



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CELULAR Y BIOCATÁLISIS

**CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE *Aspergillus sp.*
CAPAZ DE CRECER EN ASFALTENOS COMO ÚNICA
FUENTE DE CARBÓN Y DE ENERGÍA.**

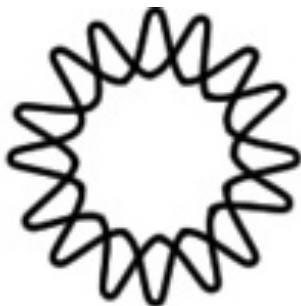
T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A

Q.F.B. CRISTINA URIBE ALVAREZ

TUTOR: DR. RAFAEL VÁZQUEZ DUHALT



CUERNAVACA, MORELOS

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mi familia y amigos.

A mi abuelo.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Rafael Vázquez-Duhalt por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su apoyo y por darme ánimos para poder llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Marcela Ayala por sus valiosas sugerencias en el manejo y análisis de los asfaltenos.

A la Dra. Lucía Perezgasga por su apoyo y enseñanzas en las técnicas de biología molecular realizadas en esta tesis, por su paciencia y por todo el conocimiento transmitido.

A la Biol. Rosa Miranda Román por su valiosa ayuda para el progreso de este trabajo, por su ayuda en la purificación de asfaltenos y por el apoyo técnico durante el uso de los diversos equipos analíticos.

A los miembros de mi comité tutorial y al jurado revisor por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A mi familia por el apoyo incondicional y palabras de aliento.

Agradezco también el apoyo económico proporcionado por CONACYT

ÍNDICE

RESUMEN.-----	1
1. INTRODUCCIÓN.-----	3
2. ANTECEDENTES.-----	6
2.1 Asfaltenos.-----	6
2.2 Refinamiento de tierras bituminosas.-----	8
2.3 Biotransformación de asfaltenos.-----	9
2.4 Características del género <i>Aspergillus sp.</i> -----	12
2.5 Lacasas-----	13
3. HIPÓTESIS-----	17
4. OBJETIVOS-----	18
4.1 Objetivos generales-----	18
4.2 Objetivos particulares-----	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS-----	19
5.1 Microorganismo.-----	19
5.2 Medios de cultivo, soluciones y reactivos.-----	19
5.2.1 Purificación de asfaltenos y eliminación de petroporfirinas.-----	21
5.3 Determinación de la especie del hongo <i>Aspergillus sp.</i> -----	22
5.3.1 Diseño de oligonucleótidos para la secuenciación de rRNA 18S-----	22
5.3.2 Obtención de rRNA 18S y clonación de cDNA en un plásmido TOPO 2.1.-----	22
5.3.3 Diferenciación morfológica de especies de <i>Aspergillus sp</i> con rRNA 18S similar.-----	25
5.3.4 Análisis del DNA genómico en busca de genes de diferenciación de especies-----	26
5.3.4.1 Oligonucleótidos para la secuenciación de un fragmento del gen β -tubulina-----	26

5.3.4.2 Obtención de DNA genómico	26
5.3.4.3 Amplificación del fragmento del gen β -tubulina	27
5.4 Microscopía electrónica de barrido.	29
5.5 Estudio del crecimiento fúngico.	29
5.5.1 Cinética de aumento de proteína intracelular.	29
5.5.1.1 Medición de proteína intracelular.	29
5.5.1.2 Curva patrón de peso seco de biomasa contra μg de proteína/ml	30
5.5.2 Cinética de mineralización de asfaltenos.	30
5.6 Caracterización de enzimas extracelulares.	31
5.6.1 Actividad enzimática con diferentes sustratos	31
5.6.2 Determinación del peso molecular de las proteínas presentes en el medio extracelular.	32
5.7 Clonación y expresión de la/las enzimas presentes en el medio extracelular	34
5.7.1 Diseño de oligonucleótidos degenerados para la clonación del gen de lacasa	34
5.7.1.1 Clonación parcial en TOPO/TA	34
5.7.1.2 Obtención del gen completo que codifica para la lacasas.	35
5.8 Crecimiento de <i>Aspergillus sp</i> en fracciones de asfaltenos y compuestos modelo.	37
5.8.1 Crecimiento de <i>Aspergillus sp</i> en diversos PAHs e hidrocarburos lineales.	37
5.8.2 Crecimiento de <i>Aspergillus sp</i> en fracciones de asfaltenos de diferente polaridad.	37
5.9 Caracterización de productos de la transformación de asfaltenos.	38
5.9.1 Análisis de muestras por espectroscopía Infrarroja.	38
5.9.2 Análisis de las muestras por Cromatografía de Gases (CG) y por Cromatografía de gases acoplada a un detector de masas	39
5.9.2.1 Análisis de fracciones de asfaltenos tratadas con <i>Aspergillus sp</i>	39
5.9.2.2 Análisis de compuestos modelo tratados con <i>Aspergillus sp</i>	39
5.9.2.3 Sililación de muestras	40
5.9.3 Obtención de matrices de emisión-excitación por medio de fluorescencia	41
6. RESULTADOS.	42
6.1 Identificación de la especie del género <i>Aspergillus sp</i>	42

6.1.1 Identificación por comparación de la secuencia del gen ribosomal rRNA 18s. -----	42
6.1.2 Identificación de la especie por morfología colonial y microscópica -----	42
6.1.3 Identificación de la especie por comparación de un fragmento del gen de β - tubulina. -----	43
6.2 Microfotografías obtenidas de la Microscopía Electrónica de Barrido. -----	44
6.3 Estudio del crecimiento de <i>N. fischeri</i> usando asfaltenos como única fuente de carbono -----	46
6.3.1 Curva patrón de peso seco de biomasa contra μg de proteína/ml-----	46
6.3.2 Cinética de crecimiento y actividad lacasa-----	46
6.3.3 Cinética de mineralización de asfaltenos -----	48
6.4 Caracterización de enzimas extracelulares. -----	49
6.4.1 Determinación de Peso molecular de proteínas extracelulares-----	49
6.5 Identificación y clonación de la/las enzimas presentes en el medio extracelular -----	50
6.5.1 Pruebas de identificación de la bacteria enzimática extracelular -----	50
6.5.2 Amplificación y clonación parcial de un gen de lacasa extracelular en TOPO/TA -----	50
6.5.3 Amplificación del gen completo de la lacasa tilA -----	52
6.6 Crecimiento de <i>N. fischeri</i> en diferentes sustratos-----	53
6.6.1 Crecimiento del <i>N. fischeri</i> en diversos compuestos modelo -----	53
6.6.2 Crecimiento de <i>N. fischeri</i> en fracciones de diferente polaridad obtenidas de asfaltenos.-----	55
6.6.2.1 Fraccionamiento de asfaltenos por diferencias en su polaridad-----	55
6.6.3 Crecimiento de <i>N. fischeri</i> en fracciones de diferentes polaridades de asfaltenos. -----	56
6.7 Caracterización de productos de la transformación de asfaltenos -----	56
6.7.1 Espectrofotometría de Infrarrojo-----	56
6.7.2 Análisis por Cromatografía de Gases (CG) y Cromatografía de Gases acoplada a un detector de masas (CG-MS)-----	58
6.7.2.1 Análisis de las muestras de las fracciones de asfaltenos -----	59
6.7.2.2 Análisis de compuestos modelo tratados con <i>N. fischeri</i> -----	60
6.7.2.3 Análisis de muestras sililadas -----	60
6.7.3 Matrices de emisión-excitación (fluorescencia) -----	64

7. DISCUSIÓN	73
8. CONCLUSIONES	80
9. PERSPECTIVAS	81
10. BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXO I. Alineamientos	88
ANEXO II. Publicación	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos del rRNA 18S diseñados para identificar la especie de <i>Aspergillus sp.</i> -----	22
Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificar una porción del gen que codifica para la β -tubulina para identificar la especie de <i>Aspergillus sp.</i> -----	26
Tabla 3. Número acceso del gen de β -tubulina de los <i>Aspergillus</i> sección <i>Fumigati</i> utilizados en este estudio-----	28
Tabla 4. Oligonucleótidos degenerados de lacasas de diferentes especies de <i>Aspergillus sp.</i> -----	34
Tabla 5. Oligonucleótidos generados para la clonación de la secuencia de la lacasa <i>tilA</i> .--	36
Tabla 6. Cantidad de acetona/tolueno necesaria para el fraccionamiento de asfaltenos por diferencias de polaridad-----	38
Tabla 7. Identidad del gen ribosomal 18S con hongos del género <i>Aspergillus</i> -----	42
Tabla 8. Características de la morfología de las colonias en medio PDA-----	43
Tabla 9. Identidad de los fragmentos de gen de β -tubulina-----	44
Tabla 10. Resultados del alineamiento dl fragmento de gen lacasa para la secuencia clonada en TOPO/TA-----	52
Tabla 11. Resultados para de la secuencia amplificada del gen completo de lacasa <i>tilA</i> ---	53
Tabla 12. Resultados de crecimiento de <i>N. fischeri</i> en compuestos modelo-----	54
Tabla 13. Fraccionamiento de asfaltenos por diferencias en su polaridad-----	55
Tabla 14. Crecimiento de <i>N. fischeri</i> en fracciones de diferentes polaridades de asfaltenos -	56
Tabla 15. Volúmenes de fluorescencia obtenidos a partir de las matrices de emisión- excitación-----	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Curva de Hubbert y gráfico de la cantidad de pozos descubiertos de 1930 a 2002.-----	4
Figura 2. Unidades estructurales que constituyen a los asfaltenos.-----	7
Figura 3. Estructura de la lacasa del hongo ascomiceto <i>M. albomyces</i> .-----	15
Figura 4. Plásmido pCR 2.1-TOPO/TA.-----	24
Figura 5. Gel de agarosa para la identificación del fragmento del gen rRNA 18S.-----	25
Figura 6. Fotografías de MEB de <i>N. fischeri</i> en medio mínimo con asfaltenos como única fuente de carbono.-----	45
Figura 7. Gráfico de aumento de biomasa y oxidación de ABTS por semana en cultivos de <i>Aspergillus sp.</i> en medio Czapek adicionado con asfaltenos.-----	47
Figura 8. Cinética de mineralización de asfaltenos de 11 semanas.-----	48
Figura 9. Gel de poliacrilamida con tinción de plata del concentrado extracelular de los cultivos de <i>Aspergillus sp.</i> en medio Czapek adicionado con asfaltenos.-----	50
Figura 10. Fragmento de 1500 pb del gen de la lacasa clonado en el plásmido TOPO. ---	51
Figura 11. Fragmento de aproximadamente 2000 pb del gen de la lacasa T1A.-----	52
Figura 12. Espectros de IR de las diferentes fracciones de asfaltenos antes y después del tratamiento de cuatro semanas con <i>N. fischeri</i> .-----	58
Figura 13. Espectro obtenido del CG de la muestra 20/80. -----	59
Figura 14. Espectro obtenido del CG de la muestra 60/40. -----	60
Figura 15. Cromatograma de la muestra de asfaltenos con tratamiento fúngico de cuatro semanas. -----	61
Figura 16. Cromatograma de la muestra control de asfaltenos sin tratamiento fúngico---	61
Figura 17. Cromatograma del TMS puro, dónde se observa la presencia de glicerol y urea. -----	62
Figura 18. Espectro de masas obtenido a los 9.52 min. que corresponde al espectro del Ácido hidroxifenil acético.-----	63
Figura 19. Espectro de masas obtenido a los 13.33 min. que corresponde al espectro del Hidroximetil carbazol.-----	63
Figura 20. Espectro de masas obtenido a los 18.01 min. que corresponde al espectro del Ácido tianafténico-2-carboxílico.-----	63

Figura 21. Espectro de masas obtenido a los 20.63 min. que corresponde al espectro de la Hidroxiprenodiona-----	64
Figura 22. MEE de una muestra de asfaltos puros sin tratamiento de una λ de 220 a 400 nm de excitación y de 350 a 710 nm de excitación. -----	66
Figura 23. MEE de los controles de las diferentes fracciones de asfaltos sin tratamiento de una λ de 240 a 480 nm de excitación (x) y de 350 a 630 nm de excitación (y). -----	67
Figura 24. MEE de las fracciones de los asfaltos 60/40 con tratamiento fúngico de 4 semanas.-----	69
Figura 25. MEE de la fracción 40/60 de los asfaltos con tratamiento fúngico de 4 semanas.-----	70
Figura 26. MEE de la fracción 20/80 de los asfaltos con tratamiento fúngico de 4 semanas. -----	71
Figura 27. MEE de la fracción R de los asfaltos con tratamiento fúngico de cuatro semanas.-----	72

ABREVIATURAS

AF	Área de fluorescencia
CG	Cromatografía de gases
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CPO	Cloroperoxidasa
FDTR	Fluorescencia en tiempo real
FIMS	Espectroscopia de masas de campo de ionización
Gb	Mil millones de barriles
GPC	Cromatografía de permeación en gel
HPA	Hidrocarburos poliaromáticos
HHPA	Hidrocarburos heteropoliaromáticos
HMG	Grupo de alta movilidad
IR	Infrarrojo
LDMS	Espectroscopia de masas de desorción de laser
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
MEB	Microscopía electronica de barrido
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NiOEP	Niquel-octanoetil-petroporfirina
RMN	Resonancia magnética nuclear
TCD	Detector de conductividad térmica
TMS	Trimetil silil acetamida
VF	Volumen de fluorescencia
VOEP	Vanadil-octanoetil-porfirinas
VPO	Osmometría de presión de vapor

RESUMEN

Los asfaltenos son polímeros con estructuras hidrocarbonadas sólidas de composición heterogénea. Son definidos como la fracción del crudo que es insoluble en solventes alifáticos de bajo peso molecular como n-pentano y n-heptano pero solubles en tolueno. (Mullins, 1998). Estos representan la fracción del crudo más pesada y con mayor punto de ebullición que queda como remanente de la destilación fraccionada.

El interés en modificar la estructura de los asfaltenos surge de la necesidad de reducir el impacto negativo de estos compuestos en el refinamiento del petróleo. La presencia de altas concentraciones de asfaltenos en los crudos aumenta los costos de extracción, refinamiento y desulfuración, además de generar grandes cantidades de desechos. Por otro lado, la modificación de los asfaltenos permitirá el uso de las tierras bituminosas y crudos extrapesados como reservas energéticas que son inaccesibles debido a su alta viscosidad.

En el presente trabajo se caracterizó un hongo capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbón y energía. La cepa se identificó por medio de análisis macroscópico, microscópico y genético (rRNA 18S y β -tubulina) como probable *Neosartorya fischeri*, hongo que pertenece a la sección *Fumigati* del género *Aspergillus*. Se estudió el crecimiento de dicha cepa en medio mineral adicionado con asfaltenos y se midió la producción de CO₂ observando que se metaboliza aproximadamente el 15% de los asfaltenos iniciales. Además se estudió la interacción del hongo con el asfalto por microscopía electrónica de barrido.

Durante las cinéticas de crecimiento del hongo, se monitoreó la actividad específica con ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenziltiazolina)) y se realizaron pruebas para detectar qué actividad enzimática había en el concentrado extracelular, la cual resultó ser positiva para siringaldazina, es decir, actividad lacasa. El gen de la lacasa presentó una identidad de 95% con respecto a la lacasa tilA de *Neosartorya fischeri*. La transformación de los asfaltenos y sus productos de degradación fueron monitoreados por CG-MS, IR y fluorescencia.

En el presente trabajo se identificó por primera vez un microorganismo que es capaz de utilizar a los asfaltenos como única fuente de carbono y energía.

ABSTRACT

Asphaltenes are solid hydrocarbonate polymer structures of heterogeneous composition; they are defined as the oil fraction which is insoluble in light alkanes such as n-pentane and n-heptane but soluble in toluene (Mullins, 1998). Asphaltenes represent the heaviest oil fraction which has the higher boiling point.

The interest in modifying the structure of asphaltenes arises from the need to reduce the negative impact of these compounds in oil refinement. The presence of high asphaltene concentrations in oil increases the costs of extraction, refinement, desulfation and produces a large amount of waste. On the other hand, asphaltene modification opens the possibility to use the bituminous lands and heavy oil remnants as energetic resources. Currently, these are inaccessible due to their high viscosity.

In this work the characterization of a fungus capable of growing in asphaltenes as the sole carbon source was achieved. The strain was identified by means of macroscopic, microscopic and genetic analysis (rRNA 18S and β -tubulin gene) as a probable *Neosartorya fischeri* which belongs to the section *Fumigati* of the *Aspergillus* gender. Strain growth was studied in mineral media additioned with asphaltenes and CO₂ production was measured, demonstrating that the fungus can metabolize approximately 15 % of the asphaltenes initially added. The interaction between the fungus and the asphaltenes was studied by scanning electron microscopy.

While monitoring the growth kinetics of the fungi, specific activity was measured with ABTS and other tests to determine specific enzymatic activities in the extracellular medium. These tests revealed a positive result for siringaldazine, which in the absence of peroxide is a specific substrate for laccases. The laccase gene exhibited 95% identity with the tilA from *Neosartorya fischeri*. Finally, transformations of the asphaltenes and their degradation products were monitored by CG-MS, IR and fluorescence.

In this work we report for the first time a microorganism that is capable of using asphaltenes as a sole source of carbon and energy.

1. INTRODUCCIÓN

El interés en la transformación de asfaltenos a moléculas de menor complejidad tiene dos principales razones: la primera, es porque estos compuestos tienen influencia en la calidad del petróleo: a mayor cantidad de asfaltenos, menor es la calidad del petróleo. Esto se debe a que los asfaltenos afectan los procesos de refinamiento del petróleo. Por ejemplo, en el proceso de extracción del crudo, los asfaltenos se incrustan en los espacios porosos de los depósitos y en las paredes de las tuberías de extracción disminuyendo el flujo de salida del crudo. Por otro lado las refinerías están casi siempre alejadas de las torres de perforación por lo que hay que transportar el crudo de un lugar a otro; esto se hace en contenedores metálicos o por medio de oleoductos de acero. Los asfaltenos reaccionan en presencia de iones férricos en condiciones ácidas formando lodo asfalténico, el cual se deposita en los conductos bloqueando el flujo del crudo. Para poder disolver el lodo asfalténico se agrega xileno o tolueno, lo que aumenta los costos de producción y genera una gran cantidad de desechos tóxicos (Pineda Flores y col. 2001). Estos compuestos también causan problemas en los procesos de deshidrosulfuración y desmetalización, ya que el azufre y los metales se encuentran dentro de una estructura que los protege y se obtiene como producto una gasolina de menor calidad. Al desarrollar la tecnología para transformar los asfaltenos se reducirían los costos de refinamiento del petróleo y la cantidad de desechos tóxicos generados.

La segunda razón por la que es interesante poder transformar la estructura de los asfaltenos, es para poder utilizar los depósitos de éstos como reservas de energía: El petróleo que tardó millones de años en acumularse, es una fuente energética no renovable y finita en la que se basa nuestra sociedad.

Según diversos estudios de la cantidad de recursos disponibles y las predicciones de la teoría de pico de Hubbert, se ha calculado que restan aproximadamente 2,000 millardos de barriles de petróleo en el mundo y que entre 2010-2047 la producción mundial de petróleo llegara a su cenit. La Figura 1a muestra una predicción (teoría de Hubbert) de la producción de barriles de petróleo mundial por día en el tiempo. Se prevé que después de alcanzar la producción máxima, las reservas de crudo disminuirán drásticamente hasta el fin del siglo, causando una crisis energética (Mohr y col., 2008). Sin embargo se observa que en la predicción hecha por Odell, (línea roja) en dónde se toma en cuenta el uso de crudos no convencionales, la producción de barriles de petróleo aumentara considerablemente teniendo su cenit hasta el año 2060 posponiendo la crisis energética

de finales de siglo. En la figura 1b se muestra una gráfica del descubrimiento de pozos petroleros en el tiempo, se observa que la cantidad de pozos petroleros descubiertos ha disminuido y según las predicciones la probabilidad de descubrir nuevos pozos es cada vez menor. Actualmente se descubren 4 veces menos petróleo de lo que es consumido (Fig. b), En 2008 se consumieron 30 mil millones de barriles. (1 barril = 159 lt).

Los depósitos de asfaltenos y de crudos extra-pesados (tierras bituminosas) son de los recursos fósiles no convencionales más importantes ya que son una enorme fuente potencial de energía para ser explotada. En Canadá, dicha reserva se estima en 280-300 Gb (mil millones de barriles), mayor aún que la reserva en crudos ligeros de Arabia, estimada en 240 Gb. ((OPEC, 2009; Government of Alberta, Canada, 2011). En Venezuela la reserva de crudos pesados se estima en 236 Gb según Petróleos de Venezuela S.A. Estas reservas son básicamente inaccesibles debido a la dificultad de extracción ya que son muy densas, viscosas, tienden a formar emulsiones, se polimerizan o están en forma de arenas asfálticas que son rocas sedimentarias porosas y permeables.

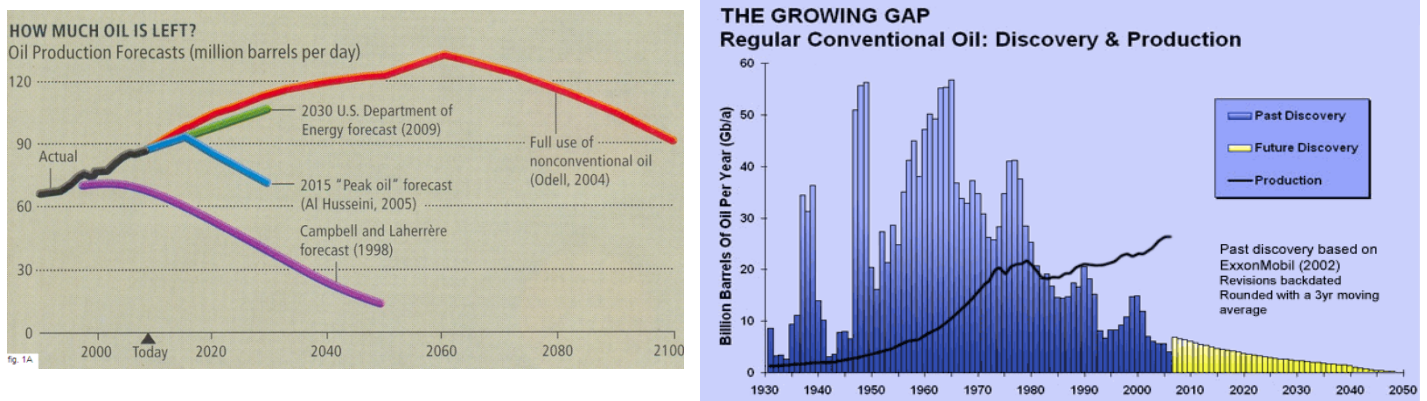


Figura 1. a) Curva de Hubbert donde muestra la extracción de petróleo a nivel mundial en millones de barriles al día, el cenit de extracción de petróleo se ha predicho en diferentes años, la línea roja muestra la extracción de petróleo en caso de utilizar las reservas de crudo no-convencionales. **b)** Gráfico de la cantidad de pozos descubiertos desde 1930 hasta 2002 y la cantidad de pozos que se prevé descubrir hasta 2040. Fuente: www.energybulletin.net/primer.php#primer

Si se logra transformar la estructura de los asfaltenos a estructuras de menor peso molecular, se podría aumentar el rendimiento de la extracción de crudo de los pozos petroleros ya que con las técnicas convencionales de extracción asistida se obtiene hasta el 50% de rendimiento de los pozos petroleros (Maugeri, 2009). Otra razón por la que resulta interesante la transformación de los asfaltenos es con fines de biorremediación; se reporta que en derrames petroleros tanto marinos como terrestres esta fracción es difícil

de retirar de los ecosistemas, debido a que no se puede degradar fácilmente (Pineda y col. 2001; Fernández y col. 2006).

Debido a las razones anteriores se justifica investigar una forma de transformar los asfaltenos a moléculas de menor peso molecular y menor complejidad. La finalidad última es aprovechar los asfaltenos para fines energéticos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Asfaltenos.

El petróleo es una mezcla fluida compleja de hidrocarburos que se separan, purifican y modifican químicamente según sus diferentes propiedades en las refinerías con la finalidad de obtener productos que nos sean útiles como son la gasolina y el gas natural. La separación básica de los componentes del crudo en una refinería se realiza de acuerdo al punto de ebullición de la fracción, que se determina principalmente por el número de carbonos o por peso molecular. En una columna de destilación fraccionada obtenemos: propano, butano, gas, gasolina, queroseno, lubricantes, parafinas y asfaltos (orden creciente de peso molecular y punto de ebullición) (Speight, 1999). Los asfaltos son la parte más pesada que se obtiene de la destilación fraccionada, al disolverlos en un alcano de bajo peso molecular (n-pentano) obtenemos una fracción soluble: los maltenos y un precipitado: los asfaltenos. Los asfaltenos pueden separarse del crudo por otros métodos como son: difusión térmica, cromatografía, cristalización, partición con solventes y precipitación química que consiste en aprovechar las propiedades de solubilidad de los asfaltenos, que son solubles en benceno y tolueno, pero no en solventes alifáticos de bajo peso molecular como heptano y pentano (Mullins, 1998).

Los asfaltenos son hidrocarburos sólidos, amorfos, de color oscuro que tienen una estructura molecular compleja conformada por esqueletos de carbón e hidrógeno con átomos de N, S y O y cantidades mínimas de Ni y V, ordenados en estructuras alifáticas y aromáticas (Strausz y col. 1992, Mullins y col. 1998) y comúnmente asociados a petroporfirinas que son estructuras constituidas de un anillo pirrólico coordinado con un compuesto metálico (Fe, V, Ni). (Figura 2).

La masa molecular de los asfaltenos se ha intentado dilucidar desde hace un par de décadas utilizando diversas técnicas las cuales han generado varios modelos de la estructura de los asfaltenos.

Una de las técnicas más comunes para determinar la masa molecular de un compuesto es la osmometría de presión de vapor (VPO), la cual mide la cantidad de unidades de un compuesto no volátil en un solvente. El problema que presenta esta técnica es que, a la concentración requerida para obtener una medición confiable, los asfaltenos forman agregados, por lo que la VPO termina midiendo la masa de los agregados, además de que, al ser estructuras heterogéneas, presentan una dispersión en las mediciones. La

cromatografía de permeación en gel (GPC) tiene los mismos problemas, aparte de que relaciona el peso molecular de los asfaltenos con controles de poliestireno. (Andreatta et al. 2007)

Las técnicas que han dado una mayor aproximación de la estructura y masa de los asfaltenos han sido la resonancia magnética nuclear (RMN), fluorescencia en tiempo real (FD) (Andreatta et al. 2007) y diversas técnicas de espectroscopia de masas (MALDI, FIMS, LDMS)(Boduszynski, 1981; Boduszynski, 2001; Winans y col, 1999), mostrando que los asfaltenos tienen en promedio 7 anillos aromáticos que varían de 4 a 10, aproximando el peso de los asfaltenos a 700-750 g/mol. (Mullins, 1999; Mullins 2007; Boduszynski 1981).

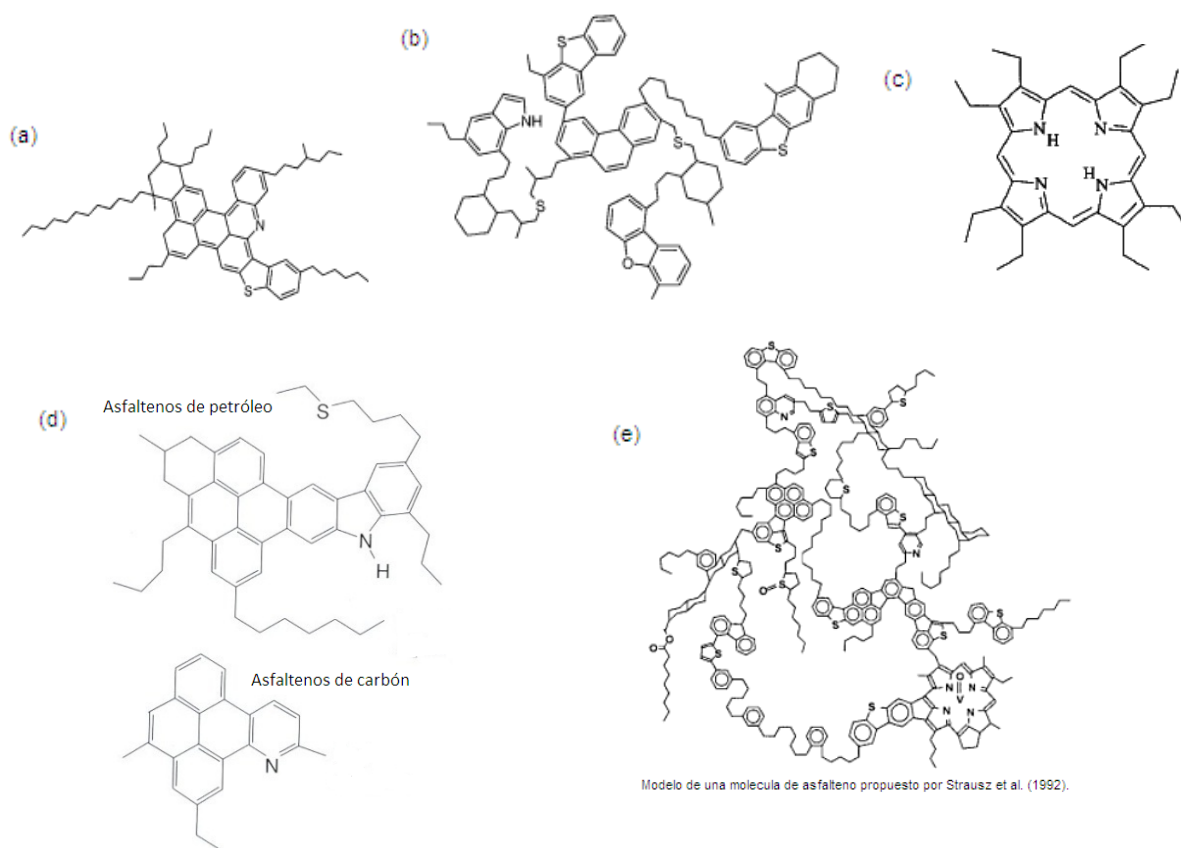


Figura 2. Unidades estructurales que constituyen a los asfaltenos: (a) núcleo aromático grande, (b) núcleos aromáticos pequeños unidos por puentes alifáticos y (c) anillo pirrólico característico de las petroporfirinas (d) diferencias estructurales se presentan entre asfaltenos dependiendo de la fuente de dónde se extraen (Mullins y col. 2007). (e) Modelo de la estructura de los asfaltenos propuesto por Strausz et al. 1992.

Los asfaltenos son polímeros heterogéneos que no tienen una estructura definida, sin embargo se han propuesto varios modelos, los cuáles coinciden en que los asfaltenos se forman a partir de núcleos de estructuras aromáticas unidas por cadenas alifáticas (Boduszynski 1984).

Existen dos modelos para estos compuestos. El primero posee un centro aromático policíclico grande con cadenas alifáticas, el segundo nos muestra muchos centros aromáticos policíclicos pequeños unidos por cadenas alifáticas de menor tamaño y unidos entre sí por cadenas alifáticas de diferentes tamaños con grupo sulfhidrilos, éteres, ésteres, etc. Cabe mencionar que todos los derivados del crudo contienen asfaltenos y la concentración y estructura de éstos influyen en las propiedades del crudo (Mullins, 2007).

La reactividad y la estructura de los asfaltenos no están determinadas y varían dependiendo de la materia prima de donde se obtengan, del método y de las condiciones de extracción. Se han reportado múltiples diferencias entre los asfaltenos obtenidos a partir de petróleo y los obtenidos a partir de carbón: la aromaticidad de los asfaltenos de petróleo es menor que la de los obtenidos de carbón. El tamaño de los anillos aromáticos de los asfaltenos de petróleo es mayor que el de los obtenidos de carbón. Las cadenas alifáticas de los asfaltenos de petróleo son más largas que las de los obtenidos de carbón. El peso molecular de los asfaltenos de petróleo es 10 veces mayor que el de los asfaltenos obtenidos de carbón. Los asfaltenos de petróleo son menos polares que los obtenidos de carbón. Los asfaltenos obtenidos de petróleo tienen menor cantidad de O₂, -OH y N que la de los asfaltenos obtenidos de carbón; por estos motivos los asfaltenos derivados del carbón son más reactivos que los derivados del petróleo (Mullins y col. 1998).

2.2 Refinamiento de tierras bituminosas.

Las tierras bituminosas se refieren a una mezcla viscosa cuya composición principal es de hidrocarburos de alto peso molecular, un gran contenido de asfaltenos, arena y diversos elementos tóxicos como son azufre, níquel, vanadio, cromo, mercurio, plomo y arsénico (Oil Sands Conservation Act 2000). El bitumen tiene una densidad mayor a 1.028 kg/cm³ (BP, 1988) y una viscosidad mucho mayor a la del crudo ligero, por lo que para poder transportarse se diluye con el uso de solventes, comúnmente, éter de petróleo o xilol (Oil Sands Conservation Act 2000). Existe una gran cantidad de tierras bituminosas en Canadá (Athabasca, Alberta) y en Venezuela (Canal del Orinoco), pero únicamente en el primero se encuentran accesibles en la superficie.

En Athabasca se realiza el refinamiento de las tierras bituminosas; el bitumen que se encuentra en la superficie es separando de la arena con agua caliente para reducir su viscosidad haciéndolo más fluido. Después se retiran los asfaltenos por partición y precipitación con solventes con una cantidad de solventes 4:1, aumentando los costos del proceso. El resto del bitumen se somete a un cracking catalítico a 450°C, este

refinamiento es costoso por lo que sólo puede hacerse mientras que los precios de petróleo no bajen y además genera una gran cantidad de contaminación.

La producción de un barril de petróleo proveniente de tierras bituminosas produce 3 veces más contaminación que en la obtención de crudo convencional, consumiendo de 2 a 4 barriles de agua dulce. Al final del proceso por cada barril de bitumen procesado quedan 1.5 barriles con desechos tóxicos (ácidos nafténicos, amoníaco y metales), arena y barro. Actualmente la contaminación generada en Athabasca por la extracción y el procesamiento del bitumen cubre un terreno de 130km² (Davies, 2009).

Se prevé que el tratamiento de bitumen de Alberta aumente de 1.5 millones de barriles por día en 2008 a 5 millones de barriles en 2030, calculando una duración del crudo de aproximadamente 200 años, lo cual generaría una gran cantidad de contaminantes (Govindhakannan y col., 2009).

2.3 Biotransformación de asfaltenos.

La fracción asfáltica es la fracción más recalcitrante del crudo debido al alto grado de complejidad estructural de los asfaltenos y al hecho de que comúnmente se encuentran agrupados en micelas rodeadas de parafinas, resinas y otros hidrocarburos menos pesados y más hidrofílicos. Finalmente, los asfaltenos están conformados por una gran cantidad de hidrocarburos poliaromáticos que también son recalcitrantes e incluso son tóxicos para microorganismos y animales (Koss, 1999; ATSDR, 1995; WHO, 1998)

Existe abundante información sobre el crecimiento de consorcios microbianos y organismos aislados capaces de crecer en hidrocarburos lineales, poliaromáticos y en crudo (Bertrand y col., 1983; Bublitz y col., 1994; Hofrichter y col. 1997; Naranjo y col., 2007; Volke y col., 2006; Saratale y col., 2007), sin embargo la información sobre la biodegradación de asfaltenos es escasa. A continuación se realizó una revisión bibliográfica de los artículos referentes a la biodegradación de asfaltenos.

Wyndham y Costerton (1981) reportaron el estudio de un grupo de bacterias aislado del bitumen del río Athabasca, el cual contiene una gran cantidad de asfaltenos. Sin embargo se observa en sus resultados que la degradación fue únicamente de la fracción malténica del bitumen. Hoefrichter y col. (1997) evaluaron la capacidad de 750 cepas de hongos de crecer en carbón y en asfaltenos, pero estos estaban adsorbidos en madera, por

lo que no pudo garantizar que la fuente de carbón empleada fuera proveniente de los asfaltenos exclusivamente.

Algunos artículos han reportado la degradación de la fracción asfáltica por diversos consorcios bacterianos. Rontani y col. (1985) estudiaron el crecimiento de microorganismos en *n*-parafina y asfaltenos, reportando una reducción del 45% del peso de los asfaltenos; obtuvieron espectros de IR de las muestras y sugirieron la adición de grupos hidroxilo y carbonilo. Sin embargo, a lo largo de sus experimentos no se usaron controles adecuados y la interpretación de los resultados puede ser incorrecta.

Pineda y col. (2002) reportaron la biodegradación de asfaltenos provenientes de un pozo de crudo maya por un consorcio microbiano aislado del mismo. Dicho consorcio incluía a las especies *Corynebacterium sp*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus brevis* y *Staphylococcus sp*. Analizaron la biodegradación de los asfaltenos en términos de producción de dióxido de carbono con 0.6% de asfaltenos como única fuente de carbón en medio mineral. Midieron la cantidad de CO₂ (Dispositivo ISO9439 y titulación con HCl) producido debido a los procesos de oxidación y mineralización que llevan a cabo los microorganismos al ocupar los asfaltenos como fuente de carbón y energía. En este experimento se muestra una producción de CO₂ en ambos controles. El consorcio microbiano sin asfaltenos genera el 39% del CO₂ generado por el inóculo con asfaltenos. Posiblemente el CO₂ producido provenga del sustrato contenido en el inóculo. Además, el medio abiótico que únicamente contiene asfaltenos, produce el 26% del CO₂ que fue generado por el inóculo con asfaltenos, mostrando incongruencia en los resultados.

Otro artículo reporta la biodegradación de asfaltenos con *Pseudomonas* (ST31) en crudo mediano. Los autores comprueban la degradación mediante análisis IR, que les permite ver la modificación de los grupos funcionales. Posteriormente midieron por osmometría de presión de vapor el peso molecular promedio de la muestra de asfaltenos que disminuye de 2500 a 1900 g/mol. (Fernández y col., 2006). Este artículo no reporta controles, interpreta de manera errónea los espectros de IR y la metodología utilizada para medir el peso molecular promedio de los asfaltenos no es correcta, ya que como revisamos anteriormente los asfaltenos son mezclas heterogéneas y forman agregados cuando se suspenden a las concentraciones requeridas para usar VPO.

Por otro lado, Sugihara y col. (1973) reportaron la desmetalización oxidativa de vanadilporfirinas en asfaltenos con agentes clorantes, obteniendo la aparición de un producto con absorbancia a 450 nm y coloración verdosa, así como la simultánea disminución de la banda de Soret a 410 nm, característica de las porfirinas que al

destruirse la estructura desaparece. Los mismos autores reportaron, en un artículo posterior, la mayor eliminación de los metales coordinados con petroporfirinas con respecto a los metales no coordinados.

La primera evidencia de transformación enzimática de asfaltenos con bases experimentales sustentables fue hecha por Fedorak y col. (1993) quienes reportaron la modificación de la estructura de las petroporfirinas de los asfaltenos con la enzima cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* en un sistema de solventes orgánicos. Lograron la desmetalización de las níquel-octano-etil-porfirinas (NiOEP) y de las vanadiloctanoetil-porfirinas (VOEP) en un 96% y 53 % respectivamente. Realizaron el mismo tratamiento a los asfaltenos obteniendo el 20% de desmetalización de Ni y de V. Semple y col. (1990), reportaron que solamente el 40% de los metales contenidos en los asfaltenos se encuentran coordinados con porfirinas. A la fecha no se ha reportado una evidencia clara de que los asfaltenos puedan ser degradados o transformados por actividad microbiana.

Pineda-Flores y Mesta-Howard (2001) sugirieron un posible mecanismo para la degradación de los asfaltenos, el cual consistía en primero someterlos a solventes polares para eliminar las micelas en las que están organizados. Romperlos mediante foto-oxidación, agregar substratos co-metabólicos y someterlos a amplios consorcios microbianos que incluyen bacterias de los géneros *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Ralstonia* sp., *Mycobacterium* sp., etc. Al final se obtenían como productos alcanos, hidrocarburos poliaromáticos (HPA) e hidrocarburos heteropoliaromáticos (HHPA). En dicho artículo se menciona que el proceso de degradación puede durar desde 2 a 7 días para alcanos, 50 a 200 días para HHPA y de 11 a 990 días para HPAs.

Naranjo y col. (2007) sugirieron la utilización del sistema enzimático extracelular oxidativo degradador de lignina (LDS) para cambiar las propiedades de los crudos pesados y extrapesados. Aislaron e identificaron 45 cepas diferentes de hongos, de las cuales 20 demostraron tener la capacidad de crecer en medio Czapek con diferentes HPAs (pireno, fenantreno, naftaleno, dibenzotiofeno y ciclohexano). Las especies identificadas pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Pseudallescheria* y *Neosartorya*.

A partir de la revisión bibliográfica realizada se concluyó que a la fecha no se ha reportado ningún microorganismo capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de

carbono y energía, sin embargo existen diferentes organismos que presentan una batería enzimática con un gran potencial de degradar estos compuestos.

2.4 Características del género *Aspergillus sp.*

Aspergillus sp. es un género de hongos filamentosos que incluye alrededor de 185 especies; pertenece a la familia de los ascomicetos y posee, en general, una estructura microscópica con hifas septadas y conidióforos rodeados por fiálides en forma de botella de donde se desprenden las esporas. Macroscópicamente son hongos filamentosos que poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro.

Los hábitats naturales de los *Aspergillus sp.* son el heno y el compostaje, sin embargo tiene la capacidad de crecer a diferentes temperaturas, condiciones ambientales y nutricionales. El rango de temperatura de crecimiento va de 0-5°C hasta 50-55°C, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies. Este género se ha aislado también de ambientes marinos y en suelos contaminados con petróleo (Valenzuela y col. 2006) y se ha reportado como hongo degradador de hidrocarburos (Chaillan y col. 2004).

Los *Aspergillus sp.* pueden ser patógenos oportunistas. Entre las patologías más frecuentes por *Aspergillus fumigatus* se encuentran la aspergilosis pulmonar invasiva, la onicomycosis, la otomicosis y la sinusitis alérgica. Otras especies producen metabolitos secundarios tóxicos como *Aspergillus flavus* que produce aflatoxinas que son hepatotóxicas para humanos; *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus caespitosus* generan fumitremógenos que son neurotóxicos y provocan temblores en el ganado que consume forraje contaminado (Bonifaz, 1990).

Hasta hace pocos años se creía que el género *Aspergillus* únicamente se reproducía de manera asexual, pero recientemente, se han reportado especies que se reproducen de manera sexual y asexual (Dyer, 2009; Machida y col. 2010). Las especies sexuales se conocen como telomorfos y se encuentran clasificadas en diferentes géneros del reino fungi (Bonifaz, 1990).

En enero de 2009, Dyer y col. publicaron el descubrimiento del ciclo sexual de *Aspergillus fumigatus* que hasta ese entonces se creía una especie que solo se reproducía asexualmente. Realizaron pruebas de recombinación de genes en los organismos; analizaron el genoma y encontraron aproximadamente 215 genes sexuales así como los genes necesarios para la expresión de éstos. Durante el análisis del genoma encontraron un dominio HMG (high mobility group) con un locus típico de hongos euscomicetos de

reproducción sexual; también encontraron genes que codifican para feromonas y para receptores de feromonas. El ciclo sexual de *Aspergillus* genera ascosporas funcionales y es clasificado bajo el género de *Neosartorya*.

Neosartorya fischeri es el hongo que presenta mayor cercanía filogenética a *Aspergillus fumigatus*, sin embargo presentan varias diferencias: macroscópicamente, *N. fischeri* presenta un micelio de la misma textura que *A. fumigatus* pero de color blanco y presenta cleistotecias que pueden distinguirse macro y microscópicamente en los cultivos. (McClenny, 2005; Machida y col. 2010). Los genomas de ambas especies fueron comparados por Worman y col. (2006) mostrando que el genoma de *N. fischeri* es ligeramente mayor, con un mayor número de clusters de genes ortólogos, posee la misma cantidad de GC y de intrones y un proteoma de menor tamaño que la cepa de *A. fumigatus*.

2.5 Lacasas

El uso de las enzimas en la industria ha favorecido la implementación de procesos catalíticos industriales económicamente viables y amigables con el medio ambiente. En el ámbito de la protección ambiental, las oxidorreductasas son las enzimas con mayor aplicación (Zazueta, 2008). Actualmente, las grandes compañías petroleras han desarrollado un gran interés en la degradación microbiana del petróleo, de los asfaltenos y de las tierras bituminosas. Los microorganismos que crecen a expensas de algún hidrocarburo producen una a o varias enzimas con las que degradan o rompen los compuestos y los utilizan como fuente de carbono (Zazueta, 2008).

El uso de enzimas en lugar de reacciones catalizadas químicamente en un proceso confiere varias ventajas. Por ejemplo, las enzimas son más específicas, es decir poseen una mayor selectividad química, lo que conlleva varios beneficios comerciales como poder actuar selectivamente en un enantiómero o diasterómero y no producen estereoisómeros; son regioselectivas, es decir pueden actuar solamente en una parte de la molécula o en un grupo funcional específico, a pesar de que exista otro de mayor reactividad; trabajan en condiciones ambientales de presión y temperatura, mientras que la mayoría de las reacciones de síntesis deben mantenerse a temperaturas elevadas causando un gasto de energía y utilizan reactivos de altas toxicidades; las enzimas y las proteínas son biodegradables y los materiales en los que se inmovilizan comúnmente son inertes; las enzimas casi no conllevan reacciones secundarias, disminuyendo la producción de contaminantes y de productos inútiles, lo cual se traduce a un menor costo y un mayor rendimiento (Rozzell, 1999).

Las lacasas (EC 1.10.3., p-difenol:dioxígeno oxidorreductasa) son enzimas que se han utilizado para degradar compuestos contaminantes y deben su nombre a que fueron aisladas del árbol de laca: *Rhus vernicifera*. La lacasa es una enzima que difícilmente se encuentra en plantas superiores y es más común aislarla de bacterias y hongos.

La lacasa fúngica típica (Figura 3a) es una proteína de aproximadamente 60-80 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de pH 4.0, con un óptimo de actividad entre 50 y 70°C. Su estructura es la de una glicoproteína donde la porción de carbohidratos contiene manosa, N-acetilglucosamina y galactosa y constituye el 15-20% de la molécula. Se ha propuesto que la glicosilación es responsable de la estabilidad estructural de la enzima y que protege a ésta de la proteólisis y de la inactivación por radicales libres. (Thurston, 1994).

La lacasa pertenece al grupo de las cobre-azul oxidasas. Las otras enzimas de este grupo son la ascorbato oxidasa de plantas y la ceruloplasmina, que es una proteína del plasma de los mamíferos. (Thurston, 1994). Las lacasas tienen múltiples sustratos como son difenoles, monofenoles y anilinas. Tienen como sustrato específico a la siringaldazina (N,N'-bis(3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído hidrazina) lo cual hace que esta reacción en ausencia de peróxido sea específica para lacasas (Thurston, 1994).

Las lacasas son enzimas monoméricas que contienen 4 átomos de cobre unidos a 3 sitios redox clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas (Figura 3):

1. Sitio T1 mononuclear, sus características electroscópicas y electrónicas son similares a la de los centros cobre-azules que se encuentran en las proteínas de transferencia de electrones. Su presencia confiere un color azul a la enzima en solución y se caracteriza por la presencia de una banda de absorción a 600nm. Cuando no contienen el cobre responsable de esta coloración se conocen como lacasas amarillas o blancas. (Figura 3b)
2. Sitio T2 mononuclear, presenta una geometría metálica trigonal y propiedades de resonancia paramagnética nuclear comparable con los complejos tetragonales de Cu(II). (Figura 3c)
3. Sitio T3 dinuclear, tiene un estado basal diamagnético que se origina del acoplamiento antiferromagnético fuerte entre los dos iones Cu(II). (Figura 3c)

La lacasa actúa por un mecanismo enzimático de ping-pong que inicia cuando el cobre del sitio T1 oxida al sustrato y se genera un radical libre. El electrón extraído es

transferido a través de un motivo tripéptido His-Cys-His y llega al sitio T2/T3 donde el oxígeno molecular es reducido a agua. El resultado final de este proceso es la reducción de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua y la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir 4 radicales libres.

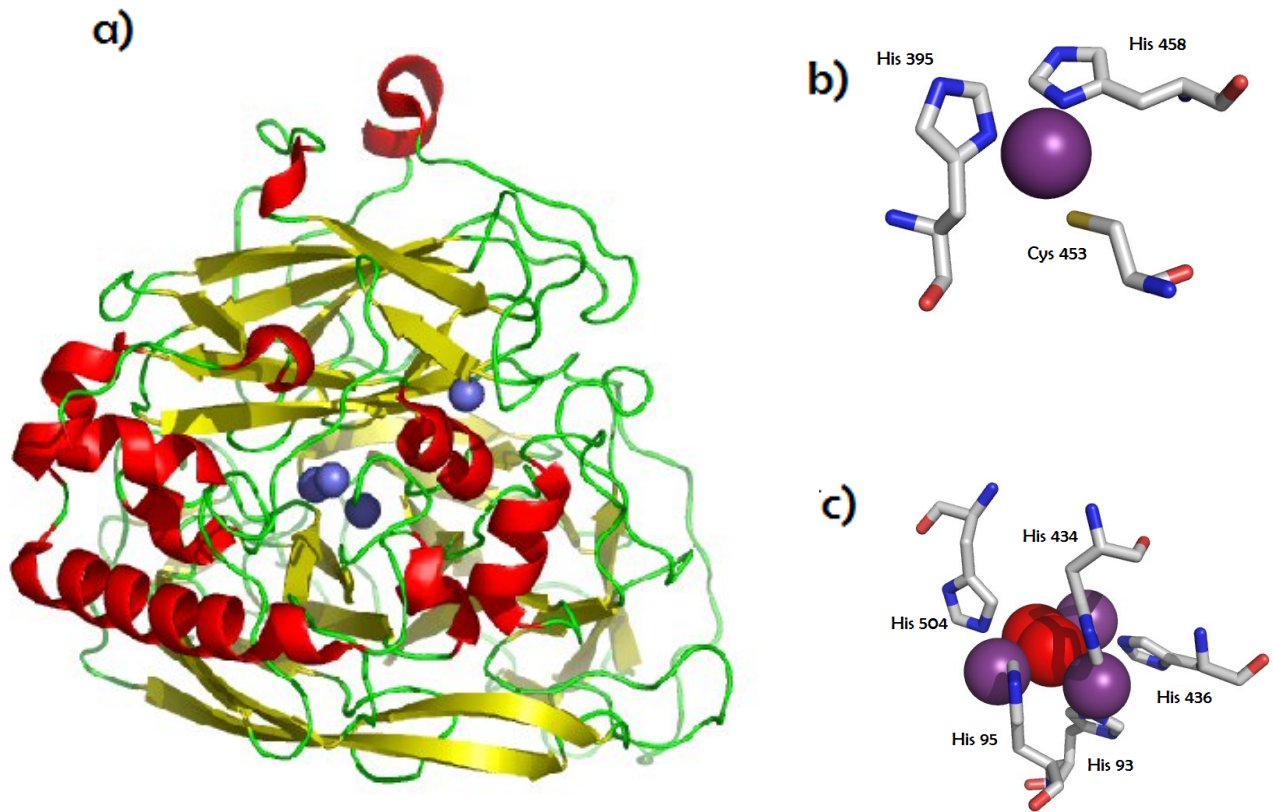


Figura 3. a) Estructura de la lacasa del hongo ascomiceto *M. albomyces*. Las lacasas son altamente conservadas estructuralmente y poseen un centro catalítico de 4 átomos de Cobre soportados por histidinas (estructura tomada del PDB) b) se observa la estructura del centro catalítico para el átomo del sitio T1 rodeada de histidinas y cisteínas. c) el cluster trinuclear contiene a los átomos del sitio T2 y T3 que se encuentra coordinado con histidinas.

Los genes que codifican para lacasas codifican para 520-600 aminoácidos incluyendo un péptido señal en el extremo N-terminal. Poseen segmentos identificados ricos en cisteínas e histidinas que sirven para dar soporte al cluster de átomos de cobre que se encuentran en cada molécula.

En *A. nidulans* se han encontrado 5 fenol-oxidasas a la fecha, tres de las cuales se regulan y se expresan sólo en ciclos sexuales o asexuales. Una de estas enzimas identificada en las hifas del hongo es la tirosinasa que está involucrada en la síntesis de melanina. La segunda enzima es la crealosa que sirve para la biosíntesis de pigmentos durante el ciclo asexual. La lacasa I, se expresa durante la formación del conidióforo y está involucrada en la formación de los pigmentos verdes, la falta de esta enzima produce esporas amarillas no maduras. La lacasa II se expresa durante el desarrollo sexual de las células y codifica para una catalasa-peroxidasa con un grupo hemo con actividad de lacasa sin centros de cobre. La última lacasa es sumamente parecida a LacII y fue descubierta mientras se trataba de clonar ésta. A esta lacasa se le conoce como *TilA* ya que se localiza en la punta de la hifa. (Scherer y col., 2001).

3. HIPÓTESIS

Si *Aspergillus sp* puede utilizar a los asfaltenos como única fuente de carbón, entonces debe contar con sistemas enzimáticos capaces de transformarlos modificando su estructura y produciendo moléculas de menor peso molecular.

4. OBJETIVOS

Realizar la caracterización de una cepa aislada, que es única en cuanto a su capacidad de degradar asfaltenos, utilizándolos como fuente de carbono y energía. Estudiar los sistemas enzimáticos involucrados en la transformación de los asfaltenos y determinar cuáles son los productos de bajo peso molecular que posiblemente se obtienen.

4.1 Objetivos particulares

- Determinar el género y especie de la cepa que está degradando a los asfaltenos por medio de morfología y herramientas moleculares.
- Estudiar la interacción del hongo con los asfaltenos.
- Estudiar el crecimiento del hongo en asfaltenos como única fuente de carbono y energía.
- Determinar las enzimas que están participando en el metabolismo de los asfaltenos, principalmente oxidorreductasas.
- Identificar y amplificar los genes de la o las enzimas responsables de la transformación de asfaltenos.
- Estudiar los cambios químicos ocurridos en los asfaltenos durante la degradación.
- Analizar los productos de menor peso molecular presentes en el medio extracelular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo.

Se estudió una cepa fúngica de morfología algodonosa, blanca, de especie no identificada, del género *Aspergillus sp.*, aislada de los crudos pesados del canal del Orinoco, en Venezuela.

5.2 Medios de cultivo, soluciones y reactivos.

A menos de que se indique lo contrario se empleó agua destilada para aforar.

Medio Czapek (1 lt) pH 5.5

NaNO ₃	4 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	1 g
KCl	1 g
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.02 g
Elementos traza	1 ml

El Sulfato de Magnesio se esterilizó aparte para evitar la precipitación y se agregó a cada matraz en condiciones de esterilidad.

Elementos traza (200ml) pH 5.5

FeSO ₄ •7H ₂ O	1 g
EDTA	10 g
ZnSO ₄ •7H ₂ O	4.4 g
H ₃ BO ₃	2.2 g
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.0 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.32 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0.32 g

Medio Sabouraud (1lt) pH 5.5

Glucosa	40 g
Peptona	10 g
Agar (para medio sólido)	1.5 g

Agar papa glucosada (PDA) (1 lt) pH5.5

Difco™ Potato Dextrose Agar 39g

Medio LB (1lt)

Triptona 10 g

Extracto de Levadura 5 g

NaCl 5 g

Solución patrón de IPTG 0.005 M

Isopropiltio-β-D-galactoside 2 g

Aforar con agua miliQ 1 ml

Solución patrón de X-gal 2%

X-gal 2 %

Aforar con dimetilformamida 1 ml

Solución patrón ampicilina 10%

ampicilina 100 mg

Aforar con agua miliQ 1 ml

Solución reveladora para gel de plata

Na₂CO₃ 400 mM

Sol. de tiosulfato al 1% 0.8 μM

Formaldehído 0.15 mM

ABTS (50mM)

azino-bis 2.2 (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic) 0.0274 g

Aforar con agua miliQ 1 ml

Amortiguador HSE

Hepes pH 6,9 10 mM

Sacarosa 0,5 M

EDTA pH 8,0 20 mM

Amortiguador TE pH 8

Tris	50 mM
EDTA	10 mM

SDS 20%

SDS	200 mg
H ₂ O	1 ml

Se emplearon los siguientes reactivos de Sigma-Aldrich: fenantreno, carbazol, benzo(a)pireno, 4,4 tiodifenol, benzofurano, heptadecano, 1,2:5,6 dibenzantraceno, dibenzotiofeno, naftaleno, fluoranteno, pireno, nonadecano, imidazol, feniletilsulfuro, trimetil silil acetamida y aceite comestible comercial Marca: 1.2.3.

5.2.1 Purificación de asfaltenos y eliminación de petroporfirinas.

Los asfaltenos se purificaron a partir de crudo maya por medio de precipitación con solventes, la ausencia de petroporfirinas se verificó monitoreando la presencia de la banda de Soret a 410 nm (García, 2004).

Se precipitaron 100 g de crudo maya con 4 litros de *n*-heptano. La suspensión se agitó por 3 horas y se dejó reposando 16 horas a temperatura ambiente cubriéndola de la luz. La fracción asfáltica se recuperó del precipitado por medio de filtración. Se resuspendió el precipitado con tolueno (10 ml/g) y se procedió a precipitar de nuevo con *n*-heptano. El sólido obtenido se secó a 75°C por 15 horas. La fracción se lavó para asegurar la remoción de compuestos solubles en heptano o compuestos que co-precipitaron con los asfaltenos.

Después, el precipitado se suspendió en *n*-heptano y se sonicó durante 20 minutos. El precipitado se recuperó por centrifugación a 12,100 g por 30 minutos, este proceso se repitió hasta que el sobrenadante presentaba un color amarillo claro. El sólido se secó a 70°C por 24 horas. Se recuperaron 10 g de asfaltenos a partir del crudo maya.

Los asfaltenos recuperados se disolvieron en tolueno (2.3% w/w de la concentración final), se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente. Se les agregó acetona a un volumen final de 90% w/w, se les mantuvo en agitación por 3 horas y finalmente se dejaron reposar por 48 horas. Después de este lapso, la suspensión se centrifugó a 12,000 g por 30 min y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó con acetona para eliminar las petroporfirinas ya que permanecen en esta fase, el procedimiento se repitió

varias veces monitoreando por espectroscopia de UV-visible la desaparición de la banda de Soret.

5.3 Determinación de la especie del hongo *Aspergillus sp.*

5.3.1 Diseño de oligonucleótidos para la secuenciación de rRNA 18S

Se mandaron a hacer oligonucleótidos diseñados a partir del alineamiento de las secuencias reportadas del rRNA 18S de varias especies de *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. granulosis* y *A. niger*) contenidas en NCBI para amplificar un fragmento de ≈ 500 pb.

Tabla 1. Oligonucleótidos de rRNA 18S diseñados para identificar la especie de *Aspergillus sp.*

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño (bp)	TM
Aspfwd	ACC TGC GGA AGG ATC ATT ACC	21	64
Aspfrev	ACA GAG CAG GTG ACA AAG CCC	21	66

5.3.2 Obtención de rRNA 18S y clonación de cDNA en un plásmido TOPO 2.1.

A partir de cultivos de *Aspergillus sp.* incubados 3 días en medio Czpek con asfaltenos a 150 rpm y 37°C se realizó la extracción de RNA con el reactivo TRIzol (Invitrogen) como se indica en las instrucciones del fabricante. Se verificó la integridad del RNA mediante un gel de agarosa.

A partir de este RNA, se realizó la síntesis de cDNA con los siguientes reactivos:

Oligo dT	1 μ l
RNA	7 μ l
dNTP (10 mM)	1 μ l
H2O	3 μ l

Esta solución se calentó a 65°C 5 min. y se colocó en hielo donde se le agregaron los siguientes reactivos:

Buffer first stand	4 µl
DTT	4 µl
RNasa	1 µl
M-MLV RT (invitrogen)	1 µl

Esta mezcla se colocó en un termociclador (BIO-RAD) a 37°C por 2 minutos, 37°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos y 4°C por 10 minutos. A partir de este cDNA se hizo un RT-PCR para amplificar con los oligonucleótidos Asp fwd y Asp rev y con los siguientes reactivos y condiciones:

H ₂ O	36.5 µl
DNA	3 µl
Buffer Taq	5 µl
MgSO ₄ (50mM)	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
oligo Asp fwd (25pm/ml)	1 µl
oligo Asp rev (25pm/ml)	1 µl
Taq (1U/µl)	0.5 µl
	50 µl

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30 s	} 30 ciclos
Hibridación	60°C	40 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	68°C	10 min	1 ciclo

El fragmento amplificado se ligó a un plásmido pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) con el protocolo recomendado por el fabricante y se incorporó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α dándoles un choque térmico a 42°C 2 minutos y dejando incubar en agitación

a 37°C por 2 horas. Posteriormente se plaqueó con 100 µl de las células transformadas en medio LB con ampicilina adicionado con IPTG y Xgal para seleccionar entre colonias blancas y azules y se incubó 24 horas. El vector utilizado (Figura 4) posee un sitio de restricción dentro del gen que codifica para *lacZ* por lo que si el fragmento se clona correctamente, este gen se interrumpe y no puede degradar la Xgal formando colonias blancas en vez de azules.

Se sembraron las colonias que resultaron blancas, es decir las que contenían el plásmido en medio LB con ampicilina y se dejaron incubando 12 horas a 37°C.



Figura 4. Plásmido pCR 2.1-TOPO utilizado para clonar nuestro fragmento de cDNA. Este vector posee un sitio de restricción dentro del gen que codifica para *lacZ* por lo que si el fragmento se clona correctamente, el gen se interrumpe y no puede degradar Xgal formando colonias blancas en vez de azules.

A partir de estas colonias se realizó un PCR de colonia:

H ₂ O	8.25 µl
DNA (colonia)	10 µl
Buffer Taq	2.5 µl
MgCl ₂ (50mM)	0.75 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
oligo Asp fwd (25pm/ml)	1 µl
oligo Asp rev (25pm/ml)	1 µl
Taq 1U/ µl (Fermentas)	0.5 µl
	25 µl

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial	94°C	4 min	}	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	1 min		
Hibridación	58°C	1 min	}	25 ciclos
Extensión	72°C	1 min		
Extensión final	72°C	10 min		1 ciclo

Se verificó en un gel de agarosa que se haya clonado nuestro fragmento de DNA y se observó una banda de ≈ 300 pb correspondiente al tamaño esperado. Después se resembró la cepa en medio LB líquido con ampicilina y se incubó 12 horas a 37°C en agitación. Se purificó el DNA (mini-prep) y se mandó a secuenciar.

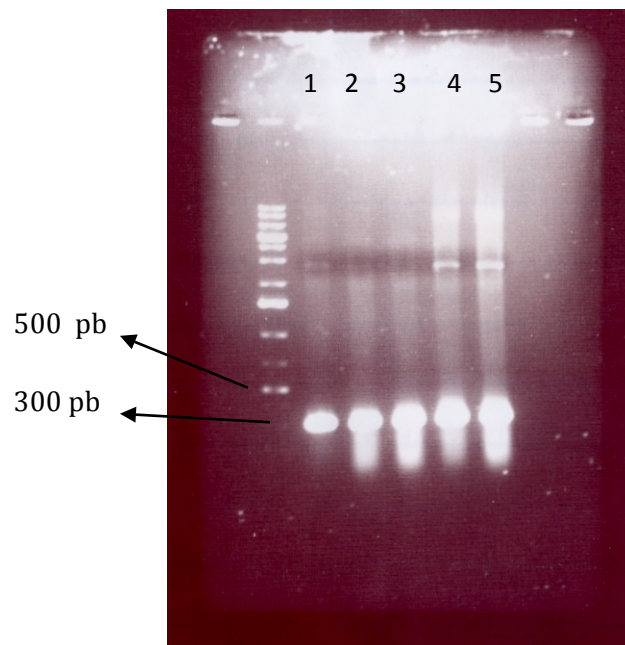


Figura 5. Gel de agarosa para la identificación del fragmento del gen de rRNA 18S. Se observa una banda de 300 pb que corresponde al gen rRNA 18S. Se observó la banda de DNA clonada a partir del PCR de colonia de las células DH5 α transformadas.

5.3.3 Diferenciación morfológica de especies de *Aspergillus sp* con rRNA 18S similar.

Los resultados de las secuencias del rRNA 18S mostraron porcentajes de identidad mayores al 98% con 4 diferentes especies de *Aspergillus sp* y *Neosartorya fischeri*. Por lo

que fue necesario discriminar entre ellas por sus diferencias en crecimiento en agar PDA, Sabouraud y por diferencias en el genoma del hongo. También se analizó la morfología de las hifas y de estructuras de reproducción de los hongos por medio de tinciones con Azul de metileno.

5.3.4. Análisis del DNA genómico en busca de genes de diferenciación de especies.

Al no obtener un resultado conciso sobre la determinación de la especie del hongo con el que trabajamos, comenzamos a buscar otras metodologías que nos fueran útiles.

El gen que se utiliza comúnmente para lograr distinguir entre las especies de *Aspergillus sp* y *Neosartorya sp* es el de la β -tubulina, por lo que nosotros seguimos un protocolo de amplificación similar al citado en el artículo de Glass y col. (1995) con el fin de lograr la identificación del hongo.

5.3.4.1 Oligonucleótidos para la secuenciación de un fragmento del gen β -tubulina.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento del gen de β -tubulina se generaron a partir de los oligonucleótidos diseñados por Glass y col. (1995) bt2a y bt2b.

Tabla 2. Oligonucleótidos para amplificar una porción del gen que codifica para la β -tubulina para identificar la especie de *Aspergillus sp*.

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño (bp)	TM
bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	24	64
bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	24	66

5.3.4.2 Obtención de DNA genómico.

Se obtuvo una cantidad de micelio de 1 a 2 g a partir de cultivos en medio Sabouraud de 2 días a 37°C en agitación. Se trituró el micelio en un mortero con nitrógeno líquido y se

transfirió a un tubo de 50 ml con 6 ml de amortiguador HSE y 0,3 ml de SDS 20%. La muestra se homogenizó en un vórtex, se incubó a 65°C durante 15 minutos y se añadió un volumen de TE. La muestra se homogenizó por inversión y a continuación, se centrifugó a 15000 rpm, a 4°C durante 20 minutos. Se trató al sobrenadante con un volumen de fenol equilibrado con Tris a pH 7 y se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante se trasvasó a tubos nuevos y se repitió la fenolización con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se centrifugó en las mismas condiciones y se lavó de nuevo el sobrenadante con cloroformo. Se agregaron 0,2 volúmenes de acetato sódico 3.0 M pH 5.2 y 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar y la muestra se dejó reposando durante una hora a -80°C. Se centrifugó a 15000 rpm, 4°C por 15 minutos, se lavó el pellet con 2 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 400 µl de agua. La muestra se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se le añadieron 2 µl de *RNAse* (10 mg/ml) y se incubó media hora a 37°C. Posteriormente se añadieron 40 µl de acetato sódico 3.0 M pH 5.2 (1/10 volúmenes) y 240 µl de isopropanol (3/5 volúmenes). El precipitado recogido después de una centrifugación a 15000 rpm durante 15 minutos se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 300 µl de agua. El DNA fue mantenido a -20°C y la integridad del DNA se comprobó en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE.

5.3.4.3 Amplificación del fragmento del gen β -tubulina.

A partir del DNA se hizo un PCR para amplificar el gen β -tubulina con los oligonucleótidos bt2a y bt2b (Glass y col., 1995) con los siguientes reactivos y condiciones:

H ₂ O	36.5 µl
DNA	3 µl
Buffer Taq	5 µl
MgSO ₄ (50mM)	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
oligo bt2a (25pm/ml)	1 µl
oligo bt2b (25pm/ml)	1 µl
Taq Hi-Fi (5U/ µl)	<u>0.5 µl</u>
	50 µl

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	1 min	} 32 ciclos
Hibridación	58°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	68°C	10 min	1 ciclo

Se esperaba un fragmento de gen de 495 pb, este producto se verificó con un gel de agarosa, se limpió y se comparó con las siguientes secuencias (Hong y col. 2007):

Tabla 3. Número de acceso del gen de β -tubulina de los *Aspergillus* sección *Fumigati* utilizados en este estudio.

Especie	No. acceso Gen Bank β -tubulina	Especie	No. acceso Gen Bank β -tubulina
<i>A. brevipes</i>	AF057311	<i>A. duricaulis</i>	AF057313
<i>A. fumigatiaffinis</i>	DQ094885	<i>A. fumigatus</i>	AY685150
<i>A. fumisynnematus</i>	AB248076	<i>A. lentulus</i>	AY738513
<i>A. novofumigatus</i>	DQ094886	<i>A. unilateralis,</i>	AF057316
<i>A. viridinutans,</i>	AF134779	<i>A. turcosos</i>	DQ534142
<i>N. assulata</i>	DQ114123	<i>N. aurata</i>	AF057318
<i>N. aureola</i>	AF057319	<i>N. coreana</i>	AY870758
<i>N. denticulata</i>	DQ114125	<i>N. fennelliae</i>	DQ114127
<i>N. fischeri</i>	AF057322	<i>N. galapagensis</i>	DQ534145
<i>N. galabra</i>	AY870734	<i>N. hiratusake</i>	AF057324
<i>N. laciniosa</i>	AY870756	<i>N. multiplicata</i>	DQ114129
<i>N. nishimurae</i>	AB201360	<i>N. pseudofischeri</i>	AY870742
<i>N. quadricinta</i>	AF057326	<i>N. spathulata</i>	AF057320

5.4 Microscopía electrónica de barrido.

Se estudió la interacción del hongo con los cristales de asfaltenos por medio de microscopía electrónica de barrido en el laboratorio de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se llevó una muestra de *Aspergillus sp.* en medio Czapek con 20 mg de asfaltenos como única fuente de carbón, la muestra fue incubada durante 3 semanas a 37°C y 100 rpm.

El microscopio utilizado fue un JEOL JSM 5410-LV con un rango de amplificación de 15 a 200,000 x con una resolución aprox. de 4 nm con detectores de electrones secundarios y dispersos.

5.5 Estudio del crecimiento fungico.

5.5.1 Cinética de aumento de proteína intracelular.

Se desarrolló un protocolo para medir el crecimiento del *Aspergillus sp.* en medio Czapek adicionado con asfaltenos como única fuente de carbono (20mg/50ml). El crecimiento se monitoreó durante 7 semanas, incluyendo controles del medio con asfaltenos sin hongo inoculado y controles con inóculo sin fuente de carbono. Las cinéticas se realizaron por triplicado.

Se disolvió una cantidad de asfaltenos en diclorometano a una concentración final de 4 mg/ml. En caso de que los asfaltenos no se disolvieran completamente los sometíamos a agitación ultrasónica tres veces durante 20 segundos en hielo. Se le agregó a cada matraz la cantidad equivalente a 20 mg y se dejó evaporar a sequedad. Posteriormente se agregaron 50 ml. de medio Czapek a cada matraz y se esterilizaron. Finalmente se sembraron los matraces a partir de una muestra homogenizada de *Aspergillus sp.* y se incubaron a 37°C con 100 rpm de agitación.

5.5.1.1 Medición de proteína intracelular.

Cada semana durante las 7 semanas que duró la cinética se tomaron tres matraces inoculados, un control con sólo asfaltenos y un control con sólo inóculo y se filtró el

contenido. Los asfaltenos y la biomasa permanecían en el papel filtro y el sobrenadante se almacenó en un matraz. Se lavó el papel filtro con agua a presión y se centrifugó el lavado a 12,000 rpm durante 5 min para eliminar el agua.

Colocamos la biomasa con asfaltenos en un mortero de porcelana limpio previamente enfriado a -70°C . Se agregó nitrógeno líquido y se maceró el hongo para romper las células. El procedimiento se repitió 3 veces para asegurar que las células se rompieran y las proteínas se liberaran al medio. Se centrifugó durante 1 min. a 3,000 rpm para precipitar los asfaltenos y se midió la cantidad de proteína total como indicador de crecimiento microbiológico por el método de Bradford.

Las muestras a evaluar contenían 200 μl de reactivo de Bio-Rad en un volumen de reacción de 800 μl . Después de agregar el reactivo los tubos se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar de 5 a 10 min. La concentración de proteínas se midió mediante densidad óptica con un espectrofotómetro Beckman modelo DU-650 a una λ de 595 nm. La curva patrón utilizada para las mediciones se realizó con BSA con una $R^2= 0.9970$.

5.5.1.2 Curva Patrón de peso seco de biomasa contra μg de proteína/ml

Se inoculó con el *Aspergillus sp.* un matraz con 50 ml de medio Sabouraud previamente esterilizado. Después de incubar 2 días a 37°C y 150 rpm, molimos el hongo en una licuadora y lavamos 3 veces el medio homogenizando con agua destilada. A partir de este homogenizado tomamos cuatro muestras de diferentes cantidades de mezcla (0.2 ml a 2 ml) con una pipeta y las guardamos en tubos eppendorf previamente etiquetados y pesados. Dos de los cuatro tubos de los diferentes volúmenes se secaron totalmente en el horno a 70°C durante dos días. Al contenido de los otros eppendorfs se les aplicó el procedimiento descrito anteriormente para obtener la cantidad de proteína/ml presente en la muestra. Con estos datos se hizo una curva patrón para poder reportar los resultados en g de biomasa seca.

5.5.2 Cinética de mineralización de asfaltenos.

Se desarrolló un protocolo para medir el consumo de asfaltenos por *Aspergillus sp.* en medio mineral midiendo la cantidad de CO_2 producida. Los cultivos (por triplicado) se sembraron en frascos serológicos estériles de 125 ml con 30 ml de medio mineral Czapek

y asfaltenos como única fuente de carbono. Se incluyeron 3 controles del medio con asfaltenos sin hongo inoculado y 3 controles con inóculo sin fuente de carbono. Se monitorearon los medios por un período de 11 semanas. Se le agregó a cada frasco serológico 20 mg de asfaltenos sin petroporfirinas de la misma manera que a los matraces inoculados para la curva de proteína interna. Los matraces se sembraron con una muestra homogenizada de *Aspergillus sp.*, se incubaron a 37°C y 150 rpm de agitación. Se realizó una curva patrón de CO₂ para poder relacionar el área del pico obtenido por el cromatógrafo con la concentración de CO₂.

De cada cultivo se tomaron 100 µl de la fase gaseosa contenida en los frascos serológicos con una jeringa de vidrio adicionada con un dispositivo especial que nos permitiera encerrar una muestra de aire y se inyectó en un Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N equipado con un detector de conductividad térmica TCD bajo las siguientes condiciones de operación: Gas acarreador: Helio. Temperatura del inyector: 150°C. Temperatura del horno: 100°C. Temperatura del detector de TCD: 250°C. Cada semana durante las 11 semanas se hizo un análisis de los cultivos para medir la cantidad de CO₂ producido.

El área del pico se relaciona con la cantidad de C monitoreado por la siguiente ecuación:

$$\text{Área del pico} * 0.00106362 = \text{mg de C consumido.}$$

Esta ecuación se obtuvo de multiplicar el área promedio de cada medición con el volumen de cabeza y con el factor de la curva patrón que relaciona X= el área del pico obtenido del cromatograma (x) con Y= el porcentaje de CO₂ (y=0.003x). Después por medio de ley de gases ideales se obtuvieron el número de moles presentes en la muestra y a partir de estos el mg de C consumidos.

5.6 Caracterización de enzimas extracelulares.

5.6.1 Actividad enzimática con diferentes sustratos.

ABTS: Cada vez que se tomaba un cultivo para analizar el aumento de proteína en la curva de cinética de crecimiento, se medía la actividad enzimática de 900 µl del

sobrenadante con 100 μ l de ABTS (50mM) en un espectrofotómetro Beckman modelo DU-650 a una λ de 436 nm después de una hora. Este procedimiento se repitió para cada punto de la curva de aumento de biomasa. El coeficiente de extinción molar del ABTS (ácido 2-2'-azino-bis(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfónico) es de 29.300 M⁻¹ cm⁻¹ a una λ de 436 nm (Wolfenden y col. 1982).

El resto del medio extracelular se congeló durante las 8 semanas que duró la cinética de crecimiento. Al concluir este período se descongeló, se eliminaron hifas y compuestos no solubles por medio de un filtro millipore de 0.22 micrómetros y se concentró en un Amicon con una membrana de 10 KDa. A partir de esto se obtuvieron 5 ml finales, que se congelaron en las paredes de un matraz de pera con hielo seco y acetona para ser liofilizados. Después de 10 horas se obtuvo un liofilizado que se resuspendió en 2 ml de buffer de fosfatos pH 6.8 y se dializó en una membrana de 12,000 KDa durante dos horas. Finalmente se centrifugó a 9,000 rpm y se midió la cantidad de proteína y la actividad enzimática con ABTS.

Siringaldazina: Se midió la actividad enzimática con siringaldazina 0.5 mM del concentrado extracelular a 530 nm por triplicado. El coeficiente de extinción molar de la siringaldazina es de 64,000 M⁻¹ cm⁻¹ a una λ de 530 nm. (Tinoco, 2001).

5.6.2 Determinación del peso molecular de las proteínas presentes en el medio extracelular.

La cantidad de proteína presente en el medio extracelular fue muy baja por lo que se concentraron en un Amicon aproximadamente 1000 veces. Al ser poca la cantidad de proteína encontrada utilizamos un gel de acrilamida con tinción de plata para determinar los pesos moleculares.

El gel de acrilamida se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	10 ml de gel separador al 12%	5 ml de gel concentrador
Agua	3.3 ml	3.4 ml
Acrilamida (30%)	4.0 ml	0.83 ml
Buffer	2.5 ml	0.63 ml

	Tris pH 8.8	Tris pH 6.8
SDS 10%	0.1 ml	0.05 ml
TEMED	0.004 ml	0.005 ml
APS (10%)	0.1 ml	0.05 ml

Se agregaron 15 µl de muestra con 5 µl de buffer de corrida, en el carril uno se cargó el marcador de pesos moleculares y se corrió con buffer Tris-Glicina-SDS a 120-160 V.

Se realizaron las soluciones necesarias para la tinción de plata ya que deben prepararse en el momento. El gel se manipuló en todo momento con guantes para no mancharlo con los dedos.

Después de que el gel terminó de correr continuamos con el protocolo para tinción de plata:

1. Se fijó con una solución de metanol 40% y formol al 5% durante media hora en agitación.
2. Se lavó dos veces el gel con agua destilada durante 5 minutos en agitación.
3. Se trató el gel con tiosulfato de sodio 0.02% durante un minuto en agitación y se lavó dos veces con agua destilada.
4. Se agregó la solución de Nitrato de plata 0.1% y se agitó durante 15 min. Se enjuagó con agua y se le fue agregando pequeñas cantidad de revelador poco a poco (1.5g de Na₂CO₃, 1 ml de la solución de tiosulfato 0.02% y 250 µl de formol en 50 ml de agua) hasta que se visualicen las bandas.
5. Cuando éstas pudieron visualizarse, se agregó ácido cítrico 2.3 M para detener la reacción (esta reacción produce burbujas) y se lavó el gel con agua durante 10 min en agitación.
6. Se lavó con etanol al 10% y glicerol al 4% durante 10 minutos en las mismas condiciones. A lo largo del protocolo se mantuvo la agitación a 40 rpm constantes.

Finalmente obtuvimos los pesos moleculares de las proteínas del medio extracelular a partir del marcador de peso molecular colocado en el primer carril.

5.7 Clonación y expresión de el o los genes de las enzimas presentes en el medio extracelular.

5.7.1 Diseño de oligonucleótidos degenerados para la clonación del gen de lacasa.

Se mandaron a hacer oligonucleótidos diseñados a partir del alineamiento de 3 secuencias reportadas en la base de datos de NCBI: para una lacasa de *A. fumigatus*, una de *A. clavatus* y una oxido-reductasa hipotética de *A. fumigatus*. Estos genes son de un tamaño aproximado de 1792 a 1830 pb. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de regiones de mayor conservación localizadas a 201 y 1505 nucleótidos dentro del gen.

Tabla 4. Oligonucleótidos degenerados de lacasas de diferentes especies de *Aspergillus sp.*

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (bp)
Lacfwd	CAR GGV GAY GAT GTY GAR TTY TTR GT	26
Lacrev	CGW AGA AYT TGT TVG MGT GYT TGT G	25

Código de bases degeneradas:

M= A/C **R**=A/G **W**=A/T **S**=C/G **Y**=C/T **K**=G/T
V=A/C/G **D**=A/G/T **H**=A/T/C **B**=C/G/T **N**=A/C/G/T

5.7.1.1 Clonación parcial en TOPO/TA

A partir del cDNA obtenido del rRNA que se utilizó como templado en la identificación del hongo, hicimos un RT-PCR para amplificar con los oligonucleótidos Lacfwd y Lacrev con los siguientes reactivos y condiciones:

H ₂ O	38.7 µl
cDNA	3 µl
Buffer Taq(10x)	5 µl
MgSO ₄ (50mM)	1.5 µl
dNTPs	1 µl
oligo Lacfwd (25pm/ml)	1 µl
oligo Lacrew (25pm/ml)	1 µl
Taq platinumium	0.2 µl
	<hr/> 50 µl

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial	95°C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30s	} 30 ciclos
Hibridación	53.7°C, 55°C, 60°C	40s	
Extensión	72°C	1.30min	
Extensión final	68°C	10 min	1 ciclo

Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1,300 pb del gen de la lacasa fúngica. Se procedió a realizar la clonación del DNA en un plásmido de igual manera que se clonó el fragmento de cDNA del rRNA 18S en TOPO 2.1 y se incorporó a células DH5α para obtener células transformadas. Se realizó un PCR de colonia para verificar que el fragmento clonado fuera el deseado.

5.7.1.2 Obtención del gen completo que codifica para la lacasas.

Clonamos el gen completo ya que sólo teníamos un fragmento de aproximadamente 1500 pb.

Se hizo un BLAST del fragmento de 1500 pb utilizando la base de datos del NCBI. A partir de estos resultados, se hizo un análisis del fragmento del genoma anterior y posterior buscando al final secuencias de STOP (taa, tag, tga), posibles codones de inicio, secuencias de péptido señal y se evaluaron con la ayuda del ExpASy Proteomics Server, a partir de esta información generamos los oligonucleótidos de la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos generados para la clonación de la secuencia de la lacasa tilA .

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Tamaño (bp)
TilAfwd	ATG GGC TCC TTT CGC GAT GGA C	22
TilArev	CTA TGA TCC CGA GGC AGC AAG C	22

A partir de cDNA hicimos un PCR para amplificar con los oligonucleótidos tilAfwd y tilArev con los siguientes reactivos y condiciones:

H ₂ O	38.7 µl
cDNA	3 µl
Buffer Taq*	5 µl
dNTPs	1 µl
oligo tilAfwd (25pm/ml)	1 µl
oligo tilArev (25pm/ml)	1 µl
Taq High-Fidelity	<u>0.3 µl</u>
	50 µl

*Incluye MgCl₂

Bajo las siguientes condiciones de amplificación:

Desnaturalización inicial	95°C	2 min	}	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30s		
Hibridación	55.7°C, 61.1°C, 65°C,	30s	}	35 ciclos
Extensión	72°C	2 min		
Extensión final	72°C	7 min		1 ciclo

Para asegurarnos que clonamos el gen correcto, se verificó el tamaño de éste en un gel de agarosa con el marcador 1Kb plus. Después se concentró todo el producto de PCR en un gel, se cortó la banda sin exponerla a luz UV, se recuperó el producto y se limpió con el kit de limpieza de DNA Zymo research para poder mandar a secuenciar.

5.8 Crecimiento de *Aspergillus sp.* en fracciones de asfaltenos y compuestos modelo.

5.8.1 Crecimiento de *Aspergillus sp.* en diversos HPAs e hidrocarburos lineales.

Se evaluó el crecimiento del hongo en diferentes compuestos modelo utilizando estos como única fuente de carbono. Se agregaron 10 mg de: fenantreno, carbazol, feniletilsulfuro, benzo(a)pireno, 4,4 tiodifenol, benzofurano, nonadecano, heptadecano, 1,2:5,6 dibenzantraceno, dibenzotiofeno, naftaleno, fluoranteno, pireno, imidazol y aceite vegetal comercial 1.2.3 a tres matraces. Después se agregó a cada matraz 50 ml de medio Czapek adicionado con elementos traza, se esterilizó y se sembraron dos matraces a partir de un inóculo de *Aspergillus sp.* dejando un matraz como control. Se incubaron a 37°C con 100 rpm de agitación. Después de 15 días, se filtró el contenido y se continuó con el protocolo descrito en la sección 5.5.1.1 para medición de proteína total por método de Bio-Rad.

5.8.2 Crecimiento de *Aspergillus sp.* en fracciones de asfaltenos de diferente polaridad.

Los asfaltenos se fraccionaron por polaridad de acuerdo al método reportado por Buenrostro (2002). El fraccionamiento por polaridad se realizó preparando una solución inicial al 2% de asfaltenos en tolueno en un volumen final de 10 ml (0.2 g en 10 ml) más 2.5 ml de acetona para llegar a una concentración final de 80/20 T/A y se colocó en tubos de centrifuga. La muestra se homogenizó por agitación ultrasónica durante 6 lapsos de 30 segundos, el tubo se mantuvo todo el tiempo en hielo y se verificó que la micropunta del sonicador no se calentase demasiado para evitar pérdidas por evaporación. El sistema se dejó reposando por 16 horas y al término de este tiempo, se centrifugó a 2500 rpm/ 30 minutos. Los asfaltenos solubles se trasvasaron a otro tubo de centrifuga con una pipeta Pasteur y se repitió el procedimiento agregando la cantidad de acetona necesaria para cumplir con el siguiente porcentaje. Los asfaltenos precipitados fueron extraídos con diclorometano a viales previamente pesados y etiquetados, finalmente se evaporó el diclorometano en un horno a 70°C por 24 horas y se pesó otra vez para obtener el porcentaje de asfaltenos correspondientes a esa polaridad.

El sistema permaneció todo el tiempo cerrado y en frío para evitar cambios en la polaridad de la soluciones debido a la evaporación de solventes. Los frascos se mantuvieron tapados con gasa para evitar agregar peso extra a los viales por deposición de polvo.

Tabla 6. Cantidad de acetona-touleno necesaria para el fraccionamiento de asfaltenos por diferencias de polaridad.

Fracción		1	2	3	4/5
Tol/Acet	100/0	80/20	60/40	40/60	20/80
Vol. Final	10	12.5	16.65	25	50
Acetona (ml)	0	2.5	4.15	8.35	25

Menos polar Más polar

Se pesaron 20 mg de cada una de las diferentes fracciones de los asfaltenos y se colocaron en matraces de 125 ml. Se les agregó medio Czapek (50ml.), se esterilizaron y posteriormente se inocularon.

Después de cuatro semanas de incubación, se midió la cantidad de proteína interna total tanto de los cultivos como de la cantidad inoculada inicialmente como se indica en la sección 5.5.1.1

5.9 Caracterización de productos de la transformación de asfaltenos

5.9.1 Análisis de muestras por espectroscopia Infrarroja

Los espectros de IR se midieron a partir de las muestras de asfaltenos remanentes de las pruebas de los fraccionamientos por polaridad; después de moler el hongo con nitrógeno y medir proteína para determinar crecimiento, se agregó diclorometano a la muestra para solubilizar los asfaltenos y poder tomar únicamente esta fracción con una pipeta Pasteur.

Las muestras de asfaltenos se diluyeron en diclorometano para poder colocar una monocapa en el diamante del IR y se dejaron secar hasta formar una película uniforme, esto se repitió 3 veces para tener una película un poco más gruesa. Con el fin de comparar

los IR de las muestras después del tratamiento fúngico de 4 semanas, se tomaron como controles los IR de las fracciones sin tratar y la concentración de estos se estandarizó para que el tamaño del pico de metilos fuera el mismo. El espectro obtenido de las muestras sin tratar se le restó a los espectros de las muestras tratadas. Los barridos se hicieron en un espectrómetro FT-IR Perkin Elmer, Spectrum RX1.

5.9.2 Análisis de las muestras por cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases acoplada a un detector de masas(CG-MS)

Se corrieron las muestras en un cromatógrafo de gases Aglient 6890 N acoplado a un espectrómetro de masas Aglient 5973 N.

5.9.2.1 Análisis de fracciones de asfaltenos tratadas con *Aspergillus sp.*

A partir de las diferentes fracciones de asfaltenos obtenidas del protocolo 5.8.2 se extrajo la fracción soluble en pentano. Esto se logró poniendo los asfaltenos recolectados en frascos de vidrio cerrados solubilizados en la mínima cantidad de diclorometano posible (20µl aprox.) y con 3 ml de pentano. Se dejaron en agitación toda la noche y eventualmente se separó por centrifugación la fracción soluble de la fracción no soluble.

El cromatógrafo de gases se programó de la siguiente forma: Temperatura inicial 100°C durante 10 minutos, seguido de un incremento de temperatura de 10°C cada 10 minutos hasta llegar a una temperatura de 300°C, temperatura a la cual se mantenía por 10 min. La temperatura de detector FID fue de 290°C, y la temperatura del puerto de inyección fue de 250°C

5.9.2.2 Análisis de compuestos modelo tratados con *Aspergillus sp.*

Los compuestos modelo fueron seleccionados por su parecido a las estructuras que forman a los asfaltenos. Los cultivos permanecieron 4 semanas en agitación a 37°C con pireno, heptadecano, carbazol y dibenzotiofeno como única fuente de carbono en medio Czapek. Los cultivos se centrifugaron y decantaron. Se le agregaron 4 ml de diclorometano al pellet, se seco la muestra con sulfato de sodio anhidro y se recolectó en un vial dónde se dejó evaporar a sequedad. El sobrenadante se trató con 2 gotas de HCl concentrado para

llevar a un pH ácido y se realizaron tres extracciones orgánicas con 10 ml. de diclorometano. Después se filtró por sulfato de sodio anhidro, se secó en un rotavapor y se recuperó en un vial. Finalmente se inyectó 1 µl de las muestras del pellet y del sobrenadante al cromatógrafo.

El programa de temperaturas del cromatógrafo fue el siguiente: Temperatura inicial de 100°C durante 10 minutos, seguido de un incremento de temperatura de 10°C cada 10 minutos hasta llegar a una temperatura de 300°C, temperatura a la que permaneció por 10 min. El flujo de gas Helio (gas acarreador) fue de 0.158 ml/min y la temperatura del detector FID permaneció a 290°C, mientras que la temperatura del puerto de inyección fue de 250°C

5.9.2.3 Sililación de muestras.

Se inocularon 6 matraces con 20 mg de asfaltenos, así como 3 controles de medio Czapek con asfaltenos sin inóculo y se incubaron durante 4 semanas a 37°C con agitación a 100 rpm. Se obtuvo el sobrenadante de estos cultivos por filtración y se realizó una extracción orgánica con diclorometano como se describe en la sección 5.9.2.2, el remanente se llevó a total sequedad con la ayuda de un rotavapor.

Estas muestras y las muestras de los asfaltenos fraccionados por polaridad con y sin tratamiento secas fueron sililadas. La sililación se llevó a cabo resuspendiendo la muestra en 10 µl de tolueno y agregando 50 µl de trimetil silil acetamida (TMS). Las muestras se dejaron reaccionando por 30 minutos a 50°C. Después se inyectaron en el CG-MS utilizando el programa del cromatógrafo mencionado en el punto anterior. Las muestras se analizaron y compararon entre sí. También se inyectó un control que contenía únicamente al compuesto TMS.

Se utilizó una columna Zebron ZB-1HT Inferno de 20 m. de largo y 0.18 mm de diámetro de Phenomenex. El cromatógrafo se programó de la siguiente manera: La temperatura inicial fue de 100°C durante 10 minutos, seguido de un incremento de temperatura de 10°C cada 10 minutos hasta llegar a una temperatura de 350°C, temperatura a la cual se mantuvo por 10 min. El flujo de gas Helio (gas acarreador) fue de 0.158 ml/min y la temperatura de detector FID fue de 290°C, mientras que la temperatura del puerto de inyección fue de 250°C.

5.9.3 Obtención de matrices de emisión-excitación por medio de fluorescencia

Para estandarizar las muestras a analizar en el espectrofluorómetro se realizó un ensayo semi-cuantitativo donde se aproximaron las concentraciones de las muestras según su absorbancia en el espectro visible a 500 nm. Las soluciones se conservaron en frascos perfectamente limpios y cerrados con tapa de teflón y en la oscuridad.

Las matrices de emisión-excitación de los compuestos se realizaron en un rango de longitudes de onda de emisión de 300 nm hasta 600 nm (leyendo cada 2 nm) y una longitud de onda de excitación desde 240 hasta 480 nm (leyendo cada 10 nm). Considerando que la fluorescencia a una longitud de onda de emisión menor a la longitud de onda a la que se está excitando no existe, las mediciones se fueron recorriendo. Quitamos de las gráficas el pico correspondiente a la dispersión Raleigh que aparece cuando la longitud de onda de excitación es igual a longitud de onda de emisión, para asegurarnos de que no hubiera señal de esta dispersión en nuestros espectros eliminamos los datos obtenidos 10 nm antes de llegar al mismo valor de longitud de onda de excitación que de emisión. El equipo utilizado para realizar las mediciones fluorométricas fue el "Espectrofluorómetro Olis DM4", con una lámpara de 75 watts. Se utilizaron 4 slits manuales de 3.16 mm. Se utilizó el software Olis Global Works. Los datos obtenidos del espectrofluorómetro se procesaron en el software Matlab 8.0 y en Excel, Microsoft Office 2007. Se utilizaron celdas de cuarzo para fluorómetro Sigma-Aldrich.

6. RESULTADOS.

6.1 Identificación de la especie del género *Aspergillus sp.*

6.1.1 Identificación por comparación de la secuencia del gen ribosomal rRNA 18S.

Para la identificación del hongo se realizó el análisis de la secuencia del gen 18S contra varias secuencias de hongos del género *Aspergillus sp.*. Esto se realizó por medio de un alineamiento (BLAST) en la base de datos del NCBI con la finalidad de buscar la mayor identidad filogenética con organismos ya reportados y secuenciados, obteniendo los resultados mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 7. Identidad del gen ribosomal 18S con hongos del género *Aspergillus*

Cepa	Porcentaje de Identidad
<i>Neosartorya fischeri</i> 18S r RNA	99%
<i>Aspergillus lentulus</i> 18S r RNA	99%
<i>Aspergillus novofumigatus</i> 18S rRNA	99%
<i>Aspergillus fumisynnematus</i> 18S rRNA	99%
<i>Aspergillus fumigatus</i> 18S rRNA	98%

El género *Aspergillus* agrupa 22 especies de *Neosartorya* y 8 de *Aspergillus* por lo que se logró reducir el número de especies probables de nuestro hongo a cinco.

6.1.2 Identificación de la especie por morfología colonial y microscópica.

Al encontrar varias especies que poseían un porcentaje de identidad mayor o igual al 99%, el cuál esta reportado por Gherbawy y col. (2010) como el porcentaje necesario para lograr la identificación de una especie, se buscaron diferentes formas para diferenciarlas entre sí. Primero se sembró al *Aspergillus* en medio PDA, en donde se reporta que dichas especies presentan diferentes morfologías:

Tabla 8. Características de la morfología de colonia en medio PDA.

Especie	Crecimiento en PDA*	Identificación
<i>N. fischeri</i>	Micelio blanco aterciopelado con presencia de cleistotecias.	++
<i>A. fumigatus</i>	Micelio blanco o verde aterciopelado con esporas verdes	+
<i>A. fumisynnematus</i>	Micelio blanco aterciopelado	+
<i>A. lentulus</i>	Micelio blanco aterciopelado.	+
<i>A. novofumigatus</i>	Micelio blanco polvoso, puede tener las orillas verdes.	-

* (<http://www.doctorfungus.org>)

Los cultivos en PDA del hongo con el que trabajamos mostraron un micelio blanco, aterciopelado, con coloración del anverso del rosada. Los cultivos de más de cuatro a seis semanas comenzaban a mostrar cleistotecias. La única descripción que coincide con la descrita en la literatura es la de *Neosartorya fischeri*, ya que nuestro hongo no produjo esporas verdes en este medio. Sin embargo, se reportan 2 especies las cuáles también presentan un micelio blanco sin la formación de esporas.

Para el análisis de la microscopia del hongo, se realizó una preparación con azul de metileno que al observarse al microscopio mostró una gran cantidad de hifas cenocíticas características de las formas de reproducción sexual de *Aspergillus*, las cuales se encuentran clasificadas en el género *Neosartorya*.

6.1.3 Identificación de la especie por comparación de un fragmento del gen de β -tubulina.

Debido a que el análisis a partir del gen ribosomal rRNA 18S resultó en 5 especies probables y la morfología del hongo así como su microscopía tampoco fueron determinantes, ya que podían describir a más de una especie de *Neosartorya sp.* y de *Aspergillus sp.*, se decidió afinar la identificación del hongo aislado mediante un análisis de la secuencia del gen de β -tubulina, los resultados obtenidos se compararon por medio de un alineamiento (BLAST) en la base de datos del NCBI, obteniendo los resultados mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 9. Identidad de los fragmentos del gen de β -tubulina.

Cepa	Porcentaje de Identidad	% de cobertura
<i>Neosartorya fischeri</i>	98%	93%
<i>Neosartorya coreana</i>	98%	86%
<i>Neosartorya lacinosa</i>	97%	86%
<i>Aspergillus lentulus</i>	94%	87%
<i>Aspergillus novofumigatus</i>	96%	86%
<i>Aspergillus fumisynnematus</i>	94%	86%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	93%	86%

A pesar de que más de una especie de *Neosartorya* muestra un alto porcentaje de similitud con el fragmento de gen de β -tubulina, la única especie que muestra un alto porcentaje de identidad con ambos genes es *N. fischeri*.

6.2 Microfotografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Barrido.

Se estudió la interacción física entre el hongo y los asfaltenos mediante microscopía electrónica de barrido, las imágenes fueron tomadas en la unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Se obtuvieron las microfotografías mostradas en la figura 6.

En estas imágenes se observó la interacción que se presenta entre las hifas del hongo y el sustrato (asfaltenos). En todas las fotos, vemos como las hifas del hongo envuelven al sustrato y crecen alrededor de éste, sin embargo en ningún caso se ve la adhesión de las hifas al sustrato y tampoco se observó en ninguna microfotografía la degradación evidente de los asfaltenos.

En las fotografías con mayor acercamiento 6-B (2000x) 6-C (1500x) y 6-D (3500x) se observaron unas estructuras que rodean a las hifas del hongo, estas se encontraron en mayor proporción en zonas que se encontraban cerca de los asfaltenos, estas estructuras extracelulares también se encontraron pegadas al sustrato (fotografías 6-C y 6-D). Es posible que se trate de un tipo de glicoproteínas ya reportadas llamadas hidrofobinas, cuya función es facilitar la interacción entre las zonas hidrófobas de un sustrato y el hongo

(Latgé, 1999; Muñoz, 1997; Wessels y col. 1991). Sin embargo, su caracterización requiere de mayor estudio, el cuál no será realizado en esta tesis. Adicionalmente, se observan irregularidades y pequeñas hendiduras en la superficie de los asfaltenos (Fig. 6A) que podrían ser resultantes de la interacción con *N. fischeri*, sin embargo no podemos asegurar esto.

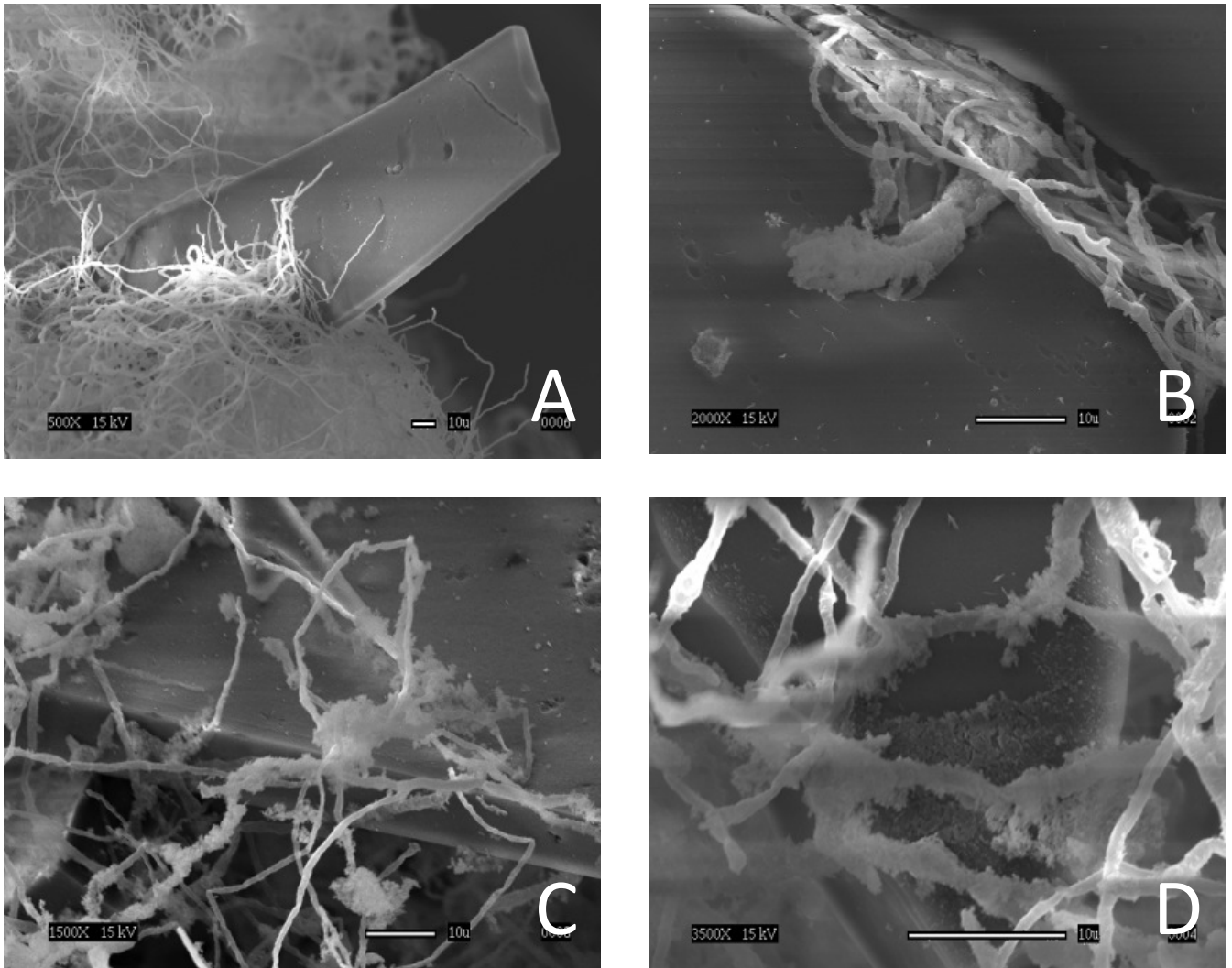


Figura 6. Fotografías de MEB de *N. fischeri* sembrados en medio mínimo con asfaltenos como única fuente de carbono a diferentes acercamientos. La fotografía a) es la de menor aumento 500x, en dónde se aprecia una estructura de asfaltenos de color gris oscuro, que es rodeada por las hifas del hongo. Conforme el objetivo de las fotografías se aumenta, b)2000x, c)1500x y d)3500x, podemos observar con mayor claridad las hifas del hongo envolviendo al sustrato y comienzan a verse las estructuras que rodean a las hifas y que se adhieren al asfalto.

6.3 Estudio del crecimiento de *N. fischeri*. usando asfaltenos como única fuente de carbono.

Se estudió el crecimiento del *N. fischeri*. en medio mineral con asfaltenos como única fuente de carbón y energía con el fin de comprobar que el hongo aislado fuera capaz de utilizar este sustrato como única fuente de carbón. Para analizar que cantidad de los asfaltenos podían metabolizarse y ver que tan rápido se lograba esto, se determinó el aumento de proteína interna y se relaciono mediante una curva patrón con el aumento de biomasa. Esto fue necesario debido a que durante el aumento de biomasa del hongo, este crece rodeando a los asfaltenos lo que hace que su separación para medir biomasa de forma adecuada sea difícil.

6.3.1 Curva Patrón de peso seco de biomasa contra µg de proteína/ml

Con la finalidad de reportar nuestros resultados como crecimiento fúngico en gramos de biomasa seca por litro, se hizo una curva patrón relacionando la biomasa seca contra la proteína soluble determinada por el reactivo de BioRad (ver métodos), obteniendo la siguiente ecuación con un coeficiente de correlación lineal de 0.95:

1 mg de biomasa seca = 2.234 mg de proteína soluble

6.3.2 Cinética de crecimiento y actividad lacasa

Se monitoreó el aumento de biomasa fúngica y la actividad lacasa extracelular durante 7 semanas (Fig. 7).

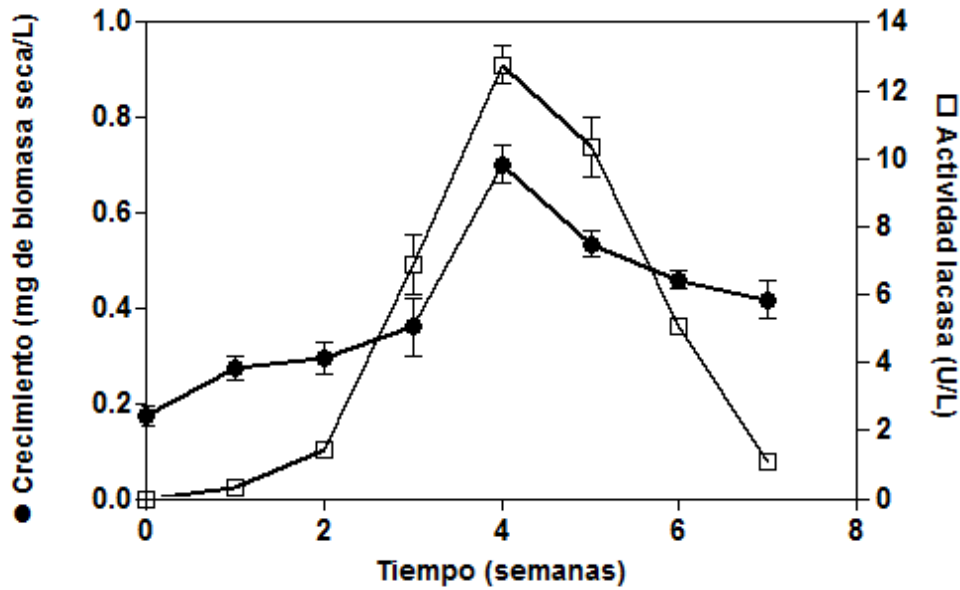


Figura 7. Gráfico del aumento de biomasa en mg/L y de la oxidación de ABTS por semana en cultivos de *N. fischeri* en medio Czapek adicionado con asfaltenos.

En el gráfico anterior, pudimos observar que ambos parámetros, la biomasa y la actividad enzimática llegan a un valor máximo a la cuarta semana, para despues decrecer lentamente.

A la cuarta semana de cultivo el valor máximo de actividad lacasa fue de 12.7 ± 0.6 mU mL⁻¹. Por otro lado se midió la concentración de proteína, obteniendo un valor de 1.73 µg/ml de proteína total, lo que equivale a una actividad específica con respecto al ABTS de 7.3 U de enzima/mg proteína. También se le midió la actividad con siringaldazina, que es un sustrato específico de lacasa en ausencia de peróxido (Thurston, 1994). La oxidación de la siringaldazina se evidencio con la aparición de un color rosado, lo que indica la presencia de una lacasa en el medio extracelular.

Se utilizaron como controles cultivos del hongo en medio Sabouraud sin asfaltenos y se les midió actividad con ABTS y siringaldazina. Los resultados de estas reacciones fueron negativas, es decir el hongo en medio rico no presenta actividad lacasa. Esto nos indica que la presencia de asfaltenos en un medio estrictamente mineral induce la producción de enzimas con actividad lacasa, mientras que en un medio con otra fuente de carbón no se observa esta actividad.

6.3.3 Cinética de mineralización de asfaltenos

Para confirmar que el hongo es capaz de utilizar a los asfaltenos como única fuente de carbono y para poder hacer una aproximación del porcentaje de los asfaltenos que puede metabolizar se midió la cantidad de CO₂ liberada al medio.

En este experimento se obtuvo una curva de mineralización de asfaltenos en la cual el CO₂ fue monitoreado con un cromatógrafo de gases con un detector TCD. Primero se hizo una curva patrón en donde se correlacionó la concentración de CO₂ con el área del pico de CO₂. La cantidad de carbón en forma de CO₂ obtenido se calculó por medio de la ecuación de gases ideales. La producción de CO₂ se monitoreó por 11 semanas haciendo mediciones semanales.

Los datos obtenidos se graficaron en la figura 8 donde se observó el aumento gradual de la concentración de CO₂. La gráfica tiene una forma bifásica en donde la primera fase estacionaria corresponde a las 4 semanas, al igual que la figura 7 que muestra el gráfico de aumento de biomasa en g/L, esto podría ser porque comienza a autodegradarse o debido a que utiliza diferentes fuentes de sustrato. Finalmente la cantidad de CO₂ producida a partir de las 9 semanas baja notablemente.

El punto de la última medición de CO₂ mostrado en la gráfica equivale a la producción total de 2.21 mg de carbono. Durand y col. (2010) señalan que el 83.5% de los asfaltenos provenientes del Crudo Maya son carbono, lo que equivaldría al 13,2 ($\pm 2,6$)% del total de carbono que tenían los frascos inicialmente.

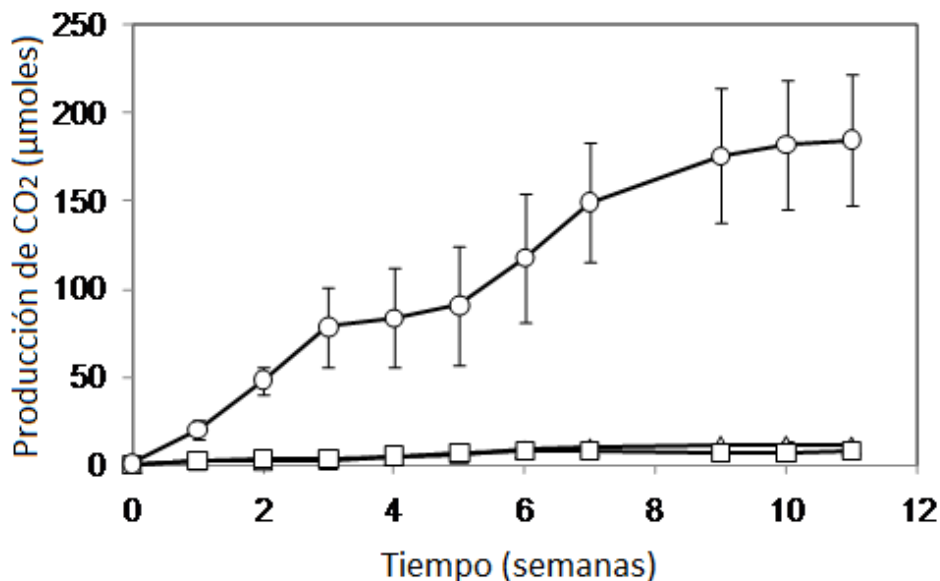


Figura 8. Cinética de mineralización de asfaltenos de 11 semanas. ● Medio Czapek con asfaltenos e inóculo, ▲ Control de medio Czapek con asfaleno, □ Control de medio Czapek con inóculo.

Al finalizar la cinética se midió la cantidad de biomasa restante en el cultivo para saber que cantidad del carbono del sustrato había sido metabolizado y se había incorporado al hongo. El valor final de biomasa seca fue de 1.5 (\pm 0.10)g L⁻¹. Si consideramos la fórmula elemental reportada para la biomasa de *A. niger* (Nielsen y col. 1994) y restamos la cantidad de inóculo, la biomasa a la onceava semana de cultivo corresponde al 2.3% del total de carbono contenido en los asfaltenos originales.

Entonces, basado en estos cálculos, podemos estimar que al menos el 15.5% de los asfaltenos son metabolizados por el hongo, sin tomar en cuenta la producción de enzimas y metabolitos extracelulares. Suponemos que el hongo es capaz de metabolizar únicamente algunas de las estructuras que conforman a los asfaltenos y cuando agota estas, deja de crecer y comienza a disminuir la biomasa.

6.4 Caracetrización de enzimas extracelulares.

6.4.1 Determinación de peso molecular de proteínas extracelulares

Cuando se hicieron las cinéticas de aumento de biomasa, se detectó una actividad oxidorreductasa del medio extracelular por lo que se realizó un análisis por medio de un gel de poliacrilamida con tinción de plata para aproximar el número de proteínas presentes en el medio extracelular (Figura 9). Se decidió usar la tinción de plata por su alta sensibilidad debido a la baja concentración de proteína extracelular.

En los carriles 2 y 4 se observó el medio extracelular liofilizado, en el carril 5 se analizó un precipitado que se formó después de resuspender el liofilizado. Los pesos moleculares de las bandas obtenidas son de aproximadamente 68 KDa y 64 KDa, respectivamente.

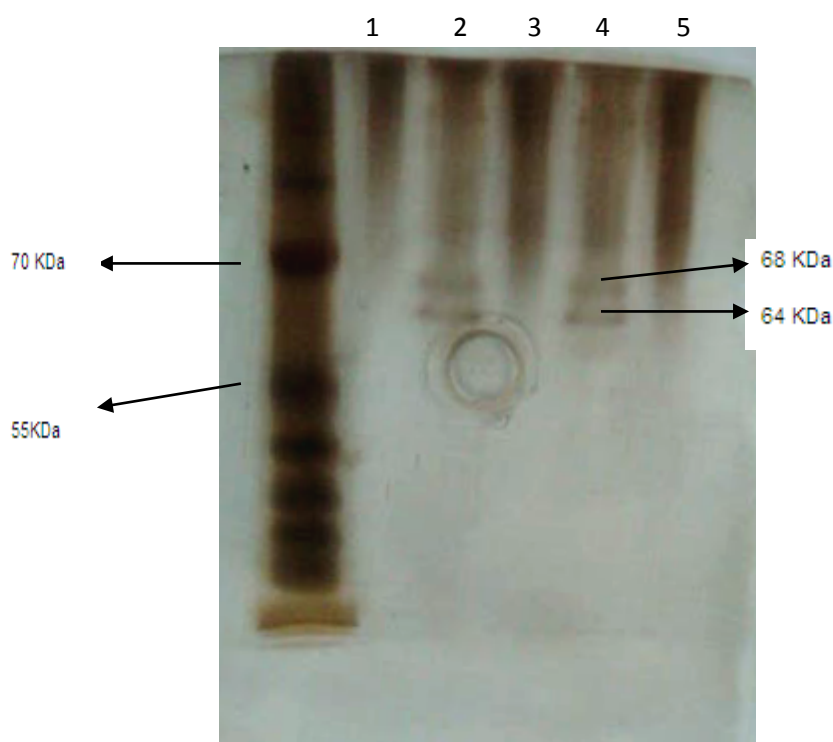


Figura 9. Gel de poliacrilamida con tinción de plata del concentrado extracelular de los cultivos de *N. fischeri* en medio Czapek adicionado con asfaltenos.

6.5 Identificación y clonación de las enzimas presentes en el medio extracelular.

6.5.1 Pruebas de identificación de la batería enzimática extracelular.

Al haber identificado dos bandas de 68 y 64 KDa en el gel de acrilamida, decidimos hacer pruebas con diferentes sustratos con el fin de saber que tipo de actividad enzimática se estaba llevando a cabo en el medio extracelular. Como se mencionó anteriormente realizamos una prueba con siringaldazina, la cuál resulto ser positiva. Se realizó esta misma prueba con el medio extracelular de *N. fischeri* crecido en glucosa. Esta prueba dio negativa, por lo que podemos deducir que la expresión de esta lacasa esta relacionada con la presencia de un compuesto recalcitrante como única fuente de carbono y energía.

6.5.2 Amplificación y clonación parcial de una lacasa extracelular en TOPO TA.

Con los resultados de los experimentos anteriores determinamos que el hongo expresaba una lacasa extracelular por lo que realizamos un análisis en las bases de datos de secuencias de lacasas reportadas para diferentes especies del género

Aspergillus, cabe mencionar que en este momento de la investigación aún no habíamos logrado la identificación del hongo. Se diseñaron oligonucleótidos degenerados de regiones conservadas de estas lacasas. En una reacción de PCR utilizando estos oligonucleótidos y el rRNA del hongo degradador de asfaltos como templado, se logró amplificar un fragmento de 1500 pb que se muestra en la Figura 10.

Para asegurar que no hubiera más de una secuencia de lacasas con el mismo peso molecular que nos impidiera identificarlas, se realizaron cortes proteolíticos en secuencias específicas. Utilizando el programa Enzyme X analizamos las secuencias que podían surgir como resultado y encontramos diferentes sitios de corte con las enzimas *EcoRV* y *XbaI*. Se realizaron mini preps de 50 colonias transformadas distintas, se sometieron a cortes proteolíticos y se analizaron los resultados observando que los patrones de corte en un gel de agarosa eran exactamente los mismos.

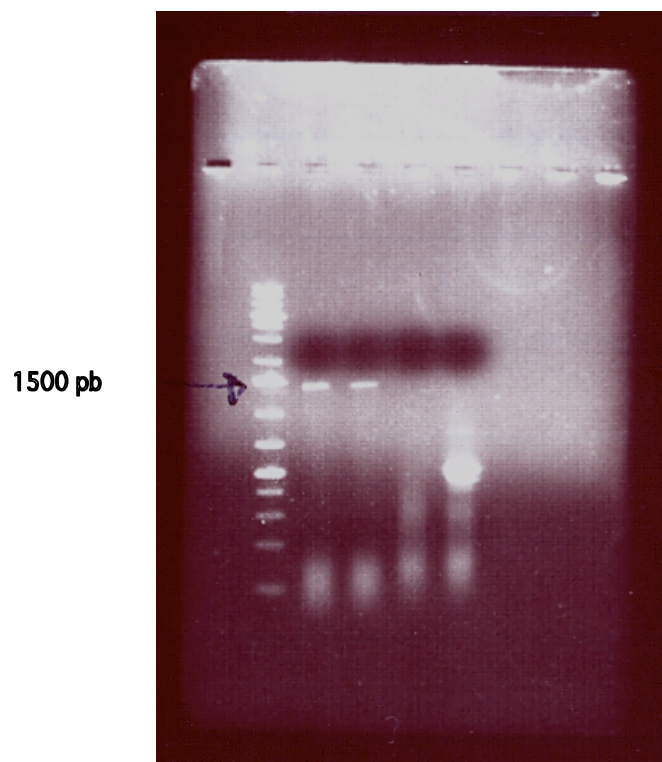


Figura 10. Fragmento de 1500 pb amplificado por PCR de un gen de la lacasa clonado en el plásmido TOPO.

Se mandaron a secuenciar dos clonas y con esta información se realizó un alineamiento (BLAST) en la base de datos de NCBI . Dichos resultados se muestran en la Tabla 10:

Tabla 10. Resultados del alineamiento del fragmento de gen de lacasa para de la secuencia clonada en el plásmido TOPO.

Especie	% de cobertura del alineamiento	% ID
<i>Neosartorya fischeri</i> laccase <i>tilA</i> , putativa	85%	92%
<i>Aspergillus fumigatus</i> laccase	65%	90%

6.5.3 Amplificación del gen completo de lacasa *tilA*

Con el fin de obtener el gen completo que codifique para la lacasa *tilA* de *N. fischeri*, se realizó una amplificación utilizando oligonucleótidos específicos del gen *tilA* (Figura 11). Los resultados de la secuenciación se muestran en la tabla 11.

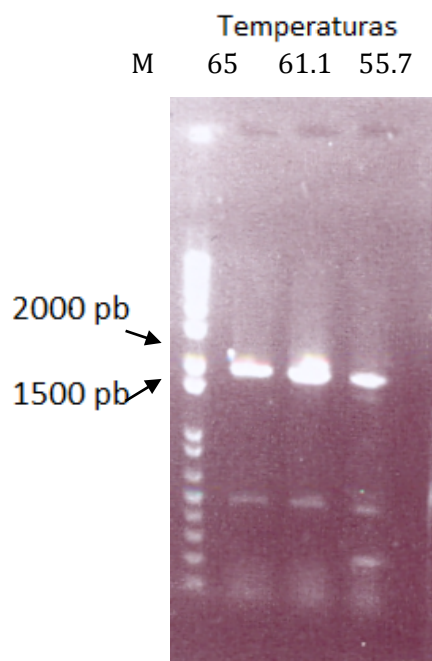


Figura 11. Fragmento aproximadamente 2000 pb del gen de la lacasa *tilA*.

A las tres diferentes temperaturas de alineamiento se logró amplificar el fragmento esperado de aproximadamente 2000 pb. El producto de PCR se limpió y se secuenció. Posteriormente un análisis tipo BLAST con la base de datos de NCBI demostró que este producto tiene una identidad del 92% con el gen *tilA* de *N. fischeri* y un 89% de identidad con una lacasa de *A. fumigatus*. Los resultados mostrados en la tabla 11.

Tabla 11. Resultados para de la secuencia amplificada del gen completo de lacasa *tilA*.

Especie	% de cobertura del alineamiento	% ID
<i>Neosartorya fischeri</i> laccase <i>tilA</i> , putativa	94%	92%
<i>Aspergillus fumigatus</i> laccase	94%	89%

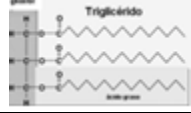


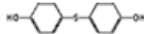
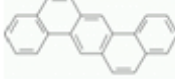

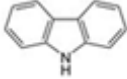
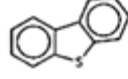

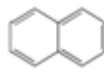
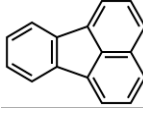
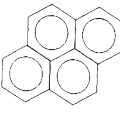
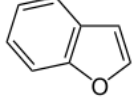
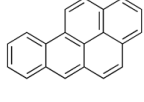
6.6 Crecimiento de *N. fischeri* en diferentes sustratos

En la sección 6.3.3 del apartado de la cinética de mineralización de asfaltenos observamos que únicamente se consumen aproximadamente el 15% de estos, lo que indica que no todas las estructuras que conforman las moléculas de asfalteno pueden ser metabolizadas por el hongo. Por este motivo se investigó en que compuestos que conforman las partes de los asfaltenos crecía mejor el hongo. Los compuestos de elección fueron el heptadecano, el pireno, el dibenzotiofeno y otros compuestos poliaromáticos así como también se buscó observar la diferencia de crecimiento del hongo en los asfaltenos fraccionados por diferencias de polaridad (sección 5.8.2).

6.6.1 Crecimiento de *N. fischeri* en diversos compuestos modelo.

Después de crecer el hongo en distintos compuestos, se calculó la biomasa (mg/L) a partir de los μg de proteína obtenidos al final del crecimiento. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de crecimiento del *N. fischeri* en diversos compuestos modelo.

Compuesto	Aumento de biomasa (mg/L)	Estructura	Compuesto	Aumento de biomasa (mg/L)	Estructura
Aceite	34.2		Heptadecano	18.4	
Nonadecano	16.2		4,4 tiodifenol	14.6	
1,2:5,6 dibenzoantraceno	9.2		Fenantreno	8.5	
Carbazol	6.5		Dibenzotiofeno	6.2	
Imidazol	4.8		Naftaleno	3.8	
Fluoranteno	3.3		Pireno	2.6	
Benzofurano	0.2		Benzo(a)pireno	--	

A partir de los resultados que se muestran en la Tabla 12 se pudo observar que el hongo presenta preferencia por los hidrocarburos lineales como en el caso del nonadecano y el heptadecano ya que muestran una mayor producción de biomasa que el resto de los sustratos. Después de éstos, el compuesto en donde el hongo mostró mayor crecimiento fue el 4, 4-tiodifenol, el cual, por su estructura fenólica es sustrato para la lacasa. El resto de compuestos son HPAs en donde se observó un menor aumento de biomasa. En el caso del 1,2:5,6 dibenzoantraceno y el fenantreno vemos en sus estructuras zonas bahías o en forma de L que confieren una alta reactividad a los compuestos. A continuación siguen compuestos poliaromáticos pequeños con heteroátomos los que funcionan como donadores de electrones y finalmente están los hidrocarburos poliaromáticos que no tienen heteroátomos ni una estructura favorable para facilitar su interacción. No trabajamos el benzo(a)pireno debido a su alta toxicidad y su capacidad cancerígena y teratógena, sin embargo habría sido interesante observar cuánto crece el hongo en este medio ya que se existen múltiples reportes de la toxicidad de este y muy pocos reportes sobre su biodegradación. (Reno y col., 1994; Uno y col., 2009; ATSDR, 1995; WHO 1998).

El aceite de cocina sirvió como un control positivo, fue el compuesto que promovió el mayor crecimiento de todos debido a la estructura de los triacilglicerolos, los cuales son sustratos naturales fácilmente metabolizables.

6.6.2 Crecimiento de *N. fischeri* en fracciones de diferente polaridad obtenidas de asfaltenos.

Otro experimento que se realizó para observar si el hongo tenía alguna preferencia por metabolizar una parte específica de las estructuras de los asfaltenos fue fraccionar estos por su polaridad y observar si había alguna diferencia en el crecimiento del hongo. En el fraccionamiento las estructuras de los asfaltenos se dividen según polaridades, el tamaño de las estructuras aromáticas y de las cadenas hidrocarbonadas (Buenrostro, 2002).

6.6.2.1 Fraccionamiento de asfaltenos por diferencias en su polaridad

Se hizo una solución al 2% de asfaltenos en tolueno y se hizo el fraccionamiento variando las concentraciones de tolueno/acetona obteniendo los resultados mostrados en la Tabla 13.

Tabla 13. Fraccionamiento de asfaltenos por diferencias en su polaridad.

Fracción (Tol/Acet)	Peso de asfaltenos (g)	Recuperación (%)	Reportado (%) (Buenrostro, 2002)
80/20	0.00077	0.385	1.2
60/40	0.12219	61.095	53.2
40/60	0.03297	16.485	27.8
20/80	0.01084	5.42	8.5
Sobrante	0.0187	9.035	9.4
Total	0.18547	92.42%	100%

En la tesis doctoral del Dr. Buenrostro (2002) se hace el fraccionamiento de los asfaltenos por solubilidad en fracciones de 10 en 10% de solventes. Por lo que los resultados se sumaron para poder compararlos con los obtenidos experimentalmente. Las

diferencias en el porcentaje de recuperación pueden deberse a que se utilizan asfaltenos a partir de diferentes crudos o al manejo experimental ya que puede haber pérdida de asfaltenos al trasvasar las soluciones.

6.6.3 Crecimiento de *N. fischeri* en fracciones de diferentes polaridades de asfaltenos.

Inoculamos 20 mg de las diferentes fracciones con el hongo (0.44 mg de biomasa seca/L) medio Czapek y los incubamos a 37°C por cuatro semanas. La tesis de Buenrostro (2002) indica que la fracción 40/60 tiene un mayor número de cadenas alifáticas y la fracción R tiene mayoría de fracciones aromáticas, es decir, un tipo de compuestos son los que predominan. Los resultados del experimento en aumento de biomasa se muestran en la Tabla 14 y se pudo observar que no existe una diferencia significativa en el crecimiento del hongo en las fracciones obtenidas del fraccionamiento por diferencia de solubilidad, sin embargo observamos que las dos fracciones con mayor crecimiento son la fracción R y la 40/60.

Tabla 14. Crecimiento de *N. fischeri* en fracciones de diferentes polaridades de asfaltenos

Fracción	Aumento de biomasa (mg de biomasa seca/L)
80/20	---
60/40	1.33
40/60	1.40
20/80	1.32
Resto	1.58

6.7 Caracterización de productos de la transformación de asfaltenos

6.7.1 Espectrofotometría de Infrarrojo.

Se realizaron análisis en espectrofotometría infrarroja de las fracciones 60/40, 40/60, 20/80 y R de los asfaltenos, antes y después del tratamiento con el *N. fischeri* (Figura 12).

Los espectros obtenidos fueron muy similares a los espectros de otros asfaltenos reportados en la literatura (Buenrostro 2002; Mullins, 1998).

Los resultados de la interpretación de los espectros fueron muy similares para todas las fracciones. Presentan, en general una banda larga y una pequeña en $3030-2845\text{ cm}^{-1}$, estas son representativas de metilos y metilenos, la proporción que existe entre el largo de los picos nos indica la proporción que existe en el compuesto. En el caso de algunos espectros como el 40/60 y el residuo con tratamiento tienen bandas en $725-715\text{ cm}^{-1}$ que indican la presencia de largas cadenas de compuestos hidrocarbonados.

En la fracción residual tratada y sin tratar se observa la presencia de compuestos aminos en la zona de $3400-3250\text{ cm}^{-1}$, sin embargo en la resta de ambos espectros no destaca ninguna banda ancha en esta zona, por lo que no podemos inferir que haya habido una transformación.

En la Figura 12 podemos ver que en general se obtuvo una menor banda de señal de metilos y metilenos, a excepción de en la fracción 60/40. En la zona de $1800\text{ a }1650\text{ cm}^{-1}$ se detectan las bandas de grupos carbonilo; en caso de los espectros con y sin tratamiento se observa en todos una pequeña banda ancha alrededor de 1650 cm^{-1} la cuál puede corresponder a alguna clase de amida en su forma o asociada a carbonilos conjugados (ej. quinona).

Entre $1600\text{ y }1300\text{ cm}^{-1}$ se localizan varias bandas pequeñas que corresponden a dobles enlaces conjugados y deformaciones del enlace C-H en grupos metilo y metileno. En la zona de $1300\text{ a }900\text{ cm}^{-1}$ se presentan varias bandas relacionadas con los dobles enlaces C=C, C=O y se presentan bandas de deformación de C-H. En la zona entre $1034\text{ y }1030\text{ cm}^{-1}$ se observa la presencia de una banda en todos los espectros con y sin tratamiento correspondiente al grupo sulfóxido S=O. Las bandas presentes en $1168, 1125\text{ y }1097\text{ cm}^{-1}$ pueden corresponder a ésteres, éteres o aminas alifáticas, éste último es más coherente ya que no se presentan bandas en la zona de carbonilos.

La región de entre $900\text{ y }700\text{ cm}^{-1}$ se relaciona con la deformación del enlace C-H aromático y se observa que todos los espectros presentan una banda en 730 cm^{-1} , esta banda corresponde a una estructura que tiene 5 hidrógenos aromáticos adyacentes, que probablemente sea producto de la transformación de los asfaltenos.

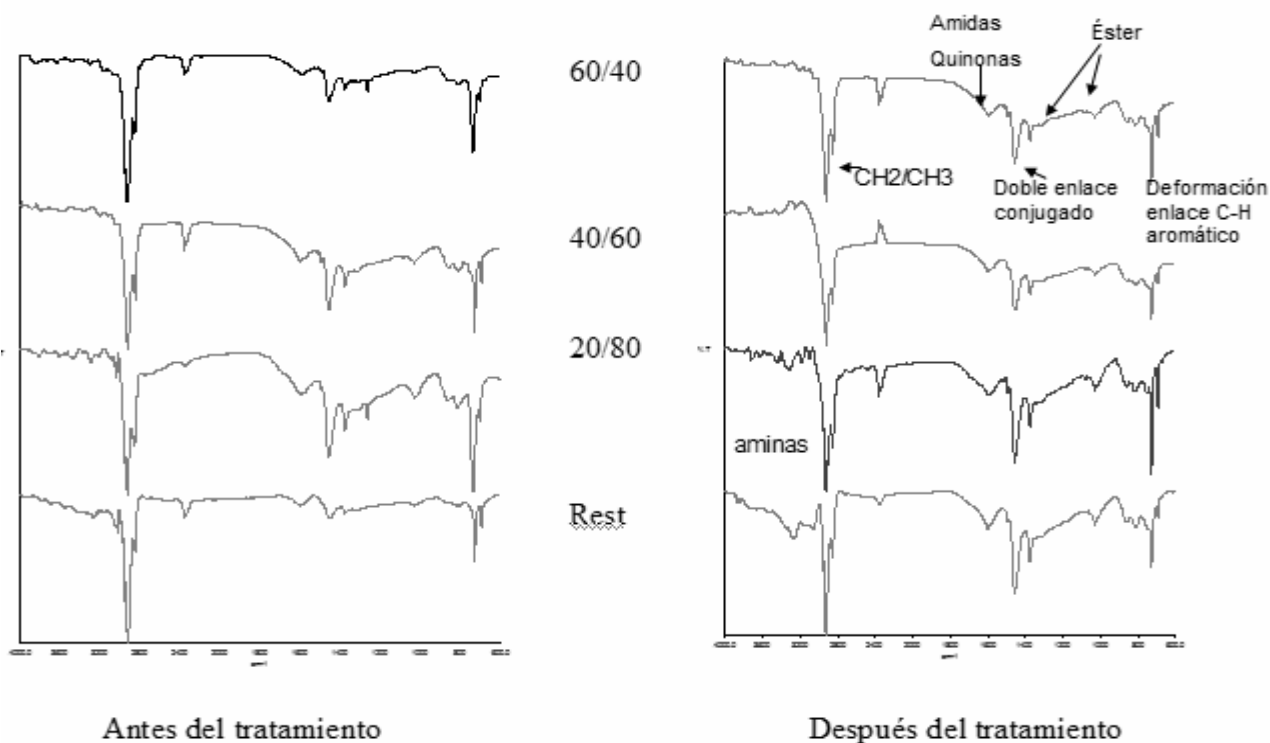


Figura. 12. Espectros de IR de las diferentes fracciones de asfaltenos antes y después del tratamiento de cuatro semanas con *N. fischeri*, en el espectro de la fracción 60/40 se muestran las bandas características de algunos grupos funcionales importantes y que sabemos pueden estar presentes en los asfaltenos.

Podemos observar que este método para evaluar la modificación de los asfaltenos no es lo suficientemente sensible ya que la transformación es mínima y no detectable por este método.

6.7.2 Análisis por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS).

Después de observar los resultados obtenidos en el IR con los asfaltenos modificados, decidimos separar la parte que después del tratamiento con el hongo fuera soluble en pentano, ya que si recordamos la definición de los asfaltenos dice que son la parte del crudo soluble en tolueno e insoluble en alcanos cortos como el pentano. Cualquier compuesto que sea soluble en pentano ya no concuerda con la definición de los asfaltenos y podemos suponer que son parte de los asfaltenos que sufrieron una transformación a causa del tratamiento fúngico. Para comprobar que la aparición de estos productos sea por causa del tratamiento fúngico y no por el tratamiento de la muestra fue necesario hacer los

controles de los asfaltenos en medio mineral sin inóculo y tratarlos de la misma manera que a las muestras.

6.7.2.1 Análisis de muestras de las fracciones de asfaltenos

Como parte de la caracterización de los compuestos que resultan solubles en pentano después del tratamiento con los hongos, todas las muestras obtenidas del fraccionamiento de tolueno-acetona (los asfaltenos no son solubles en pentano) fueron analizadas por GC. Las Figuras 13 y 14 muestran los cromatogramas de las fracciones 20-80 y 60-40.

Los cromatogramas de los controles, así como de las diferentes fracciones, se veían muy similares, los picos que se muestran cambian ligeramente en sus tiempos de retención, pero son consistentes. Los cromatogramas muestran un amplio sangrado de la columna. El único espectro que fue diferente se muestra en la Figura 14, sin embargo al inyectar esta muestra en el cromatógrafo acoplado a masas se observó una gran cantidad de silicatos derivados del sangrado de la columna por lo que se decidió realizar los análisis en una columna de alta temperatura.

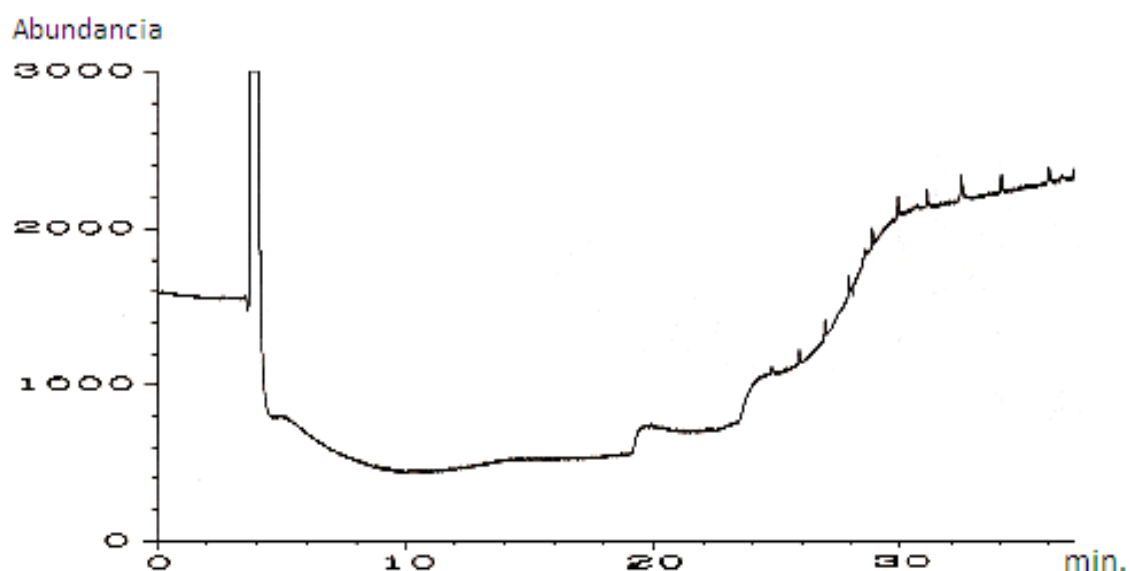


Figura 13. Espectro obtenido del CG de la muestra 20/80 (1) que muestra el patrón general con el que salieron todas las muestras.

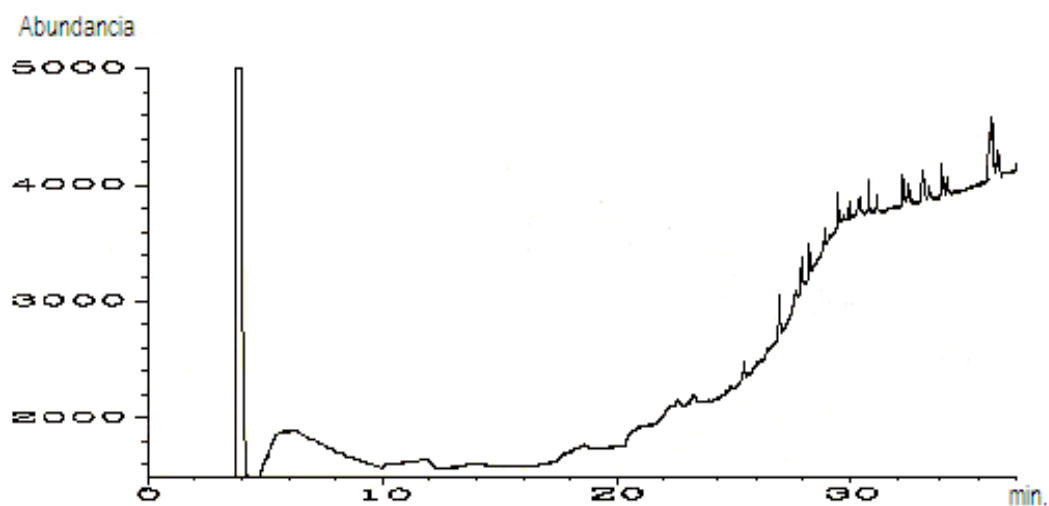


Figura 14. Espectro obtenido del CG de la muestra 60/40 que muestra diversos picos extras de los que se muestran en las demás muestras.

6.7.2.2 Análisis de compuestos modelo tratados con *Aspergillus sp.*

Los compuestos modelo se inyectaron en el CG-MS y no se encontró ningún compuesto de degradación o transformación.

6.7.2.3 Análisis de muestras sililadas.

Con el objetivo de volatilizar los metabolitos polares del sobrenadante transformado de asfaltenos, las muestras se sililaron para formar derivados del TMS. Una vez sililadas se analizaron por CG-MS. Los cromatogramas se muestran en las Figuras 15 y 16.

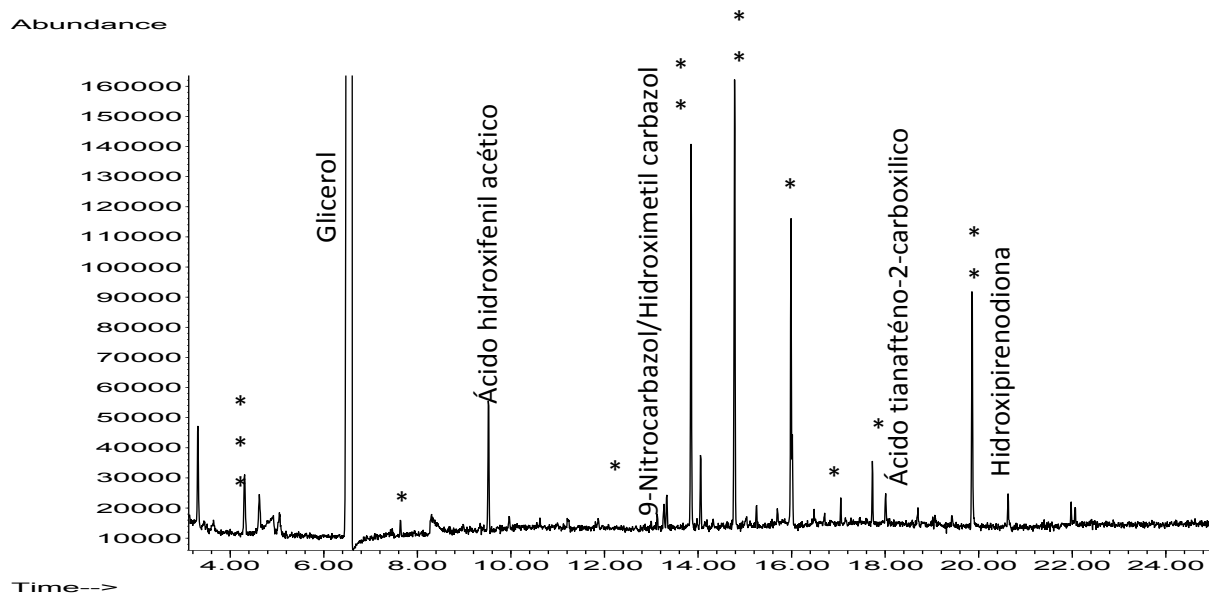


Figura 15. Cromatograma de la muestra de asfaltenos con tratamiento fúngico de cuatro semanas. (*) ácidos grasos, (**) ftalatos, (***)urea.

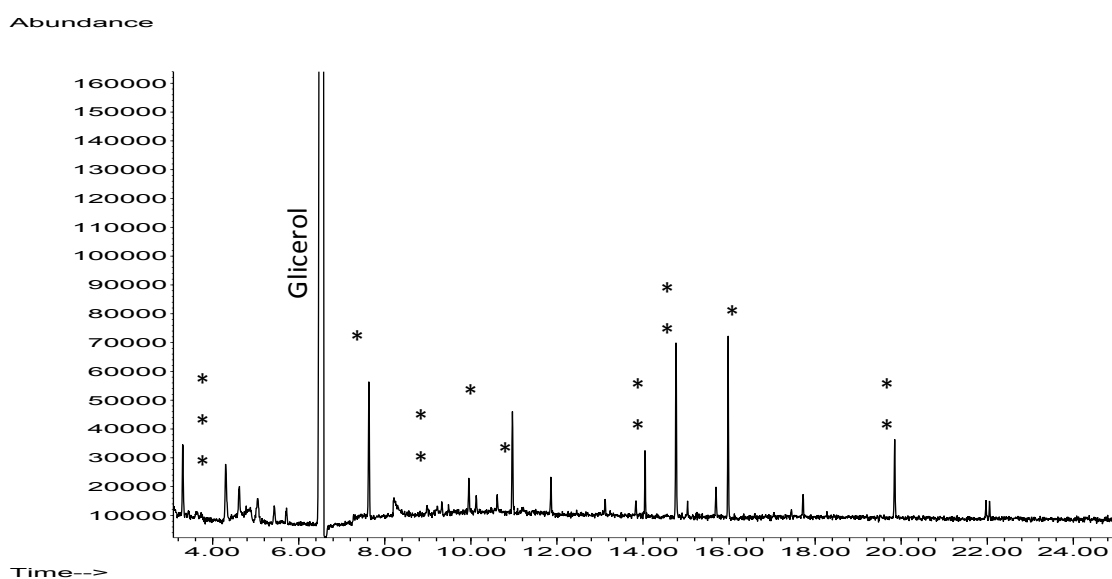


Figura 16. Cromatograma de la muestra control de asfaltenos sin tratamiento fúngico. (*) ácidos grasos, (**) ftalatos, (***)urea.

En ambos espectros podemos observar la presencia de una gran cantidad de ácidos grasos y un pico prominente de glicerol, el cual era de origen desconocido ya que inclusive el control de los asfaltenos tenían este compuesto. Se hicieron varios controles para buscar la fuente de glicerol y finalmente obtuvimos el espectro del TMS mostrado en la Figura 17, el cuál mostró la presencia de glicerol y urea en altas concentraciones. Las muestras del

sobrenadante tratado de los asfaltenos no sililados no contenían este compuesto en los cromatogramas, lo que nos indica que el contaminante provenía del TMS. El tiempo de retención no concuerda porque se utilizó un programa y una columna diferentes.

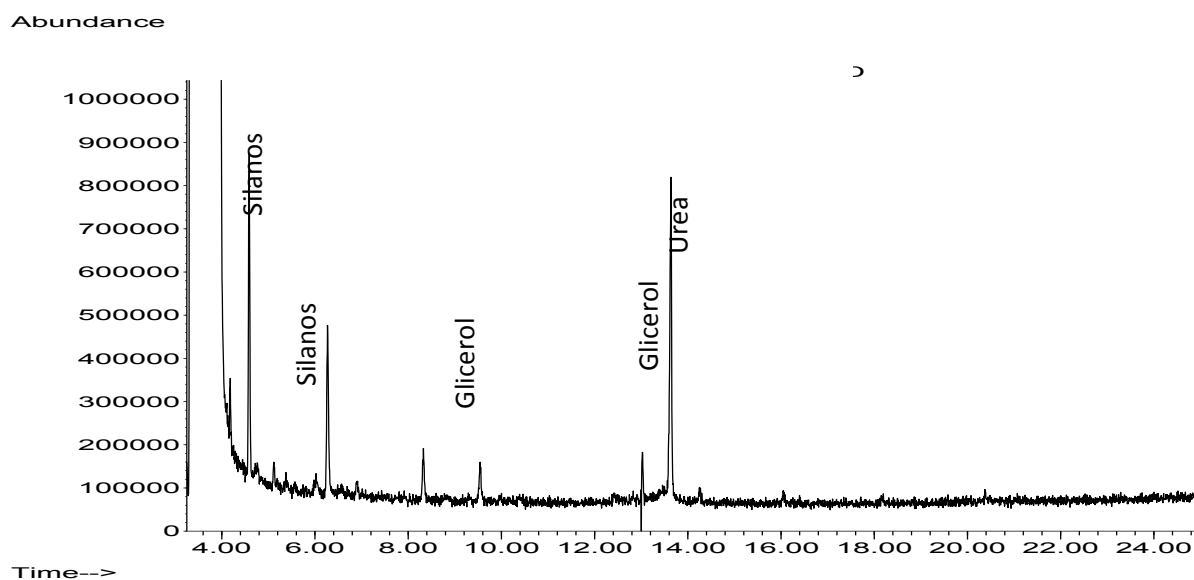


Figura 17. Cromatograma del TMS puro, dónde se observa la presencia de glicerol y urea.

Si comparamos el espectro 15 y 16 encontraremos 4 compuestos que están presentes en la muestra del sobrenadante de los asfaltenos tratados con *N. fischeri*, que no se encuentran en el control. Estos compuestos presentan los espectros de masas presentados en las Figuras 18 a 21, en donde podemos apreciar a su vez su estructura. En los cromatogramas también encontramos una variedad de pequeñas bandas que no pudimos identificar.

Cabe mencionar que todas los espectros de masas mostrados en las Figuras 18 a 21 tienen estructuras posibles como productos de transformación de asfaltenos.

Ácido hidroxifenil acético:

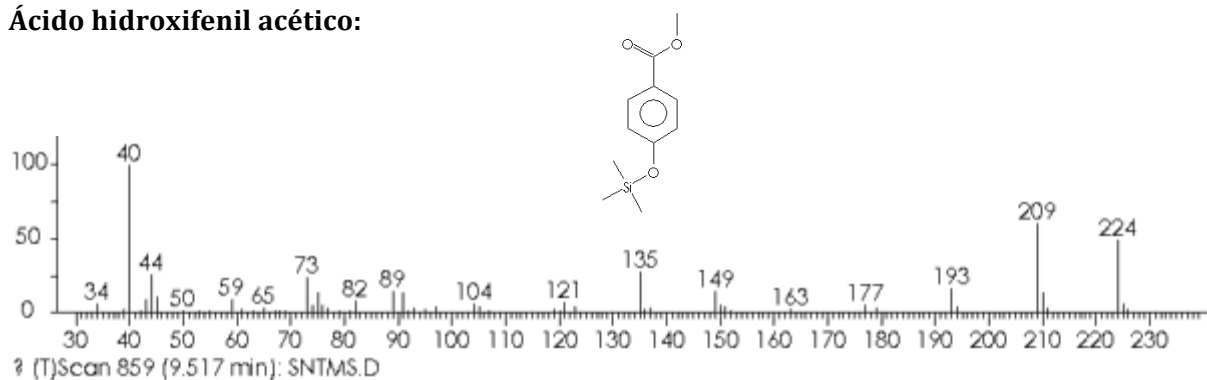


Figura 18. Espectro de masas obtenido a los 9.517 min. que corresponde al espectro del Ácido hidroxifenil acético.

Hidroximetil carbazol:

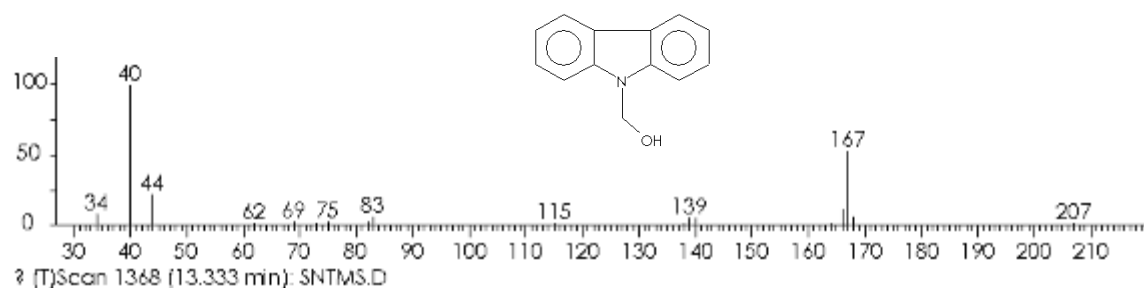


Figura 19. Espectro de masas obtenido a los 13.333 min. que corresponde al espectro del Hidroximetil carbazol.

Ácido tianafténico-2-carboxílico:

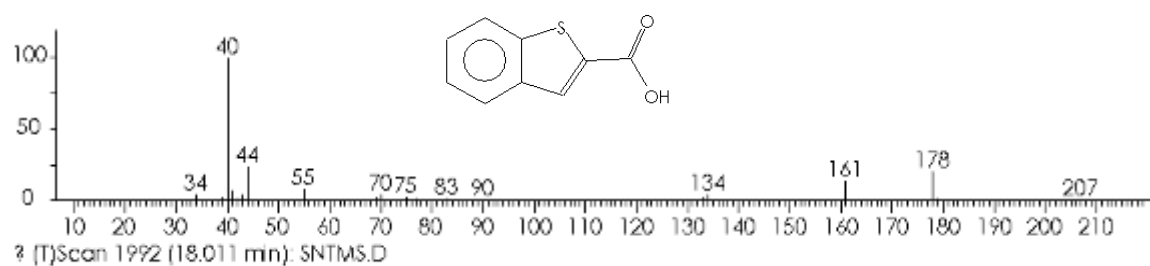


Figura 20. Espectro de masas obtenido a los 18.011 min. que corresponde al espectro del Ácido tianafténico-2-carboxílico.

Hidroxi pirenodiona:

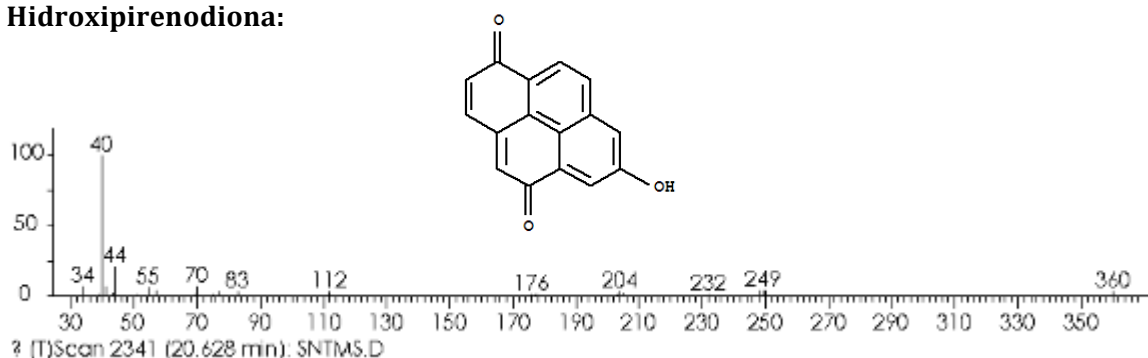


Figura 21. Espectro de masas obtenido a los 20.628 min. que corresponde al espectro de la hidroxi pirenodiona.

6.7.3 Matrices de emisión-excitación (fluorescencia)

Otro método que decidimos utilizar para ver si podíamos medir el grado de transformación de los asfaltenos fue por medio de fluorescencia. La fluorescencia es una técnica muy sensible a cambios de concentración de compuestos aromáticos y podría indicarnos si estos disminuyeron como consecuencia del tratamiento con el hongo. Las matrices de emisión-excitación son un conjunto de espectros a diferentes longitudes de onda de excitación en un determinado rango de longitud de emisión que pueden graficarse dando como resultado una matriz (Figura 22) con un perfil específico para un compuesto determinado.

Los volúmenes de fluorescencia obtenidos a partir de las matrices de emisión-excitación de las fracciones de asfaltenos se presentan en la Tabla 15. En general esperábamos un decremento en el volumen de fluorescencia de todas las muestras debido a que esperábamos que el *N. fischeri* transformara algunas de estas estructuras al metabolizarlas, haciendo que la fluorescencia causada por los anillos aromáticos disminuyera. Sin embargo como podemos observar en la Tabla 15 la mayoría de los volúmenes de fluorescencia (VF) de las MEE tuvieron un aumento del VF y las variaciones entre una medición y otra tuvieron un coeficiente de variación del 60 hasta el 88% de variación, lo que demuestra que es un método inconsistente.

Por otro lado, resultó interesante que hubo una baja de fluorescencia en la zona de 300-350 nm que es la zona de fluorescencia de los anillos de menor tamaño, que podría indicar que esta consumiendo estas estructuras.

Tabla 15. Volúmenes de fluorescencia obtenidos a partir de las matrices de emisión-excitación

Fracción	Muestra	VF	% de variación
60/40	Control	28,457,051	0
	Muestra	50,105,098 (\pm 20,068,020)	+77%
40/60	Control	25,904,940	0
	Muestra	19,651,616 (\pm 5,478,656)	- 75%
20/80	Control	34,697,177	0
	Muestra	55,758,177 (\pm 16,251,120)	+60%
R	Control	27,882,152	0
	Muestra	52,529,822 (\pm 20,879,771)	+88%

Primero obtuvimos la MEE de una muestra de asfaltenos para observar si estos presentaban fluorescencia y como sería la forma de la matriz. Como se puede observar en la Figura 22, los asfaltenos presentan una fluorescencia que va desde una λ de 260 nm hasta más allá de una λ de 400 nm de excitación y de una λ de 350 nm hasta 610 nm de excitación, por estos motivos, las MEE de las fracciones se hicieron en rangos de λ de 240-480 nm de excitación y 350-630 nm de emisión.

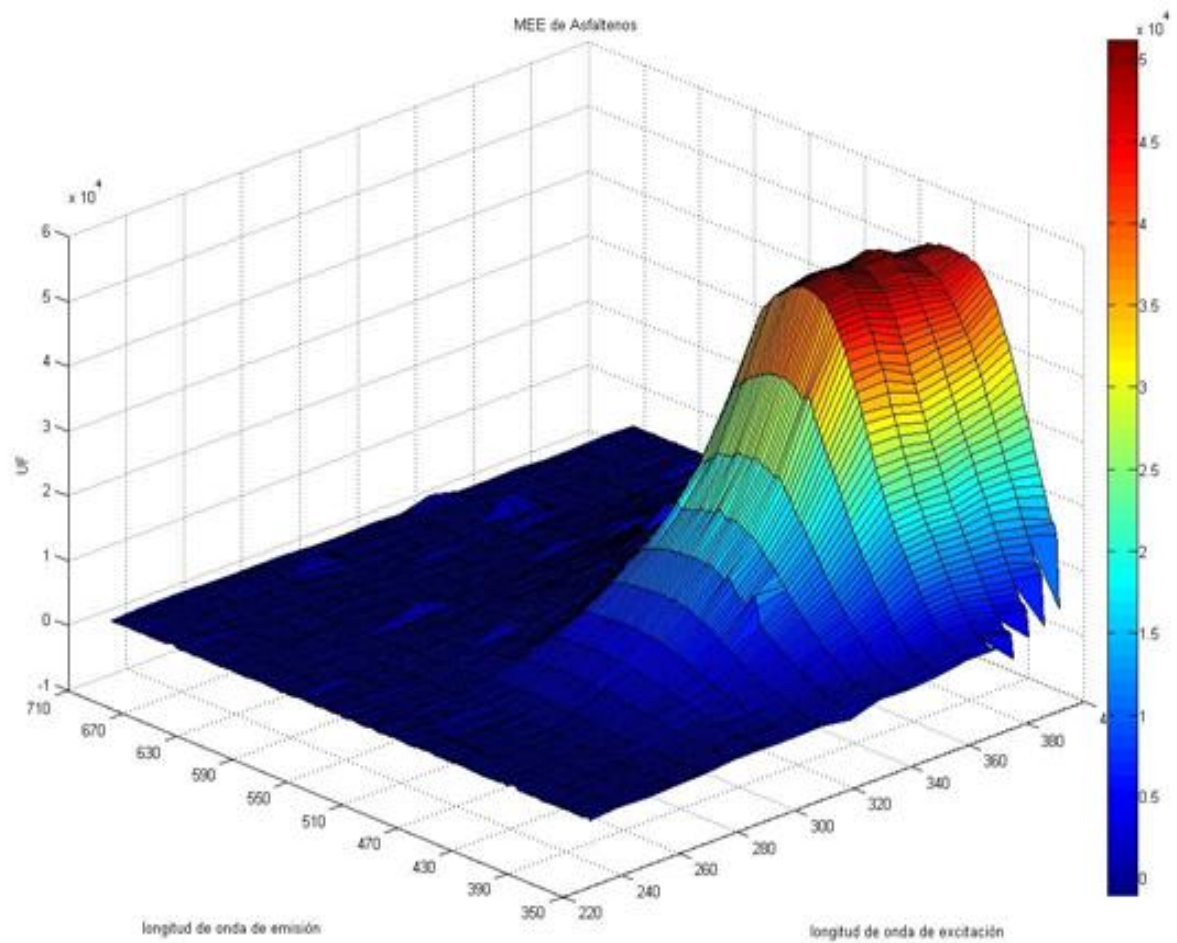


Figura 22. MEE de una muestra de asfaltenos puros sin tratamiento de una λ de 220 a 400 nm de excitación y de 350 a 710 nm de excitación.

A continuación se presentan las MEE de cada una de las fracciones de asfaltenos, primero sin tratamiento (Figura 23), con el fin de detectar alguna diferencia en los espectros de las fracciones, las muestras fueron ajustadas a una absorbancia de 1 a 500 nm. Después se compararon cada uno de los controles con un espectro promedio de los tratamientos con hongos (Figuras 23-25).

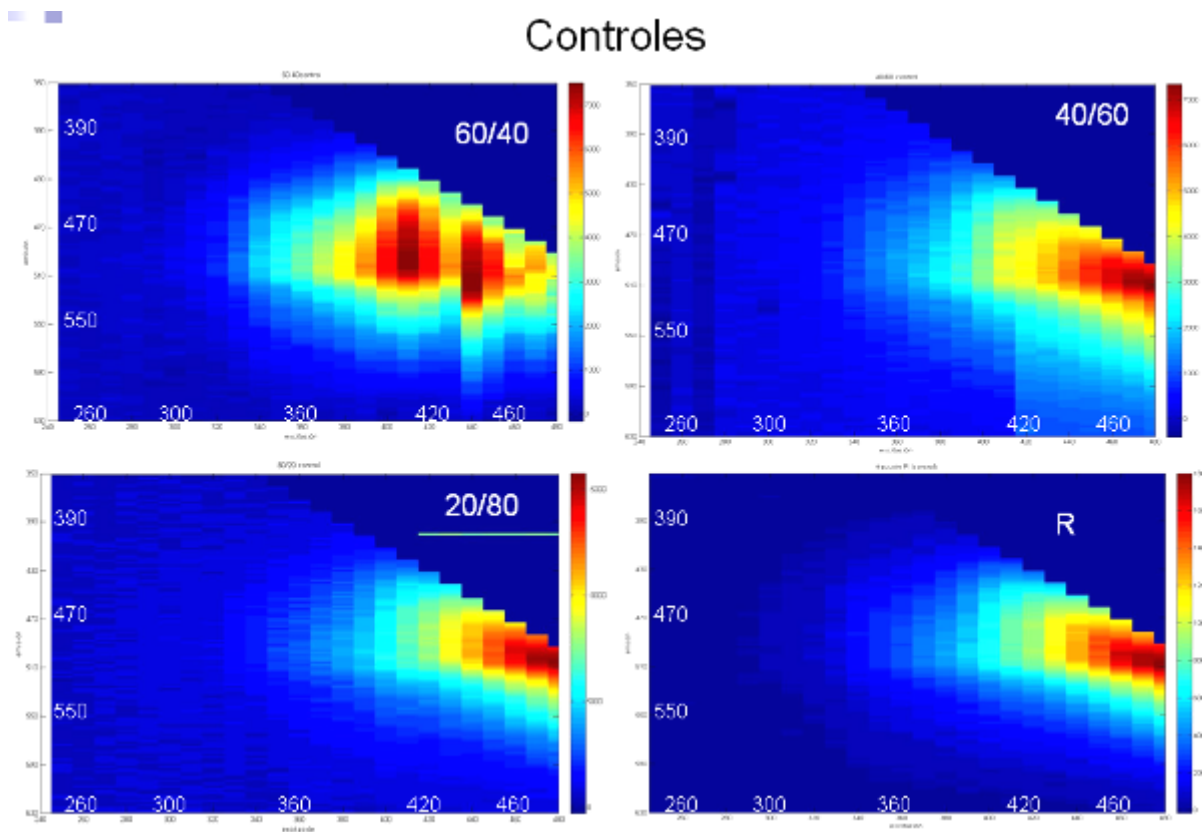


Figura 23. MEE de los controles de las diferentes fracciones de asfaltos sin tratamiento de una λ de 240 a 480 nm de excitación (x) y de 350 a 630 nm de excitación (y).

Los espectros de fluorescencia de los controles (Figura 23) muestran que existe una mayor superficie de fluorescencia en el control 60/40 y ésta va disminuyendo hasta las fracciones 20/80 y el residuo que tienen una superficie de fluorescencia similar. En cuanto al volumen mostrado en la Tabla 15 observamos que los volúmenes de fluorescencia varían en un 26%. Teóricamente, los volúmenes de fluorescencia que se encuentren corridos hacia las longitudes de onda de menor tamaño corresponden a anillos aromáticos de menor tamaño; las estructuras que posean 3 anillos en línea y 4 anillos en posición angular presentarán fluorescencia en 340-400 nm, mientras que los sistemas aromáticos de 5 y 6 anillos mostrarán fluorescencia a 400-500 nm.

En general todos los espectros comienzan a mostrar fluorescencia después de una λ de 300 nm de excitación hasta los 480 nm que medimos y desde 390 nm a 590 nm de λ de emisión. Los espectros obtenidos no muestran picos específicos como sería el caso de un compuesto puro. A continuación observamos los espectros de fluorescencia obtenidos de las fracciones 60/40 (Figura 24), 40/60 (Figura 25), 20/80 (Figura 26) y residuo (Figura 27), después de ser tratadas con el hongo durante 4 semanas y de extraer vuélvalos compuestos solubles en pentano.

Nosotros esperábamos la disminución del VF en las muestras que estuvieron en contacto con *N. fischeri* como indicativo de que algunos compuestos aromáticos hubieran perdido su aromaticidad tras el tratamiento y por tanto su fluorescencia. A su vez, esperaríamos una disminución en un área específica de la MEE a partir del cual pudiéramos evaluar la preferencia de nuestro hongo por transformar compuestos de un determinado número de anillos aromáticos. A partir de las MEE mostrados en las Figuras 23-27 obtuvimos los VF de la Tabla 15, en donde podemos ver que en general las muestras presentan mayor fluorescencia que los controles a excepción de la fracción 40/60. Cabe mencionar que los valores obtenidos entre las muestras variaban mucho lo que indica que nuestro sistema de evaluación no es preciso y confiable.

En la Figura 24 se observan los espectros de la fracción 60/40, en donde observamos que el control, que es el que tiene menor VF, tiene un área de fluorescencia (AF) ampliamente distribuida, abarcando de una λ de 320 nm de excitación y 430 nm de emisión hasta el final del espectro. Las muestras tratadas de esta fracción muestran un mayor VF, pero encontramos que una tiene mayor y otra menor área de fluorescencia. En el caso de la segunda muestra observamos que el área en donde presenta fluorescencia es menor a la del control, sin embargo tiene una mayor intensidad llevando a un mayor volumen de fluorescencia, por lo que podemos ver que ambos parámetros son independientes.

En el caso de las fracciones 40/60, (Figura 25) que es donde el VF del control fue mayor al VF promedio de las muestras, podemos ver que la muestra 1 y el control tienen patrones de fluorescencia parecidos, mientras que la muestra 2 abarca un mayor volumen y al hacer un promedio de estas muestras se obtuvo un VF menor al del control. A partir de esto dedujimos que el método empleado para medir no es consistente ni reproducible.

Finalmente en las fracciones 20/80 (Figura 26) y la fracción residual (Figura 27) se obtuvieron espectros muy parecidos, con la diferencia de que los de la fracción 20/80 ocupaban un poco más de área y mostraban un mayor volumen de fluorescencia. En estas dos series podemos ver que inclusive en los controles el área de fluorescencia es mucho menor que en las fracciones 60/40 y 40/60 (Figuras 24,25,26). Esto puede deberse a la partición por polaridades a la que fueron sometidos inicialmente.

En conclusión, analizar la transformación de los asfaltenos por medio de MEE no fue un método adecuado ya que no tiene la precisión ni la reproducibilidad necesaria para evaluar estos cambios.

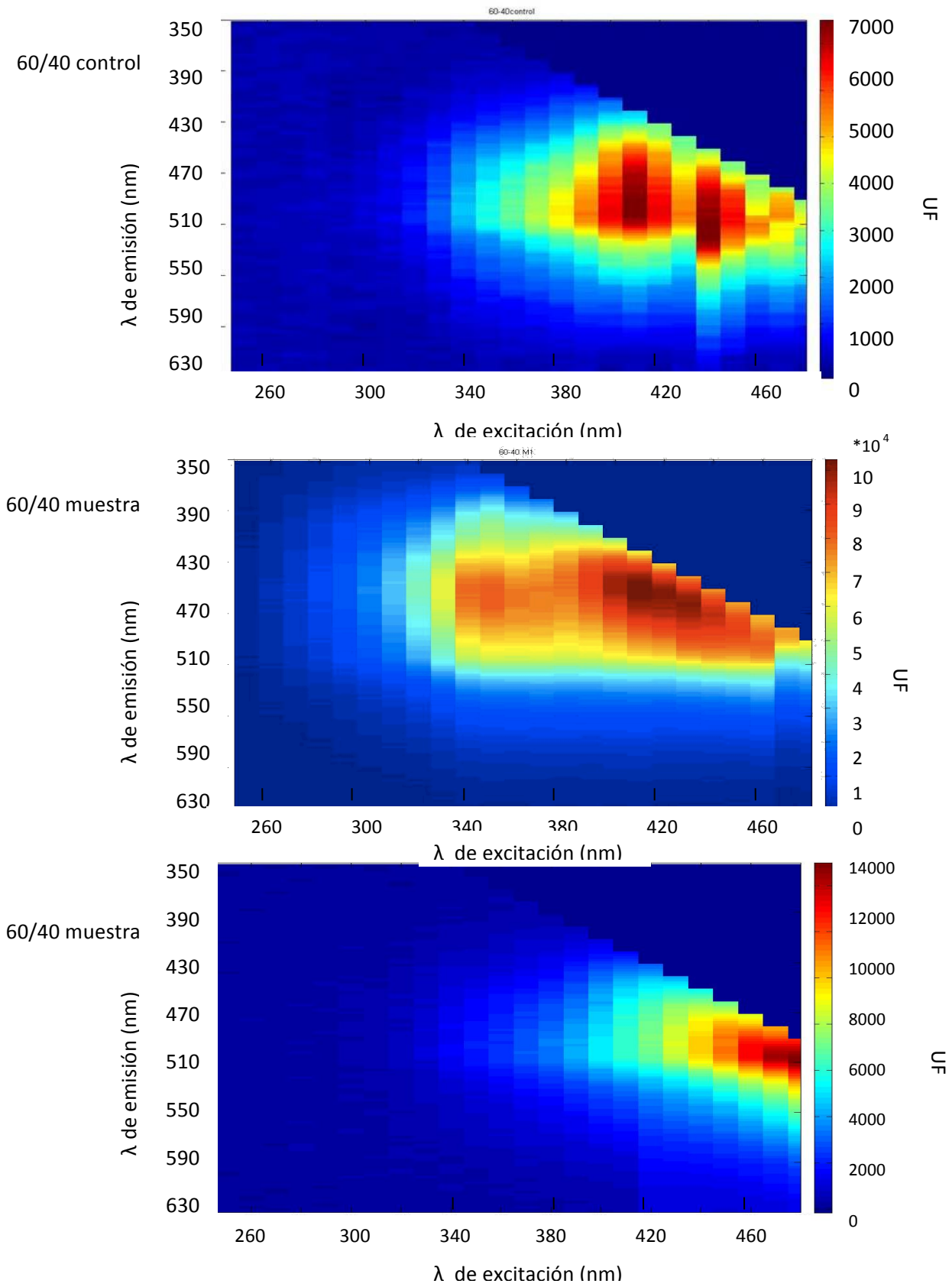


Figura 24. MEE de las fracciones de los asfaltenos 60/40 a) control; b y c) con tratamiento fúngico de 4 semanas. Espectro de λ de 240 a 480 nm de excitación (x) y de 350 a 630 nm de excitación (y).

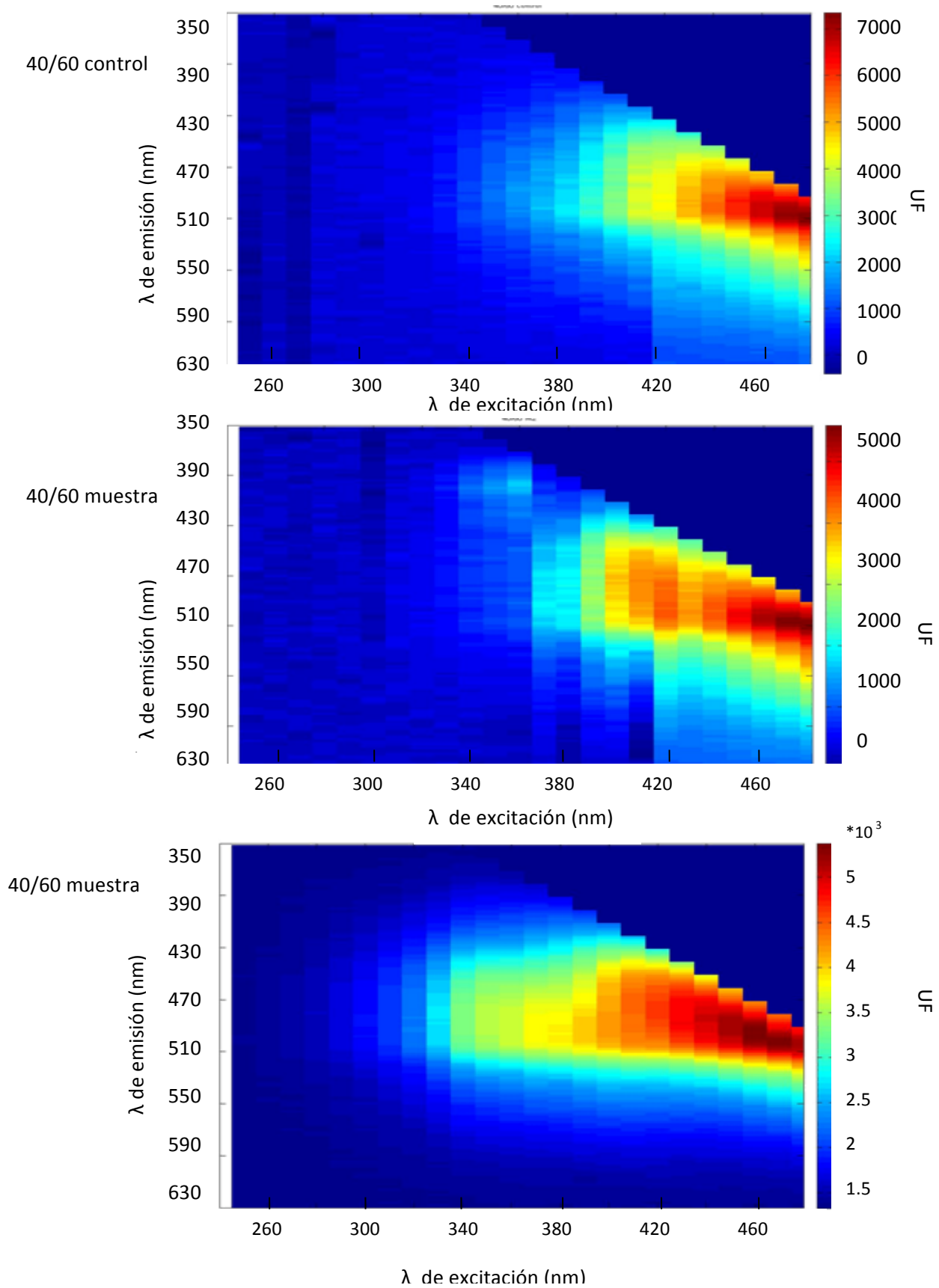


Figura 25. MEE de la fracción 40/60 de los asfaltenos con tratamiento fúngico de 4 semanas de una λ de 240 a 480 nm de excitación (x) y de 350 a 630 nm de excitación (y).

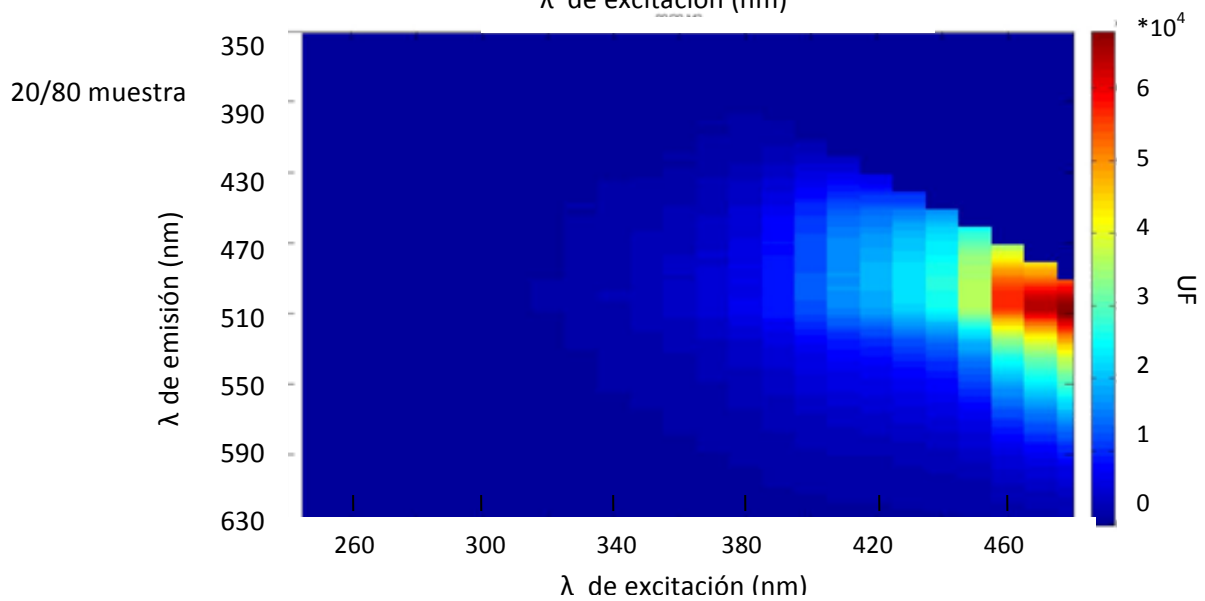
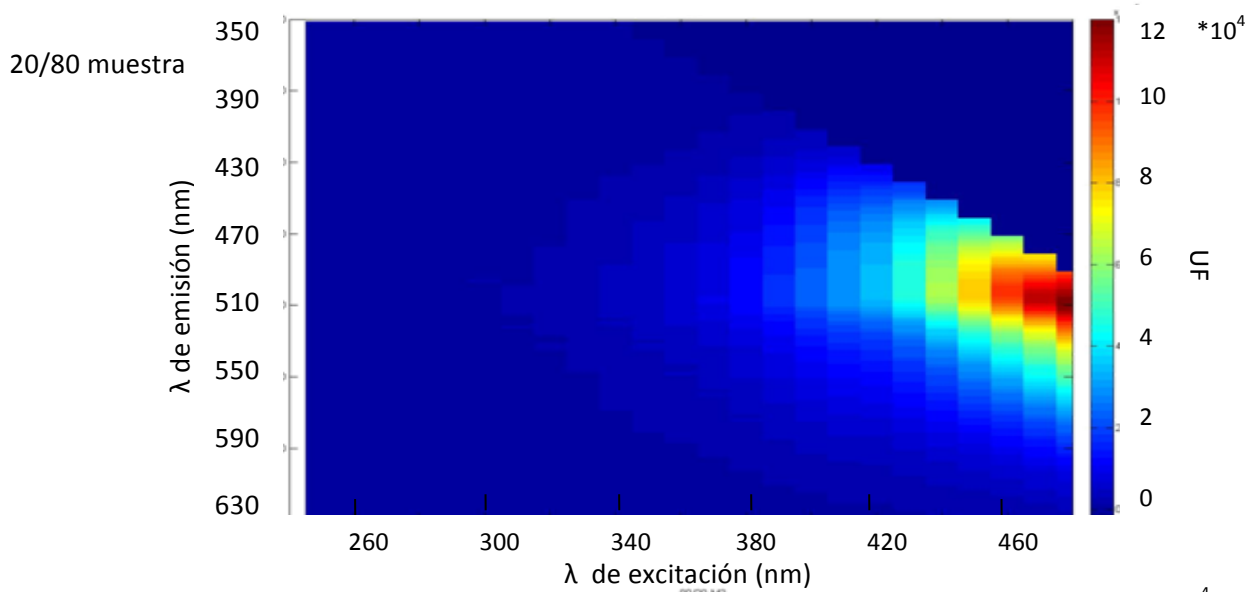
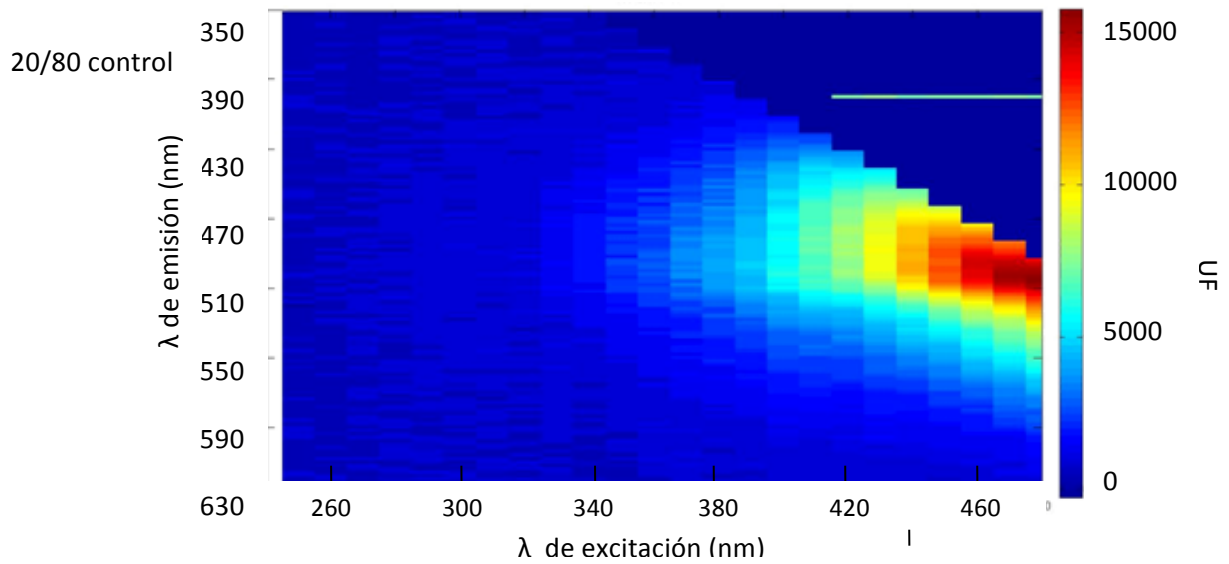


Figura 26. MEE de la fracción 20/80 de los asfaltos con tratamiento fúngico de 4 semanas de una λ de 240 a 480 nm de excitación (x) y de 350 a 630 nm de excitación (y).

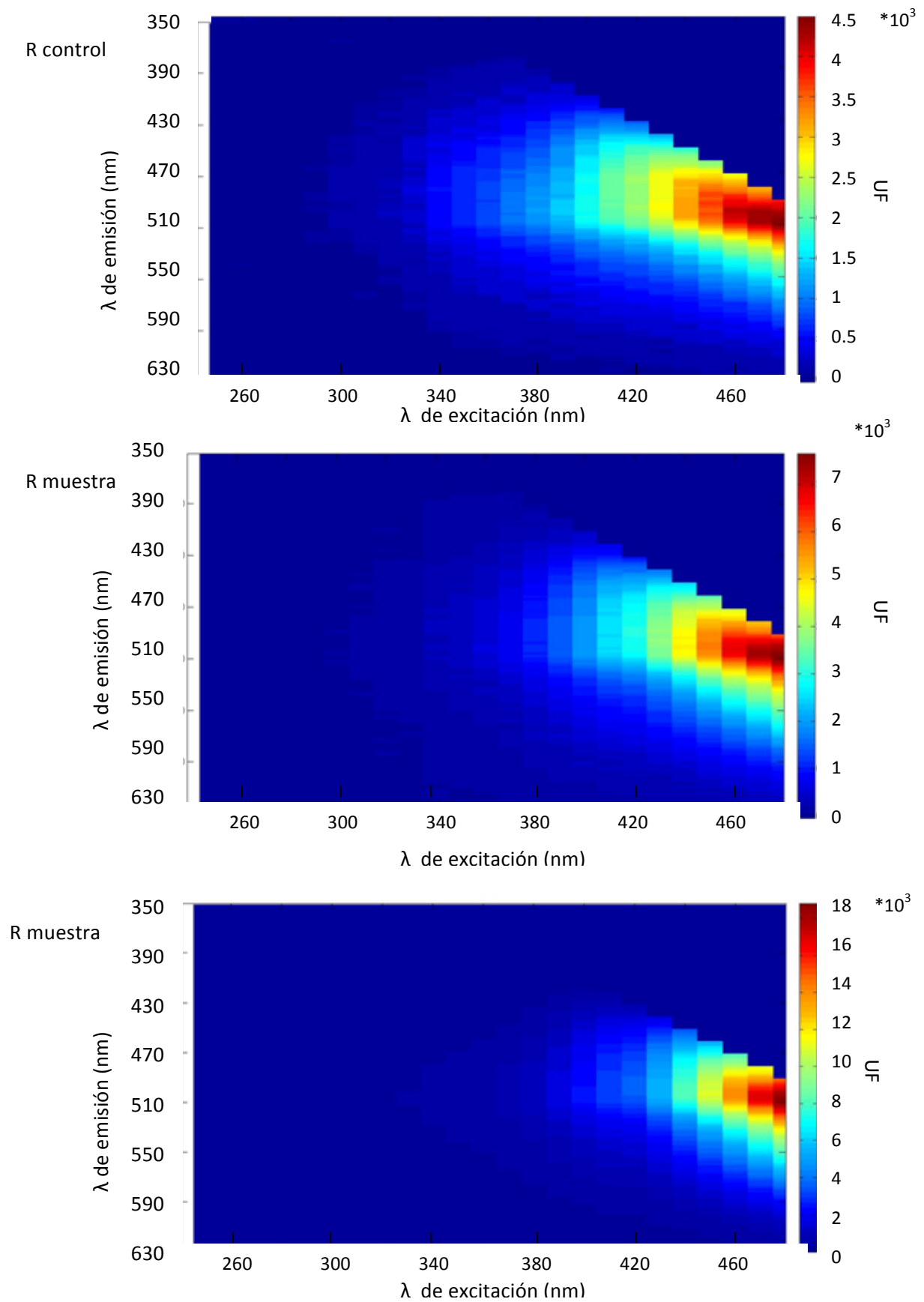


Figura 27. MEE de la fracción R de los asfaltenos con tratamiento fúngico de 4 semanas: λ de 240 a 480 nm de excitación (x) y de 350 a 630 nm de excitación (y).

7 DISCUSIÓN

Durante mucho tiempo ha habido gran controversia sobre la capacidad de los microorganismos de crecer en los asfaltenos como única fuente de carbono y energía. Existen publicaciones que reportan la biodegradación de los asfaltenos por consorcios bacterianos (Bertrand y col. 1983; Rontani y col. 1985), así como artículos que concluyen que un microorganismo no sería capaz de mantenerse en la fracción asfáltica (Thouand y col. 1999.; Lacotte y col. 1996). Los artículos que indican que una bacteria o un consorcio microbiano específico son capaces de degradar a los asfaltenos no son concluyentes ya que miden gravimétricamente la cantidad de asfaltenos residuales lo cual es poco preciso; no utilizan controles adecuados; miden la degradación de la fracción asfáltica mezclada con otra fuente de carbono o no se interpretan los datos de manera convincente. Por otro lado, existen una gran cantidad de artículos sobre la capacidad de diversos *Aspergillus sp* de degradar hidrocarburos alifáticos (Markovetz y col., 1968; Voigt y col., 1981; Amin y Modi, 1987; Volke-Sepúlveda y col., 2006), hidrocarburos aromáticos policíclicos (Ghosh y col., 1983; Yogambal y Karegoudar, 1997; Salicis y col., 1999; Garon y col., 2000; Capotorti y col., 2004) y derivados del petróleo (Elshafie y col., 2007; Itah y col., 2009; Okoro y Amund, 2010).

En este trabajo se caracterizó una cepa de *N. fischeri* que es capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbono. El monitoreo del crecimiento del hongo en medio mineral con asfaltenos como única fuente de carbono se realizó de dos maneras: La primera fue por medio de cuantificación de proteína celular (Figura 7) en donde se observó que la cantidad de proteína celular aumentó hasta la cuarta semana. Este aumento coincidió con la producción máxima de la enzima extracelular capaz de oxidar al ABTS como se muestra en la misma gráfica. Después de la cuarta semana la cantidad de proteína celular y la actividad con ABTS disminuyeron. El aumento en la proteína intracelular es un indicativo de crecimiento de una célula mas no de reproducción celular (Baserga, 1989), por lo tanto, realizamos otro experimento para poder confirmar que nuestro hongo era capaz de utilizar a los asfaltenos como única fuente de carbono y energía.

Posteriormente, se midió la producción de CO₂ durante el crecimiento fúngico. Se monitoreó durante 11 semanas por cromatografía de gases, midiendo así, el metabolismo y mineralización de asfaltenos (Figura 8). Nuestros controles muestran que el CO₂ se produjo sólo cuando el medio con asfaltenos fue inoculado con el hongo, mientras que la producción de CO₂ fue despreciable en los controles conteniendo únicamente asfaltenos o

la biomasa. Contrariamente a nuestros resultados, Pineda y col. (2004) muestran una producción de los controles del 60% del CO₂ monitoreado para los asfaltenos, por lo que suponemos que gran parte del CO₂ producido por su consorcio procede de la fuente de carbono en donde prepararon el inóculo.

En la Figura 8, se observa que hubo un aumento de producción de CO₂ hasta la tercera semana, después de eso la producción de CO₂ disminuyó para finalmente aumentar de nuevo de las 6 a las 9 semanas, esto puede deberse al consumo de dos diferentes tipos de hidrocarburos presentes en los asfaltenos. Al término de las 11 semanas, se obtuvo una cantidad de 184 μ moles de CO₂. Según el análisis elemental realizado a asfaltenos obtenidos de crudo Maya (Durand y col. 2010), el 83.5% del peso total de los asfaltenos corresponde a carbono. El balance de materia del CO₂ obtenido de los cultivos nos indica que el 13.2 (\pm 2.6%) del peso total del carbón contenido en los asfaltenos se transformó a CO₂.

Al finalizar el monitoreo de la curva de producción de CO₂, se midió la cantidad de biomasa residual, que fue equivalente a 1,5 mg/L de biomasa seca. Esta cantidad fue relacionada con la fórmula elemental reportada para la biomasa de *Aspergillus niger* (Nielsen y col. 1994) y restándole la cantidad de biomasa inoculada, la biomasa corresponde al 2.3 (\pm 0.1%) del total de carbono que tenían los frascos inicialmente. El balance de carbono total muestra que alrededor del 15,5% del carbono de asfaltenos es metabolizado.

Las Figuras 7, 8 y el análisis de los datos de dichas figuras nos muestran claramente que la cepa de *N. fischeri* aislada de la Faja Petrolífera del Orinoco, Venezuela es capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbono y energía.

Los resultados obtenidos del crecimiento del hongo en las fracciones de asfaltenos (Tabla 11) mostraron que no existe una diferencia significativa en el crecimiento del hongo, lo que indica que a pesar de que las fracciones sean de diferentes polaridades y posean características diferentes, todas las fracciones son igualmente recalcitrantes.

Por otro lado, se realizó un experimento en el cual se probó crecer el hongo en diferentes hidrocarburos lineales y heterocíclicos cuyas estructuras son parte de las estructuras de los asfaltenos (Strausz y col. 1992., Mullins y col. 2007). En la Tabla 10 se puede observar que el hongo tiene una gran facilidad de metabolizar el aceite comestible comercial y los hidrocarburos lineales. En caso del 1,2:5,6 dibenzantraceno y el fenantreno

vemos en bahías que confieren una alta reactividad a los compuestos y por tanto los pueden hacer susceptibles a degradarse. Los heteroátomos presentes en los compuestos poliaromáticos funcionan como donadores de electrones favoreciendo la capacidad de reacción. Por otro lado, el bajo crecimiento obtenido en algunos compuestos puede ser debido a su toxicidad. Es bien sabido que los derivados benzofurano pueden mostrar actividad antifúngica (Pfefferle y col., 1990;. Masubuchi y col., 2003.).

En cuanto a la identificación de la cepa, se realizó un análisis de la secuencia del gen ribosomal 18S RNA y al realizar el alineamiento (BLAST) utilizando la base de datos del NCBI, se obtuvieron 5 probables candidatos que poseen una identidad mayor o igual al 99%, porcentaje recomendado para lograr la identificación de una especie mediante este método (Youssuf, 2010). Las especies con mejor calificación en términos de porcentaje de identidad fueron *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus novofumigatus*, *Aspergillus fumisynnematus* y *Aspergillus fumigatus* (Tabla 5). El género *Aspergillus sp.* está clasificado como un hongo filamentoso de la familia de los Ascomicetos y se creía que sólo se reproducía asexualmente. Sin embargo, en artículos recientes se han identificado especies de *Aspergillus* capaces de reproducirse sexual y asexualmente (Dyer, 2009; Machida y col. 2010). El nombre aceptado para el hongo con reproducción sexual con mayor relación filogenética con *A. fumigatus* es *Neosartorya fischeri* (Machida y col., 2010). Los hongos con esporulación sexual se llaman telomorfos, refiriéndose a la espora sexual mediática teniendo fase morfológica. Dentro del género *Aspergillus*, está la familia *Fumigati*, la cual está conformada por 8 anamorfos y más de 20 telomorfos (Machida y col. 2010). Por lo tanto, *Neosartorya fischeri* es la especie telomórfica que está más estrechamente relacionada con *A. fumigatus*. La secuencia nucleotídica de los genes homólogos entre estas dos especies puede llegar a ser hasta de un 99.8% idénticos, sin embargo existe por lo menos un 2% de genes únicos de cada genoma, como por ejemplo varios genes de virulencia presentes en *A. fumigatus* que no están presentes en *N. fischeri* (Fedorova y col., 2008).

Por otro lado, se realizó una tinción del hongo con azul de metileno para poder visualizar la morfología de las hifas, que incluía micelio con hifas cenocíticas, así como la presencia de cleistotecias, típico de *Aspergillus* sexuales como *Neosartorya fischeri* (McClenny, 2005; Machida y Gomi, 2010).

Actualmente se ha desarrollado un protocolo más específico útil para diferenciar a la familia *Fumigati*, el cual consiste en la amplificación y comparación de un fragmento del

gen β -tubulina, con el se pueden diferenciar las especies (Hong y col.,2007; Alcazar-Fuoli, 2008). Al amplificar este fragmento de gen utilizando oligonucleótidos y una metodología ya establecida, (Glass y col., 1995) obtuvimos un 98% de identidad con *Neosartorya fischeri* y *Neosartorya coreana* así como un porcentaje menor con otro tipo de *Neosartorya*, los otros hongos que habían dado suficiente porcentaje de identidad de rRNA 18S no dieron una identidad suficiente con el gen de β -tubulina como para corresponder con nuestro hongo.

El hongo que muestra una mayor identidad con el gen de β -tubulina, con el rRNA 18S y que tiene una morfología y microscopía reportada igual a la que muestra nuestro hongo, así como la presencia de cleistotecias es *Neosartorya fischeri*.

La interacción del hongo con el asfalto fue observada por medio de microscopía electrónica de barrido (Figura 6) en donde se observa a las hifas del hongo rodeando a los asfaltos. A mayor aumento se observa que no existe adhesión de las hifas del hongo sobre el material de asfaltos, lo que sugiere que se requieren enzimas extracelulares en las etapas iniciales de la transformación de asfaltos. Sin embargo, se observa que existe la excreción de compuestos alrededor de las hifas y que también se encuentran adheridos a los asfaltos. Estos compuestos extracelulares podrían ser un tipo de glicoproteínas conocidas como hidrofobinas cuya función es facilitar la interacción entre el hongo y las zonas hidrófobas.

Se detectó actividad lacasa extracelular en el medio durante el crecimiento de hongos, la cual fue confirmada con la oxidación de la siringaldazina. Thurston (1994) reportó que la única enzima capaz de reaccionar con la siringaldazina en ausencia de peróxido es la lacasa, por lo que estos resultados confirman que existe una lacasa en el medio extracelular. A continuación se realizó un gel de SDS-PAGE con tinción de plata que mostró dos bandas de 68 y 64 kDa. Como la cantidad de enzima obtenida fue muy poca (Tabla 7) se clonó el gen posiblemente involucrado en la degradación de los asfaltos.

En base a que la actividad enzimática extracelular oxidó a la siringaldazina y en que en ese entonces solo sabíamos que el hongo pertenecía al género *Aspergillus sp.* se sintetizaron oligonucleótidos degenerados de las secuencias más conservadas de los genes de lacasa de diversos hongos del género. A partir del RNA obtenido del microorganismo se amplificó un fragmento con 85% de cobertura cuya secuencia presenta una identidad del 92% con el gen de la lacasa *tilA* de *Neosartorya fischeri* y un fragmento con 65% de

cobertura de 90% de identidad con un gen de la lacasa de *Aspergillus fumigatus*. Estos resultados son consistentes con la identificación preliminar de la cepa del hongo. Se amplificó de nuevo el gen de la lacasa, pero ahora se amplificaron (figura 11) aproximadamente 2000 pb, que abarcaba un 94% de cobertura y presentó una identidad con el gen de la lacasa *tilA* de *Neosartorya fisheri* del 92% y del 89% con lacasa de *Aspergillus fumigatus*. Cabe mencionar que se realizó un control de *Aspergillus sp*, en medio rico (Sabouraud) y ensayándose una prueba para ver si oxidaba siringaldazina. Ambas pruebas dieron negativas, indicando que la expresión de esta enzima está inducida por la presencia de un compuesto recalcitrante como los asfaltenos o por la ausencia de un medio fácil de metabolizar.

Las lacasas pueden catalizar la oxidación de compuestos aromáticos simples y complejos, incluyendo compuestos aromáticos policíclicos. Se ha reportado que funcionan de manera más eficiente en la presencia de mediadores redox (Collins y col., 1996; Johannes y col. 2000; Majcherczyk y col., 1998; Pickard y col., 1999). Los productos de transformación generados son generalmente compuestos más polares, como quinonas o dioles. Otra reacción que llevan a cabo este tipo de enzimas es catalizar la formación de radicales libres que pueden deslocalizar y llevar a la disrupción de un enlace covalente (Torres y col., 2003). Estas transformaciones podrían mejorar la biodisponibilidad y / o biodegradabilidad de las moléculas de asfaltenos.

Otro objetivo de este trabajo era poder analizar los productos de la biotransformación de los asfaltenos, que debido a la complejidad de su estructura, a que se trata de compuestos no volátiles y a que tienden a formar agregados fuertemente unidos, no existen metodologías estándar para su análisis. Esto representa un desafío mayor para el análisis de una muestra. En este trabajo se analizaron las muestras buscando la transformación de los asfaltenos por medio de IR, fluorescencia, CG y CG-MS.

El análisis de los IR de las diferentes fracciones mostró que los espectros obtenidos son muy semejantes a los espectros de otros asfaltenos reportados en la literatura (Buenrostro, 2002) y no presentan grandes diferencias entre ellos, ya que no fue evidente la aparición de uno u otro grupo funcional. La técnica de IR mostró no ser útil para detectar cambios en los asfaltenos después de ser tratados con el hongo. Esto puede ser debido a que la proporción de los asfaltenos modificados es muy pequeña, y esos cambios se ven enmascarados por la gran proporción de moléculas de asfaltenos inalteradas.

En la fluorescencia se observó que hay un aumento de la fluorescencia en las muestras tratadas, que es contrario a lo que se esperábamos. Se observó que en las muestras tratadas de las fracciones 20/80 y R, la fluorescencia comienza a mayores longitudes de onda, sin embargo ocurre lo contrario en las muestras 40/60. En las muestras 60/40 obtenemos una mayor área de fluorescencia en una muestra, y en la otra una menor área, lo que quiere decir que el sistema empleado no es reproducible ni confiable. Se esperaba que las variaciones en las mediciones de fluorescencia nos pudieran indicar que el hongo es capaz de metabolizar y utilizar los compuestos aromáticos de cierto número de anillos dependiendo de en qué zona disminuyera la fluorescencia y que nos diera información del consumo relativo de compuestos de diferente número de anillos. Sin embargo, este método probó no ser útil para lo que se quería determinar. Probablemente esto se deba a que las muestras no se encuentran a la misma concentración, ya que únicamente se hizo un ajuste de las diferentes muestras a una absorbancia de 1 a 500 nm, siendo una aproximación semi-cuantitativa. Otro motivo probable de la falta de precisión del método sería la aglomeración de los asfaltenos a las concentraciones usadas. El aumento de fluorescencia podría deberse a que se consumen las cadenas hidrocarbonadas y entonces hay mayor exposición de los núcleos aromáticos a la luz. También hay que tomar en cuenta que las técnicas de absorbancia y fluorescencia, solo manifiestan la presencia de compuestos con la característica de absorber luz a determinada longitud de onda o emitir fluorescencia, de manera que los datos obtenidos a partir de estas fuentes son sesgados, ya que no toman en cuenta a las moléculas de asfaleno que no tienen esta característica.

Los productos de la transformación de bajo peso molecular fueron analizados por medio de la cromatografía de gases acoplada a un espectro de masas. Se analizaron numerosas muestras al CG-MS con el fin de observar si en alguna podíamos encontrar productos de degradación. Se analizaron la fracción soluble en pentano antes y después de la transformación fúngica y también los extractos totales, sin poder detectar ningún metabolito. Con el fin de hacer más volátiles las muestras, se llevó a cabo una silylación de los extractos totales de asfaltenos antes y después del crecimiento. Con este procedimiento se identificaron cuatro productos en los cultivos y los cuales no aparecían en los experimento control: El ácido hidroxifenil acético, el ácido tianafténico-2-carboxílico, la hidroxipirenodiona y el hidroximetilcarbazol. Los espectros de masas de estos compuestos se muestran en las figuras 19 a 22. Los espectros fueron comparados con una biblioteca de espectros de masas donde encontramos los compuestos que tuvieran un espectro igual y que la estructura fuera posible y formara parte de los

asfaltenos. Estos resultados indican que el hongo metaboliza a las complejas moléculas de asfaltenos produciendo compuestos de menor peso molecular.

Es importante señalar que en los cromatogramas aparecen picos de glicerol, urea y ácidos grasos. Después de varios análisis en busca de la fuente de estos compuestos, se encontró que provenían del reactivo de sililación (TMS) el cual estaba contaminado, seguramente de algún aceite vegetal. Esta contaminación es evidente cuando se analiza el cromatograma de un ensayo en blanco en donde solo se uso buffer y el reactivo (Fig. 18).

8 CONCLUSIONES

Un aporte importante de este trabajo fue la identificación de *Neosartorya fischeri* como un hongo aislado del Canal del Orinoco, Venezuela capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbón y energía

Comprobamos que el hongo es capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbón y energía midiendo la producción de proteína intracelular así como la mineralización de asfaltenos, medida como producción de CO₂. Este es el primer reporte de un organismo que crece en asfaltenos como única fuente de carbón y energía. En este trabajo la preparación de los asfaltenos fue muy meticulosa para que no tuvieran contaminantes y se eliminaron las petroporfirinas, asegurando que el hongo creciera exclusivamente metabolizando moléculas de asfaltenos.

Se detectó actividad lacasa extracelular durante el crecimiento de *N. fischeri* en asfaltenos como única fuente de carbono, actividad que no pudimos observar cuándo el hongo crecía en un medio rico. Mediante un análisis genético realizado a la cepa de *N. fischeri* que crecía en asfaltenos, se observó la presencia de una enzima que corresponde a una lacasa *tilA*. Con los análisis realizados no se puede garantizar que sea la única enzima en el medio, ni que sea la lacasa responsable de la oxidación de la siringaldazina, sin embargo sabemos que esta siendo inducida por la presencia de un medio tan recalcitrante como los asfaltenos.

No fue posible estimar todos los cambios químicos provocados por el crecimiento fúngico sobre la estructura de los asfaltenos debido a que la proporción de asfaltenos transformados es muy baja y a la complejidad de las estructuras de los asfaltenos, incluyendo su tendencia a formar agregados.

Finalmente, se lograron detectar metabolitos de bajo peso molecular mediante CG-MS indicando que durante el crecimiento fúngico hay un rompimiento de las moléculas de asfaltenos y que probablemente sean estos metabolitos de bajo peso molecular los verdaderos sustratos que soportan el crecimiento de *Neosartorya fischeri*.

La importancia de ésta cepa de *N. fischeri* capaz de metabolizar asfaltenos, es que abre una serie de oportunidades para la refinación biotecnológica de crudos pesados y tierras bituminosas, además de tener una potencial aplicación en procesos de bioremediación.

9 PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos nos indican que existe un microorganismo capaz de crecer en asfaltenos como única fuente de carbono y energía, hecho que no había sido demostrado hasta el momento, por lo que es un tema muy poco explorado. A partir de éste se pueden desarrollar muchas ideas y potenciales aplicaciones.

En la degradación de los asfaltenos parece estar involucrada una lacasa *TilA*, el gen completo (*tilA*) de esta fue amplificado y se busca expresarlo en *K. lactis* con el fin de caracterizar la enzima para analizar sus propiedades y saber en qué grado está involucrada en la transformación de los asfaltenos. Esta enzima no se encuentra reportada y en general no hay mucha información de este tipo de lacasas, por lo que su estudio contribuirá al conocimiento de las lacasas y en general al de las oxidorreductasas con capacidades especiales.

Un proyecto que derivo de esta investigación incluye el analizar mediante técnicas genómicas y proteómicas la batería enzimática del hongo que podría estar involucrada en la transformación de los asfaltenos y estimar la capacidad de ésta cepa en la degradación de otros compuestos contaminantes y altamente recalcitrantes. También se considera interesante observar el cometabolismo de *N. fischeri* utilizando sustratos que no limiten el crecimiento del hongo, como es el glicerol.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastre-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., and Rodriguez-Tudela, J.L. 2008. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1244–1251.
- Amin, A.R., Modi, V.V., 1987. Metabolism of *n*-alkanes by *Aspergillus japonicus*. *Folia Microbiologica* 32(1):24-28.
- Andreatta, G., Bostrom, N., Mullins, O., 2007. Ultrasonic Spectroscopy of asphaltene aggregation. *Asphaltenes, Heavy Oils, and Petroleomics*. Springer Editors, New York.
- ATSDR., 1995. Public Health Statement for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Department of Health and Human Services. Atlanta, US.
- Ayala, M. and Vázquez-Duhalt, R. 2004. Enzymatic catalysis on petroleum products. *Studies in Surface Science and Catalysis* 151, *Petroleum Biotechnology, developments and perspectives*. Elsevier. pp. 67-111.
- Baserga, R., 1989. Cell growth and division. A practical approach. Pennsylvania, USA, IRL Press, 1-5.
- Bertrand, J.C., Rambeloarisoa, E., Rontani, J.F., Giusti, G., and Mattei, G. 1983. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnology Letters* 5: 567– 572.
- Bublitz, F., Guenther, T., and Fritsche, W., 1994. Screening of fungi for the biological modification of hard coal and coal derivatives. *Fuel Process Technology* 40: 347–354.
- Boduszynski M., 1981. Chemistry of asphaltenes. En: *Advances in chemistry series*, 195; American Chemical Society, Bunger J.W., Li, N.C. Eds.; Washington D.C.
- Boduszynski M., 2001. Composition of heavy petroleums. 2. Molecular characterization. *Energy & Fuels* 2, 597-613.
- Bonifaz A., 1990. *Micología médica básica*. Mendez Editores, México.
- BP bitumen, 1988. Ficha técnica del producto.
- Buenrostro-Gonzalez, E., Andersen, S.I., Garcia-Martinez, J.A., and Lira-Galeana, C. 2002. Solubility/molecular structure relationships of asphaltenes in polar and nonpolar media. *Energy Fuels* 16: 732–741.
- Campbell J.C., Laherrere J.H., 1998. The end of cheap oil. *Scientific American*, Marzo 1998. 78-83.

- Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., and Guglielmetti, G. 2004. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation* 15: 79-85.
- Carpintero O., García E., Giordano E., Marzo M. 2008. El final de la era del petróleo barato. Editorial Icaria Antarazyt 271. Marzo 2008.
- Chaillan F, Le Fléche A., Bury E., Phantavong Y. 2004. Identifiacion and biodegradation potential of tropic aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology* 155: 587-595.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., and Dobson, A.D.W. 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Applied Environmental Microbiology* 62: 4563-4567.
- Durand E., Clemancey M., Lancelin J.J., Verstraete J., Espinat D., Quoineaud A.A. 2010. Effect of chemical composition on asphaltenes aggregation. *Energy Fuels* 24:1051-1062.
- Dyer S., 2009. Addressing the Challenges of Oil Sands Development Through Better Public Policy not Public Relations. *L'actualité chimique canadienne*. Vol. 61, 16-20: 32-34.
- Dyer P.S., O'Gorman C.M., Fuller H.T. 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 457: 471-474.
- Fedorak P.M., Semple K. M., Vázquez-Duhalt R., Westlake W.S., 1993. Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 429-437.
- Fedorova N., Khaldi N., Joardar V., Maiti R., Amedeo P., Anderson M., Crabtree J., Silva J., Badger J., Albarraq A., Angiuoli S., Bussey H., Bowyer P., Cotty P., Dyer P., Egan A., Galens K., Fraser-Liggett C., Haas B., Inman J., Kent R., Lemieux S., Malavazi I., Orvis J., Roemer T., Ronning C., Sundaram J., Sutton G., Turner G., Venter C., White O., Whitty B., Youngman P., Wolfe K., Goldman G., Wortman J., Jiang B., Denning D., Nierman W. 2008. Genomic Islands in the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics*, 4 : 1-13.
- Fernández C., Silva M., Pereira J., Mallia A., 2006. Biodegradabilidad de las fracciones de resinas y asfaltenos por pseudomonas en suelo impactado con crudo mediano. *Ingeniería UC, Universidad de Carabobo Venezuela, Redalyc*, 13 (002) 7-13.
- García-Arellano H., Buenrostro-Gonzalez, E., Vazquez-Duhalt R., 2004. Biocatalytic transformation of Petroporphyrines by Chemical Modified Cytochrome C. *Biotechnology and Bioengineering*, 85:7:790-798.
- Garon, D., Krivobok, S., and Seigle-Murandi, F. 2000. Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere* 40: 91- 97.

- Gherbawy Y., Voigt K., 2010. Molecular identification of fungi, editorial Springer, USA, 501.
- Ghosh, D.K., Dutta, D., Samanta, T.B., and Mishra, A.K. 1983. Microsomal benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: assay and characterization of the enzyme system. Biochemical and Biophysical Research Communication 113: 497-505.
- Glass N.L., Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. Applied and Environmental Microbiology, 61: 1323-1330.
- Govindhakannan J., DiLabio G., Little E., 2009. Cleaner Energy for a Global Market, L'actualité chimique canadienne. 61: 26-30.
- Groezing H., Mullins O.C., 1999. Asphaltene molecular size and structure. Journal of Physical Chemistry A. 103:11237.
- Hofrichter M., Bublitz F., Fritsche W. 1997. Fungal attack on coal: Modification on hard coal by fungi. Fuel Processing and Technology 52: 43-53.
- Hong S., Shin H., Hong j., Frisvad J., Nielsen P., Varga J., Samson R., 2007. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*, Antonie van Leeuwenhoek, 93: 87-98.
- Itah, A.Y., Brooks, A.A., Ogar, B.O., and Okure, A.B. 2009. Biodegradation of international jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 83: 318-327.
- Johannes, C., and Majcherczyk, A., 2000. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. Applied Environmental Microbiology 66: 524-528.
- Kirkwood K. M., Foght J. M., Gray M.R. 2004. Prospects for biological upgrading of heavy oils and asphaltenes. Studies in Surface Science and Catalysis 151, Petroleum Biotechnology, developments and perspectives. Elsevier pp. 113-143.
- G. Koss, 1999. Toxicology. Hamburg, Germany, Academic Press.
- Lacotte, D.J., Mille, G., Acquaviva, M., and Bertrand, J.C., 1996. Arabian light 150 asphaltene biotransformation with n-alkanes as co-substrate. Chemosphere 32: 1755-1761.
- Latgé J.P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillois. Clinical Microbial Reviews, American Society for Microbiology. 12(2): 310-350.
- McClenny, N. 2005. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Medical Mycology 43: S125- S128.

- Machida M. y Gomi K., 2010. *Aspergillus*, Molecular Biology and Genomics. Caister Academic Press, Norfolk UK.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., and Huttermann, A. 1998. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microbial Technology* 22: 335-341.
- Markovetz, A.J., Jr, Cazin, J., and Allen, J.E. 1968. Assimilation of alkanes and alkenes by fungi. *Applied Microbiology* 16: 487-489.
- Masubuchi, M., Ebiike, H., Kawasaki, K., Sogabe, S., Morikami, K., Shiratori, Y., 2003. Synthesis and biological activities of benzofuran antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. *Bioorg Med Chem* 11: 4463-4478.
- Maugeri L. 2009. Squeezing more oil from the ground. *Scientific American*, October : 36-43.
- Mohr S.H., Evans G.M., 2008. Peak Oil: Testing Hubbert's Curve via Theoretical Modeling. *Natural Resources Research*. 17(1).
- Mullins C., Iino Masashi, Takanohashi T., 1998. Structures and dynamics of asphaltenes, chapter VI. Molecular and colloidal structure of coal asphaltenes and other heavy solvent soluble components. Plenum Press, New York.
- Mullins C., Sheu E., Hammami A., 2007. Asphaltenes, Heavy Oils, and Petrochemicals. Springer Editors, , New York.
- Muñoz, G., Nakari-Setälä, T., Merja-Penttilä, E.A. 1997. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Current Genetics* 32:225-230.
- Naranjo L., Urbina H., 2007. Isolation of White Autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25: 341-349.
- Nielsen J., Villadsen J. and Liden G. 1994. *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic/. Plenum Publishers. New York
- Oil Sands Conservation Act, section 1(1)(f). Chapter 0-7 2000. <http://www.gob.ab.ca/qp>
- OPEC (2009) OPEC annual statistical bulletin 2009 [WWW document]. URL http://www.opec.org/opec_web/en/.
- Okoro, C.C., Amund O.O., 2010. Biodegradation of produced water hydrocarbons by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of American Science* 6: 143-149.
- Pfefferle, W., Anke, H., Bross, M., Steffan, B., Vianden, R., and Steglich, W. 1990. Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. *The Journal of Antibiotics* 43: 648-654.

- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Corioloropsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Applied Environmental Microbiology* 65: 3805–3809.
- Pineda Flores, Boll-Argüello, Mesta-Howard, 2004. A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation* 15: 145-151.
- Pineda Flores, Mesta-Howard, 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 43 : 143.150.
- Reno P, Faust R.A., 1994. Toxicity summary for benzo(a)pyrene, Oak Ridge reservation environmental restoration program., Tenesee. 1-10.
- Rontani J., Bosser-Joulak F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C., Giusti, G., Faure, R. 1985 Analytical Study of Asthart crude oil biodegradation. *Chemosphere*, 14: 1413-1422.
- Rozzell J.D. 1999. Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7: 2253-2261.
- Salicis, F., Krivobok, S., Jack, M., and Benoit-Guyod, J.L. 1999. Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. *Chemosphere* 38: 3031–3039.
- Saratale G., Kalme S., Bhosale S., Govindwar S., 2007. Biodegradation of kerosene by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 *Journal of Basic Microbiology*. 47: 400-405.
- Scherer M., Fischer R., 2001. Molecular characterization of a blue-cooper laccase, TilA, of *Aspergillus nidulans*, *FEMS Microbiology Letters* 199: 201-213.
- Semple K, Cyr N., Fedorak P., 1990. Characterization of asphaltenes from Cold Lake heavy oil: variations in chemical structure and composition with molecular size, *Canadian Journal of Chemistry*, 68: 1092-1099.
- Sigihara J., Branthraver J., Willcox K. 1973. Oxidative demetalation of oxovanadium porphyrins. American Chemical Society, Division of Petroleum Chemistry 18: 645-657
- Speight J.G. 1999. *The Chemistry and Technology of Petroleum*, 3rd edition, Marcel Dekker, Inc. , New York.
- Strausz O.P., Mojelsky T.W. and Lown E.M., 1992. The molecular structure of asphaltene: an unfolding story, *Fuel*, 71:12, 1355-1363.
- Thurston C.F. 1994. The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, 140: 19-26.

- Tinoco P.V., 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 331-335.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., Le Borgne, S. 2003. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental* 46: 1-15.
- Uno S., Makishima M., 2009. Benzo(a)pyrene toxicity and inflammation disease. *Current Rheumatology reviews*. 5: 266-271
- Valenzuela E., Solís M., Martínez V.O., Pinochet T. 2006. Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo. *Boletín Microbiológico* 21: 35-41.
- Voigt, A., Bemann, W., and Tröger, R. 1981. The growth of thermophilic fungi strains *Aspergillus fumigatus* and *Mucor lusitanicus* in *n*-alkane medium. *Zentralbl Bakteriologie* 136: 590-602.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., Favela-Torres, E. (2006) Biodegradation of high concentrations of hexa- decane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. *Bioresource Technology* 97: 1583-1591.
- WHO, World Health Organization, 1998. Environmental health criteria 202, International Programme on chemical safety. Geneva, Switzerland.
- Winans R.E., Hunt J.E. 1999. An overview of residue characterization by mass spectrometry and small angle scattering techniques, Chemistry division, Argonne National Laboratory. USA.
- Wolfenden R.S., Wilson D.L., 1982. "Radical cation as reference chromogens in the kinetic studies of one electron transfer reaction". *J. Chem. Soc. Perkin Trans* 2:805-812
- (<http://www.anl.gov/PCS/acsfuel/preprint%20archive/Files/Volumes/Vol144-4.pdf>)
- Wortman, J.R., Fedorova, N., Crabtree, J., Joardar, V., Maiti, R., Haas, J., 2006. Whole genome comparison of the *A. fumigatus* family. *Medical Mycology* 44: S3-S7.
- Wyndham, R.C., and Costerton, J.W. 1981. *In vitro* microbial degradation of bituminous hydrocarbons and *in situ* colonization of bitumen surfaces within the Athabasca oil sands deposit. *Applied Environmental Microbiology* 41: 791-800.
- Yogambal, R.K., and Karegoudar, T.B., 1997. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Experimental Biology* 35: 1021-1023.
- Zazueta R. 2008, Las oxidorreductasas en la biotecnología ambiental. CONCYTEG, Año 3 (37).

Anexo I. Alineamientos

1. Alineamiento (BLAST) del rRNA 18S del hongo degradador de asfaltenos utilizando la base de datos del NCBI.

Secuencia base: *Neosartorya fischeri*, cepa ATCC 66781, secuencia parcial de gen rRNA 18S.

```

Score = 516 bits (279), Expect = 2e-144
Identities = 281/282 (99%), Gaps = 0/282 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query  80  TACAGAGCAGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCT 139
      |||
Sbjct  493  TACAGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCCGCTGCCT 434

Query  140  TTCGGGCCCGTCCCCgggggggaggggacggggCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCA 199
      |||
Sbjct  433  TTCGGGCCCGTCCCCGGGGGGAGGGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGAGGGCA 374

Query  200  GCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAA 259
      |||
Sbjct  373  GCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAA 314

Query  260  GACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCCT 319
      |||
Sbjct  313  GACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCCT 254

Query  320  CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAA 361
      |||
Sbjct  253  CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAA 212

```

2. Alineamiento (BLAST) del gen parcial de β -tubulina del hongo degradador de asfaltenos utilizando la base de datos del NCBI.

Secuencia base: *Neosartorya fischeri (spinosa)* NRRL 5034, gen parcial de β -tubulina.

```

Score = 870 bits (471), Expect = 0.0
Identities = 487/494 (99%), Gaps = 3/494 (1%)
Strand=Plus/Minus

Query  12  GACTGGCCG-AGACGAAGTTGTCTGGGACGGAAGAGCTCGCCGAAGGGACCGGCACGGACA 70
      |||
Sbjct  493  GACTGGCCGAAGACGAAGTTGTCTGGGACGGAAGAGCTCGCCGAAGGGACCGGCACGGACA 434

Query  71  GCGTCCATGGTACCAGGCTCGAGATCGACCAGAACGGCAGGGAACATACTTGTACCCG 130
      |||
Sbjct  433  GCGTCCATGGTACCAGGCTCGAGATCGACCAGAACGGCAGGGAACATACTTGTACCCG 374

Query  131  TTGGCCTAGTAGCGAGTTC-GATCGTGAGATGTTGCCGAAGTAGTGTAGAGTCGAGAGTT 189
      |||
Sbjct  373  TTGGCCTAGTAGCGAG-TCAGATCGTGAGATGTTGCCGAAGTAGTGTAGAGTCGAGAGTG 315

Query  190  TCAACCACGCACCTCGTGAAGTAGACGTTTCATACGCTCCAGCTGGAGGTCGGAGGAGCC 249
      |||
Sbjct  314  TCATCCACGCACCTCGTGAAGTAGACGTTTCATACGCTCCAGCTGGAGGTCGGAGGAGCC 255

Query  250  ATTGTAGCTATTATCCCCATCAGACACGCGTCTCTTCTTCTTGCATTTTCGTTTCCC 309
      |||
Sbjct  254  ATTGTAGCTATTATCCCCATCAGACACGCGTCTCTTCTTCTTGCATTTTCGTTTCCC 195

```

```

Query 310 CCGCTTTCCTCAATTGGGAGGATAAAGGTCGAACTTACTGGCCAGAGCCGTCAAGGCCGTG 369
          |||
Sbjct 194 CCGCTTTCCTCAATTGGGAGGATAAAGGTCGAACTTACTGGCCAGAGCCGTCAAGGCCGTG 135

Query 370 CTCACCAGAGATGGTCTGCCTGTAAATTTGTTAGCTGATACCCATGACAGCGAAGCTGAA 429
          |||
Sbjct 134 CTCACCAGAGATGGTCTGCCTGTAAATTTGTTAGCTGATACCCATGACAGCGAAGCTGAA 75

Query 430 CCCATGGAGGACAGCCTGCTAAGATGACAGGTCCTAATCTCCCATCATCCAAGCATTGAG 489
          |||
Sbjct 74 CCCATGGAGGACAGCCTGCTAAGATGACAGGTCCTAATCTCCCATCATCCAAGCATTGAG 15

Query 490 GTCGAGACATACCA 503
          |||
Sbjct 14 GTCGAGACATACCA 1

```

3. Alineamiento (BLAST) del gen parcial de lacasa de *N. fischeri* utilizando la base de datos del NCBI.

Secuencia base: *Neosartorya fischeri* NRRL 181 laccase *tilA* hipotética (NFIA_009660)

Score = 1119 bits (1240), Expect = 0.0
Identities = 707/765 (92%), Gaps = 0/765 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 319 GCTGCGCGCCCCGACGAATCCACTGCTCGAAGGAACCTTTCACACAACCTTCTAGTGCCA 378
          |||
Sbjct 725 GCTGCGCGCCTCCGACGATTCCTCTGCTCGAAGGAGACTTTCACACAACCTTCTAGTGCCA 784

Query 379 CTCCACCGACAGTGTTCCTGGCTGTACTCCGTCTCAGGGCTCTACCGAGCTACTCCTGG 438
          |||
Sbjct 785 CGCCACCGACACTGTTCCTGGCTGTACTCCGTCTCAGGGCTCGACGGAGCTACTCCTGG 844

Query 439 TTGATCCACTCGCTTCGTACGCCAGCTTTGACCTGATTAGTGCTGCTGGTGTGTCAACGC 498
          |||
Sbjct 845 TGGATCCACACGCTTCGTACGCCAGTTTTGACTTGATTAGTGCTGCTAGTGTGTCAATGC 904

Query 499 TCACTTTCTCAATCGACGAACATCCCATGTATATATACGCCATCGATGGAAGATATATCG 558
          |||
Sbjct 905 TCACTTTCTCAGTCGACGAACATCCCATGTATATATACGCCGTCGATGGAAGATATATCG 964

Query 559 TCCCGTTTCGGGTGGATGCCGTCACCATTGCCAACGAAACCGGTATTCATCATGGTGA 618
          |||
Sbjct 965 TCCCGTTTCGAGTGGATGCCATCACCATTGCCAACGAAACCGTTATTCGGTCATGGTGA 1024

Query 619 AGCTGGATAGACCGGCTGGTGACTACACCGTGCGTATAGCGAACGCCGGAATCAACCAAC 678
          |||
Sbjct 1025 AGCTGGATAAACC GGCTGGTGACTACACCGTGCGTATAGCGAACGCCGGAATCAACCAAC 1084

Query 679 TCATCAGTGGCAATGCGAGCATGTCTTACCACACGCCTTTCAGAACTCAATCACGTCCTT 738
          |||
Sbjct 1085 TTATFACTGCCAATGCGAGCATATCTTACGACACGCCTTTC AAGGCTCAATCACGTCCTT 1144

Query 739 CGCAGCCATCAATCGACATCACC GGCGCAAACACAACAGCGGAAGTCGTGATGTTGACG 798
          |||
Sbjct 1145 CGCAGCCATCAATCGACATCACC GGCGCAAACACAACAGCGGACGTCGTGATATTCGACG 1204

Query 799 AGAGCATGGTGACCCCTTTCCTGTGGAGGTACCGGCGCAGGAGGTTGCCCAGACCTTCT 858
          |||
Sbjct 1205 AGAGCATGGTGACCCCTTTCCTGTGGAGGTACCGGCGCAAGAGGTTGCCCAGACCTTCT 1264

```

```

Query 859 TCCTAGATATCGCGCGGTTTAAACACGTCTACCGCTGGATTCTTGAAACTCAGGCTTCC 918
          |||
Sbjct 1265 TCCTAGATGTGCGCCCGGTTCAACGCGTCTACCGCTGGATTCTTGAAACTCAGGCTTCC 1324

Query 919 CGCTCTCCGTGGAGGAGTCGCCTCCACTTCTGTTCAATCCCTCCACCGCCAAGCCCGATC 978
          |||
Sbjct 1325 CGCTCTCCATGGAGGAATCGCCTCCACTTCTGTTCAATCGCTCCGCCCGCCAAGCCCCATC 1384

Query 979 TCTCGATTTGACTCGCAACGGAACCTGGGTCGATCTCATCTTCAGAGTGGTCGGCCCTT 1038
          |||
Sbjct 1385 TTTCGATTTCAACACGTAACGGAACCTGGGTCGATCTCATCTTCAGAGTACCAGGCCCTT 1444

Query 1039 TACAGCCACCACACCCTATTCACAAACACTCGAACAAATTCTACG 1083
          |||
Sbjct 1445 TACAGCCACCACACCCTTTTCACAAGCACTCGAACAAAGTTCTTCG 1489

```

Score = 1119 bits (1240), Expect = 0.0
Identities = 707/765 (92%), Gaps = 0/765 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1481 GCTGCGCGCCCCGACGAATCCACTGCTCGAAGGAACCTTCCACACAACCTTAGTGCCA 1540
          |||
Sbjct 725 GCTGCGCGCCTCCGACGATTCCTCTGCTCGAAGGAGACTTCCACACAACCTTAGTGCCA 784

Query 1541 CTCCACCGACAGTGTCTTCTGGCTGTACTCCGTCTCAGGGCTCTACCAGACTACTCCTGG 1600
          |||
Sbjct 785 CGCCACCGACACTGTCTTCTGGCTGTACTCCGTCTCAGGGCTCGACGGAGCTACTCCTGG 844

Query 1601 TTGATCCACTCGCTTCGTACGCCAGCTTTGACCTGATTAGTGCTGCTGGTGTGTCAACGC 1660
          |||
Sbjct 845 TGGATCCACACGCTTCGTACGCCAGCTTTGACTTGATTAGTGCTGCTAGTGTGTCAATGC 904

Query 1661 TCACTTTCTCAATCGACGAACATCCCATGTATATATACGCCATCGATGGAAGATATATCG 1720
          |||
Sbjct 905 TCACTTTCTCAGTCGACGAACATCCCATGTATATATACGCCGTCGATGGAAGATATATCG 964

Query 1721 TCCCGGTTTCGGGTGGATGCCGTCACCATTGCCAACGGAACCGGTATTCAATCATGGTGA 1780
          |||
Sbjct 965 TCCCGGTTTCGAGTGGATGCCATCACCATTGCCAACGGAACCGTTATTTCGGTTCATGGTGA 1024

Query 1781 AGCTGGATAGACCGGCTGGTGACTACACCGTGCGTATAGCGAACGCCGGAATCAACCAAC 1840
          |||
Sbjct 1025 AGCTGGATAAACCGGCTGGTGACTACACCGTGCGTATAGCGAACGCCGGAATCAACCAAC 1084

Query 1841 TCATCAGTGGCAATGCGAGCATGTCTTACCACACGCCTTTCAGAACTCAATCACGTCTCT 1900
          |||
Sbjct 1085 TTATTACTGCCAATGCGAGCATATCTTACGACACGCCTTTCAGGCTCAATCACGTCTCT 1144

Query 1901 CGCAGCCATCAATCGACATCACCGGCGCAAACACAACAGCGGAAGTCGTGATGTTGACG 1960
          |||
Sbjct 1145 CGCAGCCATCAATCGACATCACCGGCGCAAACACAACAGCGGACGTCGTGATATTGACG 1204

Query 1961 AGAGCATGGTGACCCCTTCCCTGTGGAGGTACCGGCGCAGGAGGTTGCCAGACCTTCT 2020
          |||
Sbjct 1205 AGAGCATGGTGACCCCTTCCCTGTGGAGGTACCGGCGCAAGAGGTTGCCAGACCTTCT 1264

```

```

Query 859 TCCTAGATATCGCGCGGTTTAAACACGTCTACCGCTGGATTCTTGAAACTCAGGCTTCC 918
      |||
Sbjct 1265 TCCTAGATGTCGCCCGGTTCAACGCGTCTACCGCTGGATTCTTGAAACTCGGGCTTCC 1324
      |||

Query 919 CGCTCTCCGTGGAGGAGTCGCCTCCACTTCTGTTCAATCCCTCCACCGCCAAGCCCGATC 978
      |||
Sbjct 1325 CGCTCTCCATGGAGGAATCGCCTCCACTTCTGTTCAATCGCTCCGCCCGCCAAGCCCATC 1384
      |||

Query 979 TCTCGATTTGACTCGCAACGGAACCTGGGTCGATCTCATCTTCAGAGTGGTCGGCCCTT 1038
      |||
Sbjct 1385 TTTCGATTTCAACACGTAACGGAACCTGGGTCGATCTCATCTTCAGAGTCACCGGCCCTT 1444
      |||

Query 1039 TACAGCCACCACACCCTATTCACAAACTCGAACAATTCTACG 1083
      |||
Sbjct 1445 TACAGCCACCACACCCTTTTCACAAGCACTCGAACAAGTCTTCG 1489
      |||

```

Score = 1119 bits (1240), Expect = 0.0
Identities = 707/765 (92%), Gaps = 0/765 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1481 GCTGCGCGCCCCGACGAATCCACTGCTCGAAGGAACCTTCCACACAACTTAGTGCCA 1540
      |||
Sbjct 725 GCTGCGCGCCTCCGACGATTCCTGCTCGAAGGAGACTTCCACACAACTTAGTGCCA 784
      |||

Query 1541 CTCCACCGACAGTGTTCCTGGCTGTACTCCGTCTCAGGGCTCTACCGAGCTACTCCTGG 1600
      |||
Sbjct 785 CGCCACCGACACTGTTCCTGGCTGTACTCCGTCTCAGGGCTCGACGGAGCTACTCCTGG 844
      |||

Query 1601 TTGATCCACTCGCTTCGTACGCCAGCTTTGACCTGATTAGTGCTGCTGGTGTGCAACGC 1660
      |||
Sbjct 845 TGGATCCACACGCTTCGTACGCCAGCTTTGACTTGATTAGTGCTGCTAGTGTGCAATGC 904
      |||

Query 1661 TCACTTTCTCAATCGACGAACATCCCATGTATATATACGCCATCGATGGAAGATATATCG 1720
      |||
Sbjct 905 TCACTTTCTCAGTCGACGAACATCCCATGTATATATACGCCGTCGATGGAAGATATATCG 964
      |||

Query 1721 TCCCCGTTCCGGTGGATGCCGTACCATTGCCAACGAAACCGGTATTCAATCATGGTGA 1780
      |||
Sbjct 965 TCCCCGTTCCGAGTGGATGCCATACCATTGCCAACGAAACCGGTATTCCGGTCATGGTGA 1024
      |||

Query 1781 AGCTGGATAGACCGGCTGGTGACTACACCGTGCGTATAGCGAACGCCGGAATCAACCAAC 1840
      |||
Sbjct 1025 AGCTGGATAAACCGGCTGGTGACTACACCGTGCGTATAGCGAACGCCGGAATCAACCAAC 1084
      |||

Query 1841 TCATCAGTGGCAATGCGAGCATGCTTACCACACGCCCTTTCAGAACTCAATCACGTCCTT 1900
      |||
Sbjct 1085 TTATTACTGCCAATGCGAGCATATCTTACGACACGCCCTTCAAGGCTCAATCACGTCCTT 1144
      |||

Query 1901 CGCAGCCATCAATCGACATCACCGCGCAAAACACACAGCGGAAGTCGTGATGTTGACG 1960
      |||
Sbjct 1145 CGCAGCCATCAATCGACATCACCGCGCAAAACACACAGCGGACGTCGTGATATTCGACG 1204
      |||

Query 1961 AGAGCATGGTGACCCCTTTCCCTGTGGAGGTACCGGCGCAGGAGGTTGCCAGACCTTCT 2020
      |||
Sbjct 1205 AGAGCATGGTGACCCCTTTCCCTGTGGAGGTACCGGCGCAAGAGGTTGCCAGACCTTCT 1264
      |||

Query 2021 TCCTAGATATCGCGCGGTTTAAACACGTCTACCGCTGGATTCTTGAAACTCAGGCTTCC 2080
      |||
Sbjct 1265 TCCTAGATGTCGCCCGGTTCAACGCGTCTACCGCTGGATTCTTGAAACTCGGGCTTCC 1324
      |||

Query 2081 CGCTCTCCGTGGAGGAGTCGCCTCCACTTCTGTTCAATCCCTCCACCGCCAAGCCCGATC 2140
      |||
Sbjct 1325 CGCTCTCCATGGAGGAATCGCCTCCACTTCTGTTCAATCGCTCCGCCCGCCAAGCCCATC 1384
      |||

```



```

Query 2141 TCTCGATTTTCGACTCGCAACGGAACCTGGGTCGATCTCATCTTCAGAGTGGTCGGCCCTT 2200
          |||
Sbjct 1385 TTTCGATTTCAACACGTAACGGAACCTGGGTCGATCTCATCTTCAGAGTCACCGGCCCTT 1444
          |||

Query 2201 TACAGCCACCACACCCTATTTCACAAACACTCGAACAAATTCTACG 2245
          |||
Sbjct 1445 TACAGCCACCACACCCTTTTCACAAGCACTCGAACAAAGTTCTTCG 1489
          |||

```

Score = 286 bits (316), Expect = 6e-73
Identities = 204/229 (89%), Gaps = 8/229 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 34 GCCGAAGGAAAGGAATCAACCCCCATAAGTGTGCTGAGGTGACCTGGCACCAGTTGACGT 93
          |||
Sbjct 505 GCCGAAGAAA--GAA-CAGTCCCCATA---GTGCTGAG-TGAC-TGGCGCCAGTTGACGT 556
          |||

Query 94 CCGAGGAACTGTGGCATGCGGAAGAGGCAAGTGGACTAGACGCATACTGTGTAAATGCGT 153
          |||
Sbjct 557 CTGAGGAGCTGTGGCATGCGGAAGAGGCAACTGGACTAGACGCATACTGTGTGAATGCGT 616
          |||

Query 154 TATTAGTCAATGGAAGGGGCTCGATACAGTGTCTGGACCGCCATACATTGGATCAGTATA 213
          |||
Sbjct 617 TATTAGTCAATGGAAGGGGCTCCGTACAGTGTCTAGACCGCAATACGTTGGATTGGTATA 676
          |||

Query 214 GTGCGGCAAAGTGGGCATTTCTGGGAAATCTTCACTGACTGATATTGG 262
          |||
Sbjct 677 GTGCGGCAAAGTGGGCATTTCTGGGAAACTCTTCGCTGACTGATATTGG 725
          |||

```

Score = 286 bits (316), Expect = 6e-73
Identities = 204/229 (89%), Gaps = 8/229 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1196 GCCGAAGGAAAGGAATCAACCCCCATAAGTGTGCTGAGGTGACCTGGCACCAGTTGACGT 1255
          |||
Sbjct 505 GCCGAAGAAA--GAA-CAGTCCCCATA---GTGCTGAG-TGAC-TGGCGCCAGTTGACGT 556
          |||

Query 1256 CCGAGGAACTGTGGCATGCGGAAGAGGCAAGTGGACTAGACGCATACTGTGTAAATGCGT 1315
          |||
Sbjct 557 CTGAGGAGCTGTGGCATGCGGAAGAGGCAACTGGACTAGACGCATACTGTGTGAATGCGT 616
          |||

Query 1316 TATTAGTCAATGGAAGGGGCTCGATACAGTGTCTGGACCGCCATACATTGGATCAGTATA 1375
          |||
Sbjct 617 TATTAGTCAATGGAAGGGGCTCCGTACAGTGTCTAGACCGCAATACGTTGGATTGGTATA 676
          |||

Query 1376 GTGCGGCAAAGTGGGCATTTCTGGGAAATCTTCACTGACTGATATTGG 1424
          |||
Sbjct 677 GTGCGGCAAAGTGGGCATTTCTGGGAAACTCTTCGCTGACTGATATTGG 725
          |||

```

Anexo II

First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*

Cristina Uribe-Alvarez,¹ Marcela Ayala,¹
Lucia Perezgasga,¹ Leopoldo Naranjo,²
Héctor Urbina² and Rafael Vazquez-Duhalt^{1*}

¹Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. 62250 México.

²Dirección de Área de Energía y Ambiente, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Sartenejas, Caracas 1080, Venezuela.

Summary

A fungal strain isolated from a microbial consortium growing in a natural asphalt lake is able to grow in purified asphaltenes as the only source of carbon and energy. 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, indicate that the isolate is *Neosartorya fischeri*. After 11 weeks of growth, the fungus is able to metabolize 15.5% of the asphaltenic carbon, including 13.2% transformed to CO₂. In a medium containing asphaltenes as the sole source of carbon and energy, the fungal isolate produces extracellular laccase activity, which is not detected when the fungus grow in a rich medium. The results obtained in this work clearly demonstrate that there are microorganisms able to metabolize and mineralize asphaltenes, which is considered the most recalcitrant petroleum fraction.

Introduction

The world is running out of conventional crude oils; however, there are large deposits of heavy and extra-heavy crude oils worldwide. In the USA the heavy oil reserves are estimated at more than seven times the known reserves of conventional crude oils (Meyer and Schenk, 1988; Meyer and deWitt Jr, 1990). The largest heavy and extra-heavy crude oil reserves in the world are

found in the Orinoco oil belt of Venezuela, the Athabasca oil sands in Alberta, Canada, and the Olenik oil sands in Siberia, Russia. Asphaltenic and viscous heavy oils represent a huge energy reserve to be exploited in the next decades. In Canada only, the heavy oil reserve considered to be potentially recoverable is estimated to be 280–315 BBL (billion barrels of petroleum liquids), larger than the Saudi Arabia oil reserves estimated at 264 BBL (OPEC, 2009; Government of Alberta, Canada, 2011).

Heavy crude oils are known as unconventional crude oils because they cannot be produced, transported or refined by conventional methods. They have a specific gravity approaching or even exceeding that of water. Asphaltene and wax contents define the high viscosity and many problems associated with recovery, separation and processing of heavy oils and bitumens. Oil is considered to be a colloidal system where the asphaltenes are the disperse phase. In crude oil, the interaction between resins and asphaltenes render the latter stabilized. As in the case of waxes, asphaltenes deposition is the consequence of oil instability. In reservoirs, paraffins and asphaltenes remain in equilibrium, but when crude oil is extracted, this equilibrium is lost due to temperature and pressure changes, and as a consequence, asphaltenes and waxes tend to precipitate. This precipitate forms deposits during extraction in oil wells, blending of oils from different origins, storage, transportation and refining of heavy fractions (Mullins and Sheu, 1998; Mullins *et al.*, 2007).

Asphaltenes are the heaviest and most polar fraction of crude oil. Asphaltenes are defined as the fraction of crude oil that is insoluble in *n*-heptane or *n*-pentane, but is soluble in benzene or toluene. Despite that the asphaltene structure has not been fully elucidated, it is widely accepted that they are constituted by interacting systems of polyaromatic sheets bearing alkyl side-chains. Asphaltene molecules have a high content of O, N and S heteroatoms as well as metals (V, Ni and Fe) (Strausz *et al.*, 1992; Mullins *et al.*, 2007). The problems associated with asphaltenes have increased due to the need to extract heavier crude oils, as well as the trend to extract larger amounts of light fractions out of crude oil by cracking and visbreaking.

The asphaltenic fraction is recognized as the most recalcitrant oil fraction. There is no clear evidence that asphaltenes can be degraded or transformed by microbial

Received 2 February, 2011; revised 3 April, 2011; accepted 4 April, 2011. *For correspondence. E-mail vazqduh@ibt.unam.mx; Tel. (+52) 7773291655; Fax (+52) 7773172388.

© 2011 The Authors

Journal compilation © 2011 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd

activity. Microorganisms have been found associated with bitumens (Wyndham and Costerton, 1981) and natural asphalt lake (Naranjo *et al.*, 2007), which contain high amounts of asphaltenes. A molecular study by Kim and Crowley (2007) revealed a wide range of phylogenetic groups within the *Archaea* and *Bacteria* domains in natural asphalt-rich tar pits; interestingly, genes encoding novel oxygenases were also detected in such samples. On the other hand, an extensive screening involving more than 750 strains of filamentous fungi was carried out 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, from which the most active fungi, *Panus tigrinus*, growing on wood shavings coated with coal asphaltenes led to a decrease of the average molecular weight (Hofrichter *et al.*, 1997). Most of studies on asphaltenes biodegradation should be considered cautiously as the asphaltene content was usually determined gravimetrically after *n*-alkane precipitation, and thus the reported changes may be attributed to the disruption of the asphaltenic matrix by the production of surfactants during bacterial growth, liberating trapped hydrocarbons. Other studies have reported that the asphaltenic fraction does not support bacterial growth, and no changes in asphaltene content are found after bioconversion of heavy oils and asphaltenes (Lacotte *et al.*, 1996; Thouand *et al.*, 1999). A few reports on oil biodegradation have claimed the degradation of asphaltenic 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. Therefore, most of the asphaltene losses during microbial activity could be considered abiotic losses (Lacotte *et al.*, 1996). A study conducted by Pineda and colleagues (2004) reported a bacterial consortium able to grow in asphaltenes as the sole carbon source. Asphaltenes mineralization was estimated by measuring CO₂ production. The authors found in two control experiments (inoculum without asphaltenes and non-inoculated asphaltenes), a CO₂ production equivalent to 39% and 26%, respectively, of that found in the consortium growing in asphaltenes. The microbial inoculum for consortium stabilization contained 1% of crude oil, which could serve as carbon source. Thus, it is not possible to distinguish the origin of the CO₂ production.

The first clear experimental evidence that enzymes are able to modify asphaltene molecules has been reported by Fedorak and colleagues (1993). Chloroperoxidase from the fungus *Caldariomyces fumago* and a chemically modified cytochrome c were able to transform petroporphyrins and asphaltenes in reaction mixtures containing organic solvents (Fedorak *et al.*, 1993; Mogollon *et al.*, 1998; Garcia-Arellano *et al.*, 2004). Notable spectral

changes in the petroporphyrin-rich fraction of asphaltenes were observed and the enzymatic oxidation of petroporphyrins led to the removal up to 74% of Ni and 95% of V. According to Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) spectra, the chemically modified cytochrome c catalysed the oxidation of sulfur and carbon atoms in asphaltene molecules (Garcia-Arellano *et al.*, 2004). The enzymatic treatment of asphaltenes is an interesting alternative for the removal of heavy metals. It would result in reduced catalyst poisoning during hydrotreatment and cracking processes. On the other hand, the introduction of polar groups in asphaltene molecules could positively affect their sedimentation properties and improve their behaviour.

In this report we describe a fungus isolated from a natural asphalt lake that is able to grow using asphaltenes as the sole source of carbon and energy. To our knowledge, this is the first report of a microorganism able to grow in asphaltenes with rigorous control experiments.

Results

In order to determine the ability of the fungal strain to mineralize asphaltenes, mycelium was inoculated in a medium containing petroporphyrin-free asphaltenes as the only source of carbon and energy. The fungal inocula for experiments were obtained from two previous cultures with asphaltenes as the sole source of carbon to avoid any contamination from an alternative carbon source. The kinetic of biomass production during 7-week cultures is shown in Fig. 1. The maximal biomass was reached at the fourth week, and afterward the dry biomass started declining. For these experiments the asphaltene preparation

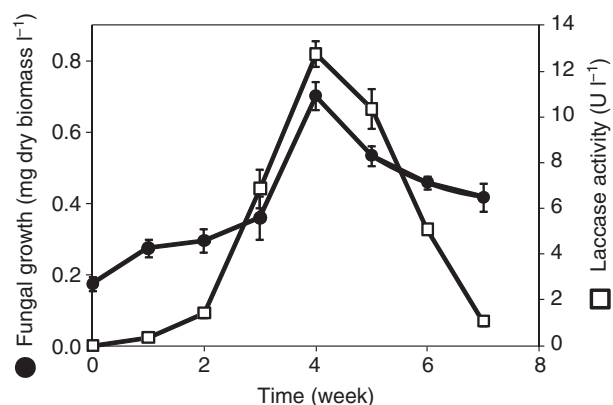


Fig. 1. Kinetics of biomass production (filled circles) and extracellular laccase activity (open squares) of *Neosartorya fischeri* cultures with oil asphaltenes as sole source of carbon. The fungus mycelia was inoculated in conical flasks containing 50 ml of modified Czapek minimal medium supplemented with 20 mg of asphaltenes as the sole carbon source. Laccase activity was estimated as the ABTS oxidation. The cultures were carried out in three independent experiments.

was reprecipitated three times, and the precipitate was exhaustively washed. In addition, a procedure to reduce the content of petroporphyrins was performed. It is then possible to conclude that the fungus is clearly growing on asphaltenes as the sole source of carbon and energy.

A preliminary methylene blue stain and optical microscopic observation showed coenocytic mycelia characteristic of sexual *Aspergillus*, such as *Neosartorya fischeri*. In order to identify the fungal strain, the genomic sequence of the 18S rRNA was determined and compared with the NCBI database. Five matches with high identity, shown in Table 1, were found: *Neosartorya fischeri* (GenBank AY373894.1), *Aspergillus lentulus* (GenBank AB250399.1), *Aspergillus novofumigatus* (GenBank AB299411.1), *Aspergillus fumisynnematus* (GenBank AB250779.1) and *Aspergillus fumigatus* (GenBank FR733870.1). Due to the high scores of the five strains in the 18S rRNA gene analysis and in order to conclusively identify the strain, the genomic sequence of the β -tubulin was determined and compared with the NCBI database. The values obtained of sequence analysis of the β -tubulin gene for the five higher matches of 18S rRNA are shown in Table 1: *Neosartorya fischeri* (GenBank EF669844), *Aspergillus lentulus* (GenBank FR775351), *Aspergillus novofumigatus* (GenBank HQ127280), *Aspergillus fumisynnematus* (GenBank AB248076) and *Aspergillus fumigatus* (GenBank NC007194). *Neosartorya fischeri* showed the higher score of the database. Thus, from the analysis of the β -tubulin gene sequence it is clear that the fungal isolate from the natural asphalt Lake of Guanoco located in Sucre, Venezuela is *Neosartorya fischeri*.

During fungal cultivation in asphaltenes, the extracellular medium was tested for peroxidase, monooxygenase and laccase activities. Only very low laccase activity was detected (Fig. 1). A maximum extracellular activity of 12.7 mU ml^{-1} (± 0.6) was found at the fourth week using 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as substrate. The concentration of extracellular protein was especially low during fungal growth. After 7 weeks culture, the extracellular media showed $1.73 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ (± 0.11) of protein; thus, a specific laccase activity of 7.3 U mg^{-1} of protein was obtained. In order to

Table 1. Comparison of the 18S rRNA and β -tubulin gene sequences from fungal isolate.

Strain	18S rRNA Identity (%)	β -Tubulin Identity (%)
<i>Neosartorya fischeri</i> ^a	99	98
<i>Aspergillus lentulus</i>	99	94
<i>Aspergillus novofumigatus</i>	99	96
<i>Aspergillus fumisynnematus</i>	99	94
<i>Aspergillus fumigatus</i>	98	93

a. Also known as *Neosartorya fischeri* var. *spinosa*.

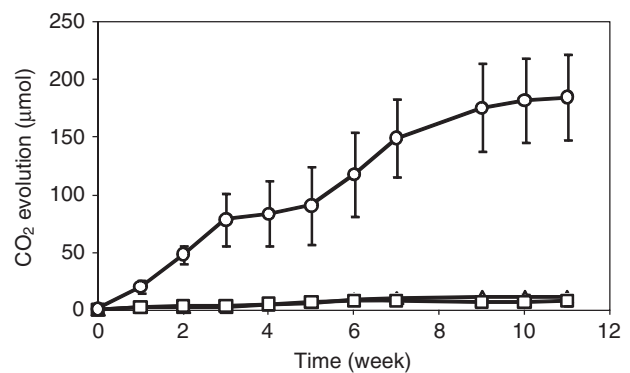


Fig. 2. Kinetics of CO₂ evolution in cultures of *Neosartorya fischeri* growing in asphaltenes as the sole source of carbon. Cultures were carried out in flasks with serological stoppers, containing 20 mg of asphaltenes in 30 ml of Czapek medium incubated at 37°C (circles). Control cultures, inoculated Czapek medium without asphaltenes (squares), and Czapek medium with asphaltenes and without inoculum (triangles).

verify the identity of the enzyme, the catalytic activity was confirmed using the laccase-specific substrate syringaldazine (Harkin *et al.*, 1974). Laccase activity was only detected in medium with asphaltenes as the sole source of carbon and energy; no activity was detected when the fungus was grown in Sabouraud media. A 1300 bp DNA fragment was amplified by PCR using degenerated oligonucleotides, which were designed according to the DNA sequences of different laccases and oxidoreductases encoding genes from various *Aspergillus* species. The partial DNA sequence, which represents 72% of the complete protein sequence, shows remarkable identity with a putative laccase Tila from *Neosartorya fischeri* (Accession number GenBank: XM 001264182.1; 92% identity) and a laccase from *Aspergillus fumigatus* (Accession number GenBank: XM 747840.1; 90% identity).

The asphaltene mineralization was quantified by measuring CO₂ production during 11 weeks cultures (Fig. 2). The CO₂ evolution steadily increased until the ninth week. None of the control experiments, medium with asphaltenes without inoculum and medium with inoculum without asphaltenes, showed significant CO₂ production (Fig. 2). According to elemental analysis, carbon represents 83.5% of the total weight in asphaltenes from Maya crude oil (Durand *et al.*, 2010). A carbon balance of cultures carried out in flasks with serological stoppers showed that 13.2% (± 2.6) of carbon mass contained in the asphaltenes was transformed to CO₂. On the other hand, the fungal dry biomass after 11 weeks of culture was 1.5 (± 0.10) mg l^{-1} . Considering the elemental formula reported for *Aspergillus niger* biomass (Nielsen *et al.*, 1994) and subtracting the inoculum weight, 2.3% (± 0.04) of asphaltene carbon was incorporated into the fungal biomass. Based on these calculations, it could be estimated that at least 15.5% of asphaltene was metabolized.

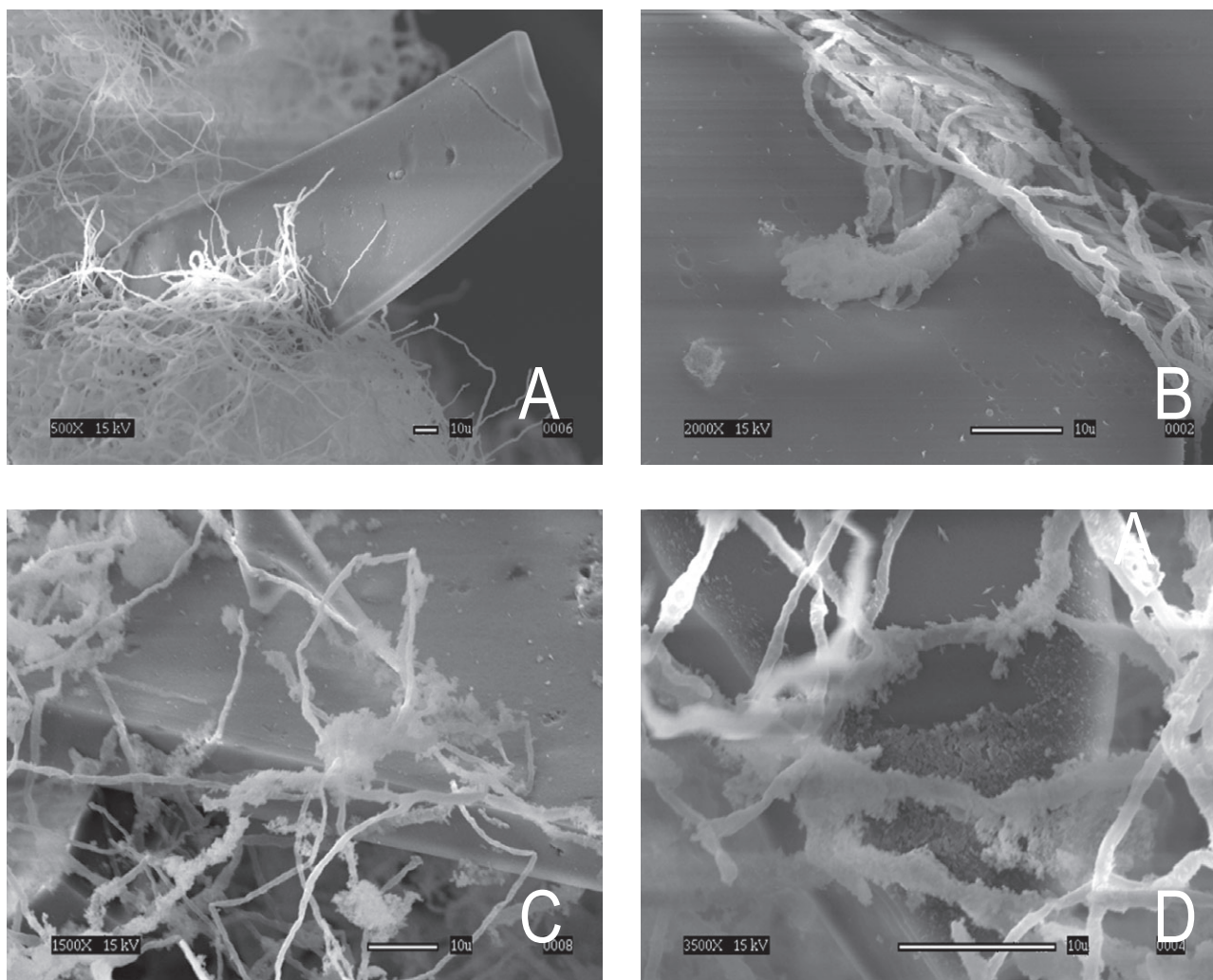


Fig. 3. Scanning electron microscopy (SEM) of the interaction between hyphae and solid oil asphaltenes in cultures of *Neosartorya fischeri*. The white bar indicates 10 µm.
 A. Fungal mycelium embedding solid asphaltene particle.
 B. Fungal hyphae showing no clear adhesion on the asphaltenic material.
 C and D. Fungal hyphae with extracellular material.

After 4 weeks' culture, the cell-free extracellular medium was solvent extracted. The extracted metabolites were then silylated and analysed by GC-MS. Low amounts of oxidized metabolites, such as hydroxyphenylacetic acid, 9-nitroso carbazole, thianaphthene-2-carboxylic acid, and hydroxypyrenedione, were detected, among traces of unidentified organic compounds. These compounds were not detected in the extracted control cultures, indicating that they are originated from the fungal metabolism of asphaltenes.

The physical interaction between the fungus strain and the solid asphaltene was analysed through scanning electron microscopy. As shown in the images in Fig. 3, the fungus surrounds the solid asphaltene and no adhesion of the hyphae to the substrate is observed. Polysaccharide-like structures that enclose the hyphae and the solid

asphaltene can be observed (Fig. 3C and D). This extracellular material could be glycoproteins that facilitate the interaction between the hydrophobic surface of the solid substrate and the fungi, as in the case of hydrophobins (Muñoz *et al.*, 1997).

In order to explore the fungal preference for certain asphaltene constituents, the asphaltenes were fractionated according to their polarity. For fungal cultivation, 20 mg of each fraction was used. The fraction abundance and fungal growth are shown in Table 2. The less polar fraction (80/20) was not tested because not enough material could be obtained for cultures. No significant differences were found for fungal growth on the different asphaltene fractions.

On the other hand, model compounds such as aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons, and sulfur, nitro-

Table 2. Fungal growth on asphaltene fractions with different polarity.

Fraction (acetone/toluene)	Weight percentage (%)	Fungi growth (mg of dry biomass l ⁻¹)
80/20	0.39	NA
60/40	61.09	1.33
40/60	16.49	1.40
20/80	5.42	1.32
Residue	9.04	1.58
Total	92.43	—

NA, not assayed.

gen and oxygen heterocycles were assayed for fungal growth. After 4 weeks' culture, the produced dry biomass in mg l⁻¹ were for each substrate as follows: heptadecane, 18.4; nonadecane, 16.2; naphthalene, 3.8; phenanthrene, 8.5; pyrene, 2.6; fluoranthene, 3.3; 1,2:5,6 dibenzanthracene, 9.2; 4,4 thiodiphenol, 14.6; dibenzothiophene, 6.2; imidazole, 4.8; carbazole, 6.5 and benzofuran, 0.2. As expected the aliphatic compounds supported high fungal growth, while polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocyclic compounds supported moderate fungal growth. Interestingly, benzofuran supported very low growth, which may be due to a toxicity effect.

Discussion

For a long time there has been controversy on the capacity of microorganisms, bacteria and fungi, to grow on asphaltenes as sole source of carbon and energy. There are reports on oil biodegradation that claim the degradation of the asphaltenic fraction by mixed bacteria (Bertrand *et al.*, 1983; Rontani *et al.*, 1985); however, there are also reports concluding that the asphaltenic fraction does not support bacterial growth (Lacotte *et al.*, 1996; Thouand *et al.*, 1999). This controversy was unsolved because most of the studies used gravimetric methods to determine the amount of residual asphaltenes and the degradation was evaluated in the presence of other oil constituents. It is well known that asphaltenes are aggregated structures that could be disrupted by both changes in its structure or by the presence of surfactant compounds produced by the microbial degradation of other petroleum constituents. In this work, rigorous asphaltene purification was carried out to avoid the presence of pentane-soluble material. Monitoring fungal biomass and CO₂ production appears to be a good technique for evaluating the asphaltene metabolization and mineralization. Figures 1 and 2 clearly show that the *Neosartorya fischeri* strain isolated from natural asphalt Lake of Guanoco is able to grow using asphaltenes as sole source of carbon and energy. The control experiments demonstrate that CO₂ evolution occurs only in the presence of both asphaltenes and fungal biomass (Fig. 2).

On the other hand, asphaltene metabolization is also supported by biomass production. After 11 weeks' fungal growth, 1.5 mg l⁻¹ of dry biomass was produced. The fungal growth on asphaltenes is significantly lower than these obtained in a rich medium. Nevertheless, the carbon balance shows that around 15% of the asphaltene carbon is metabolized. In addition, oxidized aromatic compounds could be detected in the culture supernatant after fungal growth on asphaltenes, while in the control experiments no aromatic metabolites could be detected.

No significant differences in fungal growth were detected when different polarity fractions from petroporphyrin-free asphaltenes were used as substrates (Table 2). Asphaltenes are constituted by interacting systems of polyaromatic sheets bearing alkyl side-chains, and they have a high content of O, N and S heteroatoms. The use of model compounds may give information on the specificity of the fungal enzymatic system. The model compounds used were chosen as representative moieties of the asphaltene molecules (Strausz *et al.*, 1992; Mullins *et al.*, 2007), and most of them are solid and water-insoluble as asphaltenes. *Aspergillus* sp. are not especially known as good hydrocarbon degraders (Sutherland, 1992), nevertheless there are reports on their capacity to degrade aliphatic hydrocarbons (Markovetz *et al.*, 1968; Voigt *et al.*, 1981; Amin and Modi, 1987; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2006), polycyclic aromatic hydrocarbons (Ghosh *et al.*, 1983; Yogambal and Karegoudar, 1997; Salicis *et al.*, 1999; Garon *et al.*, 2000; Capotorti *et al.*, 2004; Naranjo *et al.*, 2007), carbazole (Lobastova *et al.*, 2004) and petroleum derived complex mixtures (Elshafie *et al.*, 2007; Itah *et al.*, 2009; Okoro and Amund, 2010). In addition, there is experimental evidence that the monooxygenase system cytochrome P450 is involved in the metabolism of these substrates (Dutta *et al.*, 1983; Baillie *et al.*, 1996; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001; Vatsyayan *et al.*, 2008). On the other hand, the low growth obtained with benzofuran could be due to its toxicity. It is well known that benzofuran derivatives show antifungal activity (Pfefferle *et al.*, 1990; Masubuchi *et al.*, 2003).

Regarding the strain identification, our data suggest that the Venezuelan fungus strain could be *Neosartorya fischeri*. The analysis of the 18S rRNA gene sequence generated five matches with high identity to our isolate: *Neosartorya fischeri*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus novofumigatus*, *Aspergillus fumisynnematus* and *Aspergillus fumigatus* (Table 1). On the other hand, the analysis of the β -tubulin gene sequence showed as the best match *Neosartorya fischeri* (Table 1). The molecular probes, specially the 18S rRNA, do not have enough phylogenetic strength to resolve the evolutionary relationship among the *Aspergillus* species from *Fumigati* section. The sequence analysis of the β -tubulin gene revealed to be useful to differentiate the species related to

Aspergillus fumigatus (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). The *Aspergillus* genus is classified as Ascomycota and is believed to reproduce only by non-sexual sporulation, but it has been recently found that some species that produce both sexual and asexual spores (O'Gorman *et al.*, 2009; Machida and Gomi, 2010). The currently accepted name for sexual genera with the closest phylogenetic relationship with *A. fumigatus* is *Neosartorya fischeri* (Machida and Gomi, 2010). Rigid interpreters of nomenclature rules believe it is wrong to describe a fungus with known sexual stage as *Aspergillus*. Fungi with sexual sporulation are called teleomorphs, referring to the sexual meiotic spore bearing morphological phase. Thus, *Neosartorya fischeri* is a telomorphic species that is closely related to *A. fumigatus*. A methylene blue stain of the Venezuelan isolate allowed visual analysis of the hyphae morphology, which included coenocytic mycelia as well as the presence of cleistothecia, characteristic of sexual *Aspergillus* such as *Neosartorya fischeri* (McClenny, 2005; Machida and Gomi, 2010). Both genomes were compared by Wortman and colleagues (2006), showing that *N. fischeri* has a slightly bigger genome with more genes in orthologue clusters, the same content of GC and introns and less proteome than *A. fumigatus* strains. Nevertheless, whereas the nucleotide sequence of core genes may be 99.8% identical between the two fungi, there are at least 2% unique genes in each genome (Fedorova *et al.*, 2008). Thus, the morphological examination and both genetic sequence analyses support that the strain isolated from the natural asphalt Lake of Guanoco is *Neosartorya fischeri*.

As mentioned above, it has been reported that the *Aspergillus sp.* multi-enzymatic system cytochrome P450 is involved in the aromatic hydrocarbon metabolism. However, cytochromes P450 are not extracellular enzymes and the SEM images (Fig. 3) show no adhesion of the fungal hyphae on the asphaltene material. Thus, it seems possible that extracellular enzymes are involved in the initial stages of asphaltene transformation. An extracellular laccase activity was detected during fungi growth (Fig. 1). The 1300 bp fragment amplified from cDNA with degenerate oligonucleotides displayed the highest identity with a putative laccase TlIA from *Neosartorya fischeri* (92%) and a laccase from *Aspergillus fumigatus* (90%). These results are consistent with the identification of the Venezuelan fungus strain discussed above. Laccases are known to catalyse the oxidation of aromatic moieties of simple and complex polycyclic aromatic compounds, albeit more efficiently in the presence of small molecules which serve as redox mediators (Collins *et al.*, 1996; Majcherczyk *et al.*, 1998; Pickard *et al.*, 1999; Johannes and Majcherczyk, 2000). The products are usually more polar compounds, such as quinones or diones. The capacity of laccases to catalyse the formation of free

radicals that may delocalize and lead to covalent bond disruption (Torres *et al.*, 2003) could be involved in the asphaltene metabolism. This free radical formation and further oxidation could improve the bioavailability and/or biodegradability of asphaltene molecules. Further studies on the enzymatic activities involved in asphaltene transformation are currently being performed.

The *Neosartorya fischeri* isolate from Guanoco asphalt lake is able to mineralize 13.2% of asphaltenes. To our knowledge, this is the first report of microbial growth on asphaltenes as the sole carbon source, with rigorous asphaltene preparation and control experiments. An extracellular laccase activity is induced during the asphaltene metabolism and the partial DNA sequence shows remarkable identity with a putative laccase TlIA. *Neosartorya fischeri* is also able to grow on diverse solid and water-insoluble model compounds, suggesting that only some asphaltene molecule moieties are metabolized.

Experimental procedures

Fungal strain, asphaltenes and chemicals

Fungus strain was isolated from natural asphalt Lake of Guanoco located in Sucre, Venezuela. It is one of the largest deposits of asphalt in the world with more than 445 hectares and contains an estimated of six million tons of asphalt. It was used as a commercial source of asphalt from 1891 to 1935, and currently not being exploited. The isolate was maintained in mineral liquid media with asphaltenes. Petroporphyrin-free asphaltenes were obtained according to Buenrostro-Gonzalez and colleagues (2002) by precipitation with *n*-pentane from Mexican Maya crude oil as follows: 100 g of crude oil was suspended in 5 l of *n*-pentane and stirred for 1 h. The mixture was left in repose for 16 h at 20°C in a stopped flask, then the suspension was centrifuged at 10 000 *g* and the pellet was re-dissolved in 100 ml of dichloromethane. The asphaltene solution was reprecipitated with 5 l of *n*-pentane, maintained 16 h in repose and centrifuged. This procedure was repeated one more time and the precipitate was washed with *n*-pentane to improve the separation of the asphaltene fraction. The petroporphyrin-free asphaltenes were prepared as previously reported (Garcia-Arellano *et al.*, 2004): 6 g of asphaltene was diluted in 300 ml of toluene and stirred during 2 h at 20°C. Then, 3 l of acetone was added and the mixture stirred during 3 h at 20°C and maintained in repose for 48 h. The mixture was centrifuged at 12 000 *g* for 30 min and the pellet was washed three times with acetone. The red-brownish supernatant and subsequent washes contained the petroporphyrins (showing an A_{407}/A_{390} absorbance ratio of 1.2), whereas the pellet contained the petroporphyrin-free asphaltenes.

Asphaltene fractionation by polarity

Porphyrin-free asphaltenes were fractionated by differential precipitation according to Buenrostro-Gonzalez and col-

leagues (2002). To a 2% w/v porphyrin-free asphaltene solution in toluene, a 20% v/v of acetone as precipitant was added; the mixture was sonicated to ensure the correct dispersion of asphaltene, and the suspension was left stand for 16 h. The mixture was then centrifuged at 12 000 *g* for 30 min. The precipitated asphaltene was dried in an oven at 70°C overnight and represented the less polar fraction named 80/20. The supernatant was recovered and acetone was added to reach 40% v/v, then sonicated, maintained 16 h, and centrifuged. The procedure was repeated for 20/80 toluene-acetone solution. The residual fraction, representing the most polar fraction, was soluble in a mixture of 20% toluene and 80% acetone.

Strain identification

The identification of the fungus strain was performed by using selective media, macroscopic and microscopic examination of morphological characteristics and also by molecular techniques through 18S rRNA and β -tubulin (Glass and Donaldson, 1995) gene sequencing. Mycelium was grown in Sabouraud media (glucose 40 g ml⁻¹ and peptone 10 g ml⁻¹, pH 5.5) for 3 days at 37°C and 150 r.p.m. Total RNA was extracted with TRIZOL Reagent (Invitrogen) following the protocol of the manufacturer, after cell lysis with liquid nitrogen. cDNA was amplified using the following oligonucleotides, which were generated from the multiple alignment of various 18S rRNA DNA sequences from *Aspergillus* strains from the NCBI database: Fwd: (5'-ACCTGCGGAAGG ATCATTACC-3'), Rev: (5'-ACAGAGCAGGTGACAAAGCCC-3'). PCR reactions were performed in a Bio-Rad MyCycler thermocycler using a final concentration of 10 pM of each deoxyribonucleotide triphosphate, and 3 μ l of fungal cDNA as template. PCR conditions consisted of an initial denaturation at 94°C for 2 min, 30 cycles of amplification at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 40 s, extension at 72°C for 30 s, and a final extension at 68°C for 10 min. The PCR product (300 bp) was purified using the DNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research). The DNA fragment was cloned in the Topo TA PCR Cloning Vector (Invitrogen) and sequenced in the Institute of Biotechnology DNA Sequencing Facilities.

To amplify the β -tubulin gene, 2 μ l of genomic DNA as template and 25 μ l of oligonucleotides Bt2a: (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') and Bt2b: (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') were used. PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 2 min, 32 cycles of amplification at 94°C for 1 min, annealing at 68°C for 1 min, extension at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min. The PCR product (500 bp) was purified using the DNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research) and sequenced in the Institute of Biotechnology DNA Sequencing Facilities. All other nucleic acid manipulations were carried out by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989).

Fungal growth on asphaltene

The fungus mycelia was inoculated in flasks containing 50 ml of modified Czapek minimal medium without the original carbon source (4 g NaNO₃, 2 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄·7H₂O, 1 g KCl and 0.02 g, FeSO₄·7H₂O) supplemented with 20 mg

of asphaltene as sole carbon source. The cultures were incubated at 37°C and stirred at 100 r.p.m. Every week, three flasks were centrifuged at 12 000 *g* and the fungal pellet was grinded in a mortar with liquid nitrogen in order to break the cells. The grinded biomass was centrifuged at 12 000 *g* and the soluble protein content was then measured in the supernatant using the Bio-Rad protein reagent with a standard curve of BSA. An equivalence curve was obtained to transform between soluble protein and dry biomass. Biomass from cultures grown in Sabouraud medium was used and the following equation was obtained: 1 mg of dry biomass = 2.234 μ g of soluble protein (linear correlation coefficient of 0.95). Control experiments with inoculum in mineral media without asphaltene and also with asphaltene without inoculum were performed. All experiments were carried out in triplicate.

Cultures with asphaltene, fractionated by polarity, were performed under the same growth conditions described above, in which 20 mg of asphaltene was substituted by 20 mg of each fraction. Fungal growth on different model compounds was also estimated. The cultures were performed in 50 ml of Czapek medium containing 10 mg of diverse compounds as sole carbon source and energy: phenanthrene, carbazole, benzo(a)pyrene, 4,4-thiodiphenol, benzofurane, nonadecane, heptadecane, 1,2:5,6-dibenzoanthracene, dibenzothiophene, naphthalene, fluoranthene, pyrene or imidazole. Flasks were incubated for 4 weeks at 37°C and 100 r.p.m., and the biomass production was estimated as described above.

Asphaltene mineralization

CO₂ evolution was determined in cultures carried out in flasks with serological stoppers. Twenty milligrams of asphaltene in 30 ml of Czapek medium was incubated at 37°C and 150 r.p.m. Controls were made with inoculum in mineral media without asphaltene and also with asphaltene without inoculum. A headspace analysis was performed every week taking 100 μ l and analysing in an Altech gas chromatograph equipped with a CTR-1 column and a TCD detector. The oven temperature was 100°C, the injector temperature was 150°C and the detector temperature was 250°C. A standard curve was previously generated in order to relate CO₂ concentrations to the peak area. Data are reported as total expelled CO₂ in mg. After 11 weeks the cultures were stopped and the dry biomass was estimated as described above.

Metabolite analysis

The extracellular medium after 4 weeks' growth was acidified and extracted with dichloromethane. The organic extract was reduced under vacuum and the residue was silylated with *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA). Then, the silylated products were analysed in an Agilent Gas Chromatographer equipped with a Mass detector (GC-MS).

Electron microscopy. Fungi from cultures in 50 ml of Czapek media containing 20 mg of asphaltene were harvested after 3 weeks of incubation at 37°C and 100 r.p.m. Samples were fixed in ethanol and observed using a JEOL JSM S410-LV

scanning electron microscope with a 4 nm resolution at Microscopy Unit of the Cell Physiology Institute (UNAM).

Extracellular enzyme assays

The extracellular medium was filtered through a 0.22 µm pore membrane and then concentrated in an ultrafiltration cell (Amicon) with a 10 kDa cut-off membrane. The concentrated culture supernatant was assayed for both peroxidase and laccase activities following the protocols previously described by Chance and Maehly (1995) and Niku-Paavola and colleagues (1988) respectively.

Detection of a putative laccase encoding gene

Total RNA was extracted as mentioned above. cDNA was synthesized by PCR using total RNA as template and the following degenerated oligonucleotides obtained from the multiple alignment of the DNA sequences of laccases and oxidoreductases from various *Aspergillus* strains: Fwdlac (5'-CARGGVGAYGATGTGYGARTTYTTRGT-3'); Revlac (5'-CGWAGAAAYTTGTTVGMGTGYTTGTG-3').

Sequence analysis

Computer analysis of nucleotide and amino acid sequences was performed with ExpASY proteomics server. Multiple alignments were performed with CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>), and the partial DNA sequence was compared with the NCBI database using BLASTN software package (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1997). PCR reactions were performed in a Bio-Rad MyCycler thermocycler using a final concentration of 10 pM of each deoxyribonucleotide triphosphate, and 3 µl of fungal cDNA as template. PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min; 30 cycles of amplification at 94°C, annealing at 50°C for 40 s, extension at 72°C for 1.5 min and a final extension at 68°C for 10 min. The PCR fragment of 1300 bp was purified as mentioned above and cloned in the PCR Topo TA vector, according to manufacturer's protocol.

Acknowledgements

We thank Rosa Roman for her technical assistance. This work has been funded by the National Council of Science and Technology (CONACYT) of Mexico.

References

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., and Rodriguez-Tudela, J.L. (2008) *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1244–1251.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.

Amin, A.R., and Modi, V.V. (1987) Metabolism of *n*-alkanes by *Aspergillus japonicus*. *Folia Microbiol* **32**: 24–28.

Baillie, G.S., Hitchcock, C.A., and Burnet, F.R. (1996) Increased cytochrome P-450 activity in *Aspergillus fumigatus* after xenobiotic exposure. *J Med Vet Mycol* **34**: 341–347.

Bertrand, J.C., Rambeloarisoa, 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.

Bublitz, F., Guenther, T., and Fritsche, W. (1994) Screening of fungi for the biological modification of hard coal and coal derivatives. *Fuel Proc Technol* **40**: 347–354.

Buenrostro-Gonzalez, E., Andersen, S.I., Garcia-Martinez, J.A., and Lira-Galeana, C. (2002) Solubility/molecular structure relationships of asphaltenes in polar and nonpolar media. *Energy Fuels* **16**: 732–741.

Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., and Guglielmetti, G. (2004) Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation* **15**: 79–85.

Chance, B., and Maehly, A.C. (1995) Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol* **2**: 764–775.

Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., and Dobson, A.D.W. (1996) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4563–4567.

Durand, E., Clemancey, M., Lancelin, J.J., Verstraete, J., Espinat, D., and Quoineaud, A.A. (2010) Effect of chemical composition on asphaltenes aggregation. *Energy Fuels* **24**: 1051–1062.

Dutta, D., Ghosh, D.K., Mishra, A.K., and Samanta, T.B. (1983) Induction of benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: evidences of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun* **115**: 692–699.

Elshafie, A., AlKindi, A.Y., Al-Busaidi, S., Bakheit, C., and Albahry, S.N. (2007) Biodegradation of crude oil and *n*-alkanes by fungi isolated from Oman. *Mar Pollut Bull* **54**: 1692–1696.

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.

Fedorova, N.D., Khaldi, N., Joardar, V.S., Maiti, R., Amedeo, P., Anderson, M.J., *et al.* (2008) Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genet* **4**: e1000046.

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.

Garon, D., Krivobok, S., and Seigle-Murandi, F. (2000) Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere* **40**: 91–97.

Ghosh, D.K., Dutta, D., Samanta, T.B., and Mishra, A.K. (1983) Microsomal benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS: assay and characterization of the enzyme system. *Biochem Biophys Res Commun* **113**: 497–505.

- Glass, N.L., and Donaldson, G.C. (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous *Ascomycetes*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 1323–1330.
- Government of Alberta, Canada (2011) *Oil sands*. Resource & Assessment. Alberta Energy [WWW document]. URL <http://www.energy.alberta.ca/OilSands/1715.asp>.
- Harkin, J.M., Larsen, M.J., and Obst, J.R. (1974) Use of syringaldazine for detection of laccase in sporophores of wood rotting fungi. *Mycologia* **66**: 469–476.
- 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.
- Itah, A.Y., Brooks, A.A., Ogar, B.O., and Okure, A.B. (2009) Biodegradation of international jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. *Bull Environ Contam Toxicol* **83**: 318–327.
- Johannes, C., and Majcherczyk, A. (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl Environ Microbiol* **66**: 524–528.
- Kim, J.-S., and Crowley, D.E. (2007) Microbial diversity in natural asphalts of the Rancho La Brea tar pits. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4579–4591.
- Lacotte, D.J., Mille, G., Acquaviva, M., and Bertrand, J.C. (1996) Arabian light 150 asphaltene biotransformation with *n*-alkanes as co-substrate. *Chemosphere* **32**: 1755–1761.
- Lobastova, T.G., Sukhodolskaya, G.V., Nikolayeva, V.M., Baskunov, B.P., Turchin, K.F., and Donova, M.V. (2004) Hydroxylation of carbazoles by *Aspergillus flavus* VKM F-1024. *FEMS Microbiol Lett* **235**: 51–56.
- McClenny, N. (2005) Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Med Mycol* **43**: S125–S128.
- Machida, M., and Gomi, K. (2010) *Aspergillus*, *Molecular Biology and Genomics*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Majcherczyk, A., Johannes, C., and Huttermann, A. (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Technol* **22**: 335–341.
- Markovetz, A.J., Jr, Cazin, J., and Allen, J.E. (1968) Assimilation of alkanes and alkenes by fungi. *Appl Microbiol* **16**: 487–489.
- Masubuchi, M., Ebiike, H., Kawasaki, K., Sogabe, S., Morikami, K., Shiratori, Y., et al. (2003) Synthesis and biological activities of benzofuran antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. *Bioorg Med Chem* **11**: 4463–4478.
- Meyer, R.F., and Schenk, C.J. (1988) An estimate of world resources of heavy crude oil and natural bitumen. Proceedings of the Third UNITAR/UNDP International Conference of Hydrocarbons and Tar Sands, Alberta Oil Sands Technology and Research Authority, July 1988.
- Meyer, R.F., and deWitt, W., Jr (1990) Definition and world resources of natural bitumens. U.S. Geological Survey Bulletin.
- Mogollon, L., Rodriguez, 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., and Sheu, E.Y. (1998) *Structure and Dynamics of Asphaltenes*. New York, USA: Plenum Press.
- Mullins, O.C., Sheu, E.Y., Hammami, A., and Marshall, A.G. (2007) *Asphaltenes, Heavy Oils and Petroleomics*. New York, USA: Springer Science + Business Media LLC.
- Muñoz, G., Nakari-Setälä, T., and Merja-Penttilä, E.A. (1997) Hydrophobin gene *srh 1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Curr Genet* **32**: 225–230.
- Naranjo, L., Urbina, H., De Sisto, A., and León, V. (2007) Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatal Biotransformation* **25**: 1–9.
- Nielsen, J., Villadsen, J., and Liden, G. (1994) *Bioreaction Engineering Principles*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Niku-Paavola, M.L., Karhunen, E., Salola, P., and Raunio, V. (1988) Ligninolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. *Biochem J* **254**: 877–884.
- O’Gorman, C.M., Fuller, H.T., and Dyer, P.S. (2009) Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* **457**: 471–475.
- Okoro, C.C., and Amund, O.O. (2010) Biodegradation of produced water hydrocarbons by *Aspergillus fumigatus*. *J Am Sc* **6**: 143–149.
- OPEC (2009) *OPEC annual statistical bulletin 2009* [WWW document]. URL http://www.opec.org/opec_web/en/.
- Pfefferle, W., Anke, H., Bross, M., Steffan, B., Vianden, R., and Steglich, W. (1990) Asperfuran, a novel antifungal metabolite from *Aspergillus oryzae*. *J Antibiot* **43**: 648–654.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., and Vazquez-Duhalt, R. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 laccase. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3805–3809.
- Pineda, F.G., Mesta-HoWard, A.M., Boll-Argüello, G., and Lira-Galeana, C. (2004) A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation* **15**: 145–151.
- Prenafeta-Boldú, F.X., Luykx, D.M., Vervoort, J., and de Bont, J.A. (2001) Fungal metabolism of toluene: monitoring of fluorinated analogs by ¹⁹F nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1030–1034.
- Rontani, J.F., Bossier-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C., Giusti, G., and Faure, R. (1985) Analytical study of Asyhart crude oil biodegradation. *Chemosphere* **14**: 1413–1422.
- Salicis, F., Krivobok, S., Jack, M., and Benoit-Guyod, J.L. (1999) Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. *Chemosphere* **38**: 3031–3039.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strausz, O.P., Mojelsky, T.W., and Lown, E.M. (1992) The molecular structure of asphaltenes: an unfolding story. *Fuel* **71**: 1355–1363.
- Sutherland, J.B. (1992) Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J Ind Microbiol* **9**: 53–61.
- Thouand, G., Bauda, P., Oudot, J., Kirsh, G., Sutton, C., and Vidalie, J.F. (1999) Laboratory evaluation of crude oil bio-

- degradation with commercial or natural microbial inocula. *Can J Microbiol* **45**: 106–115.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I., and Le Borgne, S. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl Catal B: Environ* **46**: 1–15.
- Vatsyayan, P., Kumar, A.K., Goswami, P., and Goswami, P. (2008) Broad substrate cytochrome P450 monooxygenase activity in the cells of *Aspergillus terreus* MTCC 6324. *Bioresour Technol* **99**: 68–75.
- Voigt, A., Bemmann, W., and Tröger, R. (1981) The growth of thermophilic fungi strains *Aspergillus fumigatus* and *Mucor lusitanicus* in *n*-alkane medium. *Zentralbl Bakteriol Naturwiss* **136**: 590–602.
- Volke-Sepúlveda, T., Gutiérrez-Rojas, M., and Favela-Torres, E. (2006) Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: kinetic analysis. *Bioresour Technol* **97**: 1583–1591.
- Wortman, J.R., Fedorova, N., Crabtree, J., Joardar, V., Maiti, R., Haas, J., et al. (2006) Whole genome comparison of the *A. fumigatus* family. *Med Mycol* **44**: S3–S7.
- Wyndham, R.C., and Costerton, J.W. (1981) *In vitro* microbial degradation of bituminous hydrocarbons and *in situ* colonization of bitumen surfaces within the Athabasca oil sands deposit. *Appl Environ Microbiol* **41**: 791–800.
- Yogambal, R.K., and Karegoudar, T.B. (1997) Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Aspergillus niger*. *Indian J Exp Biol* **35**: 1021–1023.