



Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos en tres especies arbóreas plantadas en la zona contaminada (Shusufindi EST_40) y no contaminada (Ribereños) por actividades inherentes a la extracción de Petróleo en la Amazonía ecuatoriana

Chiriboga Segovia, Belén Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera Agropecuaria

Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

30 de agosto del 2023



INTRODUCCIÓN

Actividad Petrolera en el Ecuador



La actividad petrolera en el Ecuador inició desde la década de 1970.



Rápido crecimiento de la industria convirtiéndose.



Campos petroleros que ocupan grandes extensiones de terreno.

Características:



»» Controles ambientales.



»» Mantenimiento adecuado de los pozos petroleros.



»» Uso de tecnología obsoleta.



»» Estadísticas del daño producido.

INTRODUCCIÓN

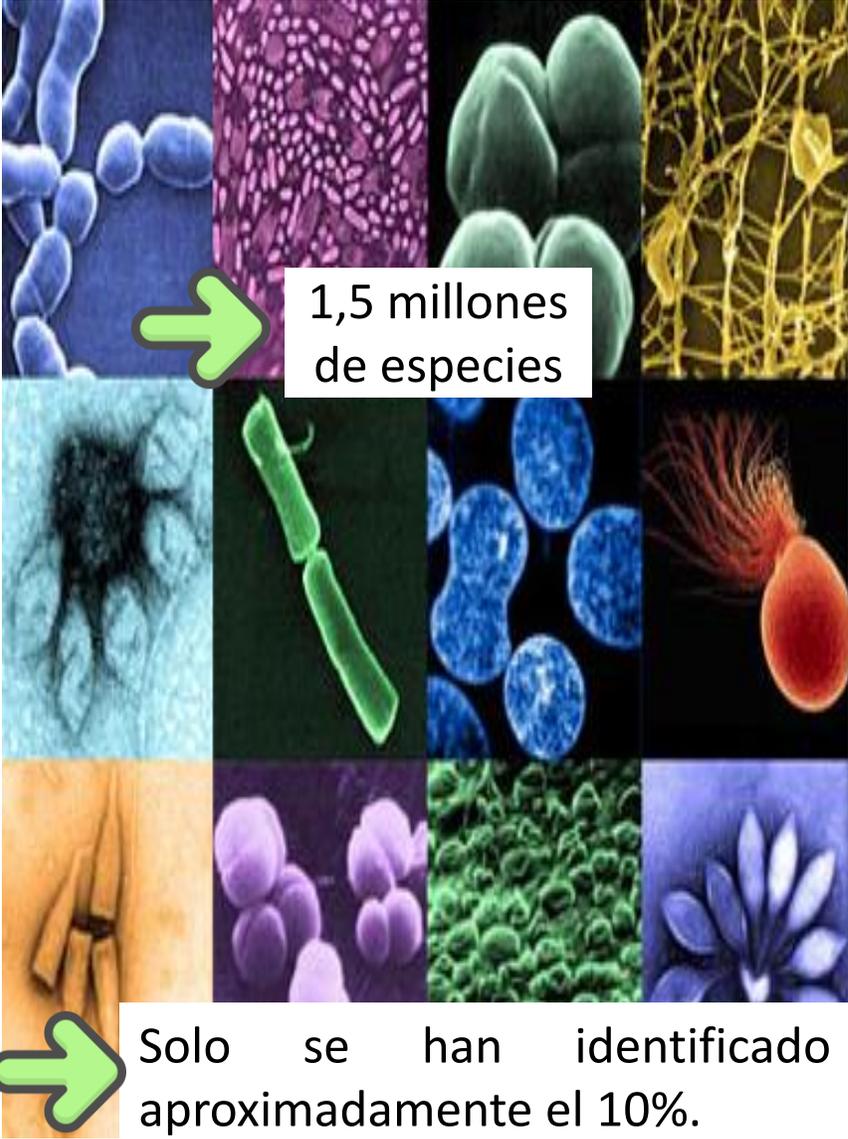
Impactos producidos



Fitorremediación forestal.

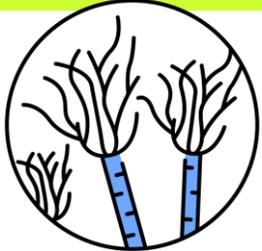
Evaluación de los efectos relacionados con la diversidad, abundancia y riqueza de hongos rizosféricos en árboles.

JUSTIFICACIÓN



Identificación de hongos

MORFOLÓGICA



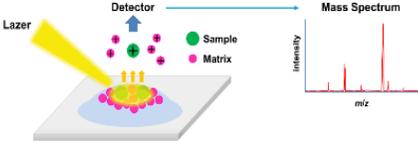
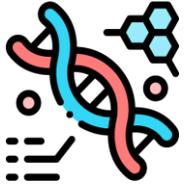
NUEVAS TECNOLOGÍAS

Nivel de orden o de familia.

Generalmente no permiten identificar, a nivel específico.

Identificación molecular

MALDITOF



(Raja *et al.*, 2017; Gautam *et al.*, 2022)

OBJETIVOS:

Objetivo General

Caracterizar molecularmente los hongos rizosféricos presentes en tres especies arbóreas plantadas en la zona contaminada de Shushufindi EST_40 y en la zona no contaminada de Ribereños en la Amazonia ecuatoriana.

Objetivos Específicos

- Activar las cepas de hongos rizosféricos pertenecientes al programa de fitorremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera en las Zonas Shushufindi EST_40 y Ribereños.
- Secuenciar el gen ITS para la identificación específica de hongos rizosféricos presentes en suelos contaminados y no contaminados.
- Identificar a nivel específico hongos rizosféricos en suelos contaminados y no contaminados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF MS).
- Comparar la riqueza específica entre suelos contaminados y no contaminados.

HIPÓTESIS:

La riqueza específica de hongos rizosféricos cambia entre suelos contaminados y no contaminados por actividades inherentes a la extracción de petróleo.

METODOLOGÍA

Ubicación del estudio



Parcelas experimentales, de los campos de explotación petrolera de la empresa Petroamazonas

RIBEREÑOS



SHUSHUFINDI



Parte experimental



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

METODOLOGÍA

Activación de cepas



Selección de muestras

14 muestras de hongos puros: 1 de cada género, previamente identificado morfológicamente.

Illustrated Genera of Imperfecte Fungi

Morphologies of Cultured Fungi and key to Species

Tabla 1 Muestras escogidas Ribereños.

#	Género
1	<i>Aspergillus</i>
2	<i>Rhizopus</i>
3	<i>Trichoderma</i>
4	<i>Penicilium</i>
5	<i>Trichoderma</i>
6	<i>Paecilomyces</i>
7	<i>Fusarium</i>

Tabla 2 Muestras escogidas Shushufindi.

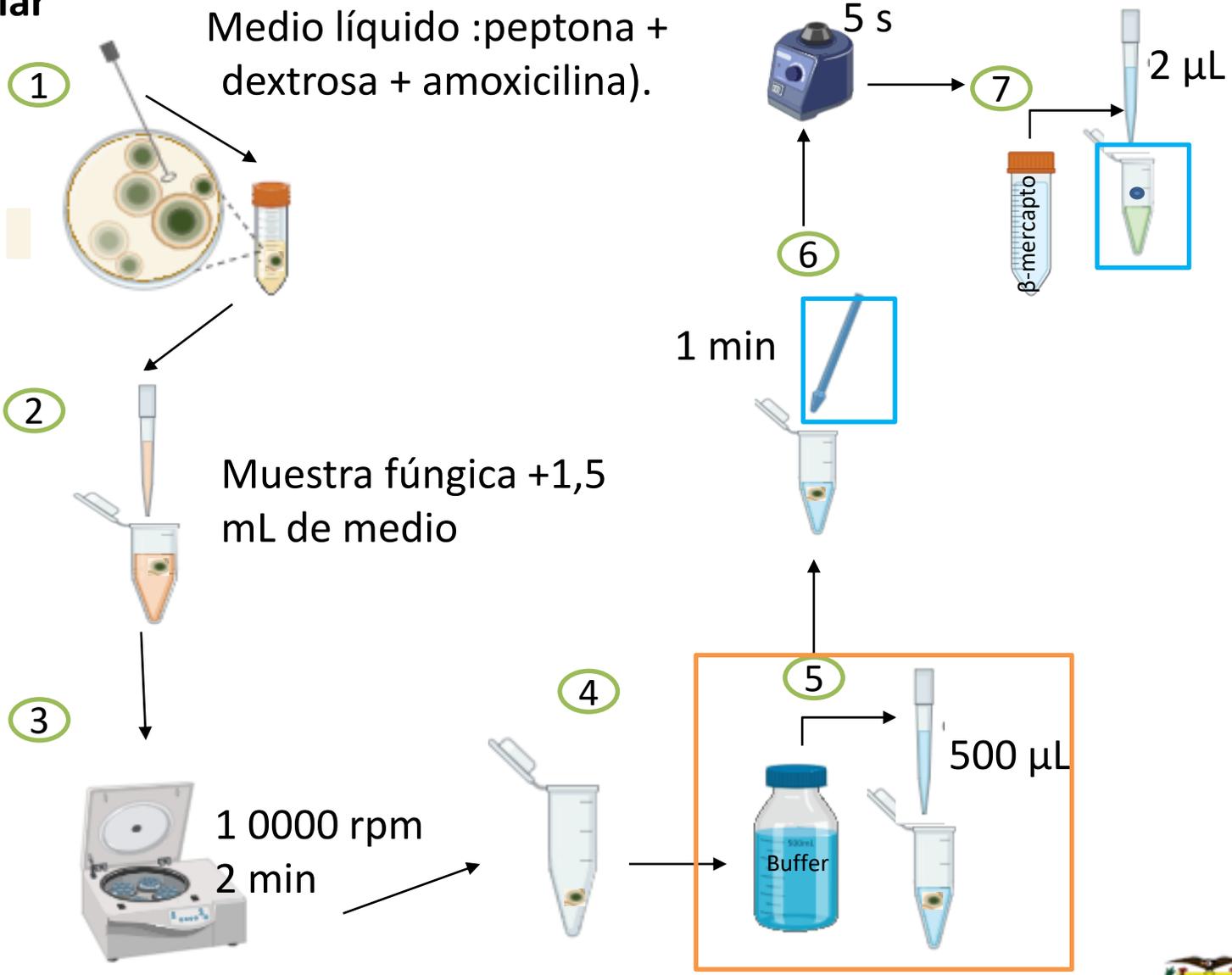
#	Género
1	<i>Scopulariopsis</i>
2	<i>Geotrichum</i>
3	<i>Rhizopus</i>
4	<i>Thielaiopsis</i>
5	<i>Trichoderma</i>
6	<i>Paecilomyces</i>
7	<i>Fusarium</i>



METODOLOGÍA

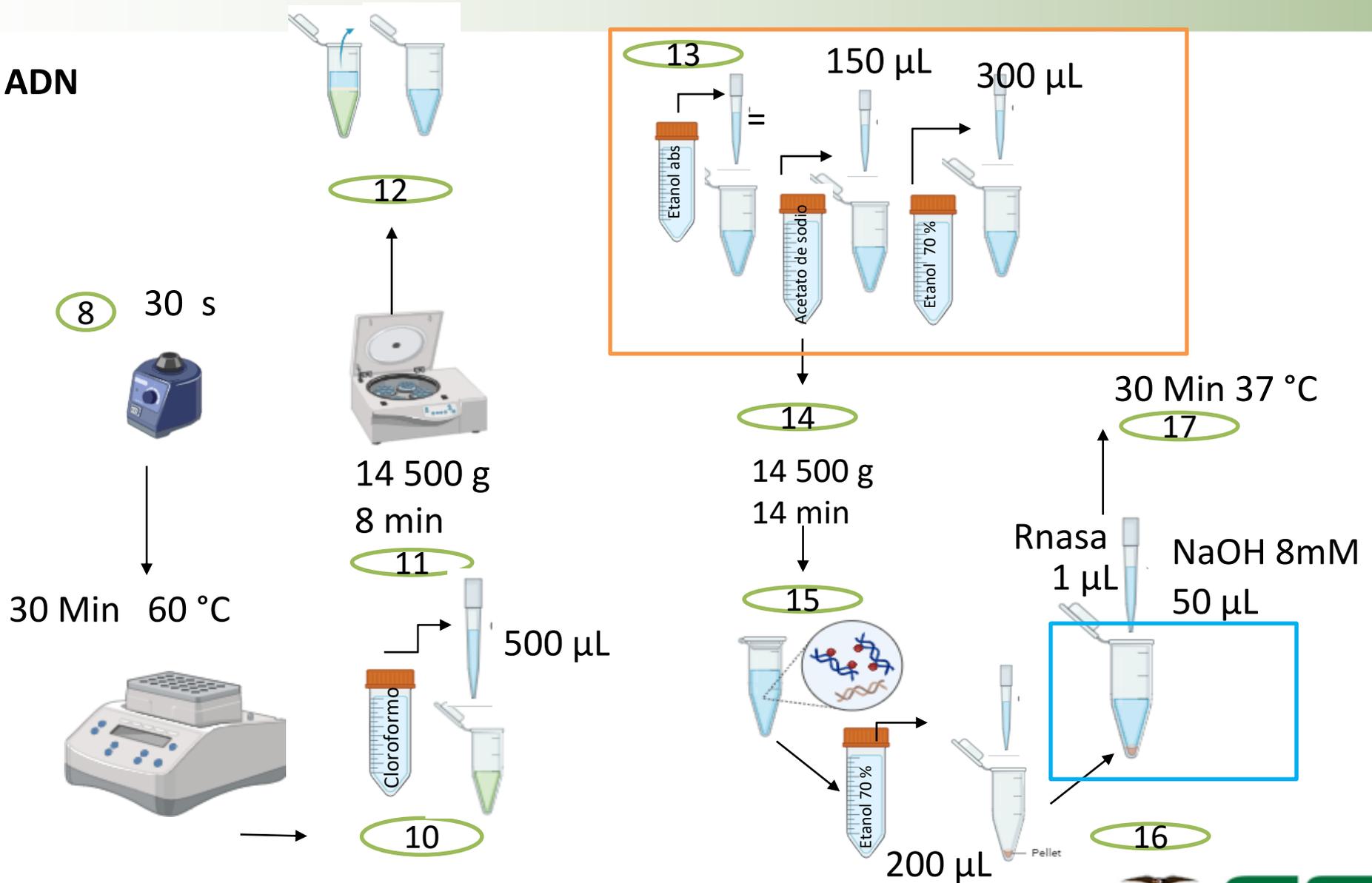
Identificación molecular

Extracción de ADN



(Berrendero *et al.* 2008)

Extracción de ADN



METODOLOGÍA

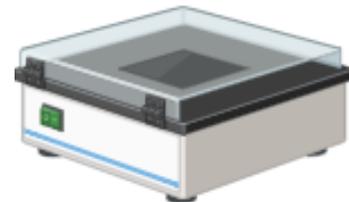
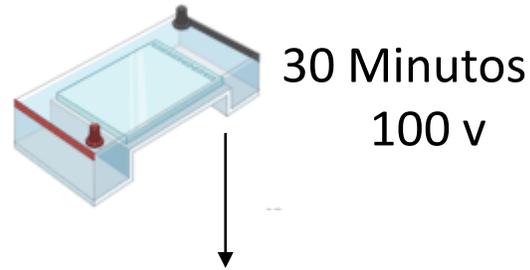
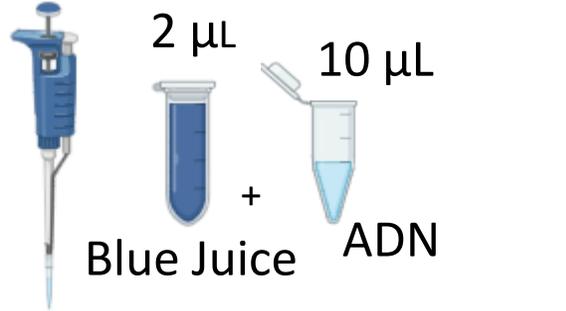
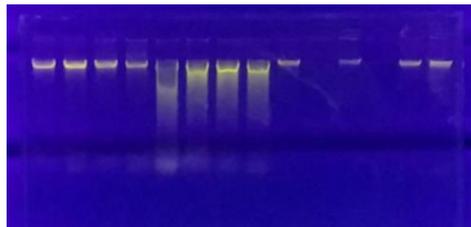
Identificación molecular

Determinación de la cantidad y calidad de ADN

➔ Calidad de ADN



- Agarosa 0.8 %
- TBE
- 4 µL de SYBR safe

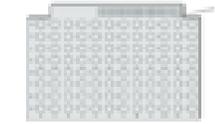


➔ Cantidad de ADN



Espectrofotómetro
Multiskan Sky Thermo
Scientific™

- 260 nm, 280 nm, 230 nm y 320 nm



Skant
Software

Concentración ADN

$$C = (A_{260} - A_{320}) \times \frac{50 \mu\text{g/ml}}{\text{Dimensión celda en cm}}$$

METODOLOGÍA

Identificación molecular

Amplificación de la región ITS

Tabla 3 *Primers utilizados para la amplificación de la región ITS.*

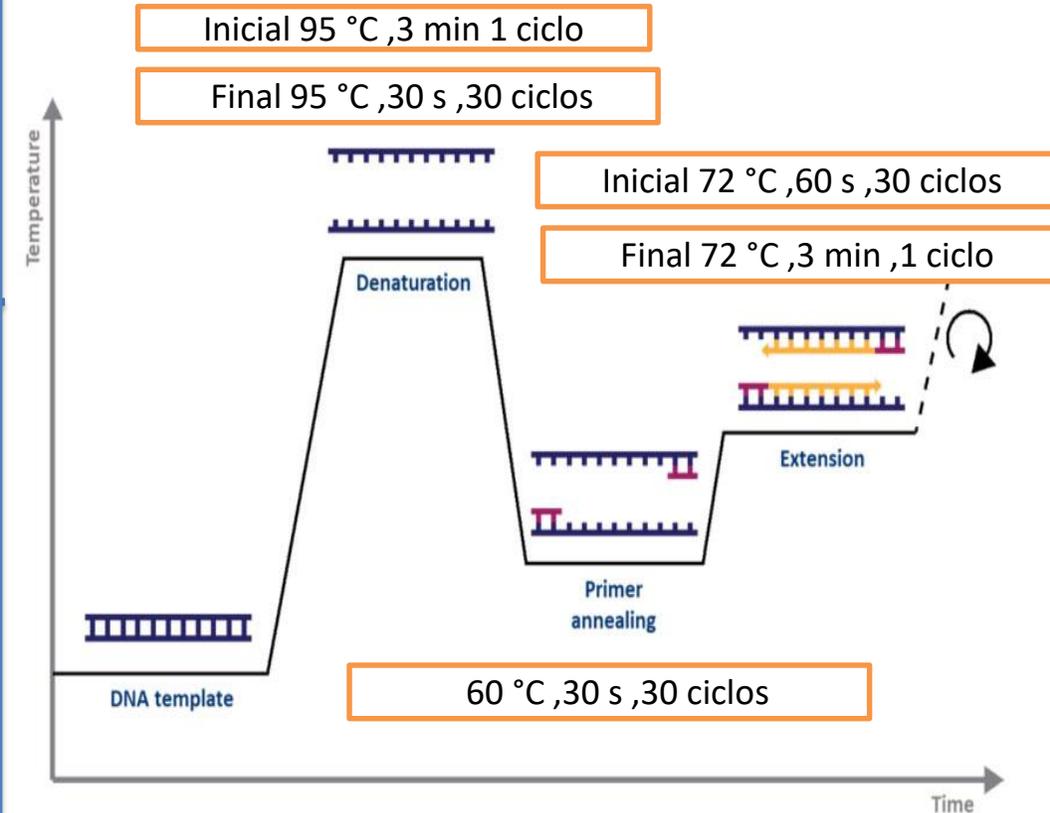
Primer	Secuencia	Tamaño amplificado (pb)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	600

Nota. Pb = pares de bases. Recuperado de: (White *et al.*, 1990).

Tabla 4 *Ajuste del master mix de reacción para un volumen final de 50 µL.*

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (1X)
PCR Buffer con Mg ²⁺	10X	1x	5 µL
MgSO ₄	25 mM	1.5mM	3 µL
dNTP's mixture	10 mM	0.2 mM	1 µL
Primer forward (ITS1)	10 µM	0.5 µM	1 µL
Primer Reverse (ITS4)	10 µM	0.5 µM	1 µL
Taq Polimerasa	5U/µL	1U	0,2 µL
Agua ultra pura	-	-	37,8 µL
ADN	-	100 ng	1 µL

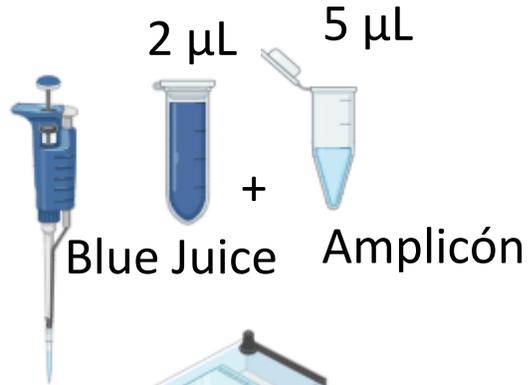
Tabla 5 *Condiciones de amplificación del gen ITS.*



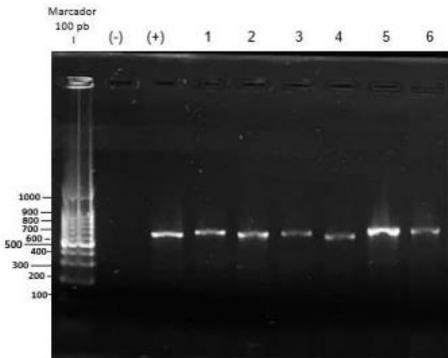
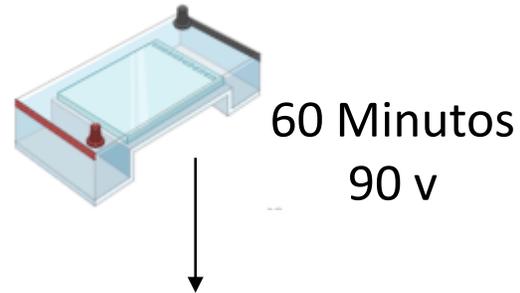
METODOLOGÍA

Identificación molecular

➔ Comprobación del producto amplificado



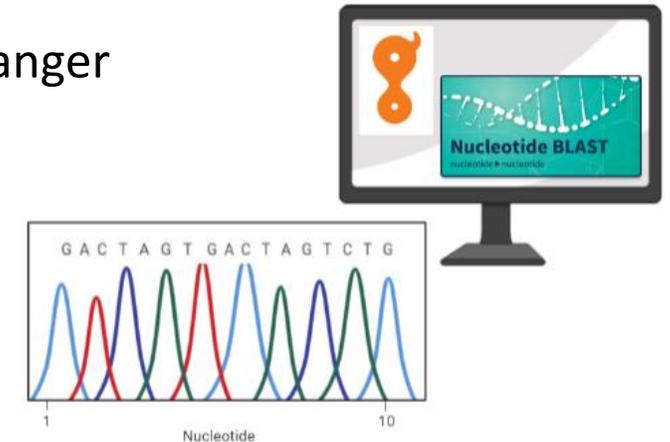
- Agarosa 1 %
- TBE
- 4 µL de SYBR safe



➔ Secuenciación y análisis bioinformático



- Secuenciación Sanger
- BLAST

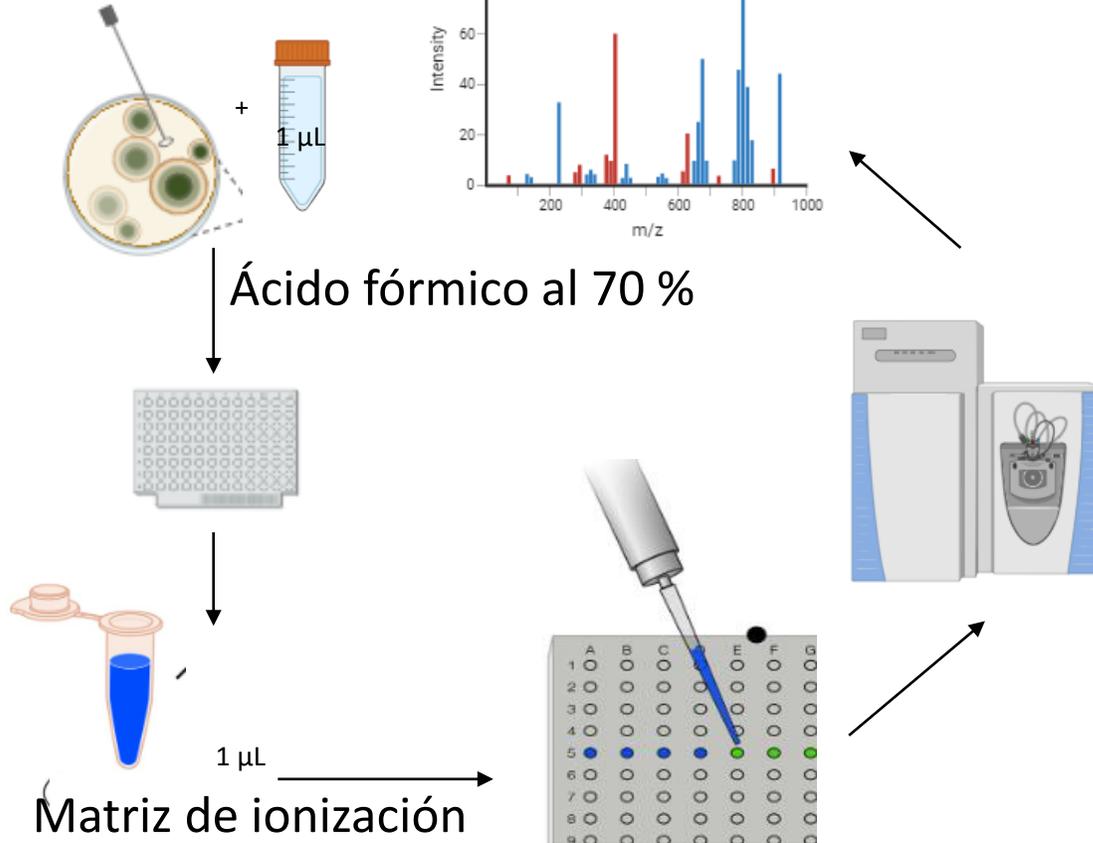
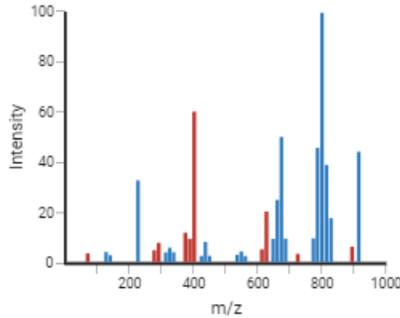


METODOLOGÍA



Análisis MALDITOF

Software SARAMIS (System Version)
4.1.0.9)



Ácido fórmico al 70 %

1 µL

Matriz de ionización

CHCA (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)



Análisis diversidad



- Riqueza (S)
- Abundancia (Ni)
- Índice de diversidad Simpson (1-D),
- Índice de Diversidad de Shannon (H')
- índice de equitatividad de Pielou (J')

- Riqueza observada en cada tipo de ecosistema
–CHAO 1



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Activación cepas

39 cepas Ribereños ,Shushufindi 22 cepas.
100 % ACTIVACIÓN

PDA.

Agua destilada

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración y pureza de ADN

Tabla 6 Resultados de concentración y pureza de ADN.

Localidad	Muestra	Concentración µg/ mL	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
Ribereños	1	422	2,12	1,48
	2	539,9	2,42	1,56
	3	1060	2,20	1,95
	4	120	2,28	1,09
	5	373,3	2,12	1,91
	6	58,37	1,7	0,81
	7	704,7	2,13	1,7
Shushufindi	1	673	2,24	1,56
	2	30,41	1,9	0,39
	3	145	2,23	1,27
	4	212,2	2,21	1,27
	5	236,6	2,17	1,41
	6	463,3	2,21	1,37
	7	273,4	2,25	1,79

Nota. µg/mL: microgramo/mililitro. Autoría propia.

1 Concentración de ADN

Método de extracción del ADN.

- Lisis celular incompleta.
- Mala conservación de la muestra.
- Mala manipulación de los microtubos.

2 Pureza de ADN

Relación A260/A280

Disolvente utilizado para resuspender el pellet de ADN.

Relación A260/A230

Proceso de extracción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del gen ITS mediante PCR

Tamaños de amplicón: ➔

550-600 pb

Al-Dhabaan. (2021) 500 a 600 pb.

Fig. 1 Amplificación región ITS.

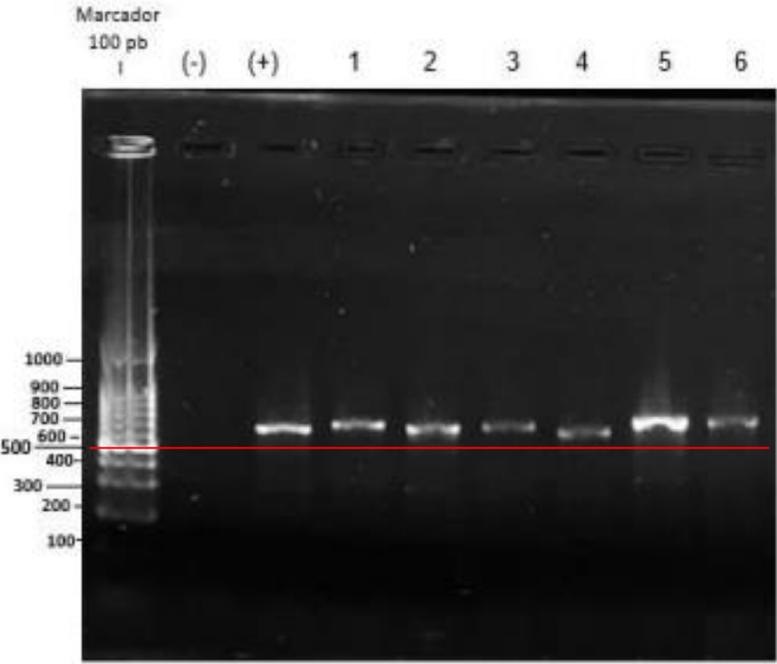


Fig. 2 Amplificación región ITS.

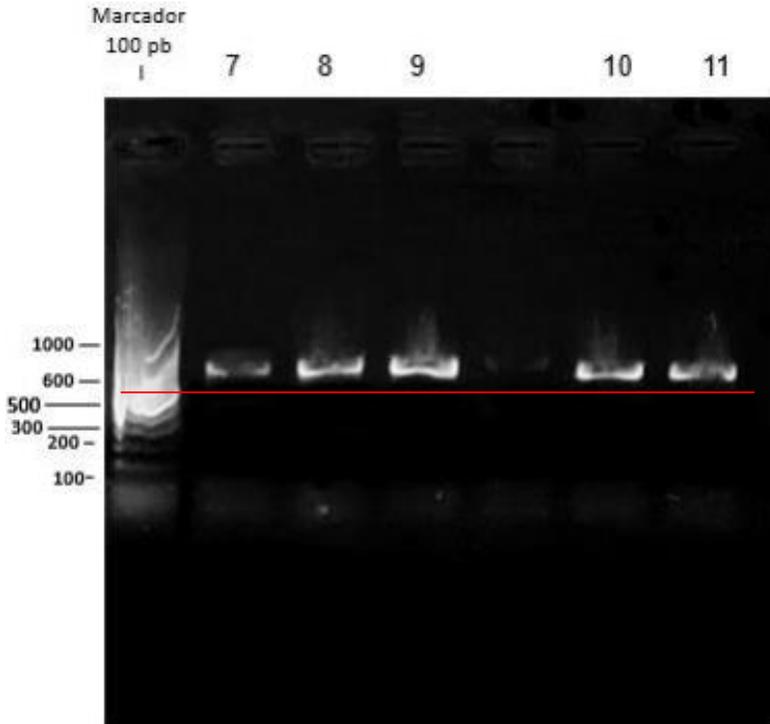
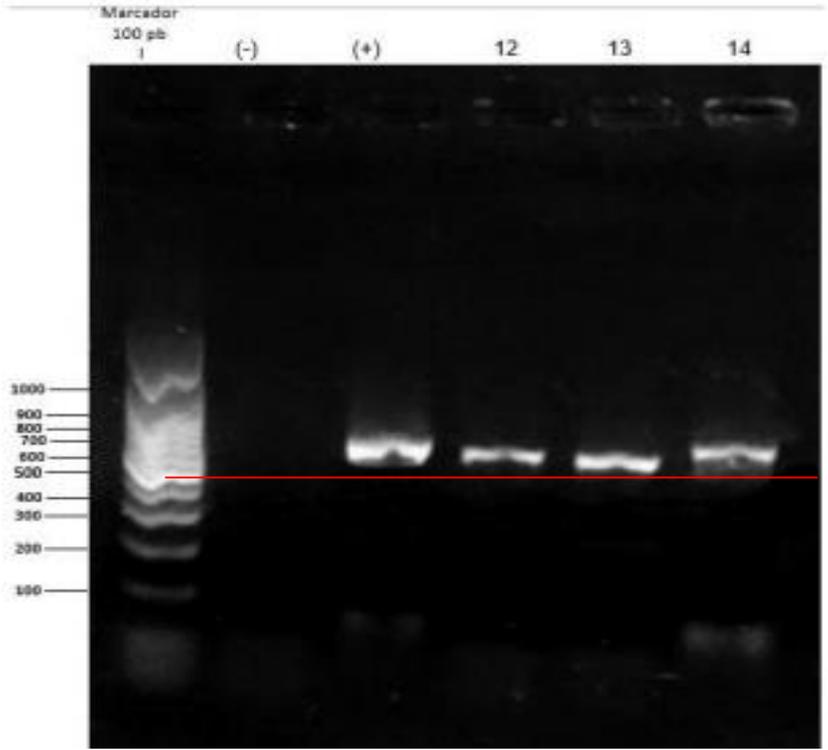


Fig. 3 Amplificación región ITS.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular de hongos

Tabla 7 Microorganismos identificados por secuenciación del gen ITS

Localidad	Muestra	Longitud	Organismo	% Identidad	Nº Accesoión
Ribereños	1	535	<i>Trichoderma virens</i>	99,81	MH857855.1
	2	888	<i>Mucor irregularis</i>	100	JX076993.1
	3	614	<i>Trichoderma harzianum</i>	99,51	KF201295.1
	4	604	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99,49	OP526905.1
	5	609	<i>Trichoderma asperellum</i>	99,61	NR_130668.1
	6	462	<i>Penicillium citrinum</i>	99,78	MF185963.1
	7	565	<i>Fusarium sp.</i> ★	100	KY363354.1
Shushufindi	1	907	<i>Mucor irregularis</i>	99,53	ON927081.1
	2	666	<i>Geotrichum candidum</i>	100	MH153587.1
	3	625	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	MW785832.1
	4	554	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100	DQ641279.1
	5	595	<i>Trichoderma asperellum</i>	100	MK210562.1
	6	608	<i>Trichoderma asperellum</i>	99,84	MK027313.1
	7	531	<i>Fusarium sp.</i> ★	99,81	MT549849.1

Nota. Nº Accesoión: Número de acceso de GenBank para las secuencias obtenidas. Autoría propia.

Se identificó el género y especie del 85,71 % de muestras.



Factor de elongación de la traducción TEF1- α .



≥ 97 %

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular de hongos

Tabla 8 *Microorganismos identificados por secuenciación del gen ITS*

Localidad	Muestra	Organismo
Ribereños	1	<i>Trichoderma virens</i>
	2	<i>Mucor irregularis</i>
	3	<i>Trichoderma harzianum</i>
	4	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	5	<i>Trichoderma asperellum</i>
	6	<i>Penicillium citrinum</i>
	7	<i>Fusarium sp.</i>
Shushufindi	1	<i>Mucor irregularis</i>
	2	<i>Geotrichum candidum</i>
	3	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	4	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	5	<i>Trichoderma asperellum</i>
	6	<i>Trichoderma asperellum</i>
	7	<i>Fusarium sp.</i>

ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

- Lignino peroxidasa,
- Manganeso peroxidasa
- Lacasasas
- Dioxigenasa

Asociadas a la degradación de hidrocarburos de alcanos de cadena larga, fracción BTEX,HAP.

BIOSURFACTANTES

- *Fusarium*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9 Hongos identificados molecularmente y la especie arbórea a la que pertenecen

Localidad	Muestra	Especie arbórea	Organismo
Ribereños	1	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Trichoderma virens</i>
	2	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Mucor irregularis</i>
	3	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
	4	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	5	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
	6	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
	7	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Fusarium sp</i>
Shushufindi	1	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Mucor irregularis</i>
	2	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
	3	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	4	<i>Piptadenia pteroclada</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
	5	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
	6	<i>Platymiscium pinnatum</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>
	7	<i>Zygia longifolia</i>	<i>Fusarium sp</i>

Nota. *Platymiscium pinnatum*: caoba, *Piptadenia pteroclada*: guarango espinudo, *Zygia longifolia*: Chíparo. Autoría propia.

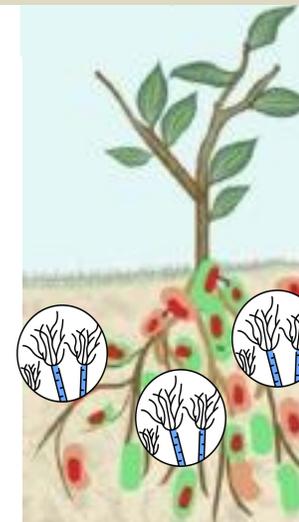
El 50 % caoba *Platymiscium pinnatum*.

El 28,57 % chíparo *Zygia longifolia*.

El 21,42 % guarango espinudo *Piptadenia pteroclada*



Asociación planta-microorganismo



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación por MALDITOF

Tabla 10 Identificación de microorganismos mediante el análisis MALDI-TOF

Localidad	Muestra	Organismo	% Identidad
Ribereños	1	No identificado	-
	2	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	86,50
	3	No identificado	-
	4	<i>Aspergillus fumigatus</i>	92,40
	5	No identificado	-
	6	<i>Trichophyton verrucoum</i>	82,40
	7	No identificado	-
Shushufindi	1	No identificado	-
	2	No identificado	-
	3	<i>Aspergillus fumigatus</i>	83
	4	No identificado	-
	5	No identificado	-
	6	No identificado	-
	7	No identificado	-

Nota. % de identificación: Corresponde al porcentaje de datos de masas moleculares identificadas en la muestra, que coinciden con la base de datos. Autoria propia.

28,57 % pudieron ser identificados por medio de espectrometría de masas MALDITOF.

El análisis MALDI-TOF es más específico para la identificación de bacterias.

Identificación de hongos filamentosos por MALDITOF

Estrechas relaciones entre especies.

Protocolo estandarizado para la obtención de los perfiles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11 Comparación de identificación molecular y MALDI-TOF

Localidad	Identificación molecular	Aislamientos analizados	Identificación			Identificación correcta MALDITOF
			No	Género	Especie	
Ribereños	<i>Trichoderma virens</i>	1	X			0
	<i>Mucor irregularis</i>	1	X			0
	<i>Trichoderma harzianum</i>	1	X			0
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1		X	X	1
	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	X			0
	<i>Penicillium citrinum</i>	1	X			0
	<i>Fusarium sp.</i>	1	X			0
	Total	7	6			1
Shushufindi	<i>Mucor irregularis</i>	1	X			0
	<i>Geotrichum candidum</i>	1	X			0
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1	X			0
	<i>Rhizopus arrhizus</i>	1	X			0
	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	X			0
	<i>Trichoderma asperellum</i>	1	X			0
	<i>Fusarium sp.</i>	1	X			0
	Total	7	7		0	0

Nota. Autoría propia.

La base de datos SARAMIS tiene la capacidad de diferenciar especies de *Aspergillus*.

El (92,85 %) de los espectros de los hongos generaron una identificación.

Base de datos de los espectros de organismos.

Biblioteca Bruker Biotyper 79,0 %, SARAMIS 32,4 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de diversidad

Tabla 12 Evaluación de la diversidad

Índices	Ribereños	Shushufindi
Riqueza específica	7	5
Abundancia	39	22
Diversidad de Simpson (1-D)	0,83	0,79
Diversidad de Shannon (H')	1,87	1,59
Equitability de Pielou (J')	0.96	0.99
Chao-1	100 %	100 %

Nota. Autoría propia.

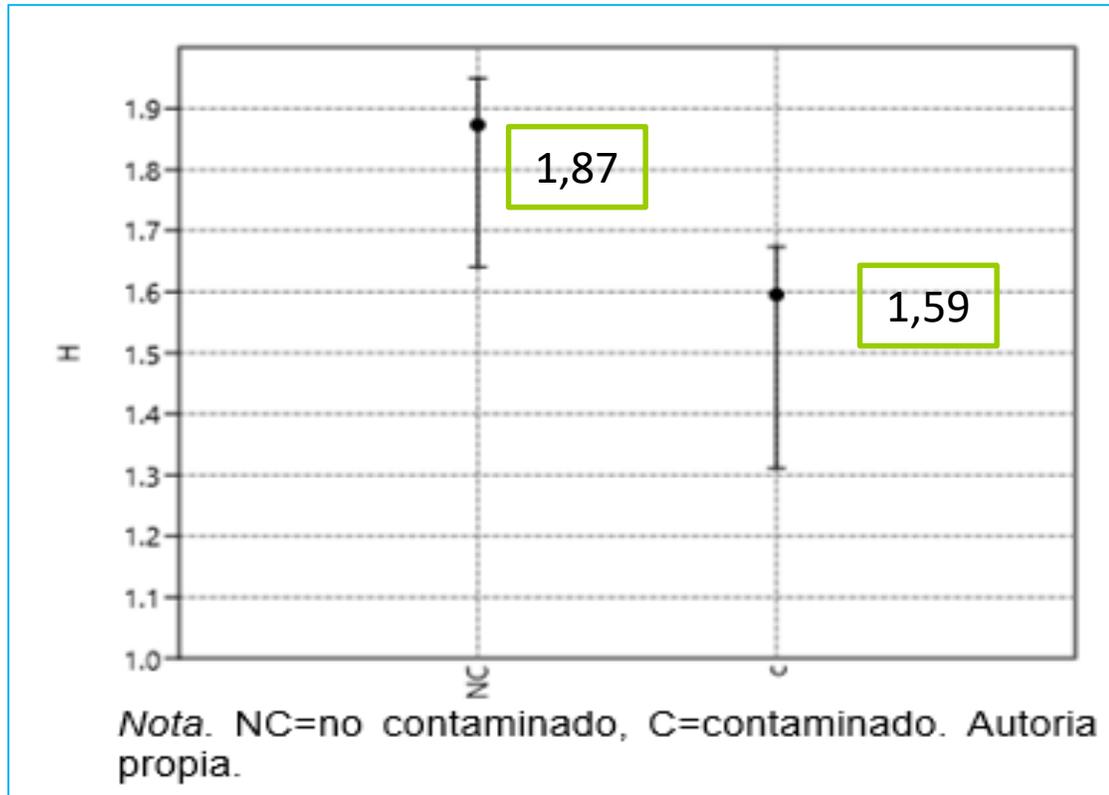
Borowik et al., (2017) diversidad alta en suelos contaminados por petróleo y sus derivados.

- Selección natural
- Fuente de carbono

Similitudes en la distribución de la abundancia entre las especies.

- El sitio no contaminado Ribereños podría contener residuos de contaminantes

Fig. 4 Índice de Shannon.



Depende de la riqueza de especies y esta puede variar por varios factores, por lo cual en sitios contaminados será menor.

CONCLUSIONES



Se activó el 100 % (39/39) de cepas de hongos rizosféricos de la zona Shushufindi y 100 % (22/22) de la zona Ribereños, pertenecientes al programa de fitoremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera.



Molecularmente se identificaron el 85,71% (12/14) de hongos a nivel de género y especie. En el sitio no contaminado Ribereños se identificaron las siguientes especies: *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum*, *Mucor irregularis*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicilium citrinum* y *Fusarium* sp., mientras que el sitio contaminado Shushufindi se identificaron especies de los géneros: *Mucor irregularis*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus arrhizus*, *Trichoderma asperellum* y *Fusarium* sp.



La identificación por espectrometría de masas MALDITOF permitió identificar el (28,57%) de las muestras de hongos. solo *Aspergillus fumigatus* coincidió tanto por el método molecular y proteómico, de esta manera el análisis MALDITOF tuvo menor rendimiento al molecular.



La estructura de la comunidad de hongos rizosféricos tanto del sitio contaminado Shushufindi como el no contaminado Ribereños, esta representada por una diversidad alta y una equitatividad homogénea.

RECOMENDACIONES

Evaluar la capacidad de degradación de petróleo en los aislados fúngicos y su actividad enzimática, para su potencial uso en suelos contaminados en la Amazonia ecuatoriana .

Para el caso de la identificación a nivel de especie del género *Fusarium* amplificar el gen TEF1- α .

AGRADECIMIENTOS



Al todo el equipo del
**Laboratorio de Microbiología ,Zoología y
Agrobiotecnología de la Carrera Agropecuaria
IASA I**

A todo el equipo.
Laboratorio de Microbiología de la ESPE.

A la Universidad Regional IKIAM

Dr. Carlos Chiriboga
Dr. Wilmer Pozo
Dr. Darwin Rueda
Ing. Gaby Morales
Ing. Ari Drouet
Ing. Xavi Paredes

Dr. Fransisco Flores
Lic. Silvana Granda