

Caracterización molecular y proteómica de hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador

Chicango Morales, Bertha Alexandra

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

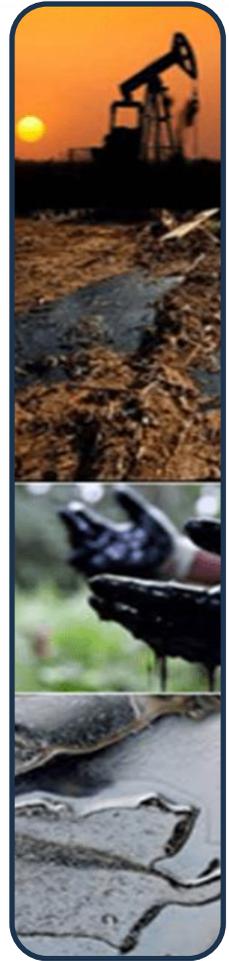
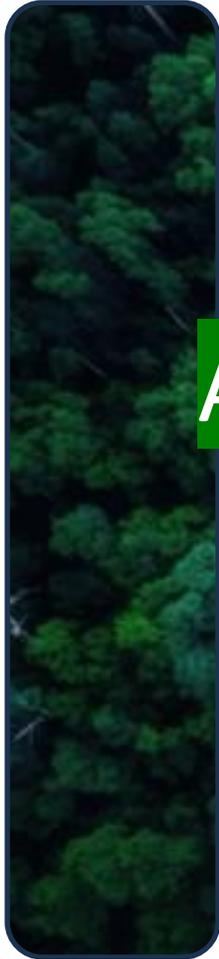
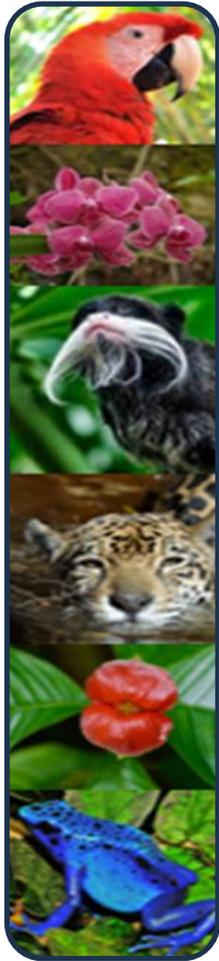
Lic. Chiriboga Novillo, Carlos Eduardo, Dr.

07 de septiembre del 2023



ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



AMAZONIA ECUATORIANA

Bravo Medina *et al.* (2017); Ferrera Cerrato *et al.* (2006)



ESPE
CORPORACIÓN DEL ESTADO ECUATORIANO
COMERCIALIZADORA DE LAS YACIMIENTOS PETROLIFEROS
CONSERVACION PARA LA ENERGIA

SANSAHUARI 02
(PCPP)

AUCA 02
(GCP)



Piptadenia pteroclada



Zygia longifolia



Platymiscium pinnatum



Crioconservación

(Sosa Vargas, 2018; Quinsasamín Armas, 2019; Remache Arequipa, 2020; Vega Chimarro, 2021)

(Ulcuango *et al.*, 2014).

General



Caracterizar molecular y proteómicamente los hongos rizosféricos de tres especies arbóreas leguminosas plantadas en el centro de gestión de pasivos Auca 02 y en la plataforma que circunscribe el pozo petrolero Sansahuari 02 Amazonía del Ecuador

Específicos

Activar las cepas de hongos rizosféricos provenientes de suelos afectados por procesos de extracción petrolera de las zonas Auca 02 y Sansahuari 02 de la Amazonía del Ecuador.

Extraer proteínas de las cepas de hongos rizosféricos para la posterior lectura en el espectrómetro de masas (MALDI-TOF).

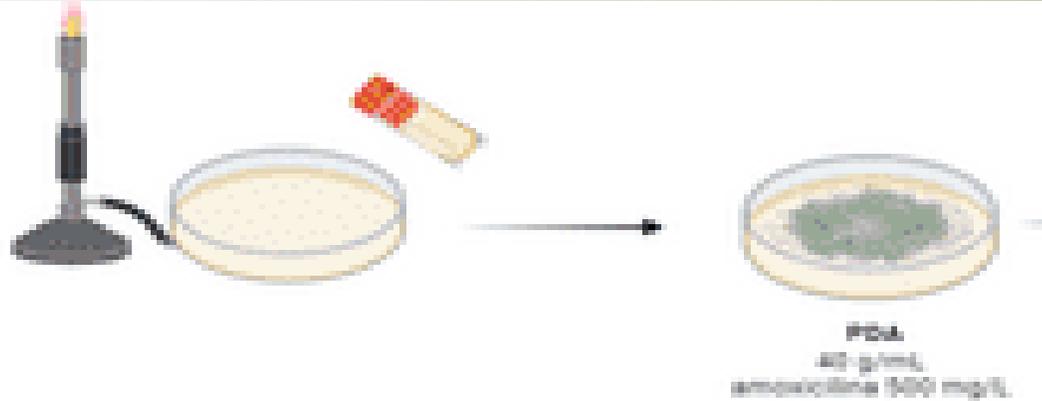
Amplificar el ADN ribosómico (región ITS, Internal Transcribed Spacer) mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para cada una de las muestras provenientes de dos tipos de contaminación del suelo.

Comparar la abundancia riqueza y diversidad de especies entre tipos de suelos contaminados por actividades asociadas a la extracción petrolera.



El tipo de perturbación del suelo no altera la abundancia, riqueza y diversidad de especies de hongos rizosféricos de los árboles leguminosos.

Acondicionamiento de las cepas



Selección de cepas

Tabla 1

Muestras seleccionadas de la zona Auca 02

Código de muestra	Género
1 A	<i>Paecilomyces</i>
2 A	<i>Botrioderma</i>
3 A	<i>Aspergillus</i>
4 A	<i>Trichoderma</i>

Tabla 2

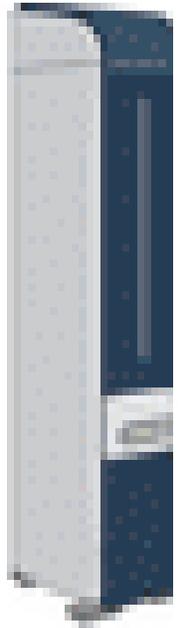
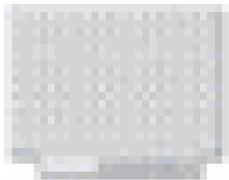
Muestras seleccionadas de la zona Sansahuari 02

Código de muestra	Género
1 S	<i>Rizopus</i>
2 S	<i>Oidiodendro</i>
3 S	<i>Rizoctonia</i>
4 S	<i>Acremonium</i>
5 S	<i>Geotrichum</i>
6 S	<i>Peaecilomyces</i>

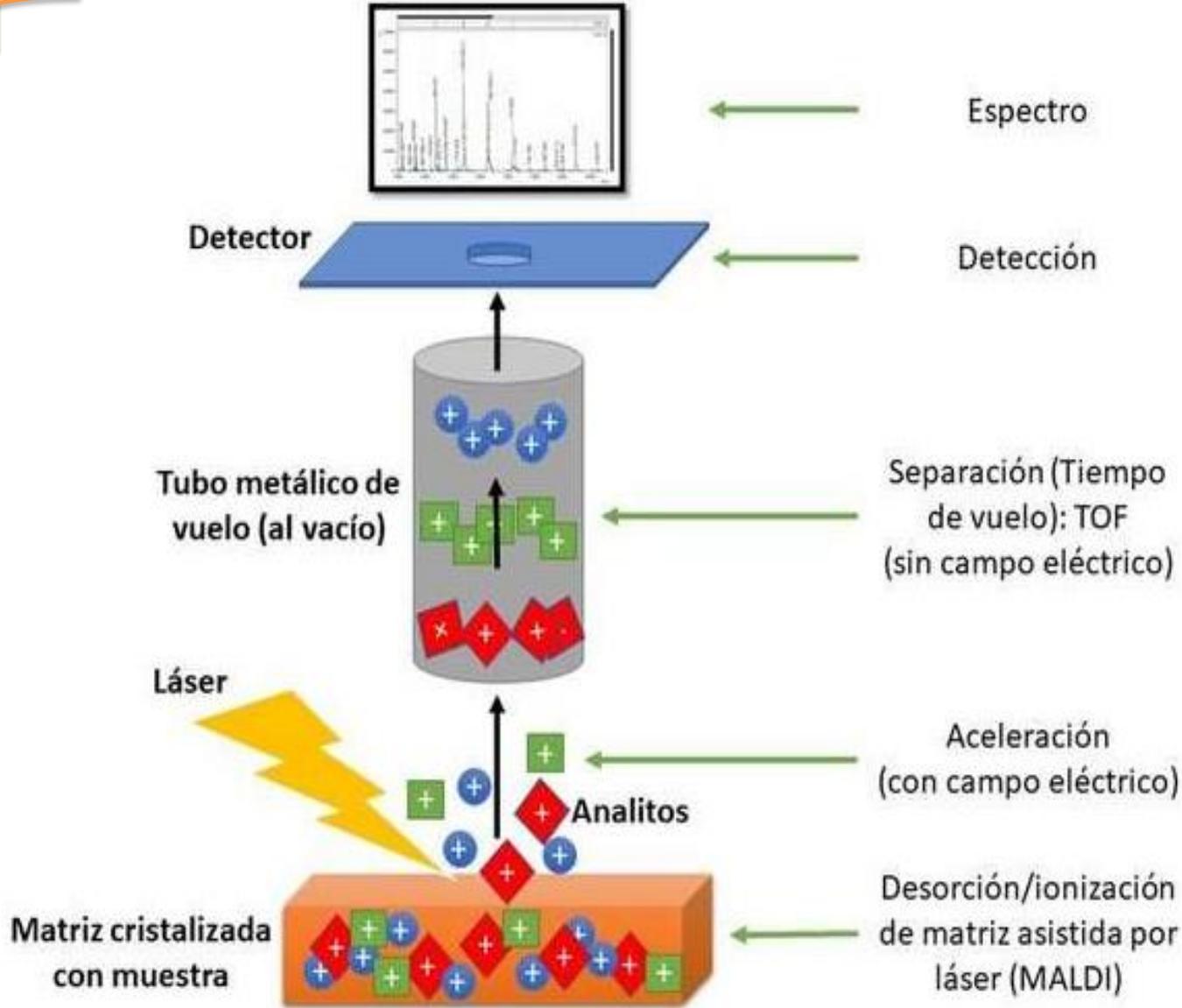
Claves dicotómicas
(Watanabe 2010; Barnett y Hunder, 1998)

(Sosa, 2018; Quinsasamín, 2019; Remache, 2020; Vega, 2021)

Identificación proteómica

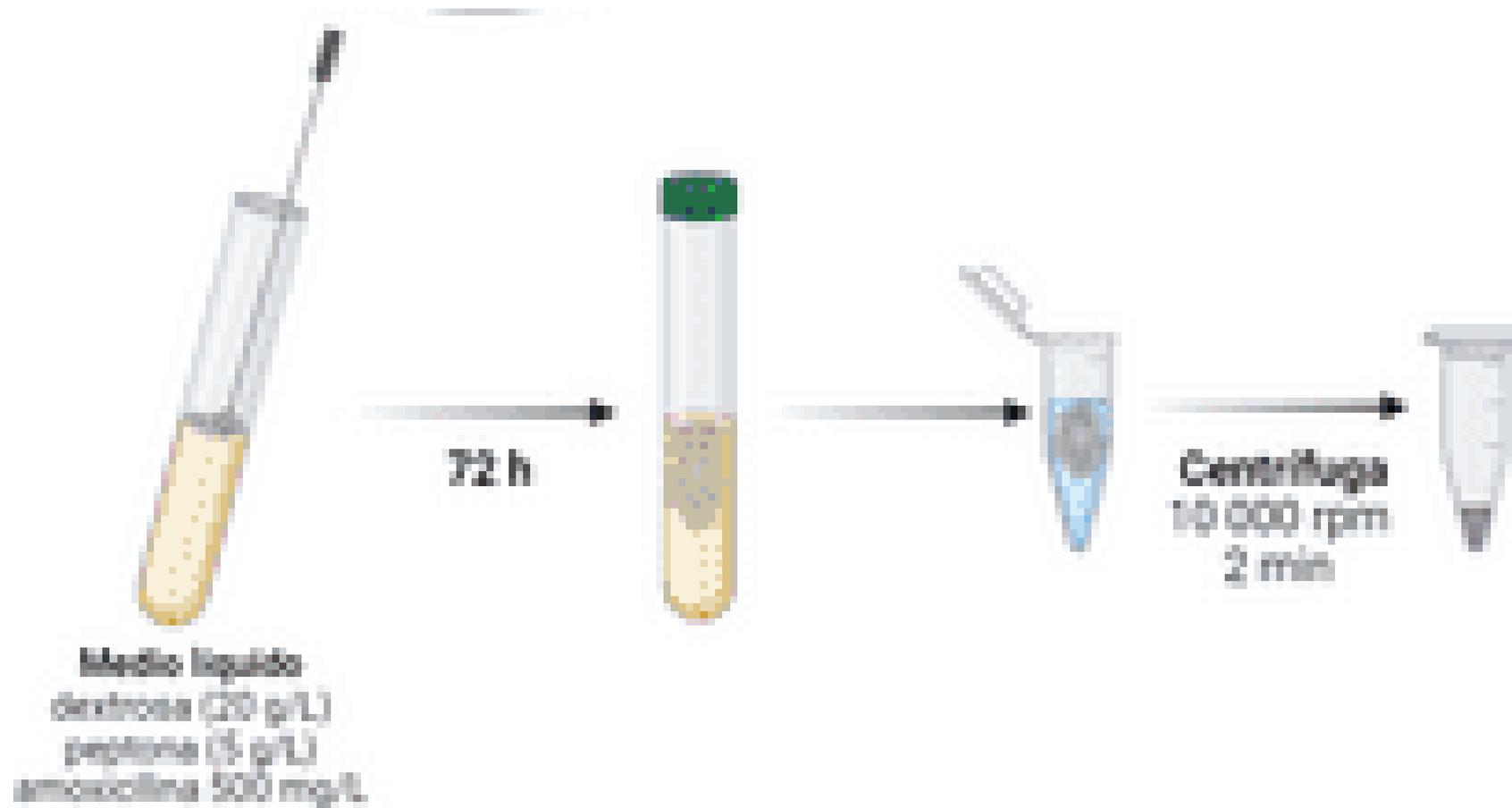


SARAMIS

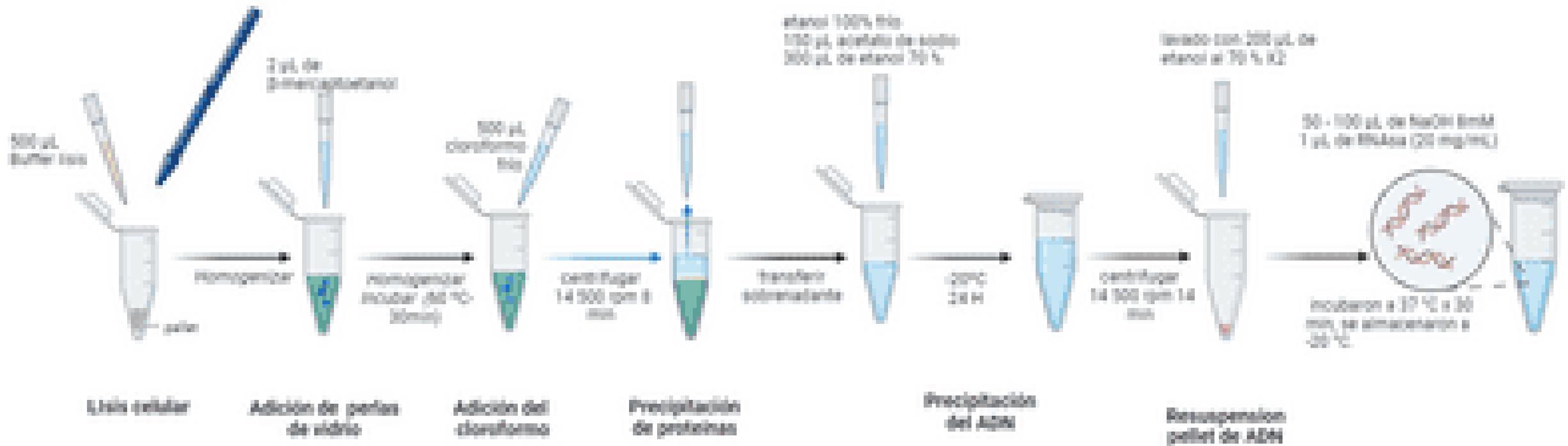


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACION PARA LA ESCUELA

Identificación molecular



Extracción de ADN



Modifico el protocolo de Flores (2021) modificado de Berrendero *et al.* (2008)

Determinación de la calidad de ADN

Concentración

Con el equipo Multiskan Sky Thermo Scientific™ se determinó la concentración y pureza de ADN

Integridad

Se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 0,8 % w/v con buffer TBE 1x

En cada pocillo se cargaron 10 μ L de las extracciones de ADN más 2 μ L de *Blue juice*, y se corrió a 100 V por 45 minutos.

Finalmente se observaron los resultados en un transiluminador (Alpha Innotech).



Pureza

Tabla 3

Valores referenciales de pureza

Relación de ondas	Rango	Criterios de Validez
260/280	$\geq 1,8-2,1$	Pureza óptima
	$\geq 1,6-1,7$	Pureza aceptable
	$< 1,6$	ADN contaminado con compuestos aromáticos
	$> 2,1$	ADN contaminado con ARN
260/230	$> 2-2,2$	Pureza óptima
	$> 1,8$	Pureza aceptable
	$< 1,8$	ADN contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono
	$< 1,5$	ADN altamente contaminado con sales, fenol, hidratos de carbono

Nota. Medidas por espectrofotometría para determinar los valores indicativos de pureza en las muestras de ADN. Recuperado de Gonzales (2021)

Tabla 4
Cantidades utilizadas para la Master Mix

Reactivo	Concentración inicial	Concentración 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

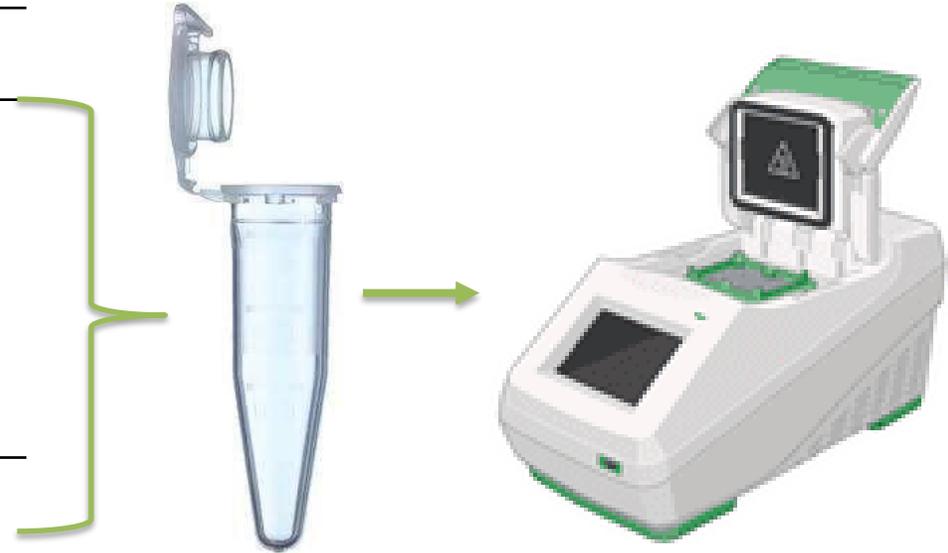


Tabla 5
Condiciones para la amplificación del gen ITS

Etapa	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
Hibridación	60 °C	30 s	30
Extensión	72 °C	60 s	
Extensión final	72 °C	3 min	1
Almacenamiento	4	Indefinido	

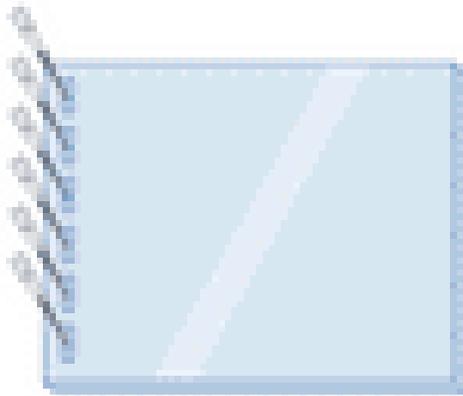
ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')

Modificado de Flores (2021)

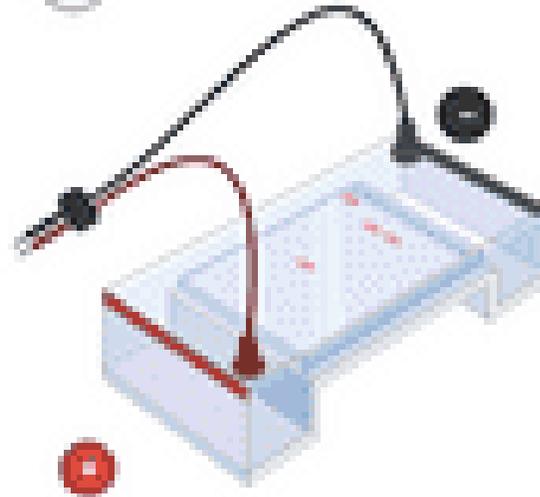
Electroforesis

1 Cargar las muestras de ADN



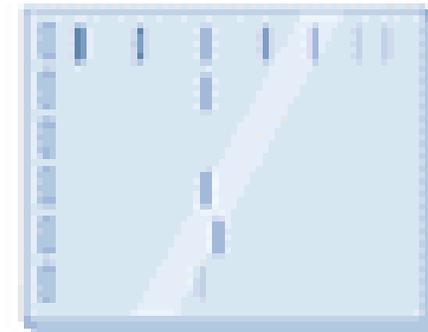
5 μ L de cada amplicón
2 μ L de Blue Juice

2 Aplicar corriente eléctrica



70 voltios por 80 minutos

3 Analizar el gel



Gel de agarosa al 1%, con buffer TBE 1x y 4 μ L de Diamond Nucleic Acid Dye y el marcador molecular 100 pb (promega).

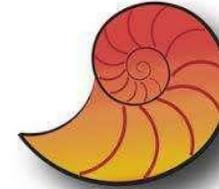
Análisis de Secuencias



geneious
prime



Análisis de Biodiversidad



Past [®]

Riqueza (S)

Abundancia (Ni)

Índice de Simpson (1-D)

Índice de Shannon (H')

Índice de equitatividad de Pielou (J')

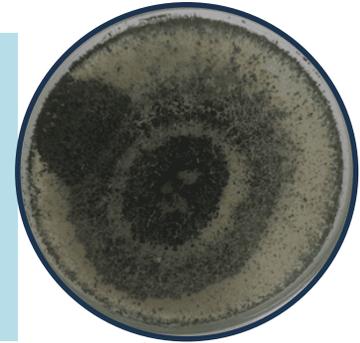


Activación de cepas

Se activaron en medio PDA 34 cepas para la zona Auca 02 y 36 para Sansahuari



El cuál proporcionó una fuente de carbono y nitrógeno a las cepas en crecimiento, dicho medio se utiliza para aislar todo tipo de hongo (Pedroza Sandoval, 2015).



Identificación MALDI-TOF

Tabla 5

Especies identificadas con MALDI-TOF

Zona	MALDI-TOF	% Identificación
PCPP	<i>Aspergillus niger</i>	76
CGP	<i>Aspergillus terreus</i>	77,90

Alegría (2021)

99,9% identificación fiable a nivel de especie
50% y 99,8% aceptables a nivel de género.

(Salas C., 2020)

SARAMIS

Base de datos se encuentra desactualizada

Se sugiere el uso de la base de datos Vitek MS™

Tabla 6

Resultados de calidad del ADN

Zona	Código de muestra	Concentración (µg/mL)	Pureza (A260/A280)	Pureza (A260/A230)
PCPP	1 S	201,3	2,001 ✓	1,149
PCPP	2 S	406,7	2,072 ✓	1,564
PCPP	3 S	101,6	2,029 ✓	1,458
PCPP	4 S	209	2,149 ✓	1,784
PCPP	5 S	721,4	2,089 ✓	1,789
PCPP	6 S	95,41	1,985 ✓	1,159
CGP	1 A	74,18	1,822 ✓	0,7928
CGP	2 A	303	2,066 ✓	1,463
CGP	3 A	129	1,281 ✗	0,327
CGP	4 A	155,9	2,057 ✓	1,397

PCR

Se debe partir de una concentración de 50 a 100 µg/mL.

González (2021)

<1,6

Contaminado con compuestos aromáticos.

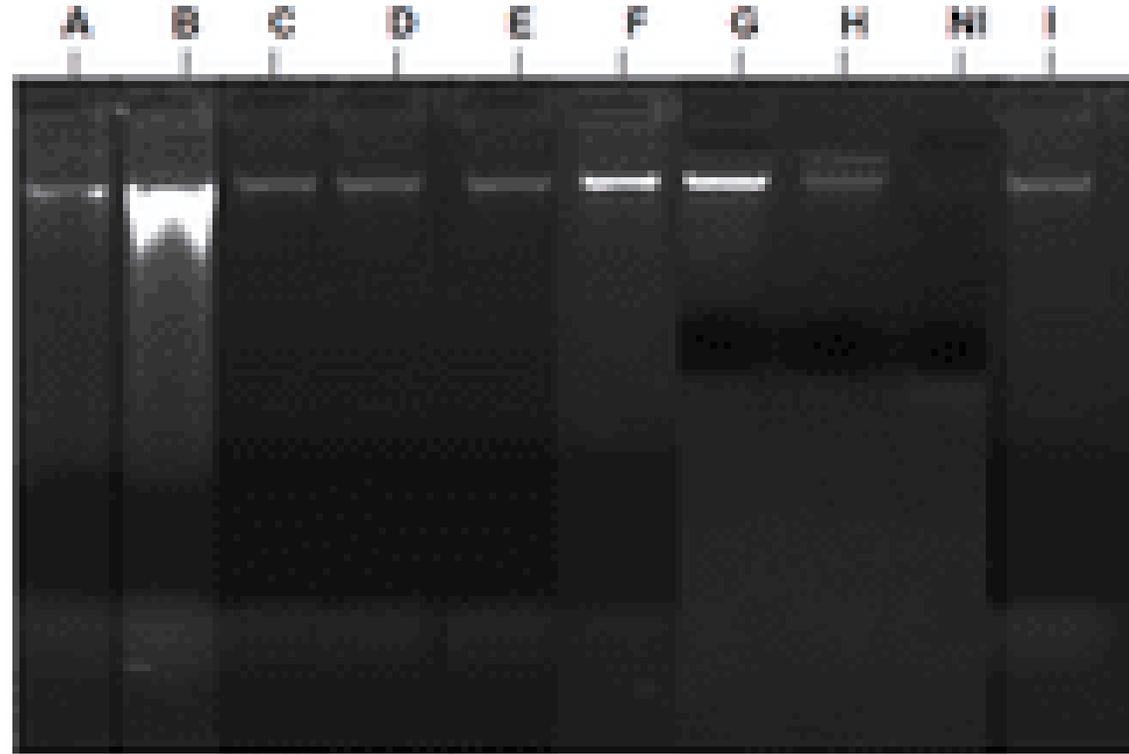
<1,5

Altamente contaminados con sales, fenoles e hidratos de carbono.

(Méndez y Pérez, 2004)

Figura 1

Integridad del ADN extraído

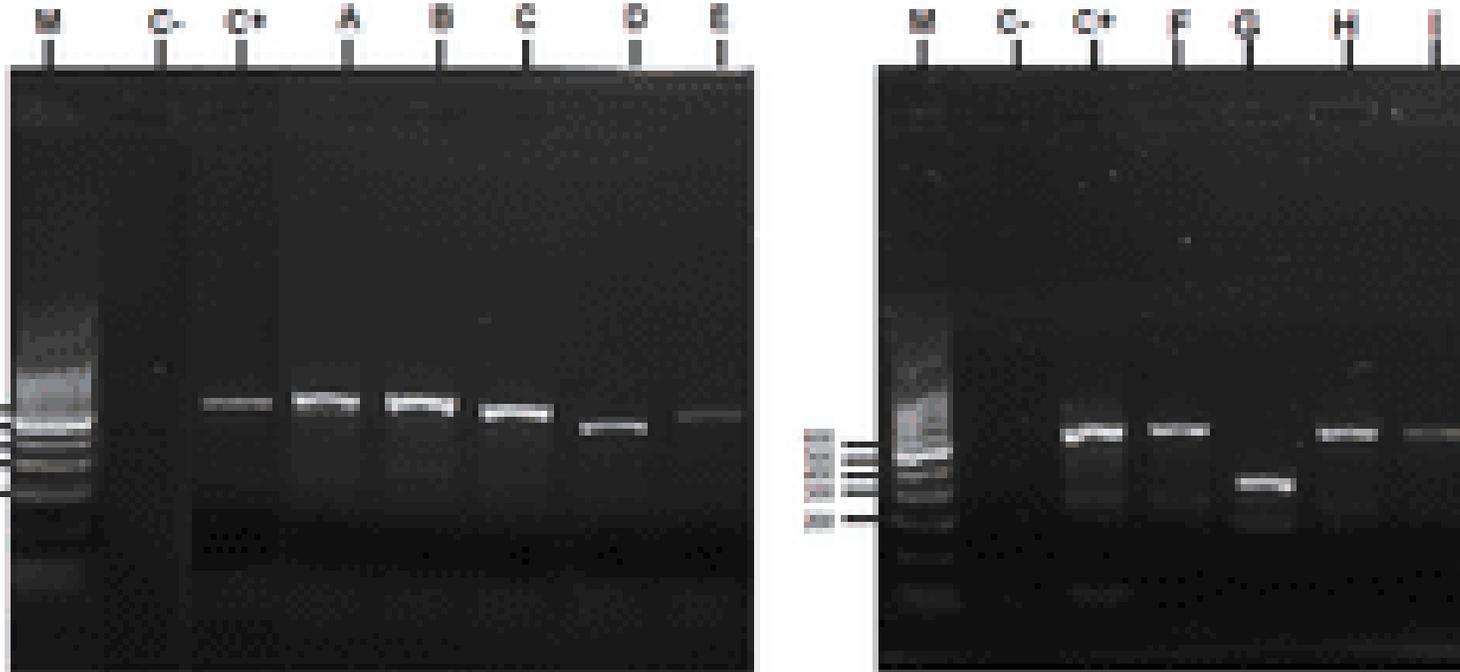


Nota. Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8% de las muestras de ADN. A=1S, B=2S, C=3S, D=4S, E=5S, F=6S, G=1A H=2B, I= 4B NI= 3A(No extraído). Autoría propia

Amplificación de la región ITS

Figura 2

Resultados de la corrida electroforética



Nota. Corrida electroforética de PCR de las muestras amplificadas con el ITS 1 e ITS 4. **M** Marcador molecular, **C-** Control Negativo, **C+** Control Positivo, **A** *Mucor irregularis* **B** *Gongronella butleri* **C** *Aspergillus fumigatus* **D** *Rhizopus arrhizus* **E** *Geotrichum candidum* **F** *Purpureocillium lilacinum* **G** *Penicillium pulvillorum* **H** *Fusarium oxysporum* **I** *Trichoderma asperellum*. Autoría propia

Mohankumar *et al.*, (2010)

Obtuvieron un producto de aproximadamente 600 pb

Huanca *et al.* (2014)

Generaron fragmentos de 300 a 400 pb para *Penicillium* sp.

Vanegas *et al.*, (2014)

La variación de los tamaños de los amplicones se debe a que las muestras pertenecen a diferentes especies.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6

Especies de hongos identificados de acuerdo con la secuenciación en las zonas PCPP y CGP

Zona	Código de muestra	Nombre científico	% de identidad
PCPP	1 S	<i>Mucor irregularis</i>	99,29
PCPP	2 S	<i>Gongronella butleri</i>	100
PCPP	3 S	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100
PCPP	4 S	<i>Rhizopus arrhizus</i>	100
PCPP	5 S	<i>Geotrichum candidum</i>	99,65
PCPP	6 S	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	100
CGP	1 A	<i>Penicillium pulvillorum</i>	100
CGP	2 A	<i>Fusarium oxysporum</i>	100
CGP	4 A	<i>Trichoderma asperellum</i>	100

Bou *et al.* (2011)

≥ 98,5 %

Se puede definir la especie

Frances *et al.* (2011)

Redes miceliales extendidas

Enzimas catabólicas

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Asimilación de hidrocarburos aromáticos

Tamayo y Cariga (2021)

Capacidad de biodegradación sobre los suelos contaminados con aceite, diésel y crudo

Tabla 7

Análisis de la Biodiversidad según el nivel de contaminación

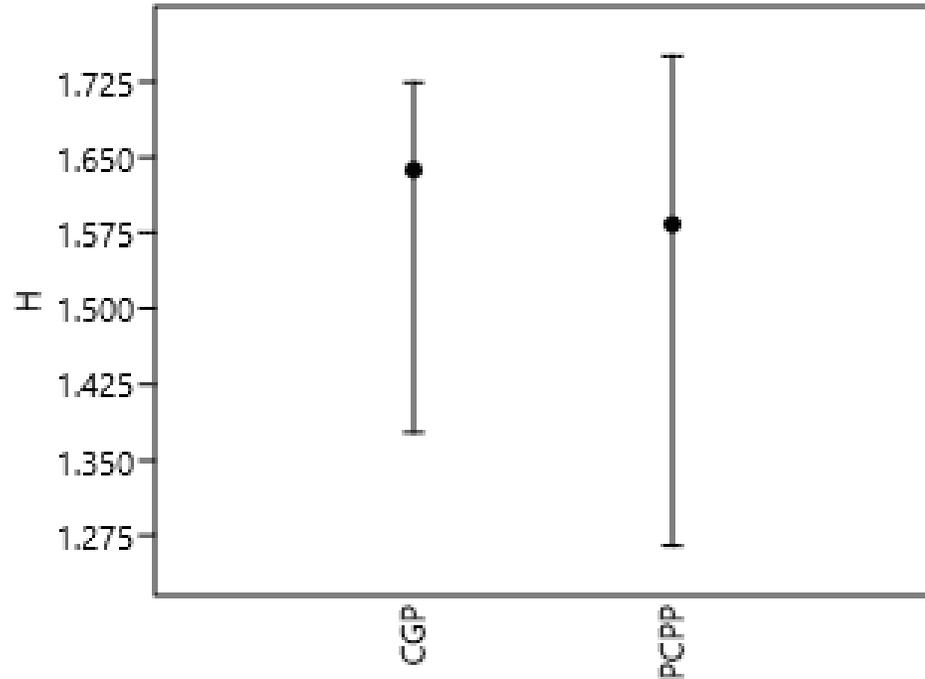
Índices	Auca	Sansahuari	
Riqueza específica	6	7	
Abundancia	34	36	
Diversidad de Simpson ($1 - \lambda$)	0,78	0,74	→ diversidades altas
Diversidad de Shannon (H')	1,64	1,58	
Equitability de Peilou (J')	0,91	0,81	→ homogéneo

Moreno (2001)

Índice de Shannon (H')

Figura 3

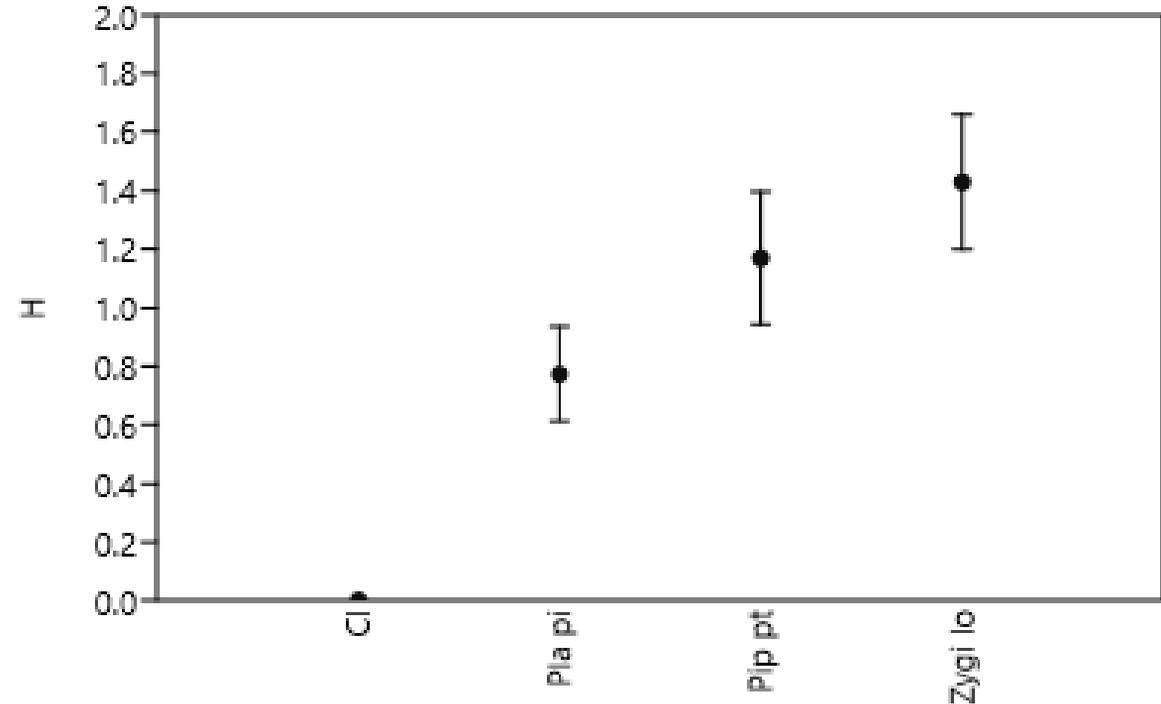
Índice de Shannon (H') para las dos zonas perturbadas



Nota. Índice de Shannon. CGP Centro de Gestión de Pasivos Auca 02; PCPP Plataforma que Circunscribe al Pozo Petrolero Sansahuari 02. Autoría propia.

Figura 4

Índice de Shannon (H') para las especies arbóreas



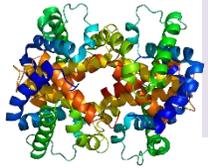
Nota: Diversidad fúngica de acuerdo a las especies arbóreas plantadas siendo Claro (Cl), *Platymiscium pinnatum* (Pla pi), *Piptadenia pteroclada* (Pip pt) y *Zygia longifolia* (Zig lo).

Se activaron el 100% de las 36 cepas provenientes de la zona Sansahuari 02 al igual que de las 34 cepas de la zona Auca 02.

Con la técnica de MALDI-TOF se identificó una especie de la zona Sansahuari 02 con un 76% de similitud y correspondiente a *Aspergillus niger*, y para la zona Auca 02 también se logró identificar una especie con un 77,90% de similitud correspondiente a *Aspergillus terreus*.

Mediante la secuenciación Sanger, obtenida a partir de amplicones de regiones de ITS de hongos rizosféricos, se logró identificar un total de nueve cepas diferentes, seis especies de la zona Sansahuari 02 (*Mucor irregularis*, *Gongronella butleri*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus arrhizus*, *Geotrichum candidum* y *Purpureocillium lilacinum*) y tres especies de zona Auca 02 (*Penicillium pulvillorum*, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma asperellumy*).

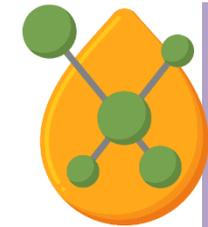
En los dos niveles de contaminación se encontraron diversidades altas, sin embargo, la abundancia, riqueza e índice de diversidad de Shannon, no presentaron tendencias diferentes entre niveles de contaminación, pero si entre especies arbóreas.



Estandarizar un protocolo para extracción de proteínas de hongos y usar una base de datos actualizada (Vitek MS), a fin de que se obtener similitudes con altos porcentajes.



Estandarizar un protocolo para extracción de ADN con nitrógeno líquido de la especie que no se pudo extraer el material genético en el presente estudio.



Realizar un análisis del perfil enzimático de las cepas para conocer el mecanismo de acción dentro del proceso de biorremediación y así estimar la asociación de microorganismos más adecuada para la digestión de hidrocarburos.

Agradecimientos



Dr. Wilmer E. Pozo-Rivera PhD

Ing. Xavier Paredes M Sc

Laboratorio de Zoología
IASA I - ESPE

Dr. Carlos Chiriboga M Sc.

Ing. Gaby Morales M Sc

Laboratorio de Microbiología
IASA I - ESPE

Dr. Darwin Rueda

Ing. Ariana Drouet

Laboratorio de Agrobiotecnología
IASA I - ESPE

Dr. Francisco Flores PhD

Lic. Silvana Granda

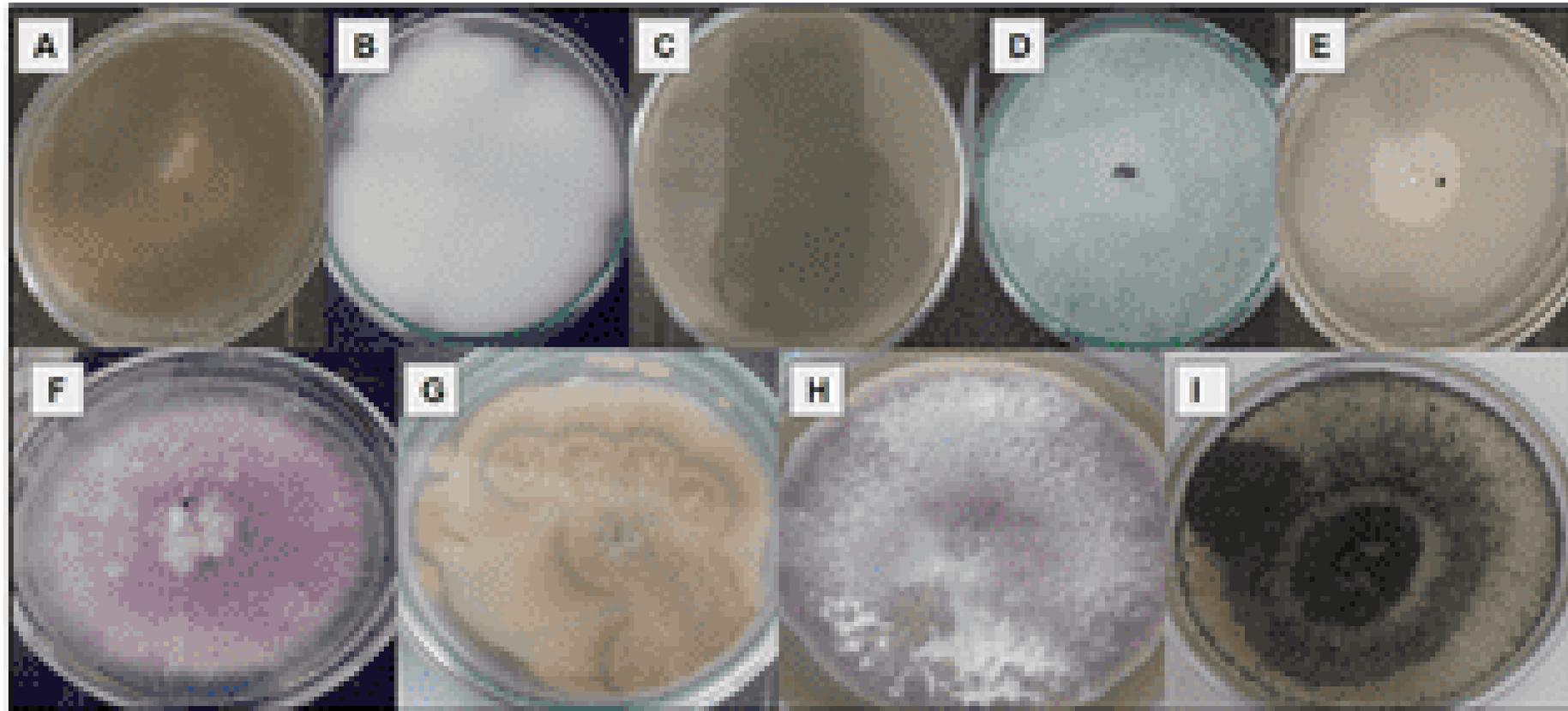
Laboratorio de Microbiología
ESPE MATRIZ



FAMILIA Y AMIGOS



Figura 9 Morfología de cepas identificadas en las 2 zonas perturbadas.



Nota: Desarrollo micelial de cepas activadas e identificadas. **A** *Mucor irregularis* **B** *Gongronella butleri* **C** *Aspergillus fumigatus* **D** *Rhizopus arrhizus* **E** *Geotrichum candidum* **F** *Purpureocillium lilacinum* **G** *Penicillium pulvillorum* **H** *Fusarium oxysporum* **I** *Trichoderma*

Análisis filogenético

Árbol Filogenético de especies encontradas en las dos zonas

