



Caracterización proteómica y molecular de hongos rizosféricos presentes en tres especies arbóreas plantadas en la zona de gestión de pasivos (Lago 19) y en la zona de plataformas que circunscriben a los pozos petroleros (Cuyabeno 02) en la Amazonía ecuatoriana

Guevara Chávez, William Santiago

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera Agropecuaria

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario

Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

06 de septiembre del 2023



Antecedentes



Respeto hacia el medio ambiente (Roshandel *et al.*, 2021)



2000 millones de barriles de petróleo (San Sebastian *et al.*, 2001)



Región Amazónica fuente de producción (Falconí y Larrea, 2001)



Extracción petrolera en el Ecuador (Larrea, 2020)

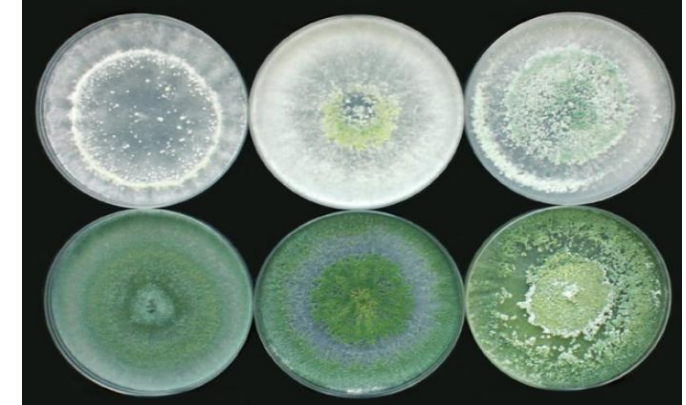
Justificación



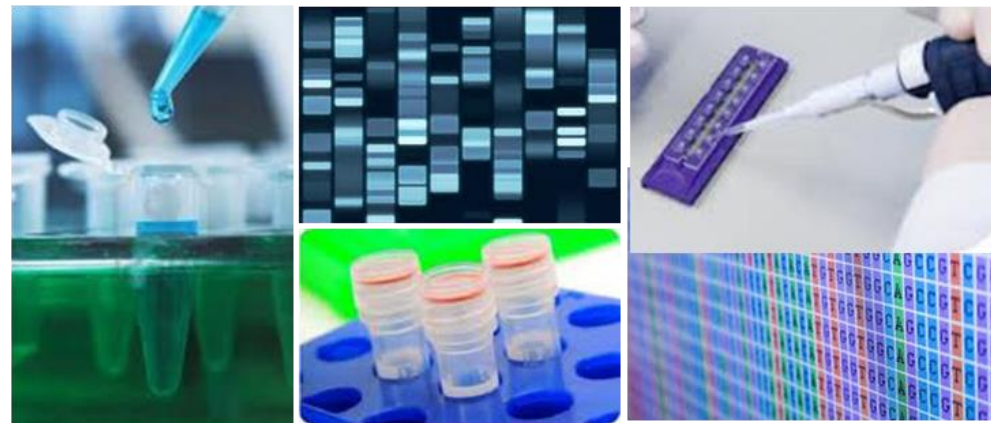
Cambios en la composición del suelo (Aguilar., 2020)



Especies fúngicas de gran interés (Recalde y Sánchez, 2017), (Martín *et al.*, 2004)



Género y especie de un hongo (Garzón, 2013)



Específicas sensibles y eficientes (Mendoza, 2005)

General

- Caracterizar proteómica y molecularmente a los hongos rizosféricos de especies arbóreas plantadas en la zona de gestión de pasivos (Lago 19) y en la zona de plataformas que circunscriben a los pozos petroleros (Cuyabeno 02) en la Amazonía ecuatoriana.

Específicos

- Activar las cepas de hongos rizosféricos pertenecientes al programa de fitorremediación de suelos afectados por procesos de extracción petrolera en las zonas Lago 19 y Cuyabeno 02 de la Amazonía ecuatoriana.
- Identificar las especies de los hongos rizosféricos mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).
- Secuenciar el gen ITS de hongos rizosféricos para la identificación molecular de especies fúngicas.
- Comparar la riqueza específica entre tipos de suelos contaminados por actividades asociadas a la extracción petrolera.

La riqueza de especies fúngicas rizosféricas cambia con los tipos de contaminación de suelos perturbados por actividades asociadas a la extracción de petróleo.

Laboratorio de Microbiología y de Agrobiotecnología de la Carrera Agropecuaria (campus IASA I)

Laboratorio de Microbiología de la Carrera de Biotecnología (campus Matriz)

Colaboración:

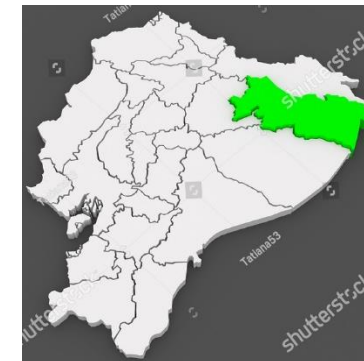
Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Regional Amazónica IKIAM.

Laboratorio de Zoología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE

Sitio de estudio

Tipos de perturbación por actividades relacionadas a la extracción de petróleo

- Centro de Gestión de Pasivos – CGP.
- Plataformas que Circunscriben a los Pozos Petroleros – PCPP.



Activación y selección de muestras



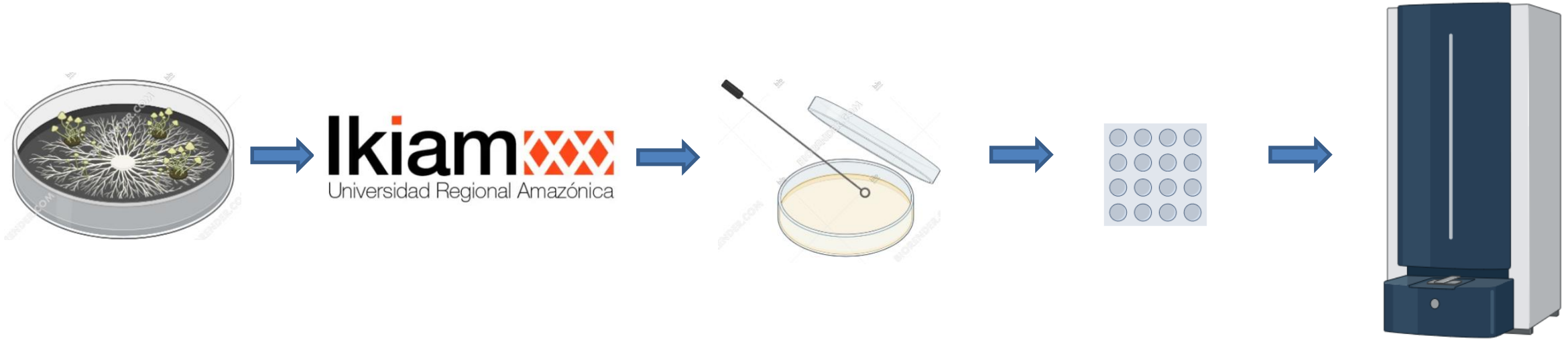
Tabla 1
Especies fúngicas seleccionadas

Localidad	Especie	Localidad	Especie
Lago 19	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Cuyabeno 02	<i>Rhizopus</i> sp.
	<i>Geotrichum</i> sp.		<i>Botryotrichum</i> sp.
	<i>Cephalosporium</i> sp.		<i>Chaetomium</i> sp.
	<i>Botryoderma</i> sp.		<i>Trichoderma</i> sp.
	<i>Paecilomyces</i> sp.		<i>Aspergillus</i> sp.
	<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.
	<i>Trichoderma</i> sp.		<i>Paecilomyces</i> sp.
			<i>Thielaviopsis</i> sp.
			<i>Cunninghamella</i> sp.



(Morphologies of Cultured Fungi and key to Species, Watanabe, 2010)

Espectrometría de masas MALDI-TOF

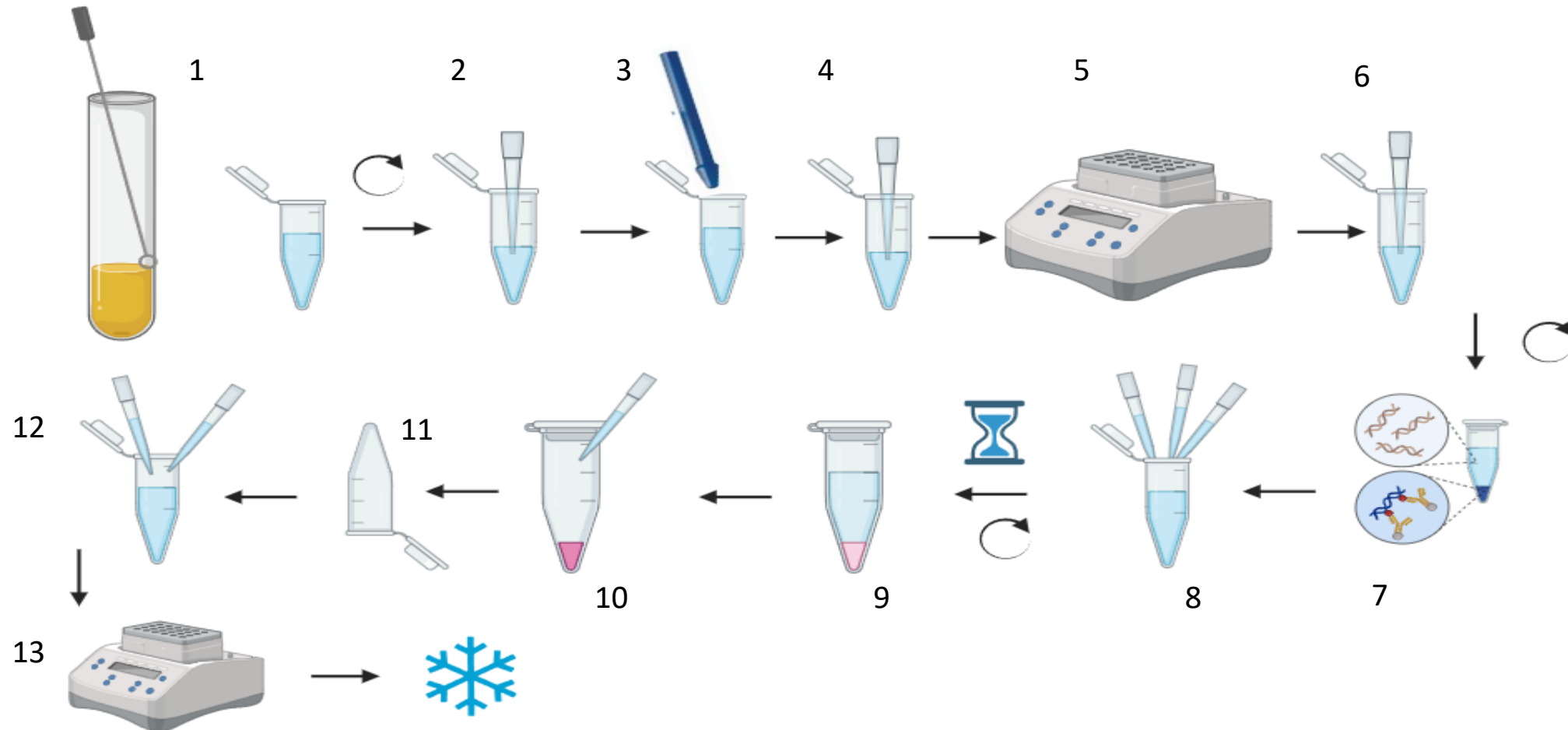


MALDI-MS application (2.9.4.1)

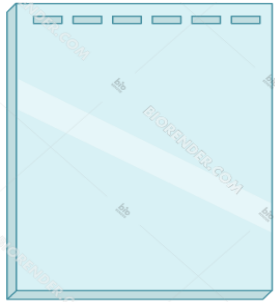
SARAMIS (System versión 4.1.0.9)

EXTRACCIÓN DE ADN

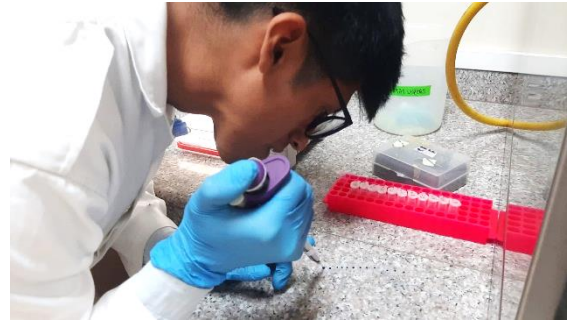
Procedimiento:



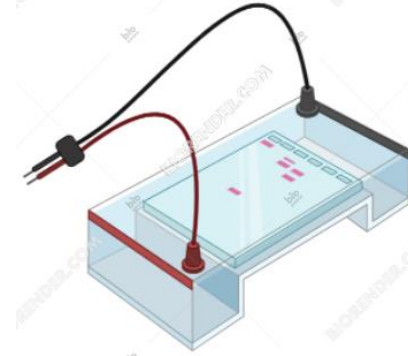
Integridad



1.- Electroforesis horizontal en gel de agarosa.



2.- Carga de muestras en el gel

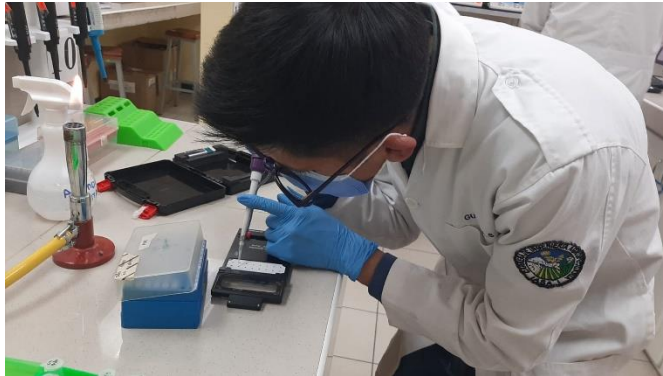


3.- Migración de muestras



4.- Verificación de la integridad

CALIDAD Y CANTIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS



Carga de muestras

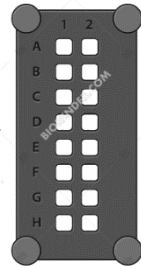


Tabla 2

Relación de absorbancias y rangos de aceptación de la pureza de ADN

Razón	Rango aceptado	Menor valor del rango
260/280	~1.8 ADN ~2.0 ARN	Presencia de proteínas, fenoles
260/230	2.0 -2.2	Presencia de EDTA, carbohidratos, fenoles

AMPLIFICACIÓN DE ADN

Se amplificó la región ITS (Espaciador Interno Transcripto),.

Secuencias: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')

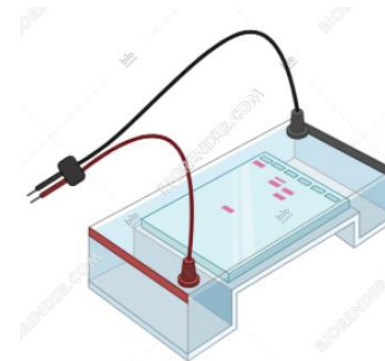
Tabla 3

Reactivo	Conc. inicial	Conc. final	Volumen por reacción (1X)
PCR Buffer	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 4

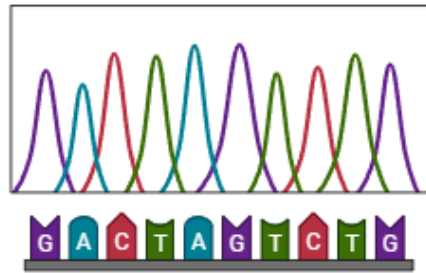
Configuración del termociclador.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 minutos	1
Desnaturalización	95 °C	30 segundos	
Hibridación	60 °C	30 segundos	30
Extensión	72 °C	60 segundos	
Extensión final	72 °C	3 minutos	1



TRATAMIENTO DE DATOS

geneious⁸
prime



ANÁLISIS DE DIVERSIDAD

Riqueza (S)

Abundancia (N_i)

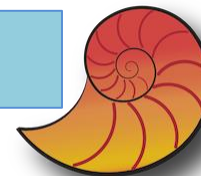
Índice de diversidad Simpson (1-D)

índice de Diversidad de Shannon (H')

Shannon (H') a partir de intervalos de confianza al 95%, con el método de Bootstrap con 10 000 interacciones.

La riqueza observada fue evaluada mediante el estimador no paramétrico Chao 1

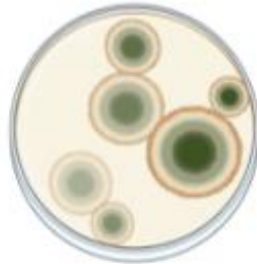
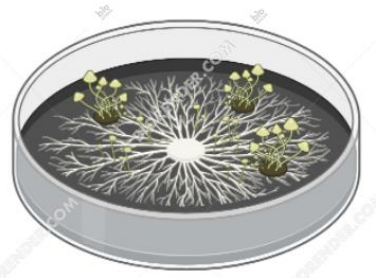
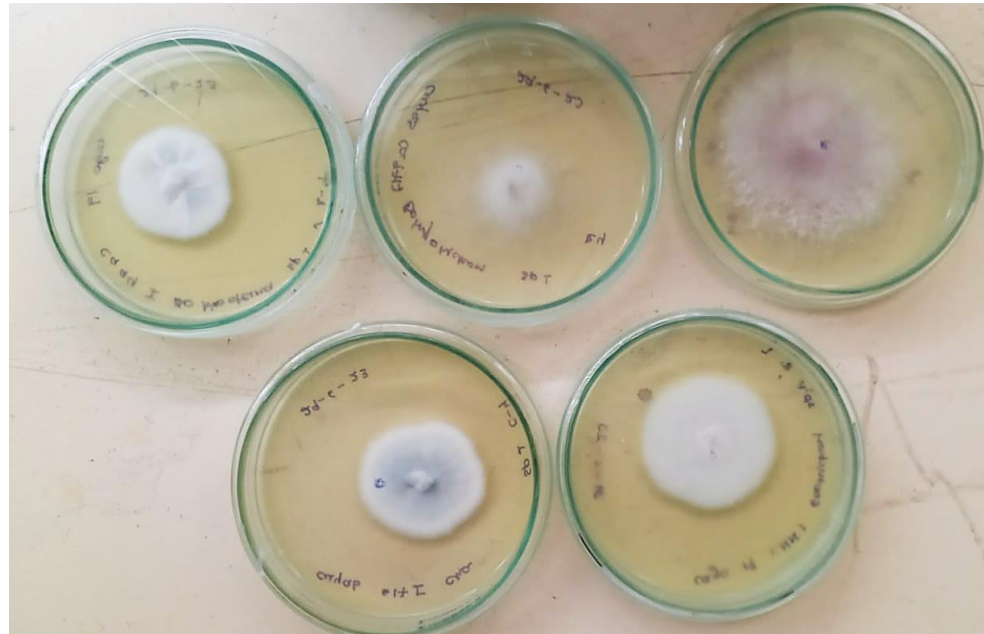
Software PAST[®]



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ACTIVACIÓN DE CEPAS

Se activaron en medio PDA.
32 cepas para la zona de CGP y
33 cepas en la zona de PCPP



Murrieta *et al.* (2014); Narrea y Malpartida (2006)

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE MALDI-TOF

Ruiz (2022) diversidad genotípica y fenotípica de *Geotrichum*

MALDI-TOF MS identificación bacterias y levaduras Jordana y colaboradores (2012).

Maldonado *et al.* (2018); Leyer *et al.* (2017) la base de datos SARAMIS. Patel (2019)

Maldonado *et al.* (2017), procesamientos complejos para MALDI-TOF.

Siller *et al.* (2017) resultados erráticos MALDI-TOF.

Prieto (2018) ausencia de espectros

Patel (2019) base de datos organizada

Tabla 5

No.	Código de muestra	Microorganismo Identificado	Porcentaje de Identificación (%)	Observaciones
1		<i>Penicillium</i>	-	N/I
2		<i>Thielaviopsis</i>	-	N/I
3		<i>Paecilomyces</i>	-	N/I
4		<i>Aspergillus</i>	-	N/I
5		<i>Rhizopus</i>	-	N/I
6		<i>Penicillium</i>	-	N/I
7		<i>Trichoderma</i>	-	N/I
8		<i>Geotrichum clavatum</i>	84	N/A
9		<i>Paecilomyces</i>	-	N/I
10		<i>Rhizoctonia</i>	-	N/I
11		<i>Cephalosporium</i>	-	N/I
12		<i>Botryoderma</i>	-	N/I
13		<i>Botryotrichum</i>	-	N/I
14		<i>Chaetomium</i>	-	N/I
15		<i>Cunninghamella</i>	-	N/I
16		<i>Trichoderma</i>	-	N/I

Nota: N/I: No identificado. N/A: Ninguna



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACION DE LA CALIDAD DE ADN

Tabla 6

Concentración y pureza de la extracción de ADN fúngico

Localidad	Género	Concentración (µg/ml)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
Lago 19	<i>Geotrichum</i>	30,41	1,91	0,398
	<i>Cephalosporium</i>	33,47	1,952	0,372
	<i>Rhizoctonia</i>	664,1	2,025	1,826
	<i>Botryoderma</i>	169,8	2,216	1,183
	<i>Paecilomyces</i>	638,5	2,039	1,889
	<i>Aspergillus</i>	33,78	1,924	0,578
	<i>Trichoderma</i>	559,3	2,298	1,555
	<i>Rhizopus</i>	834,8	2,249	2,073
Cuyabeno 02	<i>Botryotrichum</i>	781,4	2,106	1,793
	<i>Chaetomium</i>	788	2,108	1,545
	<i>Trichoderma</i>	470,2	2,268	1,689
	<i>Aspergillus</i>	286,7	2,111	1,826
	<i>Penicillium</i>	106,7	2,059	0,832
	<i>Paecilomyces</i>	666,5	2,036	1,349
	<i>Thielaviopsis</i>	181,1	2,267	0,973
	<i>Cunningamella</i>	231,3	2,417	1,463

Nota. La pureza está relacionada con la absorbancia medida a diferentes longitudes

de onda (230, 260 y 280 nm). Fuente: Autor.

Concentración

Alejos y colaboradores (2014) para PCR al menos 5 ng/µl de ADN.

Ávila y Quito, (2019) secuenciación de ácidos nucleicos es de 10 ng/µl.

Pureza (A260/A280)

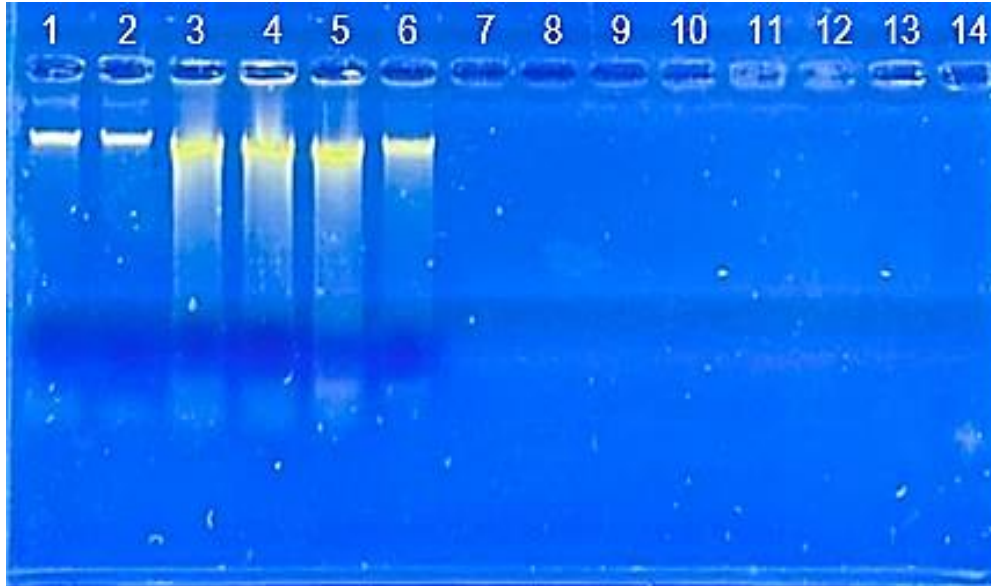
Mohammadian *et al.* (2015); Huang *et al.* (2018) rango de 1,8 – 2,1 son

Sarkanj *et al.* (2018) evaluación de la pureza del ADN.

Pureza (A260/A230)

Koetsier y Cantor (2019) A260/A280 y A260/A230 mayores a 1,8. Uso en aplicaciones posteriores

INTEGRIDAD



ADN está íntegro, se visualizará una banda estrecha (Alejos *et al.*, 2014)

Fragmento de un centímetro de ancho, ADN fragmentado (Yábar, 2003)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AMPLIFICACIÓN DEL GEN ITS

Tabla 6

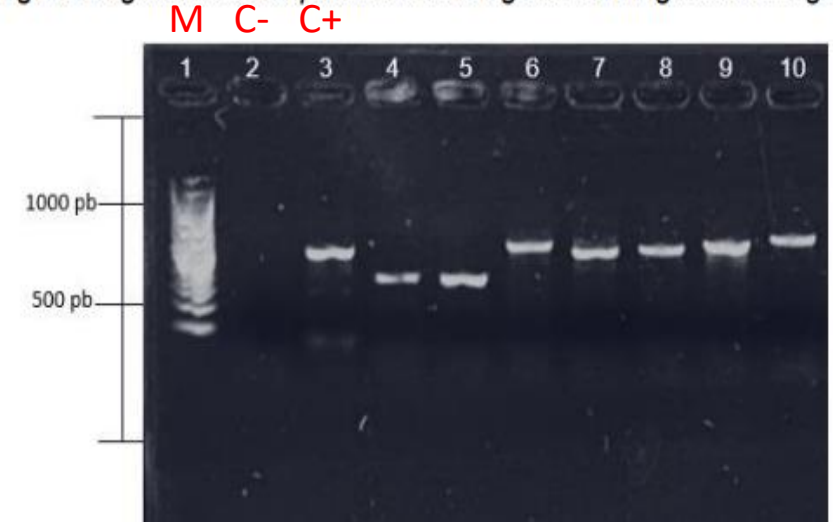
Orden de carga de las muestras en el gel de agarosa de las dos localidades.

Lago 19		Cuyabeno 02	
N° de pocillo	Especie	N° de pocillo	Especie
4	<i>Rhizoctonia</i> sp.	4	<i>Rhizopus</i> sp.
5	<i>Geotrichum</i> sp.	5	<i>Botryotrichum</i> sp.
6	<i>Cephalosporium</i> sp.	6	<i>Chaetomium</i> sp.
7	<i>Botryoderma</i> sp.	7	<i>Trichoderma</i> sp.
8	<i>Paecilomyces</i> sp.	8	<i>Aspergillus</i> sp.
9	<i>Aspergillus</i> sp.	9	<i>Penicillium</i> sp.
10	<i>Trichoderma</i> sp.	10	<i>Paecilomyces</i> sp.
		11	<i>Thielaviopsis</i> sp.
		12	<i>Cunninghamella</i> sp.

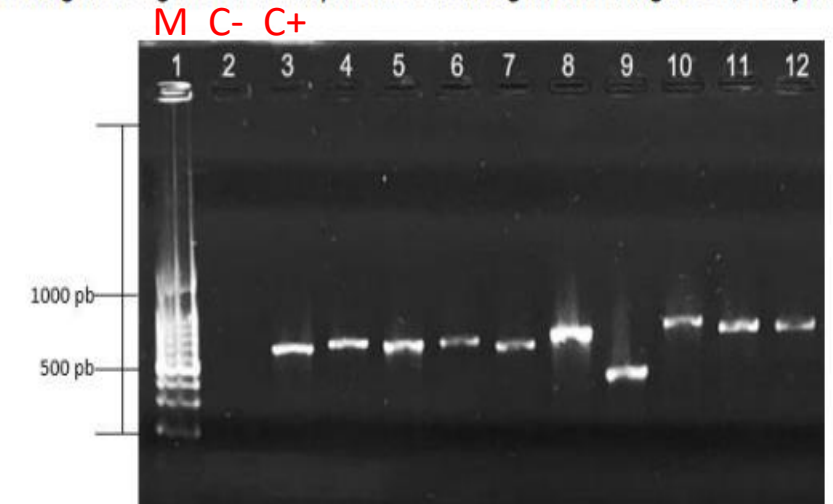
Viaud *et al.*, (2000), el tamaño de los productos de amplificación varió de 500 a 650 (pb)..

Chen *et al.* (2011), se logró amplificar la región ITS de los 16 géneros de hongos

Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de los géneros fúngicos de Lago 19



Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de los géneros fúngicos de Cuyabeno 02



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR MEDIANTE SECUENCIACIÓN

Li *et al.* (2020) géneros de hongos *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* y *Penicillium*

Ezekoye *et al.* (2018), los hongos: *Aspergillus* spp., *Geotrichum candidum*

Idowu y Ijah, (2018) : *Penicillium verrucosum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor mucedo* y *Aspergillus fumigatus*.

Argumedo *et al.*, (2009) *Trichoderma* agente biológico.

Zafra *et al.*, (2015) *T. asperellum* es un eficiente degradador de (HPA).

Valenzuela *et al.* (2006) *Penicillium* mayor abundancia que *Cunninghamella*, *Mucor*.

Contreras y Carreño (2018), mayor biomasa: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cunninghamella* sp., y *Paecilomyces* sp.

Tabla 7

Localidad	Caracterización Morfológica	Caracterización Molecular	Longitud	% de identidad	N° de Accesoión
Lago 19	<i>Geotrichum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	666	100	MH153587.1
	<i>Cephalosporium</i>	<i>Mucor irregularis</i>	653	99,54	MH153587.1
	<i>Rhizoctonia</i>	<i>Mucor irregularis</i>	606	98,06	KX349458.1
	<i>Botryoderma</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>	480	98,33	MW113607.1
	<i>Paecilomyces</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>	559	100	MK450697.1
	<i>Aspergillus</i>	<i>Mucor</i> sp.	500	99,6	MG751198.1
	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	605	100	MK790040.1
Cuyabeno 02	<i>Rhizopus</i>	<i>Mucor irregularis</i>	907	98,2	JX976257.1
	<i>Botryotrichum</i>	<i>Paecilomyces lagunculariae</i>	532	99,62	OW985620.1
	<i>Chaetomium</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>	511	100	MT192717.1
	<i>Trichoderma</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	596	100	MF871569.1
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	573	100	MT597427.1
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	205	100	ON204057.1
	<i>Paecilomyces</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>	551	100	MK307848.1
	<i>Thielaviopsis</i>	<i>Mucor irregularis</i>	645	98,24	MF356572.1
	<i>Cunninghamella</i>	<i>Cunninghamella phaeospora</i>	583	100	JN205864.1

Nota. El N° de Accesoión es un hipervínculo que redirige a la accesoión con mayor porcentaje de identidad encontrada en el GenBank. Fuente: Garrido (2023).

ESPECIES FÚNGICAS Y SU RELACIÓN CON LAS ESPECIES ARBÓREAS

Sosa (2018) *Piptadenia pteroclada* menor diversidad

Quinsasamín (2019) y Remache (2020) *P. pteroclada* (Guarango espinudo) y *Platymiscium pinnatum* (Caoba) mayor diversidad.

Zygia longifolia (Chíparo), Sosa (2018) y Remache (2020) menor diversidad fúngica

Tabla 8

Especies fúngicas asociadas a las especies arbóreas

Localidad	Especie fúngica	Especie arbórea
	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Zygia longifolia</i>
	Lago 19	<i>Penicillium janthinellum</i>
	<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
	<i>Mucor sp</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Zygia longifolia</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Paecilomyces laguncularie</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
	<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
Cuyabeno 02	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>
	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Penicillium janthinellum</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Mucor irregularis</i>	<i>Piptadenia pteroclada</i>
	<i>Cunninghamella phaeospora</i>	<i>Platymiscium pinnatum</i>

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DIVERSIDAD FÚNGICA EN LOS SUELOS CONTAMINADOS

Tabla 9

Índices de diversidad determinados en el Software PAST

Índices	CGP	PCPP
Riqueza específica	5	7
Abundancia	32	33
Diversidad de Simpson ($1-\lambda$)	0,69	0,80
Diversidad de Shannon (H')	1,38	1,77
Chao-1	100 %	100 %

Nota: CGP: Centro de gestión de pasivos. PCPP: Plataformas

que circunscriben a los pozos petroleros. $1-\lambda$ representa a 1-D.

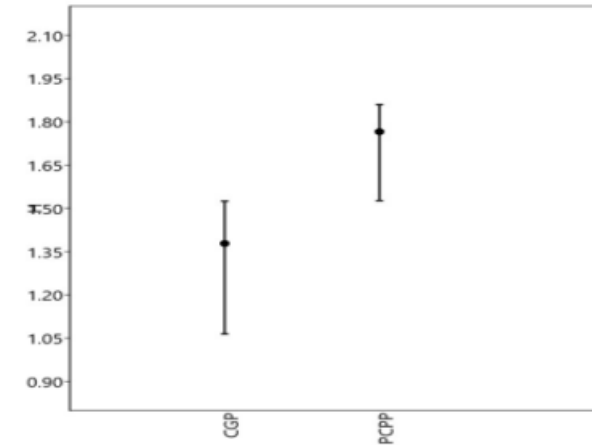
Fuente: Hammer *et al.* (2001).

Borowik *et al.* (2017) diversidad insipiente.

Mucor irregularis, *Penicillium janthinellum*, y *Trichoderma asperellum*, comunes CGP y PCPP.

Acorde al índice Simpson ($1-\lambda$), tanto CGP como PCPP presentaron una diversidad alta. Kierna (2023).

Significancia del Índice de Shannon (H') de los dos tipos de perturbación CGP y PCPP



El índice de Shannon (H')

Espinosa (2019) Rango 1 y 4,5 . Si la abundancia una especie, (H') = 0 (Kierna, 2023).

Pernía *et al.* (2012); (Li *et al.*, 2020) esto debido a la presencia de carbono orgánico

Chao 1, reveló que se colectaron el 100% de las especies observadas

- Con la reactivación en medio nutritivo PDA se obtuvieron un total de 65 cepas, de las cuales 32 correspondieron al Centro de Gestión de Pasivos y 33 a la zona de Plataformas que Circunscriben a los Pozos Petroleros PCPP.
- Mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF se identificó una especie fúngica (*Geotrichum clavatum*) de un total de 16 muestras, sin embargo, el porcentaje de identificación fue bajo (84%), debido a que la base de datos microbiana SARAMIS es una versión anterior a VITEK MS, la base de datos actual.
- La amplificación del gen ITS permitió identificar la presencia de las especies: *Penicillium janthinellum*, *Penicillium crustosum*, *Mucor irregularis*, *Paecilomyces laguncularie*, *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus fumigatus*, *Cunninghamella phaeospora* y *Geotrichum candidum* en CGP (Lago 19) y PCPP (Cuyabeno 02).
- La diversidad fúngica entre las dos zonas contaminadas evaluadas tendió a ser mayor en PCPP, mostrando así el desarrollo de una biorremediación natural.

RECOMENDACIONES

- Para obtener resultados fiables en la identificación de organismos mediante MALDI-TOF MS, se recomienda usar una base de datos organizada, completa y actualizada.
- Para conseguir una adecuada concentración y pureza de ADN fúngico, se recomienda utilizar micelio joven, pues este es el factor que limita obtener un aislamiento exitoso de ADN.
- Se recomienda realizar estudios posteriores relacionados con la metabolómica de las especies con potencial biorremediador identificadas en el presente estudio, con el fin de conocer los metabolitos secundarios que estos pueden producir y aplicarlos en las ciencias agropecuarias.
- Se recomienda usar *primers* específicos para secuenciar otros fragmentos de genes que permitan la identificación a nivel de especie de la cepa *Mucor sp.*

GRACIAS

