischeri* to metabolize HMW-PAHs. Additionally, we present experimental evidence that strongly suggest cytochrome P450 system involved in the oxidation of these recalcitrant compounds. The implications of these findings are discussed.

Materials and methods

Chemicals

Coronene (99 %), benzo(g,h,i)perylene (98 %) and indeno(1,2,3-cd)pyrene (98.8 %), TRI reagent[®] RNA isolation reagent, ethanol, and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO). NaNO₃, K₂HPO₄, MgSO₄•7H₂O, KCl, FeSO₄•7H₂O, and dextrose anhydrous powder were obtained from J.T. Baker (Center Valley, PA). Bacto peptone, bacto potato dextrose broth (PDB), and potato dextrose agar (PDA) were obtained from DIFCO (Sparks, MD). Dichloromethane, methanol, hexane, hydrochloric acid, and KOH were supplied by Fermont (Monterrey, Mexico).

Petroporphyrin-free asphaltenes were purified from Mexican Maya crude oil as previously described (Uribe-Alvarez et al. 2011). First, asphaltenes were obtained by precipitation with n-pentane. Crude oil (100 g) was suspended in 5 l of n-pentane and stirred for 1 h. The mixture was left in repose overnight at 20 °C in a stopped flask, then the suspension was centrifuged at 10,000g and the pellet was redissolved in 100 ml of dichloromethane. The asphaltene solution was reprecipitated with 5 l of n-pentane, maintained overnight in repose, and centrifuged. This procedure was repeated one more time and the precipitate was washed with n-pentane obtaining the asphaltenes fraction. Next, the petroporphyrin-free asphaltenes were prepared from 6 g of asphaltenes diluted in 300 ml of toluene and stirred for 2 h at 20 °C. Then, 3 l of acetone was added and the mixture stirred for 3 h at 20 °C and maintained in repose for 48 h. Afterwards, the mixture was centrifuged at 12,000g for 30 min and the pellet was washed three times with acetone. The red-brownish supernatant and subsequent washes contained the petroporphyrins, whereas the pellet contained the petroporphyrin-free asphaltenes.

Organism and culture media

Neosartorya fischeri strain used in this study was isolated and characterized as previously reported (Uribe-Alvarez et al. 2011). This strain is available in the fungal collection of the Instituto de Ecología (WDCM782) as *N. fischeri* IE 978. The strain was maintained on PDA or Saboraud medium. In order to evaluate the hydrocarbons (HMW-PAHs or asphaltenes) as sole carbon source, a modified Czapek minimal medium without original carbon source was used (3.0 g l⁻¹ NaNO₃; 1.0 g l⁻¹ K₂HPO₄; 0.5 g l⁻¹ MgSO₄•7H₂O; 0.5 g l⁻¹ KCl; and 0.01 g l⁻¹ FeSO₄•7H₂O) supplemented with either asphaltenes, coronene, benzo(g,h,i)perylene, or indeno(1,2,3-cd)pyrene. The insoluble substrates were ground in fine particles before adding to medium. In order to avoid fungal growth on the residual carbon source from the original rich cultures, PAH and asphaltenes cultures were inoculated with an inoculum from 20-day cultures with PAH or asphaltenes as sole carbon source. All cultures were inoculated with 5 % inoculum volume. The cultures were incubated at 37 °C and shaken at 100 rpm.

Determination of oxygen consumption

The substrate fungal metabolization was monitored by measuring the oxygen consumption with an OxiTop® measuring system equipped with a KOH trap (CO₂ trap). This method is based on the monitoring of pressure changes with a piezoresistive electronic pressure sensor. *N. fischeri* was inoculated in 40 ml of Czapek medium with 10 mg of coronene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, or asphaltene. Control cultures were carried out without carbon source. The culture bottles were incubated at 37 °C and 100 rpm for 17–30 days. All the cultures and controls were performed in triplicates.

Ergosterol production

The ergosterol content in fungal biomass was measured using a methodology previously reported (Barajas-Aceves et al. 2002). *N. fischeri* was inoculated in 20 ml of Czapek medium containing 5 mg of coronene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, or asphaltene as a sole source of carbon. Control cultures without carbon source were also analyzed. The cultures were incubated at 37 °C and shaken at 100 rpm for 14 days; then, they were centrifuged into 50-ml Teflon centrifuge bottles. Methanol (10 ml) was added to the biomass pellet, and the suspension sample was sonicated for 3 min (1 min × 3) in an ice-water bath and then centrifuged at 9000 rpm for 15 min at 4 °C. The biomass pellet was washed three times with 10 mL of methanol. Supernatants were transferred to 50-ml Teflon tubes, and 5 ml of absolute ethanol and 2 g of KOH were added. This mixture was saponified in a

water bath at 80 °C for 1 h. The tubes were then removed from the water and allowed to cool and 10 ml of hexane were added. The tubes were closed and shaken vigorously. Two phases are formed and the upper hexane layer was removed and transferred into a round-bottom flasks. The alcoholic phase was washed twice with 10 ml of hexane. The combined hexane phases were then evaporated to dryness on a rotatory evaporator at 40 °C under vacuum. The extracted ergosterol was redissolved in 1 ml HPLC-grade methanol and transferred to an amber vial and stored at -20 °C until HPLC analysis.

The extracts were analyzed on an HPLC (Agilent 1100 series) equipped with a reverse-phase column Phenomenex Kinetex 5 μ C18 100 Å, 150 × 4.60 mm. The samples were eluted with 97:3 methanol/water with 0.1 % trifluoroacetic acid with a flow rate of 0.5 ml min⁻¹, and monitored at 282 nm for 20 min. The ergosterol content was estimated against a standard curve obtained from ergosterol solutions of 0 to 1000 μg ml⁻¹.

Metabolite identification

The metabolites from HMW-PAHs transformation were analyzed by HPLC and mass spectrometry. *N. fischeri* was inoculated in 20 ml of Czapek with 5 mg of coronene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, or benzo(g,h,i)perylene and incubated for 17 days at 37 °C and 100 rpm. Then, the culture medium was acidified with a few drops of HCl and extracted three times with 10 ml dichloromethane. The mixture was shaken and centrifuged, and the organic phase was collected and concentrated under vacuum and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The chromatograph (Agilent 1100 series) was equipped with UV detector and a reverse-phase C₁₈ column 5 μ, 100 Å (150 × 4.6 mm) supplied by Phenomenex (Los Angeles, CA). The elution was performed with a gradient from methanol to 40 % dichloromethane in methanol over a period of 15 min, at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The substrate and metabolites were monitored at 280 nm.

Products of transformation were also analyzed by nLC-MS at the Queen's Mass Spectrometry and Proteomics Unit (MSPU) at the Queen's University in Kingston, Ontario. A nano LC high-resolution MS (Orbitrap Velos Pro) hybrid mass spectrophotometer and Agilent capillary HPLC 1100 system with a mass resolution of 100,000 Da and a mass accuracy of 1 ppm RMS for organic compounds, were used. The samples were eluted with a gradient from methanol to dichloromethane in 25 min at a rate of 300 nL min⁻¹.

Fourier transform infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FTIR-ATR) spectra were recorded by a PerkinElmer Spectrum 100 (PerkinElmer Cetus Instruments, Norwalk CT) from 650 to 4000 cm⁻¹, using a universal ATR sampling accessory and a diamond tip. The Spectrum

software supplied with the equipment was used for baseline subtraction.

Microsomal transformation of HMW-PAHs

Microsomes were obtained according to Jauregui et al. (2003). Fungal cells (10 mg dry weight) were grounded in a mortar in liquid nitrogen with protease inhibitor and suspended in 25 mL of 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.0 containing 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 10 % glycerol. The mixture was homogenized in a blender (Dremel Moto-tool) at 28,000 rpm. The microsomal fraction was isolated by differential centrifugation. The homogenized biomass was first centrifuged at 600g for 5 min and then the supernatant was centrifuged at 12,000g for 10 min. Then, 8 mM CaCl₂ was added to the supernatant to allow complete sedimentation of microsomes at 27,000g for 15 min. The pellet was washed two times with 20 mM Tris-HCl buffer containing 8 mM CaCl₂.

The microsomes were assayed for the NADH oxidation in the presence of each polycyclic aromatic hydrocarbons; coronene, benzo(g,h,i)perylene, or indeno(1,2,3-cd)pyrene. Reactions were carried out in 1 ml reaction mixtures containing 10 μM of PAH, 0.4 mM NADH, 100 mM phosphate buffer, pH 5.0, containing 10 % acetonitrile, and 20 ng of microsomal protein. The PAH transformation was monitored spectrophotometrically for NADH oxidation at 340 nm. No NADH oxidation was detected in controls without microsomes or PAHs.

Microscopy studies

Atomic force microscopy After 5-day growth in either Czapek medium with asphaltenes or glucose-peptone medium, one drop of the culture was placed on the slide and dehydrated at room temperature. The fungal cells were examined directly for atomic force microscopy (AFM) in a scanning probe microscope (SPM) equipped with an AFM XE-70 Park system. The method used was non-contact with a cantilever NC HR non-contact of Park system.

Laser scanning confocal microscopy Fluorescence microscopy of the strain under both culture conditions (asphaltenes and glucose-peptone) was performed on an inverted laser scanning microscope FV1000 FluoView™ (Olympus, Japan) equipped with a Multi-line Ar laser for excitation at 405 for asphaltenes and PAHs and 488 nm for FM4-64 and Sybgreen (SYBRG) and 543 nm for BODIPY. An UPlanFLN 60X, 1.42 NA oil immersion objective was used. Images were captured simultaneously by fluorescence and differential interference contrast (DIC) channels with FluoView™ software (Olympus, Japan). Final figures were

created using Adobe Photoshop CS5 Extended (Adobe Systems Inc., San Jose, CA).

Cell staining methods For different cell compartment staining, mycelia cultured with asphaltenes or glucose-peptone was incubated in separate assays with 2.5 μM FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR), to label the plasma membrane and organelle membranes, 1:10,000 SYBR® Green I (Molecular Probes, Eugene, OR) to label nuclei and mitochondria and 2.5 μg ml⁻¹ BODIPY (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) to label lipids.

Results

Fungal growth on HMW-PAHs

In order to determine the ability of *N. fischeri* to metabolize HMW-PAHs, the mycelium was inoculated in Czapek media containing coronene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, or petroleum asphaltenes as sole carbon source. Kinetics of oxygen consumption was monitored during the fungal growth (Table 1). *N. fischeri* was able to grow in a medium containing HMW-PAHs as a sole carbon source. Asphaltene showed the highest oxygen consumption (138 mg l⁻¹ day⁻¹), while coronene and indeno(1,2,3-cd)pyrene also showed an average oxygen consumption with values of 82 and 81 mg l⁻¹ day⁻¹, respectively, and without statistic ($p < 0.05$) differences between them. Finally, benzo(g,h,i)perylene showed the lowest oxygen consumption with 62 mg l⁻¹ day⁻¹. Inoculated controls without carbon source showed no oxygen consumption (Table 1).

The fungal growth was estimated by measuring the ergosterol production (Table 1). Asphaltenes and coronene showed the highest average ergosterol production during the first 14 days of culture with 34 and 31 μg ml⁻¹ day⁻¹, respectively. While cultures with indeno(1,2,3-cd)pyrene and benzo(g,h,i)perylene showed lower ergosterol production of 22 and 27 μg ml⁻¹ day⁻¹, respectively. Controls without carbon source showed, as expected, no growth with a slight decrease in the ergosterol content due to endogenic metabolism (Table 1). The oxygen consumption and the ergosterol production showed a linear correlation coefficient of 0.81.

Fungal transformation of HMW-PAHs

Metabolic products were extracted from 17-day-old cultures of *N. fischeri* with different HMW-PAHs as sole source of carbon and energy. The extracts were analyzed by HPLC, infrared spectroscopy, and mass spectrometry to determine their chemical nature. Polar compounds were detected by HPLC chromatography as shown for coronene (Fig. S1). No products were detected in non-inoculated control cultures.

Table 1 Maximal oxygen consumption rate and ergosterol production of *N. fischeri* cultures with HMW-PAHs and asphaltenes as sole carbon source

Substrate	Oxygen consumption ^a (mg l ⁻¹ day ⁻¹)	Ergosterol production ^b (μg l ⁻¹ day ⁻¹)
Coronene	82 (±19)	30.9 (±2.7)
Benzo(g,h,i)perylene	62 (±28)	27.0 (±5.0)
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	81 (±9)	22.4 (±5.2)
Asphaltenes	138 (±26)	34.2 (±6.0)
Control without substrate	0 (±9)	-2.3 (±0.6)

^a *Neosartorya fischeri* was inoculated in OxiTop[®] bottles containing 40 ml of Czapek minimal medium supplemented with 10 mg of HMW-PAHs or asphaltenes. Experiments were carried out in three independent replicates

^b *Neosartorya fischeri* was inoculated in 20 ml of Czapek medium with 5 mg of coronene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(g,h,i)perylene or asphaltene, and a culture control without carbon source. The cultures were incubated at 37 °C and shaken at 100 rpm for 14 days. Experiments were carried out in three independent replicates

The production of oxidized products was confirmed by the appearance of new bands of O–H and C–O groups in the FTIR-ATR spectra (Fig. S2). Pure coronene (Fig. S2a), benzo(g,h,i)perylene (Fig. S2c), and indeno(1,2,3,cd)pyrene (Fig. S2e) show characteristic bands at 3044–3024 (C–H stretching), 1610–1598 (C=C stretching), 1340–1318 (C–C stretching), and 840–675 cm⁻¹ (out-of-plane C–H vibrations). C–C stretch vibrations produce generally intense peaks at 1569 and 1309 cm⁻¹, while the peaks close to 1200 cm⁻¹ are mainly contributed by C–H in-plane vibrations. These signals are associated to the presence of aromatic hydrocarbon. After biotransformation of coronene (Fig. S2b) and benzo(g,h,i)perylene (Fig. S2d), the appearance of weak bands in the range of 3730–3700 cm⁻¹ and between 1400 and 1100 cm⁻¹, which can be assigned at O–H stretching and in-plane O–H vibration, respectively. On the other hand, the biotransformed extract from indeno(1,2,3c,d)pyrene (Fig. S2f) showed new strong bands localized at 3350–3200 (O–H stretching), 1460–1360 (in-plane bend O–H vibrations) and 1050–950 cm⁻¹ (C–O stretching), indicating that oxidation reaction occurs at higher extent on this HMW-PAH compound.

The reaction products were also analyzed by nano-LC high-resolution MS hybrid mass spectrometry. Hydroxycoronene (C₂₄H₁₂O, [M+H]⁺ *m/z* 317.09652 Da), dihydroxycoronene (C₂₄H₁₂O₂, [M+H]⁺ *m/z* 333.09721 Da), and coronenodione (C₂₄H₁₀O₂, [M+H]⁺ *m/z* 331.07612 Da) were detected from coronene metabolization (Fig. 1). In fungal cultures with benzo(g,h,i)perylene, the monohydroxy (C₂₂H₁₂O, [M+H]⁺ *m/z* 293.09609 Da), dihydroxy (C₂₂H₁₂O₂, [M+H]⁺ *m/z* 309.09028 Da), monoketone (C₂₂H₁₁O, [M+H]⁺ *m/z* 292.08752 Da), and dione (C₂₂H₁₀O₂, [M+H]⁺ *m/z* 307.07536 Da) derivatives were detected (Fig. 2). Finally, *N. fischeri* metabolization of indeno(1,2,3-cd)pyrene showed also hydroxyindeno(1,2,3-cd)pyrene (C₂₂H₁₂O, [M+H]⁺ *m/z* 293.09567 Da), dihydroxyindeno(1,2,3-cd)pyrene (C₂₂H₁₂O₂, [M+H]⁺ *m/z* 309.09101 Da),

indeno(1,2,3-cd)pyrenone C₂₂H₁₁O, [M+H]⁺ *m/z* 292.08758 Da), and indeno(1,2,3-cd)pyrenodione (C₂₂H₁₀O₂, [M+H]⁺ *m/z* 307.07470 Da) (Fig. 3). All these metabolic products strongly suggest the participation of a cytochrome P450 monooxygenase. It is important to point out that the exact position of the hydroxyl and ketone substituents on the PAH structure has not been determined. Thus, Figs. 1, 2, and 3 are schematic representations of a possible isomeric structure.

In vitro transformation (microsomal fraction)

Concentrated extracellular medium (100 times) by ultrafiltration (cutoff 10,000 Da) was unable to transform any of the HMW-PAHs tested. This extracellular extract showed extremely low laccase activity and no peroxidase activity (Uribe-Alvarez et al. 2011). Then, microsomal fractions were obtained from *N. fischeri* grown in two different media; potato dextrose broth (PDB) and Czapek, both supplemented with phenanthrene. The microsomes were then assayed for the NADH oxidation in the presence of HMW-PAHs. The microsomal fraction obtained from Czapek was able to oxidize NADH with rates of 25 nmol μg prot⁻¹ min⁻¹ in indeno(1,2,3-cd)pyrene, 20 nmol μg prot⁻¹ min⁻¹ in coronene, and 6 nmol μg prot⁻¹ min⁻¹ in benzo(g,h,i)perylene. No NADH oxidation could be detected with microsomes from PDB medium and in control experiments without the addition of PAH substrate. These results clearly indicate that in the presence of PAH, as sole carbon source, specific CYPs are induced and thus microsomes became able to transform HMW-PAHs. The CYP participation in the xenobiotics oxidation, including PAHs, has been well documented and the increased expression of CYP has been demonstrated in microsomal fractions from *Aspergillus fumigatus* cultures in the presence of xenobiotics (Baillie et al. 1996). Syed et al. (2010) performed a genome-wide CYP microarray screen of the white-rot fungus *Ph. chrysosporium*, and six PAH-inducible CYP genes were

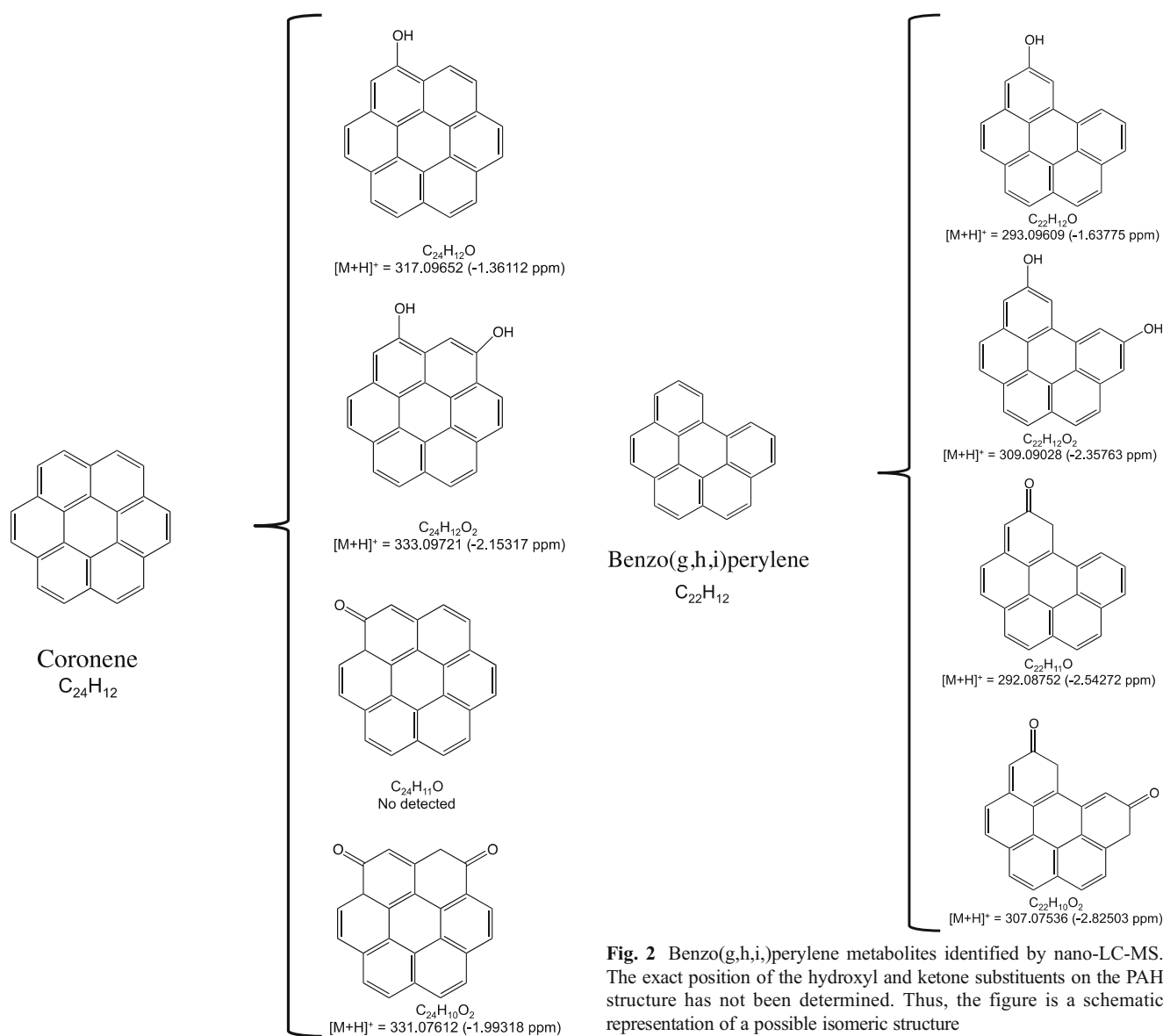


Fig. 1 Coronene metabolites identified by nano-LC-MS. The exact position of the hydroxyl and ketone substituents on the PAH structure has not been determined. Thus, the figure is a schematic representation of a possible isomeric structure

identified. All six CYP were cloned and expressed in *Pichia pastoris* in conjunction with a homologous P450 oxidoreductase. Each of the six recombinant CYP monooxygenases showed PAH-oxidizing activity albeit with varying substrate specificity toward PAHs from three to five rings. The same group demonstrated that the cloned CYP63A2 conferred the unique catalytic capability to oxidize the six-ring PAH benzo(g,h,i)perylene (Syed et al. 2013).

Microscopy studies

The participation of CYP in the HMW-PAHs and asphaltene metabolism should involve substrate cell internalization.

Fig. 2 Benzo(g,h,i)perylene metabolites identified by nano-LC-MS. The exact position of the hydroxyl and ketone substituents on the PAH structure has not been determined. Thus, the figure is a schematic representation of a possible isomeric structure

Confocal microscopy studies were conducted to compare observations of *N. fischeri* grown in asphaltenes and glucose-peptone, respectively. Laser scanning confocal microscopy without any dye addition was used, taking advantage of the aromatic fluorescence property of asphaltenes. Under these conditions, confocal images showed an intense fluorescence in fungal hyphae grown with asphaltenes different to those grown in glucose-peptone condition that did not have any fluorescence (Fig. 4). This could be attributed to the accumulation of aromatic compounds inside the cell. Fungal hyphae were also stained with FM4-64 for membranous organelles, with BODIPY for lipid bodies, and with SYBR green for nuclei and mitochondria. As demonstrated by the confocal images in Fig. 4, the asphaltene fluorescence does not match with membranous organelles or with lipid bodies. The HMW-PAH internalization has been also confirmed in fungal cultures grown with coronene (Fig. 5).

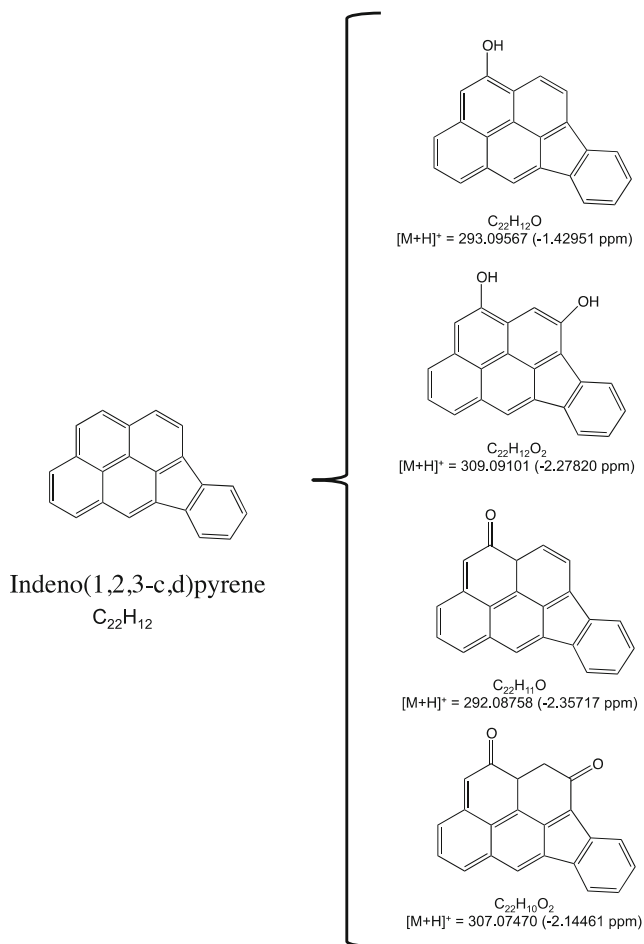


Fig. 3 Indeno(1,2,3-cd)pyrene metabolites identified by nano-LC-MS. The exact position of the hydroxyl and ketone substituents on the PAH structure has not been determined. Thus, the figure is a schematic representation of a possible isomeric structure

The presence of PAH inside cells was also detected in *Fusarium solani* (Rafin et al. 2000; Verdin et al. 2005). BaP accumulation in lipid bodies in *F. solani* was later confirmed and a PAHs passive uptake mechanism was suggested (Verdin et al. 2005; Wu et al. 2009; Thion et al. 2012). These authors observed the same blue fluorescence that observed in Fig. 4. Fayeulle et al. (2014) also found BaP fluorescence inside the hyphae and claimed that internal lipid bodies constitute the intracellular storage sites for PAHs, but contrary to previous studies, they demonstrated an energy-dependent uptake process for PAHs.

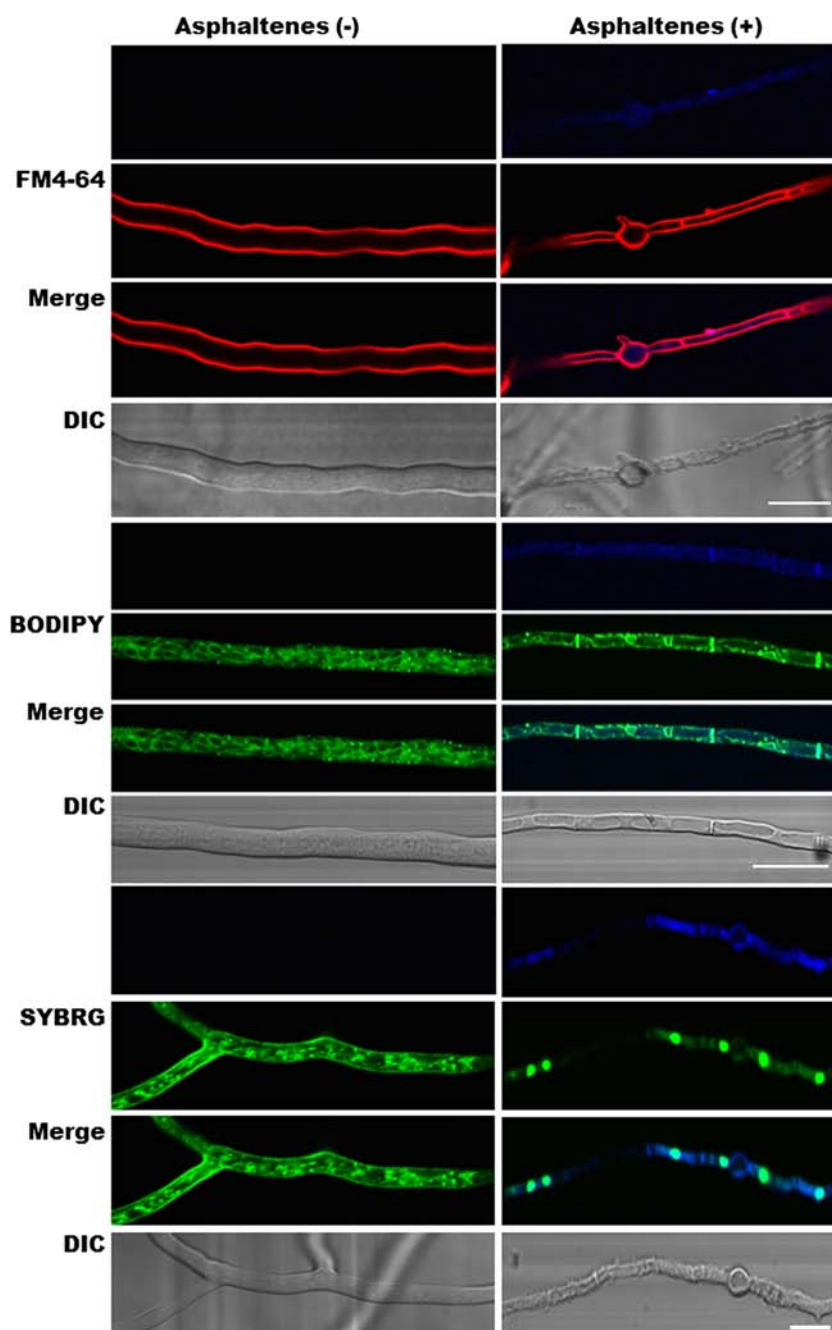
Fungal hyphae from asphaltene and glucose cultures were observed by atomic force microscopy (Fig. 6). Morphological differences on the surface of *N. fischeri* were observed. The hypha of cells from glucose-peptone media showed to be smoother than hyphae grown in asphaltenes as carbon source. Also, larger protuberances on the surface of fungal mycelia from asphaltene cultures were detected. The roughness of each hyphae was also determined. The hyphae grown in asphaltenes showed a roughness average of 22.932 versus

0.112 nm observed in hyphae from glucose-peptone cultures. Differences in the hyphae size were also found. Hyphae from glucose-peptone were 10- μ m width, while hyphae from asphaltenes cultures were only 5- μ m width. Wu et al. (2009), recently found morphological differences on the surface of strain *Aspergillus* sp. BAP14 between the glucose and benzo(a)pyrene (BaP) treatment. Consistently, by AFM they observed that the hyphae grown in glucose were smoother than those from BaP treatment. In addition, they detected many larger protuberances in cells grown in BaP, which might refer to the lipid vesicles as observed by fluorescence microscope after Sudan III staining. This phenomenon had been also reported by Verdin et al. (2005) for *F. solani* cultures with benzo(a)perylene.

Discussion

Neosartorya fischeri has been previously reported as able to grow with asphaltenes as carbon source (Uribe-Alvarez et al. 2011) and it has been estimated that at least 15.5 % of asphaltene were mineralized to CO₂ in fungal cultures. Asphaltene biodegradation has been recently reviewed (Hernández-López et al. 2015a) and from literature, it is known that there are few microorganisms, both bacteria and fungi, able to metabolize this recalcitrant petroleum fraction. Asphaltene composition includes aromatics with very high molecular weight, which are considered recalcitrant to microbial attack. Recalcitrance of PAHs seems to increase directly with the molecular weight (Juhász and Naidu 2000). Microbial metabolism of PAHs containing until three rings (i.e., naphthalene, phenanthrene, anthracene and fluorene) has been extensively studied; however, information about microbial degradation of those PAHs containing more than six benzene rings is scarce (Juhász and Naidu 2000). Benzo(a)pyrene biodegradation, containing five benzene rings, has been extensively studied (Cerniglia and Yang 1984; Verdin et al. 2005; Ullrich and Hofrichter 2007; Fayeulle et al. 2014). In our work, three HMW-PAH, two with six benzene rings and one with seven, have been tested for *N. fischeri* metabolization. The non-ligninolytic fungi *N. fischeri* is able to metabolize benzo(g,h,i)perylene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, and coronene. Other non-ligninolytic fungi such as *Cunninghamella elegans* have been reported as able to metabolize PAHs that range in size from naphthalene to benzo(a)pyrene (two to five aromatic rings) (Sutherland 1992; Pothuluri et al. 1993; Cerniglia et al. 1994); but before this work, scarce information is available on the fungal transformation of HMW-PAHs with more than five aromatic rings. Transformation of HMW-PAHs of various ring sizes, including 6 rings, benzo(g,h,i)perylene was obtained using recombinantly expressed CYP63A2 (Syed et al. 2013). No activity toward the

Fig. 4 Confocal images of the intracellular localization of asphaltenes. Membranous organelles are stained with FM4-64, lipid bodies were stained with BODIPY, and nuclei and mitochondria were stained with SYBR green (SYBRG). Scale bar = 10 μ m



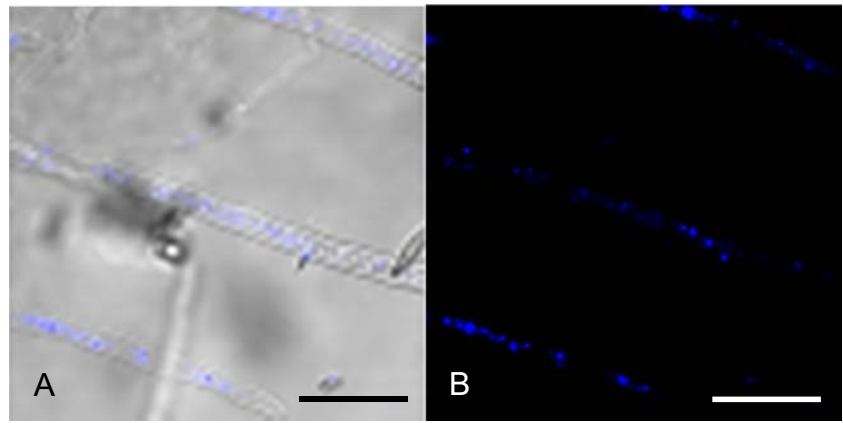
three-ring PAHs was found, suggested that this fungal CYP has a preference for HMW-PAHs. This selectivity could be related to the size of active-site cavity as suggested from modeling and docking estimations (Syed et al. 2013).

FTIR and nLC-MS analyses (Figs. 2, 3, and 4 and S2) clearly showed the production of hydroxylated derivatives from the *N. fischeri* metabolism on HMW-PAHs. Two mechanisms have been proposed for the incorporation of oxygen before aromatic ring cleavage; one involving dioxygenases, mainly in bacterial degradation, and monooxygenases for fungal PAH degradation. Several enzymatic systems could be involved in the fungal metabolism of PAHs, including

intracellular cytochrome P450 and extracellular lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. The initial transformation of PAHs by non-basidiomycetes fungi results in the production of dihydrodiols, phenols, quinones, and dihydrodiol epoxides (Cerniglia and Yang 1984; Cerniglia 1997; Vazquez-Duhalt 1998; Haritash and Kaushik 2009).

N. fischeri, as a non-ligninolytic fungus, does not produce extracellular peroxidases and only a very low laccase-like activity has been detected (Uribe-Alvarez et al. 2011). Thus, it seems that a CYP enzyme is involved in the first oxidation transformation of HMW-PAHs. In addition to the chemical nature of products, this suggestion is supported by the

Fig. 5 Confocal images of the intracellular localization of coronene. **a** Fluorescence at 405 nm. **b** Merge of fluorescence and differential interference contrast (DIC). Scale bar = 10 μm



HMW-PAH transformation by microsomal preparations from cultures in the presence of PAHs, while no activity was found with microsomes from cultures without PAH, suggesting the induction of specific CYPs by the presence of PAH.

Moreover, an analysis of microarray data from comparative expression performed of fungal cells grown either in asphaltenes or in glucose as a sole carbon source, which is available in the Gene Expression Omnibus (GEO) with the number GSE68146 (Hernández-López et al. b), shows three upregulated CYP monooxygenases genes and one flavin monooxygenase gene (Table 2). This microarray data showed

that 287 genes were upregulated when fungi were growth in asphaltenes; meanwhile, 118 were downregulated. A number of 38 of the 287 upregulated genes encoded enzymes, from which 14 were oxidoreductases and 3 of them were identified as cytochrome P450 monooxygenases (CYP) and one as flavin binding monooxygenase that could be involved in the asphaltenes oxidation in *N. fischeri* (Table 2). The Blast2GO tool was used to assign function to each of the genes (Götz et al. 2008). The upregulated genes showed an induction between 2^2 and 2^7 times, and the same criterion was used for downregulated genes (>4 times). This was determined by

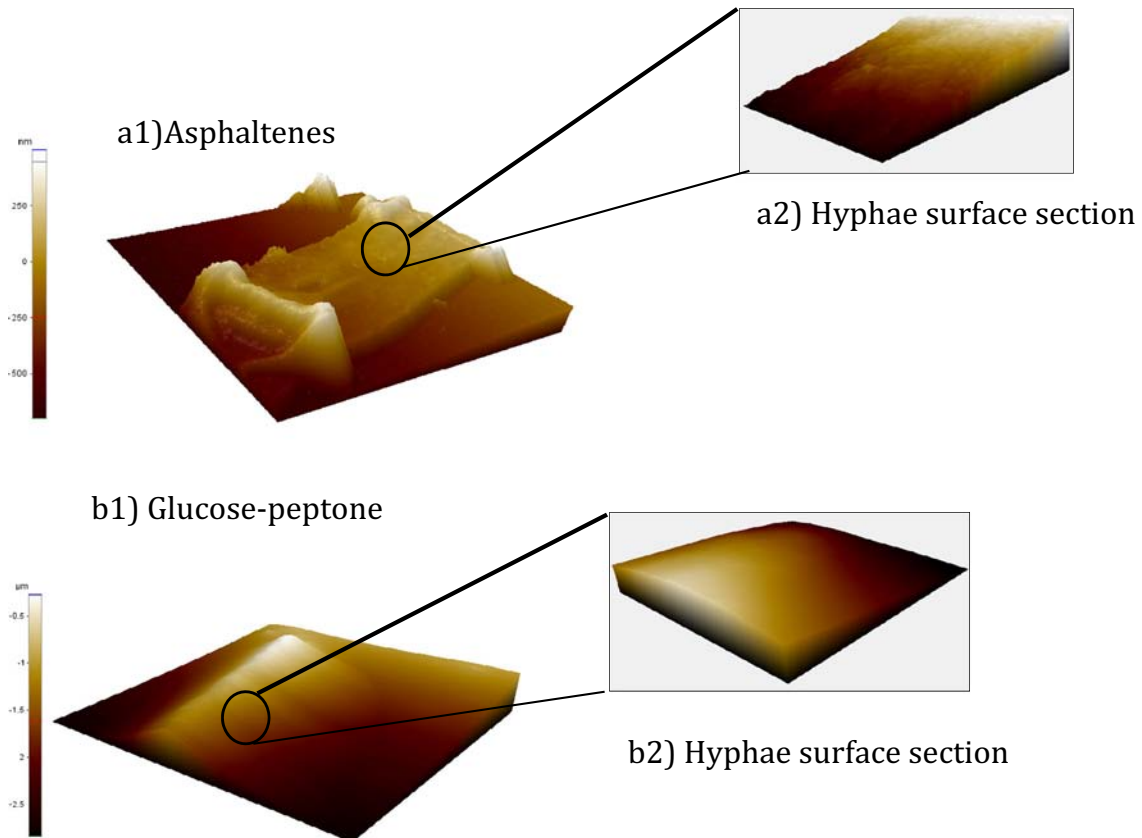


Fig. 6 Atomic force microscopic (AFM) analysis showing morphological differences of *Neosartorya fischeri* hyphae grown in **a** asphaltenes and **b** glucose-peptone: 1 Hyphae, 2 Hyphae surface section

Table 2 Upregulated monooxygenase genes identified from the analysis of differential microarray data of *N. fischeri* grown either in asphaltenes (Asph) or in glucose (Glu) as a sole carbon source

EC code	Name	CYP code	ID	Glu	Asph	Asph/Glu	Log base 2	Fold change
1.14.13.8	Flavin binding monooxygenase-like protein		NFIA_048080	720.7	15,429	21.41	4.42	16
1.14.14.1	Cytochrome P450 alkane	CYP539D8	NFIA_054110	332.8	6553.3	19.69	4.30	16
1.14.14.1	NADPH cytochrome P450	CYP505E1	NFIA_004540	316.5	2086.2	6.59	2.72	8
1.14.14.1	Cytochrome P450	CYP547C2	NFIA_096320	615.1	13,529.5	22.00	4.46	16

The microarray data is available in the Gene Expression Omnibus (GEO) with the number GSE68146

calculating the logarithm base two of the ratio of expression between the two conditions. The conventional practice of setting arbitrary cutoff point is the changing twofold change in gene expression (Doddapaneni and Yadav 2005); however, in this study, we considered differential expression greater than four times.

CYP monooxygenases have been reported to be involved in the fungal biotransformation of dioxins, endocrine disruptors, pesticides, and PAHs (Masaphy et al. 1996; Jauregui et al. 2003; Subramanian and Yadav 2009; Kasai et al. 2010; Cerniglia and Sutherland 2010). Despite several decades of research demonstrating involvement of CYP monooxygenation reactions in fungal metabolism of PAHs, it is until recently that a specific CYP responsible for oxidation of these compounds has been described (Syed et al. 2013). From genomic P450 microarray screening, six PAH-responsive CYP genes inducible by PAHs were identified (Syed et al. 2010). Specifically, the role of CYP63A2 from *Ph. chrysosporium* on the transformation the six-ring PAH benzo(g,h,i)perylene was clearly demonstrated showing specificity for HMW-PAH (Syed et al. 2013).

Substrate-inducible CYP-mediated reactions have been reported in filamentous fungi during detoxification of environmental low and medium molecular weight PAHs (da Silva et al. 2004). In addition, the CYP monooxygenase participation in the transformation of PAHs has been described in fungi lacking extracellular oxidoreductases (Cerniglia and Sutherland 2010). The role of CYP has been also investigated in vivo and in vitro using CYP inhibition during phenanthrene metabolism in *Ph. chrysosporium* and *Pestalotiopsis* sp. Piperonyl butoxide, a well-known CYP inhibitor, can significantly inhibit the phenanthrene transformation to trans-9,10-dihydrodiol and asphaltene degradation indicating the important role of CYP catalyzed oxidation in the initial metabolism of PAH (Yanto and Tachibana 2014; Ning et al. 2010).

On the other hand, the flavin monooxygenases (FMOs) are a family of NADPH- and oxygen-dependent enzymes that readily N- and S-oxygenate a diverse group of xenobiotics and certain endogenous amines. Each isoform demonstrates species- and tissue-specific expression patterns as well as distinguishable but overlapping substrate specificities with other FMOs and cytochrome P450s (Furnes and Schlenk 2004).

The white-rot basidiomycete *Ph. chrysosporium* was investigated in its cellular responses against vanillin. Based upon a proteomic survey, it was demonstrated that two flavin-containing monooxygenases (PcFMO1 and PcFMO2) are translationally upregulated in response to exogenous addition of vanillin. PcFMO1 was cloned and heterologously expressed in *Escherichia coli* in order to elucidate their catalytic functions. Cloned bacteria showed activity against monocyclic phenols such as phenol, hydroquinone, and 4-chlorophenol. Interestingly, the product from hydroquinone was identified as 1,2,4-trihydroxybenzene, an important intermediate in a metabolic pathway of aromatic compounds in which the aromatic ring can be further cleaved by fungal dioxygenases for mineralization. The authors suggest that the *ortho* cleavage pathway of phenolic compounds would presumably be associated with PcFMO1 (Nakamura et al. 2012).

Our results strongly suggest that a CYP is involved in the metabolic oxidation of HMW-PAHs and asphaltenes. We have identified three CYP monooxygenases candidates that could be involved in the asphaltene oxidation by *N. fischeri* (Table 2). These monooxygenase genes showed a significant induction (between 8- and 16-fold) when the fungus was cultured in the presence of asphaltenes. The induction of CYPs encoding genes in response to the presence of different PAHs, and the role of CYP from *Ph. chrysosporium* on the PAH biotransformation, including six-ring PAH has been reported (Syed et al. 2010, 2011, 2013).

Finally, the CYP transformation of HMW-PAHs implicates an intracellular metabolism. Thus, cell uptake and transport mechanisms should be involved. Taking advantage of the intrinsic aromatic fluorescence of asphaltenes and HMW-PAHs, we performed laser scanning confocal microscopy, showing an intense fluorescence in fungal hyphae when grown in asphaltenes (Fig. 5) and in coronene (Fig. 6). This observation strongly suggests a fungal asphaltene uptake. Verdin et al. (2005) observed the same blue fluorescence in *F. solani* grown with benzo(a)pyrene, and proposed a passive mechanism of uptake. On the other hand, Fayeulle et al. (2014) found benzo(a)pyrene fluorescence inside the hyphae, and suggested that the lipid bodies constitute the intracellular storage sites of PAHs with an energy-dependent uptake.

Thus, we can conclude so far that *N. fischeri* is able to grow in a medium containing HMW-PAHs (six and seven rings) as sole source of carbon and energy. The metabolites produced during the biodegradation include hydroxyl and ketone derivatives. In addition to the chemical nature of metabolic products, the involvement of CYP enzymatic system is supported by (i) the fact that the highly hydrophobic substrates are internalized in the fungal hyphae cells, (ii) at least three CYP genes are upregulated when the fungus is growing with aromatic hydrocarbons as sole source of carbon, and (iii) the microsomal preparations from cultures in the presence of PAH are able to oxidize HMW-PAHs.

Acknowledgments We thank Dr. Katrin Quester for her technical assistance. We thank to Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, José Luis Santillán Torres, and Jorge Ramírez for technical assistance in the microarray determinations. We thank Gerardo Coello, Gustavo Corral and Ana Patricia Gómez for genArise software assistance, and Olga A. Callejas for confocal microscopy. This research was funded by the Mexican Council of Science and Technology (CONACyT)

Compliance with ethical standards

Funding This research was funded by the Mexican Council of Science and Technology (SEP-CONACyT 165633).

Conflict of interest All authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

Baillie GS, Hitchcock CA, Burnet FR (1996) Increased cytochrome P-450 activity in *Aspergillus fumigatus* after xenobiotic exposure. *Med Mycol* 34:341–347

Barajas-Aceves M, Hassan M, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R (2002) Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *J Microbiol Methods* 50:227–236

Bertrand JC, Rambeloarisoa E, Rontani JF, Giusti G, Mattei G (1983) Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol Lett* 5:567–572

Cerniglia CE (1997) Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:324–333

Cerniglia CE, Sutherland JB (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis K (ed) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 2079–2110

Cerniglia CE, Yang SK (1984) Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol* 47:119–124

Cerniglia CE, Gibson DT, Dodge RH (1994) Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol* 60:3931–3938

da Silva M, Esposito E, Moody JD, Canhos VP, Cerniglia CE (2004) Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp. *Chemosphere* 57:943–952

Das N, Chandran P (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* 2011:1–13

Doddapaneni H, Yadav JS (2005) Microarray-based global differential expression profiling of P450 monooxygenases and regulatory proteins for signal transduction pathways in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Mol Genet Genomic Med* 274: 454–466

Fayeulle A, Veignie E, Slomianny C, Dewailly E, Munc J-C, Rafin C (2014) Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. *Environ Sci Pollut Res* 21:3515–3523

Fedorak PM, Semple KM, Vazquez-Duhalt R, Westlake DWS (1993) Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb Technol* 15:429–437

Furnes B, Schlenk D (2004) Evaluation of xenobiotic N- and S-oxidation by variant flavin containing monooxygenase 1 (FMO1) enzymes. *Toxicol Sci* 78:196–203

Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talón M, Dopazo J, Conesa A (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* 36:3420–3435

Haritash AK, Kaushik CP (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater* 169:1–15

Hernández-López EL, Ayala M, Vazquez-Duhalt R (2015a) Microbial and enzymatic biotransformations of asphaltenes. *Pet Sci Technol* 33:1019–1027

Hernández-López EL, Ramírez-Puebla ST, Vazquez-Duhalt R (2015b) Microarray analysis of *Neosartorya fischeri* using different carbon sources, petroleum asphaltenes and glucose-peptone. *Genomic Data* 5:235–237

Jauregui J, Valderrama B, Albores A, Vazquez-Duhalt R (2003) Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation* 14:397–406

Juhasz AL, Naidu R (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad* 45: 57–88

Kasai N, Ikushiro S-I, Shinkyo R, Yasuda K, Hirose S, Arisawa A, Ichinose H, Wariishi H, Sakaki T (2010) Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:773–780

Lacotte DJ, Mille G, Acquaviva M, Bertand JC (1996) Arabian light 150 asphaltene biotransformation with n-alkanes as co-substrates. *Chemosphere* 32:1755–1761

Marín-Spiotta E, Gruley KE, Crawford J, Atkinson EE, Miesel JR, Greene S, Cardona-Correa C, Spencer RGM (2013) Paradigm shift in soil organic matter research affect interpretations of aquatic carbon cycling: transcending disciplinary and ecosystem boundaries. *Biogeochemistry* 117:279–297

Masaphy S, Levanon D, Henis Y, Venkateswarlu K, Kelly SL (1996) Evidence for cytochrome P-450 and P-450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett* 135:51–55

Mullins OC (2011) The asphaltenes. *Annu Rev Anal Chem* 4:393–418

Nakamura T, Ichinose H, Wariishi H (2012) Flavins-containing monooxygenases from *Phanerochaete chrysosporium* responsible for fungal metabolism of phenolic compounds. *Biodegradation* 23: 343–350

Ning D, Wang H, Ding C, Lu H (2010) Novel evidence of cytochrome P450-catalyzed oxidation of phenanthrene in *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic conditions. *Biodegradation* 21: 889–901

Pothuluri JV, Freeman JP, Evans FE, Cerniglia CE (1993) Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol* 59:1977–1980

- Rafin C, Potin O, Veignie E, Lounes-Hadj AS, Sancholle M (2000) Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, *Fusarium solani*. *Polycycl Aromat Compd* 21:311–329
- Rontani JF, Bossier-Joulak F, Rambeloarisoa E, Bertrand JC, Giusti G, Faure R (1985) Analytical study of Astart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere* 14:1413–1422
- Scotti R, Montanari L (1998) Molecular structure and intermolecular interaction of asphaltenes by FT-IR, NMR, EPR. In: Mullins OC, Sheu EY (eds) *Structures and dynamics of asphaltenes*. Plenum, New York, pp 79–113
- Subramanian V, Yadav JS (2009) Role of P450 monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 75:5570–5580
- Sutherland JB (1992) Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J Ind Microbiol* 9:53–61
- Syed K, Doddapaneni H, Subramanian V, Lam YW, Yadav JS (2010) Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochem Biophys Res Commun* 399:492–497
- Syed K, Kattamuri C, Thompson TB, Yadav JS (2011) Cytochrome b5 reductase–cytochrome b5 as an active P450 redox enzyme system in *Phanerochaete chrysosporium*: atypical properties and in vivo evidence of electron transfer capability to CYP63A2. *Arch Biochem Biophys* 509:26–32
- Syed K, Porollo A, Lam YW, Grimmett PE, Yadava JS (2013) CYP63A2, a catalytically versatile fungal P450 monooxygenase capable of oxidizing higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons, alkylphenols, and alkanes. *Appl Environ Microbiol* 79:2692–2702
- Thion C, Cébron A, Beguiristain T, Leyval C (2012) PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures. *Int Biodeterior Biodegrad* 68:28–35
- Ullrich R, Hofrichter M (2007) Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell Mol Life Sci* 64:271–293
- Uribe-Alvarez C, Ayala M, Perezgasga L, Naranjo L, Urbina H, Vazquez-Duhalt R (2011) First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microb Biotechnol* 4:663–672
- Vazquez-Duhalt R (1998) Cytochrome c as a biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym* 7:241–249
- Verdin A, Lounès-Hadj Sahraoui A, Newsam R, Robinson G, Durand R (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ Pollut* 133:283–291
- Wu Y-R, He T-T, Lun J-S, Maskaoui K, Huang T-W, Hu Z (2009) Removal of benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus sp.* BAP14. *World J Microbiol Biotechnol* 25:1395–1401
- Yanto DHY, Tachibana S (2013) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis sp.* NG007. *Int Biodeterior Biodegrad* 85:438–450
- Yanto DHY, Tachibana S (2014) Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. *J Hazard Mater* 278:454–463



Data in Brief

Microarray analysis of *Neosartorya fischeri* using different carbon sources, petroleum asphaltenes and glucose-peptone

Edna L. Hernández-López^b, Shamayim T. Ramírez-Puebla^c, Rafael Vazquez-Duhalt^{a,*}^a Centro de Nanociencias y Nanotecnología, UNAM, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, Baja California 22860, Mexico^b Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001 Cuernavaca, Mor., Mexico^c Centro de Ciencias Genómicas UNAM, Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Mor., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 May 2015

Accepted 1 June 2015

Available online 14 June 2015

Keywords:

Asphaltenes

Neosartorya

Cytochrome P450

Biotransformation

ABSTRACT

Asphaltenes are considered as the most recalcitrant petroleum fraction and represent a big problem for the recovery, separation and processing of heavy oils and bitumens. *Neosartorya fischeri* is a saprophytic fungus that is able to grow using asphaltenes as the sole carbon source [1].

We performed transcription profiling using a custom designed microarray with the complete genome from *N. fischeri* NRRL 181 in order to identify genes related to the transformation of asphaltenes [1]. Data analysis was performed using the genArise software. Results showed that 287 genes were up-regulated and 118 were down-regulated.

Here we describe experimental procedures and methods about our dataset (NCBI GEO accession number GSE68146) and describe the data analysis to identify different expression levels in *N. fischeri* using this recalcitrant carbon source.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Specifications	
Organism/cell line/tissue	<i>Neosartorya fischeri/mycelium</i>
Sex	N/A
Sequencer or array type	MYcroarray_CAT_Neosartorya-fischeri-NRRL181_40K-3rep-V1
Data format	Raw data: TXT files, normalized data: EXCEL files
Experimental factors	<i>Neosartorya fischeri</i> grown in glucose-peptone vs. <i>Neosartorya fischeri</i> grown in petroleum asphaltenes
Experimental features	Whole genome analysis to identify genes differentially expressed
Consent	N/A
Sample source location	Natural asphalt lake in Orinoco oil belt of Venezuela

Direct link to deposited data

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE68146>.

Experimental design, materials and methods

Fungal culture conditions and RNA isolation

Neosartorya fischeri strain ELH was cultured in Saboraud (40 g/L glucose, 10 g/L peptone) or modified Czapek minimal medium without original carbon source (4 g/L NaNO₃, 2 g/L K₂HPO₄, 1 g/L MgSO₄·7H₂O,

Table 1

GO classifications of the annotated genes. Annotated genes were separated in biological process, molecular function and Cellular component categories. Number of annotated genes are shown in brackets.

Upregulated	Downregulated
<i>Biological process</i>	
Localization (9)	Signaling (3)
Biological regulation (10)	Response to stimulus (8)
Cellular process (51)	Metabolic process (44)
Metabolic process (62)	Localization (6)
	Biological regulation (10)
	Cellular component organization or biogenesis (9)
<i>Molecular function</i>	
Binding (49)	Transporter activity (4)
Transporter activity (6)	Structural molecule activity (4)
Catalytic activity (56)	Nucleic acid binding transcription factor activity (7)
	Molecular transducer activity (2)
	Enzyme regulator activity (1)
	Catalytic activity (30)
	Antioxidant activity (1)
	Binding (37)
<i>Cellular component</i>	
Organelle (18)	Organelle (19)
Cell (39)	Membrane enclosed lumen (8)
Macromolecular complex (13)	Membrane (9)
	Macromolecular complex (17)
	Cell (34)
	Extracellular region (3)

* Corresponding author.

1 g/L KCl, 0.02 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, trace element 1 mL/L) supplemented with asphaltene (400 mg/L). The cultures were incubated at 37 °C and shaken at 100 rpm for 24 h or 17 days for Saboraud and Czapek, respectively. The mycelium was frozen and disrupted with liquid nitrogen. The RNA extraction was performed using a TRI reagent kit (Sigma). RNA quality was tested in agarose gel.

Probe preparation and hybridization to arrays

For cDNA synthesis dUTP-Cy3 or dUTP-Cy5 was incorporated for each different growth condition, employing the CyScribe First-Strand cDNA labeling kit (Amersham). Incorporation of fluorophore was analyzed by using the absorbance at 555 nm for Cy3 and 655 nm for Cy5. Equal quantities of labeled cDNA were hybridized using hybridization solution UniHyb (TeleChem International INC.), to the arrays for 14 h at 42 °C.

Data acquisition and analysis

Acquisition and quantification of array images were performed in GenePix 4100A with GenePix software by Molecular Devices. All images were captured using optimal laser power and 5 μm resolution. For

each spot the Cy3 and Cy5 density mean value and the Cy3 and Cy5 background mean value were calculated with software ArrayPro Analyzer from Media Cybernetics.

Microarray data analysis was performed using genArise software, developed by the Computing Unit of the Institute of Cellular Physiology of UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). This software carry out background correction, Lowess normalization, intensity filter, analysis of replicates and selection of differentially expressed genes to identify those that show accurate evidence of differential expression by calculating an intensity-dependent z-score. It uses a sliding window algorithm to calculate the mean and standard deviation within a window surrounding each data point, and define a z-score where z measures the number of standard deviations a data point is from the mean.

$$z_i = [R_i - \text{mean}(R)] / \text{sd}(R)$$

where z_i is the z-score for each element, R_i is the log-ratio for each element, and $\text{sd}(R)$ is the standard deviation of the log-ratio. With this criterion, the elements with a z-score > 2 standard deviations would be the significantly differentially expressed genes.

In order to perform functional annotation of the genes, sequences were aligned using the blast2go tool [2].

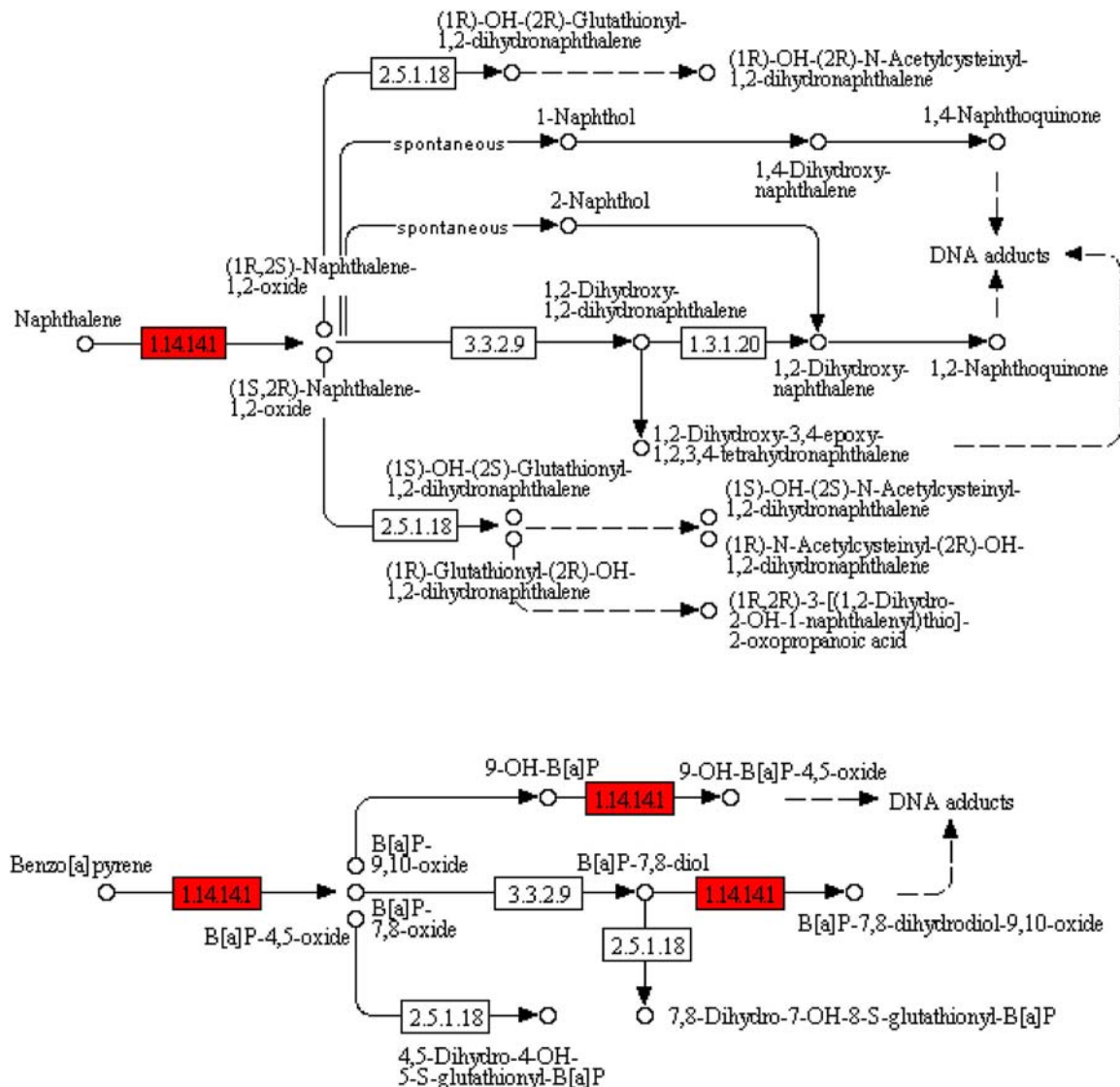


Fig. 1. KEGG pathway reconstructions of metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Up-regulated genes coding for monooxygenase enzyme are shown in red.

Discussion

405 genes were differentially expressed (z -score > 2) from which 287 were up-regulated and 118 down-regulated. We obtain GO functional annotation for 203 genes. Results are summarized in Table 1.

41 sequences were encoded for enzymes from which 10 corresponded to oxidoreductases and 4 specifically for monooxygenases, which had been related to aromatic hydrocarbon degradation [3]. We used KEGG annotation in order to find pathway annotation of up-regulated genes (Fig. 1).

References

- [1] C. Uribe-Alvarez, M. Ayala, L. Perezgasga, L. Naranjo, H. Urbina, R. Vazquez-Duhalt, First evidence of mineralization of petroleum asphaltene by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microb. Biotechnol.* 4 (5) (2011) 663–672.
- [2] S. Götz, J.M. Garcia-Gomez, J. Terol, T.D. Williams, S.H. Nagaraj, M.J. Nueda, M. Robles, M.T., J. Dopazo, A.A. Conesa, High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res.* 36 (10) (2008) 3420–3435.
- [3] H. Ichinose, Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s. *Biol. Pharm. Bull.* 35 (6) (2012) 833–837.

Microbial and Enzymatic Biotransformations of Asphaltenes

E. L. Hernández-López,¹ M. Ayala,¹ and R. Vazquez-Duhalt²

¹*Institute of Biotechnology, UNAM, Cuernavaca, Morelos, Mexico*

²*Center for Nanosciences and Nanotechnology, UNAM, Ensenada, Baja California, Mexico*

Asphaltenes are considered the most recalcitrant fraction of oils. Nevertheless, there are reports with rigorous experimental procedures that clearly demonstrate the capacity of enzymes and few microorganisms to transform asphaltenes. These microorganisms, fungi and bacteria, may contain a unique or very versatile enzymatic system that allows the transformation and mineralization of the highly complex asphaltene molecules. For enzymatic reactions, the biotransformation may occur only when the asphaltenes and the enzyme are in the same phase, reducing the mass transfer limitations. In this work, literature on the biotransformations of asphaltene fraction is critically reviewed.

Keywords: asphaltenes, biodegradation, biotransformation, enzymatic transformation

1. INTRODUCTION

Asphaltenes are present in most petroleum materials, and in all heavy oils and bitumens from oil sands. This material is defined by solubility as the components that dissolve in toluene and precipitate from crude oil in n-alkane solvents (either n-pentane or n-heptane). The asphaltene concentration in a light crude oil may be less than 1%, while the concentration in heavy bitumen can be more than 20% of total weight. The low solubility of the asphaltene fraction poses challenges during the production and processing of petroleum.

The molecular nature of asphaltenes from oils and coals has been the subject of intensive research. The analytical and spectroscopic techniques only give the average characteristics of the asphaltene fraction, which is composed of a variety of complex and chemically diverse aromatic molecules, surrounded and held together by aliphatic chains and heterogroups. These molecules differ significantly in their chemical characteristics, such as molecular weight, aromaticity, alkyl-substitution of functional groups, heteroatoms, and metal content, according to their origin. Each analytical technique is useful for acquiring information about a particular aspect of the asphaltenes, but it is necessary to integrate the results of more than one technique to draw general conclusions (Scotti and Montanari, 1998).

The molecular weight of asphaltenes has been a controversy over 20 years. Several measurements have produced values that differ by a factor of 10 or more. Results from ionization mass spectroscopy suggest a molecular weight in the range of 700 Da, whereas vapor pressure osmometry for the same asphaltene indicates a larger molecular weight (i.e., 4000 Da). The molecular weights obtained by vapor pressure osmometry were explained by aggregation of asphaltene molecules, present at

Address correspondence to Rafael Vazquez-Duhalt, Center for Nanosciences and Nanotechnology UNAM, Km. 103 carretera Tijuana-Ensenada, Ensenada, Baja California 22860, Mexico. E-mail: rvd@cnyn.unam.mx

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/lpet.

TABLE 1
Molecular Weight or Molecular Size of Asphaltenes Obtained With Different Analytical Techniques (Modified from Akbarzadeh et al., 2007, copyright Schlumberger. Used with permission.)

<i>Analytical Method</i>	<i>Molecular Weight or Molecular Size</i>	<i>Reference</i>
Field-ionization mass spectrometry (FI-MS)	800 Da	Boduszynski, 1981
Electrospray ionization, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI FT-ICR MS)	Most 400–800 Da, Range 300–1400 Da	Rodgers and Marshall, 2007
Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry (APPI MS)	Average 750 Da Range 400–1200 Da	Merdrignac et al., 2004
Field-desorption/field ionization mass spectrometry (FD-FI MS)	Average 1000 Da, with a broad distribution	Qian et al., 2007
Laser desorption ionization (LDI)	800–1000 Da	Hortal et al., 2006
Time-resolved fluorescence depolarization (TRFD)	~2 nm diameter corresponding to 750 Da, Range 500–1,000 Da	Groenzin and Mullins, 2000
Nuclear magnetic diffusion	~2.6 nm diameter	Freed et al., 2007
Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)	~2.4 nm diameter corresponding to 750 Da. Smaller for coal asphaltenes.	Andrews et al., 2006
Taylor dispersion diffusion	~1.4 nm diameter for coal asphaltenes	Wargadalam et al., 2002

the concentrations used during the measurements. This aggregation tendency of asphaltenes also explains the molecular weight as high as 10,000 Da obtained by molecular exclusion chromatography. On the other hand, desorption mass spectroscopy gave an average molecular weight of 400 Da (range of about 200–600 Da) more or less in accordance with ionization mass spectroscopy (Groenzin and Mullins, 2000). Thus, depending on the concentration many of the observed properties of asphaltenes vary. Broadly speaking, the aggregation state of asphaltenes is thought to evolve from single molecules (~1.5 nm) below 100 mg/L, to nanoaggregates (~2 nm) of around 10 asphaltene molecules at concentrations ranging from 100 mg/L to approximately 3 g/L; above 3 g/L, clusters (from 6 to less than 30 nm) of several nanoaggregates may form, its size depending not only on concentration but also on other variables as well, such as temperature (Mullins, 2011). Table 1 shows the molecular weight and molecular size obtained with different analytical techniques.

If the molecular weight of asphaltenes has been a difficult issue to resolve, the determination of the chemical structure is still an unresolved issue due to the diversity of molecules present in the asphaltene fraction. Although the set of chemical groups constituting the asphaltenes, such as the number of fused aromatic rings, aliphatic chains length, heteroatoms and several functional groups, has been elucidated, the fact that asphaltenes are a population of hundreds of chemically diverse molecules hampers the definition of a precise, single chemical structure. The challenging task of classifying and quantifying the distribution of chemical structures is also limited by the unavailability of appropriate analytical tools for these complex structures, limiting the knowledge on the structure-function relationship (Speight, 1999). However, significant advances have been made, particularly in the last decade, as we summarize below.

Twenty years ago, Strausz et al. (1992) reported a model of an asphaltene molecule after the analysis of asphaltenes from oil sands deposits in Athabasca, Canada. According to their hypothetical model (Figure 1A) the proposed chemical formula is $C_{420}H_{496}N_6S_{14}O_4$, with a molecular weight of 6191 Da, a value supported by the molecular weight of 6000 Da experimentally obtained by vapor pressure osmometry. Now it is known that this molecular weight represents the weight of a micelle aggregate instead of a single molecule (Strausz et al., 1992).

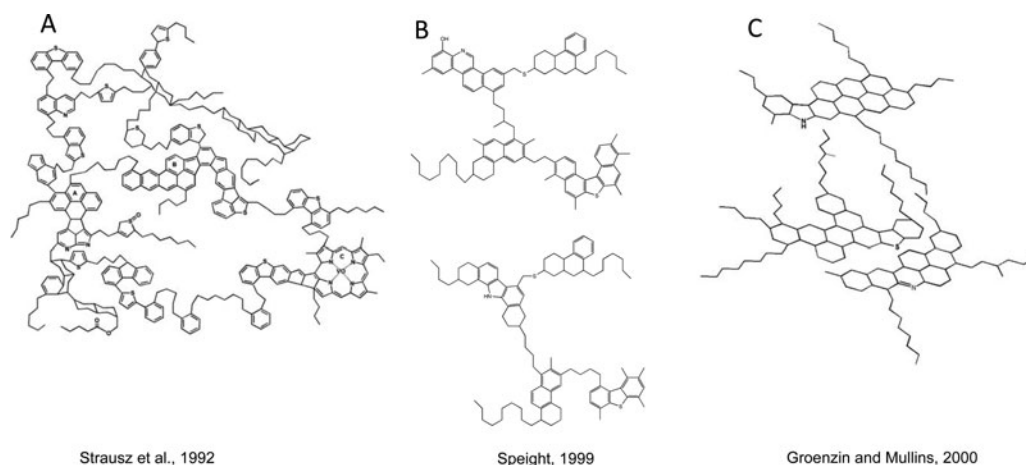


FIGURE 1 Hypothetical structure of a molecule of asphaltene according different authors: (A) Strausz et al. (1992). © Elsevier. Reproduced by permission of Elsevier. Permission to reuse must be obtained from the rightsholder. (B) Speight (1999). © 1999 From *The chemistry and technology of petroleum* by James Speight. Reproduced by permission of Taylor and Francis Group, LLC, a division of Informa plc. (C) Groenzin and Mullins (2000). Reprinted with permission from H. Groenzin and O. C. Mullins, *Molecular Size and Structure of Asphaltenes from Various Sources, Energy & Fuels*, 14 (3): 677–684. Copyright 2000, American Chemical Society. A–C represent aromatic larger aggregates and the remaining structural units are based on experimental data.

Several years later, spectroscopic studies led by Speight et al. indicated the presence of carbazole nitrogen and amide nitrogen. In addition, nonaqueous potentiometric titration confirmed the presence of different types of nitrogen and also provided evidence for the presence of pyridine and indole nitrogens in asphaltenes. Oxygen fractions include phenol oxygen, polyhydroxyphenols, quinones, and amide oxygen. This evidence was indicative of a much more open structure. According to these investigations a key structural feature of petroleum asphaltenes is the occurrence of small polynuclear aromatic systems, benzothiophenes, dibenzothiophenes, and *n*-paraffins within the asphaltene molecule (Figure 1B; Speight, 1999).

Finally, according to recent studies by Groenzin and Mullins (2000), an average asphaltene molecular weight of 750 Da was proposed, as well as a series of molecular structures. According to these asphaltene structures, the asphaltene molecule has an average of seven fused aromatic rings, ranging from 4 to 10, with a molecular diameter between 10 and 20 Å (Figure 1C; Groenzin and Mullins, 1999; Mullins, 2011). The fused aromatic ring system bears alkyl substituents, possessing what has been called an island molecular architecture.

For biodegradation studies, asphaltenes are usually precipitated from crude oil using *n*-pentane or *n*-heptane. The selected solvent yields slightly different fractions: *n*-pentane insolubles, which are soluble in *n*-heptane may be described as light asphaltenes (Indo et al., 2009; Mullins, 2011). The composition of the resultant fraction may vary depending on the precipitation and recovery procedure, as has been observed by many authors (Ancheyta et al., 2002; Luo et al., 2010). Asphaltenes may interact, albeit not as strongly as thought before, with other components of crude oil, such as resins; resins also bear an aromatic nature, although the fused ring system is smaller, the heteroatom content is lower and the fraction in general is not recalcitrant. Thus, the procedure during asphaltene purification is crucial to increase the extent to which these other components are eliminated.

2. BIODEGRADATION

Biodegradation of hydrocarbons by microorganisms represents the main mechanism by which petroleum and other hydrocarbon pollutants are eliminated from the environment (Margesin and Schiner, 2001). Biodegradation of petroleum is a dynamic process, not properly characterized by measuring total residue and best understood if the fate of component fractions is monitored during microbial degradation. The results of several studies indicated that the components of petroleum, although may be degraded simultaneously, are degraded at different rates (Walker et al., 1976). One of the important factors that limit biodegradation of oil pollutants in the environment is their limited availability to microorganisms. Petroleum hydrocarbon compounds, due to its hydrophobic nature, bind to soil components; this phenomenon reduces the removal or degradation of petroleum components. Hydrocarbons differ in their susceptibility to microbial attack and the microbial degradation can be generally ranked as follows: linear alkanes > branched alkanes > small aromatics > cyclic alkanes > polycyclic aromatic > resins > asphaltenes. The asphaltenes are considered the most recalcitrant fraction of oils, and some compounds, such as the high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), may not be degraded at all (Das and Chandran 2011).

In the case of asphaltenes, the complex nature of the fraction poses challenges to the biodegradation studies. Unfortunately, in the majority of studies the extent of asphaltene degradation has been determined using gravimetric measurements, without considering the effect of the presence of oxidized molecules or the production of biosurfactants in the precipitation behavior of the asphaltene fraction.

2.1 Degradation by Microbial Consortia

Some early studies reported that the asphaltenic fraction did not support bacterial growth, and no changes in asphaltene content were found after bioconversion of heavy oils and asphaltenes (Lacotte et al., 1996; Thouand et al., 1999). Thirty years ago, only few reports on oil biodegradation claimed the degradation of the asphaltene fraction by mixed bacteria (Bertrand et al., 1983; Rontani et al., 1985). However, none of these reports described the analytical results of extractable materials recovered from appropriate sterile controls.

In environmental microbiology it is well known that the biodegradation of recalcitrant compounds is faster and more effective with microbial consortium when compared with the use of single, pure, and axenic microbial cultures (Leahy and Colwell, 1990; Das and Chandran, 2011). In addition to be more robust to environmental fluctuations, multiple interacting microbial populations (consortia) can perform more complicated functions that are difficult or even impossible for individual strains or species. The capacity to mineralize otherwise recalcitrant compounds is based on cometabolism, due to the richest enzymatic diversity than allow consortia to biodegrade recalcitrant compounds (Brenner et al., 2008). Thus, in the presence of a certain biodegradable substrate, another compound may be incidentally transformed by the enzymatic machinery of the growing microorganism, generating a product that may be susceptible to further degradation or even mineralization by a different microbial species present in the consortium.

In 1989, Pendrys studied the bacteria responsible for the biodegradation of an asphalt cement. From this enriched mixed culture, they isolated aerobic bacteria belonging to five genera (*Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Flavimonas* sp., and *Flavobacterium* sp.). The preferential biodegradation was evaluated obtaining different fractions of asphalt using chromatographic techniques. The polar aromatic and asphaltene fraction were able to keep certain viability in the bacterial culture, but no more than 4×10^4 CFU/mL were detected, indicating poor bacterial growth sustainability. It is important to point out that the asphalt cement is rich in asphaltenes but also contains other petroleum fractions (Pendrys, 1989).

Later on, a microbial consortium isolated from highly polluted refinery effluents was tested for cometabolization of asphaltenes, in the presence of n-alkanes (Lacotte et al., 1996). The authors reported a weight loss in the asphaltene fraction after microbial culture. However, these results should be considered cautiously because the asphaltene content was determined gravimetrically after n-alkane precipitation; a solubilization of hydrocarbons due to the production of surfactants during bacterial growth and the disruption of asphaltenic aggregates could occur. Therefore, most of the asphaltene losses during microbial activity could be related to nonmetabolizing, abiotic losses.

More recently, Pineda-Flores et al. (2004) reported a microbial consortium capable of mineralizing asphaltenes. The enrichment system contained mineral medium supplied with asphaltenes as energy and carbon source. The reported respiration of the microbial consortium using asphaltenes as a sole carbon source was 800 $\mu\text{mol CO}_2$ in 13 days. Nevertheless, the two control experiments, cultures without asphaltenes and noninoculated cultures showed the production of 200 and 300 $\mu\text{mol CO}_2$, respectively. The inoculum for these experiments came from cultures growing in crude oil, thus the high CO_2 production in the control experiments could be attributed to the presence of residues from lighter petroleum fractions in the inoculum.

On the other hand, the highest asphaltene degradation with a microbial consortium was reported by Tavassoli et al. (2012). The consortium was isolated from an Iranian oil and enriched during asphaltene biodegradation. From 25 identified strains, five were selected based on their higher capacity for asphaltene degradation as a sole carbon and energy source. The strains were identified as *Pseudomonas* spp and four *Bacillus* spp (*B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. cereus*, and *B. firmus*; Tavassoli et al., 2012).

Recently, Jahromi et al. (2014) studied the biodegradability of asphaltenes using four different consortia. Unfortunately, they quantified the asphaltenes biodegradation by UV absorption in toluene solutions at 280 nm, before and after microbial growth. Even if a standard curve of known amounts of asphaltenes in toluene was used, the fact that the degradation products or other microbial metabolites can alter the estimation makes this yet simple method not appropriate for estimating asphaltene degradation. Moreover, the growth medium contained yeast extract as nitrogen source, but could also provide carbon to the consortium (Jahromi et al., 2014).

2.2 Degradation by Axenic Bacteria

There are very few reports on asphaltene degradation by pure and axenic bacteria. However, some works have reported pure microbial strains as able to degrade asphaltenes. In these cases, again most studies used gravimetric determination to evaluate the asphaltene degradation.

Recently, axenic halotolerant (7.5–10% NaCl) thermophilic (45–50°C) bacteria strains from oil-polluted water were isolated from enriched cultures with asphaltenes as sole carbon source (Ali et al., 2012). Several strains were selected according to their capacity to degrade asphaltenes, which was evaluated by gravimetric losses. A 34–42% decrease in the average molecular weight determined by GPC of asphaltenes recovered from the culture was observed, while the IR spectra data suggested that the bacteria were capable of oxidizing the abundant thioether linkages of macromolecular structures to sulfoxide and sulfone functions. Among three isolates the strain Asph 2 recorded the highest asphaltene biodegradation rates reaching 83%, 89%, and 96% after 7, 14, and 21 days of incubation, respectively (Ali et al., 2014).

On the other hand, Lavania et al. (2012) isolated a bacteria strain from a sea-buried oil pipeline located on the western coast of India. The isolate was identified as *Garciaella petrolearia* by 16S rRNA full gene sequencing. The degradation ability of this strain to grow in different petroleum fractions (aliphatic, aromatic, and asphaltenes) was determined over a period of 30 days under anaerobic conditions. Unexpectedly, the degradation of the asphaltene fraction was higher (55%) than for the aromatic (45%) and the aliphatic (25%) fraction.

Finally, many consortium studies have allowed the isolation of bacterial strains with a potential to degrade asphaltenes. *Acinetobacter calcoaceticus* was isolated from a consortium growing in asphalt cement. The bacterial growth produced visible deterioration of asphalt cement beyond the perimeter of the colony. *Pseudomonas aeruginosa* degraded asphalt as well, but this degradation was localized to the area that was covered by the colony. Nevertheless, in this report no appropriate quantification of asphaltenes degradation was performed (Pendry, 1989).

2.3 Degradation by Fungi

Although most studies on hydrocarbon biodegradation and specifically on asphaltenes have been performed with bacteria, there are some reports in which fungi have been assayed for asphaltene degradation. An extensive screening involving more than 750 strains of filamentous fungi was carried out in order to select strains able to modify untreated hard coal (Bublitz et al., 1994; Hofrichter et al., 1997). Only six of the 750 strains tested exhibited some activity. The most active fungus was *Panus tigrinus*; which after growing on wood shavings coated with coal asphaltenes resulted in a decrease of the asphaltene average molecular weight (Hofrichter et al., 1997). On the other hand, 2-hydroxybiphenyl was detected as a product after treatment of coal asphaltenes with the fungus *Coprinus sclerotigenis*, which led the authors to suggest that the release of 2-hydroxybiphenyl was due to enzymatic attack by fungus; however, no further characterization was performed.

The first report on the fungal degradation of petroleum asphaltenes with rigorously obtained preparations, avoiding the presence of nonasphaltenic hydrocarbons, was recently published (Uribe-Alvarez et al., 2011). A fungal strain isolated from a microbial consortium growing in a natural asphalt lake from Orinoco, Venezuela, was able to grow in purified asphaltenes as the only source of carbon and energy (Figure 2). The asphaltenes were rigorously purified in order to avoid contamination from other petroleum fractions. In addition, most of petroporphyrins were removed. The 18S rRNA and β -tubulin genomic sequences, as well as some morphologic characteristics, indicated that the isolate is *Neosartorya fischeri*. After 11 weeks of growth, the fungus was able to metabolize 15.5% of the asphaltenic carbon, including 13.2% transformed to CO₂ (Figure 2B). The results obtained in this work clearly demonstrated that there are microorganisms able to metabolize and mineralize asphaltenes, which is considered the most recalcitrant petroleum fraction.

Recently, a fungus from another genus, *Pestalotiopsis* sp. NG007, was reported to degrade asphaltenes as a sole carbon source. The fungus, which is halotolerant, was able to degrade 21.4% of asphaltenes after 15 days of incubation in pure water (Yanto and Tachibana, 2013).

3. ENZYMATIC TRANSFORMATION

This first enzymatic attack is crucial for further biodegradation of recalcitrant compounds. Chloroperoxidase, a versatile enzyme from the fungus *Caldariomyces fumago* was reported to transform asphaltenes (Fedorak et al., 1993; Mogollón et al., 1998). The transformation was carried out in a microemulsion or ternary medium constituted of different proportions of toluene, isopropanol and water. A petroporphyrin-rich fraction of asphaltenes was used as substrate and the extent of the transformation was measured as the disappearance of the Soret band, indicating the petroporphyrin destruction. Vanadium and nickel, which are present in the petroporphyrin molecules, were found as water-soluble species after the enzymatic transformation. The asphaltene transformation by chloroperoxidase from *C. fumago* was the first evidence that there are enzymatic systems able to react with the recalcitrant oil fraction of asphaltenes. According to the reaction media used, it seems that a main limiting factor for the asphaltene transformation is

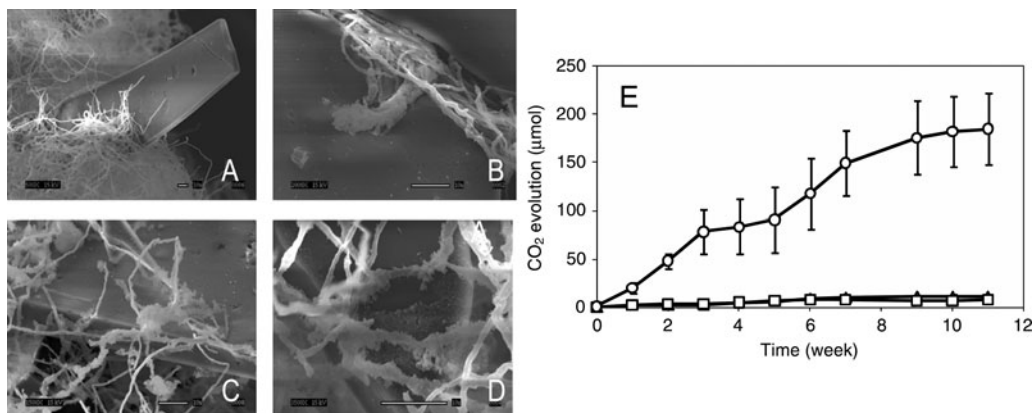


FIGURE 2 Scanning electron microscopy of the interaction between hyphae and solid oil asphaltenes in cultures of *Neosartorya fischeri*. The white bar indicates 10 μm. (A) Fungal mycelium embedding solid asphaltene particle. (B) Fungal hyphae showing no clear adhesion to the asphaltene material. (C and D) Fungal hyphae with extracellular material. (E) Kinetics of CO₂ evolution in cultures of *Neosartorya fischeri* growing in asphaltenes as the sole source of carbon. Cultures were carried out in flasks with serological stoppers, containing 20 mg of asphaltenes in 30 mL of Czapek medium incubated at 37°C (circles). Control cultures, inoculated Czapek medium with asphaltenes and without inoculum (triangles) (Uribe-Alvarez et al., 2011). © The Authors; Journal compilation © Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd. Reproduced by permission of John Wiley and Sons. Permission to reuse must be obtained from the rightsholder.

its high hydrophobicity, and thus the biotransformation may occur only when the asphaltenes and the enzyme are in the same phase, reducing the mass transfer limitations (Fedorak et al., 1993).

Two preparations of chloroperoxidase, a covalent bioconjugate with chitosan and a lipophilized preparation containing sucrose, were tested for the transformation of a porphyrin-free asphaltene fraction (Ayala et al., 2012). The reactions were performed in a ternary system with low water content (6.3%). The covalent conjugation of chloroperoxidase with chitosan increased

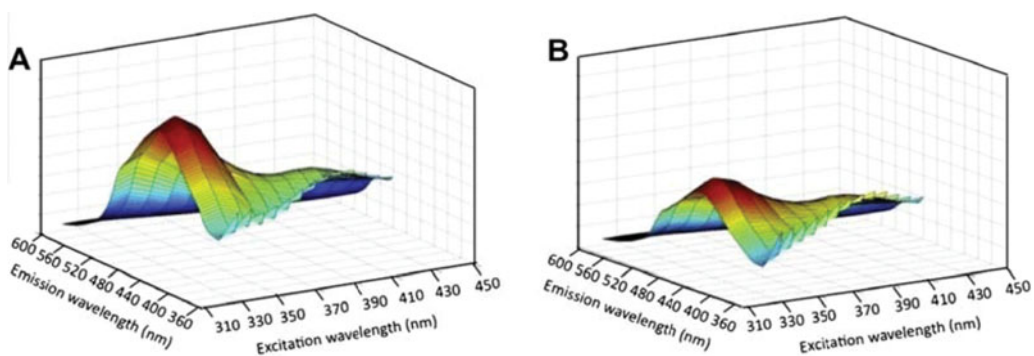


FIGURE 3 Excitation emission fluorescence matrix of (A) control asphaltenes and (B) chloroperoxidase-treated asphaltenes in the reaction mixture (Ayala et al., 2012). © Elsevier Ltd. Reproduced by permission of Elsevier Ltd. Permission to reuse must be obtained from the rightsholder.

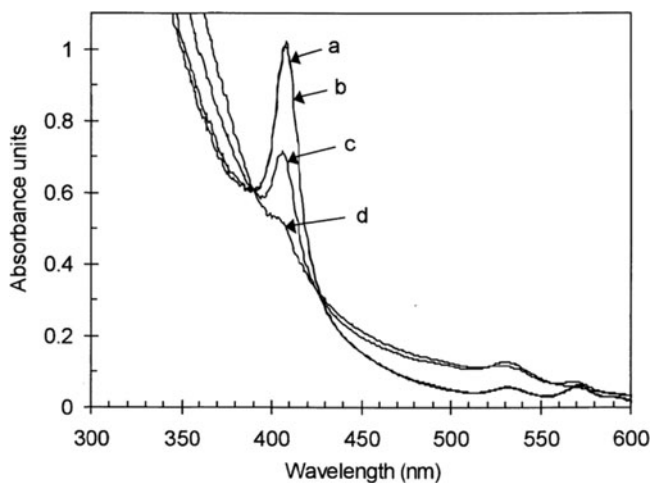


FIGURE 4 Absorption spectra of the petroporphyrin rich-fraction of asphaltenes after biocatalytic treatment with PEG-Cyt-Met. Control without treatment (a), control without biocatalyst and in the presence of 100 mM of *tert*-butyl hydroperoxide (b), reaction with one addition of PEG-Cyt-Met (c), and reaction after a second addition of PEG-Cyt-Met (d) (Garcia-Arellano et al., 2004. © Wiley Periodicals, Inc. Reproduced by permission of Wiley Periodicals, Inc. Permission to reuse must be obtained from the rightsholder.).

the total turnover number (TTN) by 10-fold. On the other hand, fluorescence due to aromatic groups decreased by 24% in treated asphaltenes (Figure 3), indicating significant molecular changes after the biotransformation. In addition, enzymatically transformed asphaltenes are more reactive and thus generate less coke, as evidenced by thermal degradation under nitrogen atmosphere.

Other proteins, such as cytochrome *c*, have shown the ability to transform asphaltenes. Cytochrome *c* from horse heart was chemically modified in the protein surface and in its active site (prosthetic group) (Tinoco and Vazquez-Duhalt, 1998). The protein was modified by alkylation to form methyl esters of the propionates of the prosthetic heme group, increasing the hydrophobicity of the active site. The protein was also modified by binding poly(ethylene)glycol (PEG) moieties on the free amino groups of the cytochrome surface, obtaining a protein that is soluble in organic solvents. This chemically modified preparation changed both the catalytic activity and substrate specificity of the cytochrome *c*. From the 20 PAH tested compounds, the PEG-Cyt-Met oxidized 17, while the unmodified cytochrome *c* was only able to oxidize eight aromatic compounds. This modified protein was able to efficiently transform a petroporphyrin-rich fraction of asphaltenes (Garcia-Arellano et al., 2004). The reactions were carried out in a ternary system containing methylene chloride, methanol and water, and in the presence of 100 mM of *tert*-butyl hydroperoxide. The biocatalytic transformation produced notable spectral changes in the petroporphyrin rich-fraction of asphaltenes, including the loss of the Soret band, which is mainly due to the presence of vanadyl petroporphyrins (Figure 4), suggesting the disruption of the porphyrin ring. With sequential additions of PEG-Cyt-Met the complete loss of the band signal was achieved. The petroporphyrins disruption released in solution the coordinating metals, mainly Ni and V. The enzyme-treated asphaltene fraction lost 95% of V and 74% of Ni. The enzymatic removal of heavy metal from asphaltenes is an interesting alternative to reduce catalyst poisoning in hydrotreatment and cracking processes (Garcia-Arellano et al., 2004). Controls with only 100 mM *tert*-butyl hydroperoxide showed no reduction in the absorbance of the Soret band (Figure 4).

4. METABOLIC PATHWAY OF ASPHALTENES

As mentioned before, the microbial transformation of asphaltenes has been just recently demonstrated. Thus, the metabolic pathways for these biotransformations are still unknown. Nevertheless, the information on the biotransformation of highly hydrophobic aromatic compounds could give some light on the possible metabolic pathway of asphaltene degradation.

The microbial transformation of hydrophobic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), could occur either inside or outside the cell. The transformed compounds outside the cell by extracellular enzymes can be then intracellularly metabolized. Similarly, the metabolites generated inside the cell can be excreted and transformed by extracellular enzymes. Another option is excretion of aromatic substrates as conjugates, which can persist or be intracellularly transformed leading to the full mineralization or to the excretion in different oxidation stages if the further oxidation is prevented (Harms et al., 2011). Two mechanisms have been proposed for the incorporation of oxygen before aromatic ring cleavage; one involving dioxygenases, mainly in bacterial degradation, and monooxygenases, peroxidases, and laccases for fungal PAH degradation. Several extracellular fungal enzymes have been reported as able to oxidize a variety of PAHs including lignin peroxidase, laccase, manganese peroxidase, and versatile peroxidase (Cerniglia, 1997; Vazquez-Duhalt, 1998; Haritash and Kaushik, 2009). On the other hand, the participation of cytochromes P450 has been reported in the metabolism of dioxins, endocrine disruptors, pesticides and PAHs (Masaphy et al., 1996; Jauregui et al., 2003; Subramanian and Yadav, 2009; Cerniglia, 2010; Kasai et al., 2010). White-rot basidiomycetes have an extraordinary capability to degrade and mineralize the recalcitrant high molecular weight PAHs. Despite several decades of research demonstrating involvement of P450 monooxygenation reactions in fungal metabolism of PAHs, specific P450 monooxygenases responsible for oxidation of these compounds are not yet known. Recently, a genomic P450 microarray screening identified six PAH-responsive P450 genes inducible by PAHs of different molecular weight (Syed et al., 2010).

In the case of asphaltene metabolism both extracellular and intracellular enzymes could be involved. Several filamentous fungi are able to transform high and low molecular weight aromatic hydrocarbons by substrate-inducible cytochrome P450 mediated reactions (da Silva et al., 2004). Genomic, genetic, and biochemical studies indicate that the fungi contain a repertoire of cytochrome P450 enzymes, with overlapping specificities, that along with attendant downstream pathways, act to assimilate aromatic hydrocarbons and may be the asphaltenes. There remain, however, many unanswered questions and significant aspects of the fungal-PAH interaction have not been elucidated.

The eventual mechanisms involved in asphaltene uptake and intracellular transport also remain unresolved. However, the role of intracellular monooxygenase activity from cytochromes P450 in the transformation of PAHs has been well established in fungi lacking extracellular oxidoreductase activity (Cerniglia, 2010), as in the case of filamentous fungi *Cunninghamella elegans* and *Fusarium solani* (Cerniglia and Yang, 1984; Verdin et al., 2005; Ullrich and Hofrichter, 2007; Fayeulle et al., 2014).

The intracellular oxidation has been demonstrated in *P. ostreatus* in which the cell-free medium previously induced with PAH is unable to transform phenanthrene, suggesting that the extracellular enzymes are not involved in the initial oxidation of the aromatic compound (Bezalel et al., 1996a). In addition, products such as *trans*-4,5-dihydropyrene and *trans*-1,2-dihydroanthracene from pyrene and anthracene, respectively, were found in cultures of this fungus, suggesting that a cytochrome P450 is involved in the first oxidation of PAHs. This organism is able to mineralize the PAHs may be by ligninolytic mechanisms in subsequent steps (Bezalel et al., 1996b).

Although these findings support an intracellular metabolism of PAHs, the cell uptake and transport mechanisms have not yet been clearly described. Some authors suggested that the PAHs uptake by

the hyphae of the fungus *Fusarium solani* is a passive transport that is not correlated with energy-dependent specific transport processes and independent of endocytosis and vesicular transport. The authors proposed that the PAHs uptake by the cell is due to a mosaic lipid destabilization caused by these lipophilic molecules (Castelli et al., 2002; Verdin et al., 2005). On the other hand, Fayeulle et al. (2014) recently demonstrated that the PAHs cell uptake is carried out by an energy-dependent mechanism. This energetic entrance process could permit a faster PAH incorporation into fungal cells. However, further research is necessary to elucidate the molecular mechanisms of asphaltene transmembrane transport in the few microorganisms that are able to metabolize this recalcitrant petroleum fraction.

5. CONCLUSIONS

Asphaltenes are the most recalcitrant fraction of petroleum. After several years of controversy, now it seems clear that there are microorganisms able to biodegrade asphaltenes, either by cometabolism in a consortium or with both fungal and bacterial axenic cultures. Among bacteria, *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. appear to be the more apt to degrade asphaltenes, either as single culture or in consortium with other microorganisms. Interestingly, a thermophilic, halotolerant bacteria has displayed the highest asphaltene biodegradation capacity reported so far, highlighting the importance of screening the environment for microorganisms harboring new or special enzymes, with unusual specificity. Two fungal strains, *Neosartorya fischeri* and *Pestalotiopsis* sp. NG007 were able to use asphaltenes as the sole source of carbon and energy. These fungi might contain a unique or very versatile enzymatic system that allows the transformation and mineralization of the highly complex asphaltene molecules.

The enzymatic transformation of asphaltenes is limited by its highly hydrophobic character. However, by the use of organic solvent-water mixtures the mass transfer limitations are reduced, allowing the enzymatic transformation. Peroxidases are able to catalyze the oxidation of asphaltenes under these conditions. In addition, the chemical modification of enzymes, in order to make them hydrophobic and soluble in organic solvents, enhances their catalytic performance.

Finally, most of studies from the literature on asphaltenes biodegradation should be considered cautiously as the asphaltene content is usually determined gravimetrically after n-alkane precipitation from cultures, and thus the reported changes may be attributed to the disruption of the asphaltenic aggregates as a result of microbial activity. Thus, new methods for the analysis of the very complex asphaltene molecules in order to evaluate their microbial modification should be carefully designed and further developed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. K. Quester for her technical assistance.

FUNDING

The Mexican National Council for Science and Technology (CONACyT) funded this work.

REFERENCES

- Akbarzadeh, K., Hammami, A., Kharat, A., Zhang, D., Allenson, S., Creek, J., Kabir, S., Jamaluddin, A., Marshall, A. G. Rodgers, R. P., Mullins, O. C., and Solbakken, T. (2007). Asphaltenes-problematic but rich in potential. *Oilfield Rev.* 19:22–43.
- Ali, H. R., El-Gendy, N. S., Moustafa, Y. M., Mohamed, I., Roushdy, M. I., and Hashem, A. I. (2012). Degradation of asphaltene fraction by locally isolated halotolerant bacterial strains. *ISRN Soil Sci.* ID 435485.
- Ali, H. R., Ismail, D. A., and El-Gendy, N. S. (2014). The biotreatment of oil-polluted seawater by biosurfactant producer halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* Asp2. *Energy Sources, Part A* 36:1429–1436.
- Ancheyta, J., Centeno, G., Trejo, F., Marroquin, G., Garcia, J. A., Tenorio, E., and Torres, A. (2002). Extraction and characterization of asphaltenes from different crude oils and solvents. *Energy Fuels* 16:1121–1127.
- Andrews, A. B., Guerra, R. E., Mullins, O. C., and Sen, P. N. (2006). Diffusivity of asphaltene molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* 110:8093–8097.
- Ayala, M., Hernández-López, E. L., Perezgasga, L., and Vazquez-Duhalt, R. (2012). Reduced coke formation and aromaticity due to chloroperoxidase catalyzed transformation of asphaltenes from Maya crude oil. *Fuel* 92:245–249.
- Bertrand, J. C., Rabeloarisoa, E., Rontani, J. F., Giusti, G., and Mattei, G. (1983). Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* 5:567–572.
- Bezalel, L., Hadar, Y., and Cerniglia, C. E. (1996). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:292–295.
- Bezalel, L., Hadar, Y., and Cerniglia, C. E. (1996). Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2554–2559.
- Boduszynski, M. M. (1981). Asphaltenes in petroleum asphalts: Composition and formation. In: *Chemistry of asphaltenes*, Bunker J. W., Li, N. C. (Eds.). Washington, DC: American Chemical Society.
- Brenner, K., You, L., and Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol.* 26:483–489.
- Bublitz, F., Guenther, T., and Fritsche, W. (1994). Screening of fungi for the biological modification of hard coal and coal derivatives. *Fuel Process. Technol.* 40:347–354.
- Cerniglia, C. E. (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:324–333.
- Cerniglia, C. E., and Sutherland, J. B. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Timmis, K. N. (Ed.): Berlin: Springer-Verlag; Chapter 34, pp. 2079–2110.
- Cerniglia, C. E., and Yang, S. K. (1984). Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:119–124.
- Castelli, F., Librando, V., and Sarpietro, M. G. (2002). Calorimetric approach of the interaction and absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons with model membranes. *Environ. Sci. Technol.* 36:2717–2723.
- Da Silva, M., Esposito, E., Joanna, D. M. C., Canhos, V. P., and Cerniglia, C. E. (2004). Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium sp.* *Chemosphere* 57:943–952.
- Das, N., and Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res. Int.* 2011:1–13.
- Fayeulle, A., Veignie, E., Slomianny, C., Dewailly, E., Munch, J.-C., and Rafin, C. (2014). Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*; 21:3515–3523.
- Fedorak, P. M., Semple, K. M., Vazquez-Duhalt, R., and Westlake, D. W. S. (1993). Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme Microb. Technol.* 15:429–437.
- Freed, D. E., Lisitza, N. V., Sen, P. N., and Song, Y.-Q. (2007). Molecular composition and dynamics of oils from diffusion measurements. In: *Asphaltenes, heavy oils and petroleomics*, Mullins, O. C., Sheu, E. Y., Hammami, A., Marshall, A. G. (Eds.). New York: Springer.
- Garcia-Arellano, H., Buenrostro-Gonzalez, E., and Vazquez-Duhalt, R. (2004). Biocatalytic transformation of petroporphyrins by chemical modified cytochrome c. *Biotechnol. Bioeng.* 85:790–798.
- Groenzin, H., and Mullins, O. C. (1999). Asphaltene molecular size and structure. *J. Phys. Chem. A* 103:11237–11245.
- Groenzin, H., and Mullins, O. C. (2000). Molecular size and structure of asphaltenes from various sources. *Energy Fuels* 14:677–684.
- Harms, H., Schlosser, D., and Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:177–192.

- Haritash, A. K., and Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 169:1–15.
- Hofrichter, M., Bublitz, F., and Fritsche, W. (1997). Fungal attack on coal: I. Modification of hard coal by fungi. *Fuel Proc. Technol.* 52:43–53.
- Hortal, A. R., Martínez-Haya, B., Lobato, M. D., Pedrosa, J. M., and Lago, S. (2006). On the determination of molecular weight distributions of asphaltenes and their aggregates in laser desorption ionization experiments. *J. Mass Spectrom.* 41:960–968.
- Indo, K., Ratulowski, J., Dindoruk, B., Gao, J., Zuo, J. Y., and Mullins, O. C. (2009). Asphaltene nanoaggregates measured in a live crude oil by centrifugation. *Energy Fuels* 23:4460–4469.
- Jahromi, H., Fazaelpoor, M. H., Ayatollahi, S., and Niazi, A. (2014). Asphaltenes biodegradation under shaking and static conditions. *Fuel* 117:230–225.
- Jauregui, J., Valderrama, B., Albores, A., and Vazquez-Duhalt, R. (2003). Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation* 14:397–406.
- Kasai, N., Ikushiro, S., Shinkyō, R., Yasuda, K., Hirose, S., Arisawa, A., Ichinose, H., Wariishi, H., and Sakaki, T. (2010). Metabolism of mono- and dichloro-dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* cytochromes P450. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:773–780.
- Lacotte, D. J., Mille, G., Acquaviva, M., and Bertrand, J. C. (1996). Arabian light asphaltene biotransformation with n-alkanes as co-substrates. *Chemosphere* 32:1755–1761.
- Lavana, M., Cheema, S., Sarma, P. M., Mandal, A. K., and Lal, B. (2012). Biodegradation of asphalt by *Garciaella petrolearia* TERIG02 for viscosity reduction of heavy oil. *Biodegradation* 23:15–24.
- Leahy, J. G., and Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54:305–315.
- Luo, P., Wang, X., and Gu, Y. (2010). Characterization of asphaltenes precipitated with three light alkanes under different experimental conditions. *Fluid Phase Equilib.* 291:103–110.
- Margesin, R., and Schiner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:650–663.
- Masaphy, S., Levanon, D., Henis, Y., Venkateswarlu, K., and Kelly, S. L. (1996). Evidence for cytochrome P450 and P450-mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135:51–55.
- Merdrignac, I., Desmazières, B., Terrier, P., Delobel, A., and Laprévotte, O. (2004). Analysis of raw and hydrotreated asphaltenes using off-line and on-line SEC/MS Coupling. *International Conference on Heavy Organics Deposition*, Los Cabos, Baja, México, November 14–19.
- Mogollón, L., Rodríguez, R., Larrota, W., Ortiz, C., and Torres, R. (1998). Biocatalytic removal of nickel and vanadium from petroporphyrins and asphaltenes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70–72:765–777.
- Mullins, O. C. (2011). The asphaltenes. *Ann. Rev. Anal. Chem.* 4:393–418.
- Pendry, J. P. (1989). Biodegradation of asphalt cement-20 by aerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1357–1362.
- Pineda-Flores, G., Boll-Argüello, G., Lira-Galeana, C., and Mesta-Howard, A. M. (2004). A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation* 15:145–151.
- Qian, K., Edwards, K. E., Siskin, M., Olmstead, W. N., Mennito, A. S., Dechert, G. J., and Hoosain, N. E. (2007). Desorption and ionization of heavy petroleum molecules and measurement of molecular weight distributions. *Energy Fuels* 21:1042–1047.
- Rodgers, R. P., and Marshall, A. G. (2007). Petroleomics: Advanced characterization of petroleum-derived materials by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS). In: *Asphaltenes, heavy oils and petroleomics*, Mullins, O. C., Sheu, E. Y., Hammami, A., Marshall, A. G. (Eds.). New York: Springer.
- Rontani, J. F., Bosser-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J. C., Giusti, G., and Faure, R. (1985). Analytical study of Asyhart crude oil biodegradation. *Chemosphere* 14:1413–1422.
- Scotti, R., and Montanari, L. (1998). Molecular structure and intermolecular interaction of asphaltenes by FT-IR, NMR, EPR. In: *Structures and dynamics of asphaltenes*, Mullins, O. C., Sheu, E. Y. (Eds.). New York: Springer.
- Speight, J. G. (1999). *The chemistry and technology of petroleum* (3rd ed.). New York: Marcel Dekker.
- Speight, J. G., and Moschopedis, S. E. (1982). On the molecular nature of petroleum asphaltenes. In: *Chemistry of asphaltenes*, Bunker, J., Li, C. N. (Eds.). Washington, DC: American Chemical Society.
- Strausz, O. P., Mojelsky, T. W., and Lown, E. M. (1992). The molecular structure of asphaltene: an unfolding story. *Fuel* 71:1355–1363.
- Subramanian, V., and Yadav, J. S. (2009). Role of P450 monoxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5570–5580.

- Syed, K., Doddapaneni, H., Subramanian, V., Lam, Y. W., and Yadav, J. S. (2010). Genome-to-function characterization of novel fungal P450 monooxygenases oxidizing polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 399:492–497.
- Tavassoli, T., Mousavi, S. M., Shojaosadati, S. A., and Salehizadeh, H. (2012). Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel* 93:142–148.
- Thouand, G., Bauda, P., Oudot, J., Kirsch, G., Sutton, C., and Vidalie, J. F. (1999). Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. *Can. J. Microbiol.* 45:106–115.
- Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1998). Chemical modification of cytochrome c improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* 22:8–12.
- Ullrich, R., and Hofrichter, M. (2007). Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell Mol. Life Sci.* 64:271–293.
- Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., and Vazquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltene by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microb. Biotechnol.* 4:663–672.
- Vazquez-Duhalt, R. (1998). Hemoproteins as biocatalyst for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Advances in bioprocess engineering II*, Galindo, E., Ramírez, O. T. (Eds.). Amsterdam: Kluwer Academic Publishers; pp. 183–207.
- Verdin, A., Sahaoui, A. L.-H., Newsam, R., Robinson, G., Durand, R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environ. Pollut.* 133:283–291.
- Walker, J. D., Colwell, R. R., and Petrakis, L. (1976). Biodegradation rates of components of petroleum. *Can. J. Microbiol.* 22:1209–1213.
- Wargadalam, V. J., Norinagak, K., and Iino, M. (2002). Size and shape of a coal asphaltene studied by viscosity and diffusion coefficient measurements. *Fuel* 81:1403–1407.
- Yanto, D. H. Y., and Tachibana, S. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp NG007. *Int. Biodet. Biodegrad.* 85:438–450.

CONSTANCIAS CONGRESOS, SEMINARIOS Y CURSOS



Institute of Applied Synthetic Chemistry
Vienna University of Technology
Getreidemarkt 9/163
A-1060 Vienna / Austria
<http://www.ias.tuwien.ac.at/>

Univ.Prof. Dipl.-Ing. Dr. Marko Mihovilovic
marko.mihovilovic@tuwien.ac.at

July 30, 2015

CERTIFICATE OF ATTENDANCE BIOTRANS2015/0432

We confirm that Edna Lorena Hernández López has attended the BIOTRANS2015, taking place in Vienna / Austria on July 26-30, 2015.

Edna Lorena Hernández López has given a poster presentation entitled
"BIOTRANSFORMATION OF PETROLEUM ASPHALTENES AND
HIGH-MOLECULAR-WEIGHT POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS
"

Registration number: 432

Participant name: Edna Lorena Hernández López

TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN
Institut für Angewandte Synthesechemie
A-1060 Wien, Getreidemarkt 9/163



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Centro de Nanociencias y Nanotecnología



Ensenada, B.C., a 6 de Mayo de 2015

*M.C. Edna Lorena Hernández López
CNyN-UNAM
Presente:*

En nombre de los Investigadores del Centro de Nanociencias y Nanotecnología-UNAM, y de los estudiantes asociados a éste, quiero expresarle mi agradecimiento por la presentación de su interesante conferencia en nuestro seminario semanal, con el título.

***"ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE ASFALTENOS E HIDROCARBUROS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS DE MUY ALTO PESO MOLECULAR
EN NEOSARTORYA FISCHERI"***

Esperamos seguir contando con su participación en un futuro próximo.

ATENTAMENTE

***Dr. Rubén Darío Cadena Nava
Coordinador de Seminarios***

RDCNve

ELSEVIER CERTIFICA QUE:

EDNA LORENA HERNÁNDEZ LÓPEZ

Asistió al curso de **ScienceDirect - Scopus - Mendeley**
con una duración de **2** horas impartido en:

Universidad Nacional Autónoma de México el día **19 de marzo del 2015**

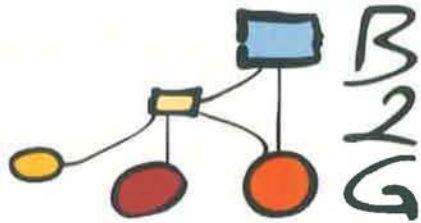


Patricia Urías Hernández.

Customer Marketer

Latin America North- Research Solutions Sales





Fourth International Course in

Automated Functional Annotation and Data Mining

Edna Lorena Hernández López

attended the

IV International Course in Automated
Functional Annotation and Data Mining

held in Irapuato, Mexico, from the 9th to the 11th of May, 2012 at the
Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, CINVESTAV




Dr. Ana Conesa


Dr. Stefan Götz