

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE
ENZIMAS RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE
ACEITE DE RECAMBIO DE AUTOMÓVIL EN MEDIOS
LÍQUIDOS, OBTENIDAS DEL SOBRENADANTE DE
CULTIVOS DE *Cladosporium cladosporioides*.**

**Daniela Mendoza Aldana
Cod: 20152140014**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C 2021**

**DETERMINACIÓN DEL PERFIL ELECTROFORÉTICO DE ENZIMAS
RELACIONADAS CON LA DEGRADACIÓN DE ACEITE DE
RECAMBIO DE AUTOMÓVIL EN MEDIOS LÍQUIDOS, OBTENIDAS
DEL SOBRENADANTE DE CULTIVOS DE *Cladosporium cladosporioides*.**

**DANIELA MENDOZA ALDANA
Cod: 20152140014**

INVESTIGACIÓN INNOVACIÓN

**Trabajo de grado para optar por el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

**DIRECTORA
ILEANA ROMEA CARDENAS MANOSALVA
Mc. Calidad y Gestión Ambiental**

**UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS FACULTAD DE
CIENCIAS Y EDUCACIÓN PROYECTO CURRICULAR LICENCIATURA EN
BIOLOGÍA BOGOTÁ D.C 2021**

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	5
2. PLANTEAMIENTO PROBLEMA	5
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. MARCO CONCEPTUAL	7
4.1 Generalidades y composición de los aceites de recambio de automóvil.....	7
4.2. Contaminación de medios acuáticos por aceites de recambio de automóvil y su impacto ambiental	8
4.3. Degradación de aceites de recambio de automóvil mediante biorremediación	9
4.3.1. El papel de los hongos en la biodegradación de contaminantes derivados del petróleo	9
4.3.2. El papel de <i>Cladosporium cladosporioides</i> en la degradación de HPA	10
4.3.3. Rol de las enzimas presentes en los hongos en la biorremediación de productos derivados de hidrocarburos poliaromáticos	10
4.4 Perfil electroforético proteínico	12
5. OBJETIVOS	13
6. HIPÓTESIS	13
7. METODOLOGÍA	13
7.1. Condiciones óptimas de crecimiento de <i>C. cladosporioides</i> empleando aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono	13
7.2 Cultivo del hongo para la proliferación de enzimas extracelulares	14
7.3 Aislamiento de enzimas obtenidas del medio de cultivo	14
7.4 Separación de enzimas mediante peso molecular	15
7.5 Evaluación de la posible actividad enzimática de las proteínas aisladas.	15
8. RESULTADOS	15
8.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de <i>C. cladosporioides</i> con aceite de recambio de automóvil como único sustrato.	15
8.2 Concentración de enzimas extracelulares obtenidas del medio de cultivo.	17
8.3 Separación de enzimas extracelulares mediante el peso molecular.	18
8.4 Evaluación de la posible degradación de aceite de recambio de automóvil a partir de enzimas extracelulares recuperadas.....	20
9. ANALISIS DE RESULTADOS	21

9.1 Condiciones óptimas de crecimiento de <i>C. cladosporioides</i> con aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono.	21
9.2 Concentración de enzimas extracelulares.	21
9.3 Caracterización del perfil electroforético de las enzimas extracelulares de <i>C. cladosporioides</i>	22
9.4. Evaluación preliminar de la degradación de aceite de recambio de automóvil mediante las enzimas extracelulares caracterizadas	25
10. CONCLUSIONES	27
11. RECOMENDACIONES	27
12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	25
13. ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

TABLA 1. Contenido de HPA en los diferentes aceites de motor.	8
TABLA 2. Diámetro de crecimiento de <i>C. cladosporioides</i> en diferentes concentraciones de aceite de recambio de automóvil.	16
TABLA 3. Ensayo de Bradford.	18
TABLA 4. Pesos moleculares por muestra.	19
TABLA 5. Evaluación de la degradación de aceite de recambio de automóvil en caja de Petri. .	20

GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Rutas generales para la degradación aerobia de HPA	11
GRÁFICA 2. Reacciones iniciales en la degradación de HPA.....	12
GRÁFICA 3. Curva de crecimiento <i>C. cladosporioides</i> en medios con aceite de recambio de automóvil.	17
GRÁFICA 4. Perfil electroforético muestras problema.	19

1. INTRODUCCIÓN

Los derivados orgánicos del petróleo como los aceites de recambio de automóvil compuestos en un 45% de hidrocarburos poliaromáticos, son una problemática importante en la actualidad, ya que la disposición final es inadecuada, por lo general terminan contaminando afluentes hídricos e interrumpiendo negativamente los ciclos naturales que ocurren allí. (Espinoza et al., 2016) Por tanto, es necesario encontrar alternativas eficientes y económicas para contrarrestar este tipo de afecciones que interfieren negativamente en las interacciones acuáticas.

La biorremediación es una rama de la biotecnología que se enfoca en la capacidad metabólica de diferentes microorganismos en la degradación de diferentes tipos de contaminantes que se encuentran en medios acuáticos, terrestres o atmosféricos (Ziolo et al., 2015) en relación a esto, los hongos son ampliamente utilizados en procesos de biorremediación debido a que poseen diferentes rutas metabólicas que, para el caso de sustratos hidrocarbonados, parten de las enzimas de tipo extracelular que estos organismos liberan al medio (Kadri et al., 2017) ya que estas le permiten metabolizar diferentes sustratos que suelen ser altamente contaminantes.

Al reconocer y aislar las enzimas extracelulares que le permiten a los organismos fúngicos catabolizar en este caso los componentes derivados del aceite de recambio de automóvil que se compone ampliamente de hidrocarburos poliaromáticos ya que, como plantean Cerniglia y Sutherland (2010) eliminar las condiciones que requiere el organismo para la degradación de componentes tóxicos permite reducir costos y aumentar la posibilidad de degradación de los sustratos contaminantes, por ende, este trabajo tiene como finalidad detectar enzimas extracelulares encontradas en los sobrenadantes de cultivo *in vitro* de *Cladosporium cladosporioides* una especie de hongo que ha sido empleado en procesos de biorremediación de contaminantes como los hidrocarburos poliaromáticos (Kadri et al., 2017) y que podrían tener potencial en la biodegradación de los componentes que conforman el aceite de recambio de automóvil de motor, utilizando para ello la separación mediante peso molecular por electroforesis, con el fin de detectar las posibles enzimas extracelulares relacionadas con la degradación de este tipo de contaminantes.

2. PLANTEAMIENTO PROBLEMA

Los aceites de recambio de automóvil utilizados como aceite de motor, al ser vertidos en desagües o campos abiertos, son altamente contaminantes ya que; este tiene diversos compuestos químicos que incluyen metales pesados como: cromo, cadmio, arsénico plomo, etc; además de hidrocarburos poliaromáticos y benceno son complejos que, al ser menos densos que el agua se extienden formando películas que alteran los procesos biológicos que ocurren en los medios acuáticos, (Zambrano et al., 2012) como por ejemplo: el nivel de oxigenación (alterando los procesos de reaireación y fotosíntesis). Igualmente, al contener metales pesados capaces de bioadsorberse debido a su liposolubilidad se consideran altamente cancerígenos.

En Colombia, el desecho de aceites de recambio de automóvil, se ha reglamentado mediante leyes y decretos, registrados como residuos tóxicos y peligrosos especificados en las leyes 253 de 1996, 1252 de 2008; además de los decretos 283 de 1990 y 4741 de 2005. Sin embargo, los vertederos clandestinos persisten, por lo que se considera un problema de salud pública importante en el país.

Por ende, se hace necesario encontrar y evaluar maneras alternativas de realizar la degradación de este tipo de contaminantes de los medios acuosos. Las proteínas enzimáticas extracelulares, son complejos peptídicos que son liberados al medio por un organismo vivo; estas le permiten al mismo degradar estructuras complejas para su utilización interna, especialmente para la adquisición de diversas fuentes de carbono para procesos metabólicos internos ya que, este tipo de proteínas se encargan de romper sustratos encontrados en el medio, lo que hace de este tipo de proteínas un objeto de estudio en procesos de degradación de contaminantes de tipo orgánico (Márquez et al., 2015). Por ende, se hace preciso determinar cómo afecta la interacción de proteínas extracelulares de organismos condicionados a medios líquidos contaminados con aceite de recambio de automóvil, en la degradación de este tipo de sustratos.

3. JUSTIFICACIÓN

Los aceites de recambio de automóvil se constituyen principalmente de hidrocarburos poliaromáticos provenientes del crudo del petróleo que, el cual es de por sí, es bastante contaminante debido a su composición que resulta ser cancerígena y mutágena por lo que se considera peligroso cuando es liberado a un medio bien sea acuático, aéreo o terrestre; sin embargo, este resulta ser mayormente contaminante una vez desechado, ya que durante su utilización este aceite adquiere además moléculas como carbón, cromo, arsénico, plomo, níquel, sílice, entre otros, que se derivan de procesos de combustión, del desgaste de piezas o de la combinación de este con otros fluidos, los cuales además de ser cancerígenos son altamente tóxicos, (Zambrano et al., 2012) sobre todo en medios acuáticos los cuales se ven mayormente afectados debido a que estos compuestos crean una película en la superficie que impide la correcta transferencia de oxígeno con el medio, estos contaminantes pueden además generar efectos tóxicos que afectan la fauna y flora presente en los ecosistemas acuáticos; igualmente, debido a los componentes descritos con anterioridad estos aceites suelen sedimentarse en el fondo de las fuentes hídricas lo que permite la contaminación indeterminada del vertiente acuático en donde se encuentran. Una de las principales problemáticas a la hora de manejar residuos que contengan aceites de recambio de automóvil, es el manejo inadecuado de los mismos ya que, si estos llegan hasta el sistema de alcantarillado, a rellenos sanitarios o a los botaderos a cielo abierto, pasarán a ser lixiviados que pueden llegar a contaminar reservas de agua importantes como las fuentes hídricas subterráneas.

Debido a la problemática que conlleva deshacerse apropiadamente de este tipo de residuos, que en Colombia son considerados como residuos peligrosos mediante las leyes 253 de 1996 y 1252 de 2008 (Ministerio de ambiente, 2014) que pretenden regular el destino final de residuos como el aceite de recambio de automóvil usado sin embargo, no son medidas verdaderamente eficientes a la hora de erradicar apropiadamente este tipo de contaminantes ya que se estima que en Colombia 31 millones de galones de aceite de recambio de automóvil usado no tiene una adecuada disposición final (Ziolo et al., 2015); de estos, se conoce que únicamente el 38% que equivale a un total de 8'283.000 galones al año son reutilizados, en cuanto al resto, no se tiene certeza de su paradero final por lo que es posible deducir que terminan siendo vertidos en alcantarillados, vertederos, rellenos sanitarios o en fuentes hídricas, que como se estipula anteriormente, genera grandes afectaciones en la salud pública y en el ecosistema.

Ya que este tipo de contaminantes genera grandes afectaciones y a causa del manejo desmedido que se le da a pesar de la regulación estatal, se hace importante encontrar alternativas para el tratamiento

de aceites contaminantes que permitan una mejor compactación de los residuos tóxicos, ayudando así al control sanitario y a la remediación de hábitats contaminados por estos. Una excelente alternativa a la hora de tratar este tipo de afecciones es la biorremediación, que resulta ser una opción a los procedimientos tradicionales de mitigación en ambientes contaminados, ya que resulta ser más económica, menos contaminante y más eficaz a la hora de reducir, eliminar o transformar contaminantes en suelo, agua o aire, los procesos de biorremediación son llevados a cabo por microorganismos como hongos, bacterias o algas quienes emplean proteínas (enzimas) extra o intracelulares para realizar procesos de degradación de moléculas contaminantes (Chandrakant et al., 2011).

Se ha encontrado que los hongos poseen un gran potencial para la degradación de contaminantes derivados del petróleo (Chandrakant et al., 2011) así que, mediante el aislamiento y determinación de las proteínas producidas por hongos que se encuentran involucradas en procesos de biorremediación, sería posible conocer cuáles son los factores proteicos que se encuentran involucrados en este tipo de procesos, lo que, de continuar con los protocolos de aislamiento correspondientes, podría traducirse en una aceleración de los mecanismos de degradación en el medio empleado, ya que se reducirían los procesos necesarios para realizar la degradación de contaminantes como el petróleo a partir de organismos vivos, (Deshmukh et al., 2016) facilitando que la degradación por medio de enzimas extra o intracelulares sea mucho más rápida y eficiente.

Ahora bien, utilizar enzimas extracelulares ha permitido generar avances científicos importantes en áreas como la biotecnología mediante procesos de ingeniería genética en procesos de biodegradación, fermentación (mediante operaciones del Upstream), aplicación industrial, en bioprocesos de producción de enzimas microbianas, entre otras. (Castañeda, 2019)

4. MARCO CONCEPTUAL

4.1 Generalidades y composición de los aceites de recambio de automóvil de motor.

Los aceites de recambio de automóvil, son sustancias que se encuentran en estado líquido y se encuentran derivadas del petróleo hasta en un 85% es por ello que, el principal componente de los aceites de recambio de automóvil son los hidrocarburos de tipo: poliaromáticos con un 45%, además de cicloalcanos con un 30% y finalmente alcanos con un 20% (Pantoja, 2008). Los hidrocarburos poliaromáticos (HAP) componen mayormente la estructura de este tipo de aceites, por ello, se hace necesario describir las características principales de este tipo de compuestos.

Los HAP son hidrocarburos policíclicos que se encuentran formados por varios anillos de tipo bencénico. El benceno C_6H_6 es la construcción fundamental de este tipo de moléculas por lo que varios bencenos unidos por enlaces carbono, compondrán la forma estructural de los hidrocarburos poliaromáticos (Agudo, 2010). Entre sus características físico químicas, los hidrocarburos poliaromáticos se encuentran en medio líquido y son semi volátiles, son compuestos inestables fotoquímicamente por lo que suelen degradarse por la luz; además de ser lipolíticos y por ende, suelen a unirse a moléculas lipídicas y se disuelven en estas permitiendo que estas puedan adherirse a organismos vivos y causar problemáticas que van desde cáncer hasta complicaciones de tipo mutagénico (Zambrano et al., 2012)

PAH	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	A	B	C
Antraceno	0,002 - 0,030	1,6 - 10,8	0,5 - 4,4
Benzo[α]pireno	0,008 - 0,266	5,2 - 35,1	0,7 - 11,9
Benzo[e]pireno	0,030 - 0,402	6,4 - 48,9	1,3 - 10,7
Benzo[ghi]perileno	0,010 - 0,139	4,4 - 85,2	2,1 - 16,0
Benzofluoranteno	0,013 - 0,234	5,7 - 44,3	1,8 - 16,8
Trifenilo + criseno	0,182 - 11,9	8,7 - 74,0	5,1 - 42,8
Coroneno	0,001 - 0,016	2,8 - 29,4	0,1 - 6,4
Fluoranteno	0,008 - 2,750	3,4 - 109,0	1,3 - 58,9
Indeno (1,2,3-cd) pireno	0,001 - 0,020	2,1 - 12,5	0,8 - 9,0
Perileno	0,007 - 0,224	1,9 - 10,0	0,4 - 2,7
Pireno	0,039 - 6,530	5,7 - 326,0	1,4 - 78,0

A - Aceite de motor nuevo, B - Aceite de motor usado (vehículo gasolina)
y C - Aceite de motor usado (vehículo diesel).

Tabla 1. Contenido de HPA en los diferentes aceites de motor. En la tabla se evidencia la composición de hidrocarburos poliaromáticos que se encuentran presentes en el aceite de recambio de automóvil para **A.** Aceite de motor nuevo, **B.** Aceite de motor usado de un vehículo que emplea gasolina, mientras que la **C.** Evidencia los HPA presentes en vehículos con diesel. Fuente: Ziolo et al., 2015. Biorremediación de suelos contaminados con aceites usados de motor.

4.2. Contaminación de medios acuáticos por aceites de recambio de automóvil y su impacto ambiental

El agua es un recurso vital para la existencia de la vida tal y como se conoce, a pesar de esto, este recurso se ve constantemente perturbado por la acción antropogénica en relación a las actividades industriales, domésticas, por prácticas agrícolas, entre otros. La mayoría de contaminantes presentes en el agua son de origen orgánico sustancias como aceites, grasas, colorantes y herbicidas son principales fuentes de contaminación de corrientes acuáticas. (Morales, 2012)

Una de las principales causas de contaminación en afluentes hídricas son los aceites derivados de hidrocarburos, como el aceite de recambio de automóvil estos, suelen tener concentraciones cercanas a los 64.625 L/m² (Muñoz, 2017) este material, al ser más densos que la composición del agua se extienden en la superficie formando películas debido a la alta hidrofobicidad que presentan los hidrocarburos (Ziolo et al, 2015) que impiden el intercambio de gases entre el agua y la atmósfera, lo que interrumpe procesos como el ingreso de oxígeno al agua y la salida de dióxido de carbono de la misma impidiendo así procesos naturales como la reaireación o la fotosíntesis, altera también la relación C:N, además las emulsiones de aceite pueden recubrir y por tanto destruir algas y plancton presentes en el ecosistema, las fracciones solubles que cuentan con moléculas de hidrocarburo pueden ejercer una acción tóxica directa debido a su alta liposolubilidad generando así la bioadsorción de un compuesto cancerígeno y mutagénico que, al ser una molécula orgánica puede llegar a producir la acidificación del agua junto con bajos niveles de oxígeno disponible para su metabolización; estas

sustancias pueden sedimentarse llegando hasta el fondo de las fuentes hídricas destruyendo bentos y áreas donde algunas especies soban y realizan procesos metabólicos. (Morales, 2012)

4.3. Degradación de aceites de recambio de automóvil mediante biorremediación.

Debido al impacto actual que tienen en el planeta los desastres antropogénicos causados en el ecosistema, se hace necesario encontrar alternativas que sean ambientalmente sostenibles y más económicas que los tratamientos convencionales es allí, donde campos como la biorremediación que se resume como los diversos procesos de descontaminación que utilizan organismos vivos como hongos, bacterias o algas, (Vásquez et al., 2010) bien sea por atenuación natural en la que se emplean consorcios nativos *in situ*, por bioestimulación en la cual se controlan los macro y micronutrientes de los consorcios a la hora de realizar la degradación de sustancias contaminantes o, finalmente por bioaumentación que se refiere a la adición de microorganismos al medio con el fin de incrementar satisfactoriamente la remoción del sustrato contaminante del medio trabajado. (Ziolo et al., 2015)

En trabajos realizados mediante la biorremediación de medios contaminados con aceites de recambio de automóvil se ha encontrado que bajo procesos de atenuación natural los porcentajes de eficiencia de remoción de hidrocarburos contenidos en este tipo de aceites llega a 95% en un tiempo de 120 días (Vásquez et al., 2010) o procesos realizados mediante la bioaumentación con porcentajes de degradación de hasta 93.7% de hidrocarburos poliaromáticos presentes en los aceites de recambio de automóvil en un plazo de 90 días (Anza, 2016). Además, en procesos relacionados a la biorremediación de medios que posean hidrocarburos poliaromáticos se ha encontrado eficiencias de hasta el 61,74% con el uso organismos fúngicos debido a las condiciones enzimáticas y resistentes de los mismos (Márquez et al., 2015).

4.3.1. El papel de los hongos en la biodegradación de contaminantes derivados del petróleo

El papel de los hongos en procesos de biorremediación de contaminantes derivados del petróleo como es el caso de los aceites de recambio de automóvil es vital ya que los hongos presentan una gran estabilidad en los pH ácidos que resultan como un producto asociado a la degradación o adsorción de hidrocarburos además de mostrar una óptima resistencia a los metales pesados derivados de este tipo de contaminantes por lo que, a la hora de tratar contaminantes como los HAP, resultan más eficientes que las bacterias (Mineki, 2015).

Se ha determinado que, aunque los hongos no utilizan de forma óptima los hidratos de carbono pertenecientes a los HAP si se encuentra que logra co-metabolizar este tipo de hidrocarburos oxidando sus moléculas a través de enzimas extracelulares (Karigar y Rao, 2011) y las cuales pueden penetrar los contaminantes del medio y remover por tanto a los hidrocarburos presentes allí (Kadri et al., 2017), se conoce además que hongos como *Cladosporium cladosporioides*, *Cylindrocarpon destructans* o *Penicillium brevicompactum* han sido ampliamente reportados en procesos asociados a la degradación de los componentes hidrocarburos aromáticos (Anderson et al., 2003 en: Cerniglia y Sutherland, 2010)

4.3.2. El papel de *Cladosporium cladosporioides* en la biodegradación de HPA.

Cladosporium cladosporioides es un hongo filamentoso, que pertenece al filo Ascomycota y se caracteriza por tener una coloración oscura que, cuando se encuentra en medios con contaminantes pesados, toma un color negro por eso se conoce de esta manera. Al ser saprófito puede colonizar medios variados, que abarcan material orgánico como madera, paja, frutas y arbustos hasta plásticos, productos cosméticos, pinturas y combustibles fósiles, (Vega, 2011), como el caso del aceite de recambio de automóvil que cuenta con una alta composición de HPA. Los rangos de adaptación que tiene esta especie, se deben a que, como plantean Agrawal (2018), cuentan con una ruta co-metabólica que se encarga de la degradación por rutas periféricas de los hidrocarburos poliaromáticos, es decir, que a partir de la síntesis de compuestos intermedios realizados por las enzimas extracelulares liberadas al medio, que se da el proceso de metabolización de la fuente de carbono. Es por ello que sólo la síntesis de enzimas extracelulares permitirá la degradación de este tipo de contaminantes por parte de *C. cladosporioides* y que estará sujeta, por lo tanto, a la fase exponencial de crecimiento ya que es allí donde se debe realizar una mayor cantidad de procesos co-metabólicos que permitan el rompimiento de este tipo de moléculas.

Es debido a estos procesos co-metabólicos realizados por esta especie y otras de su género, que se ha evidenciado una eficiencia de hasta el 85.7% (Agrawal, 2018) a la hora de degradar compuestos poliaromáticos, por lo que *C. cladosporioides* cuenta con diversos estudios que lo utilizan debido a este tipo de rutas co-metabólicas en la biorremediación de suelos y medios líquidos con contaminantes hidrocarburos.

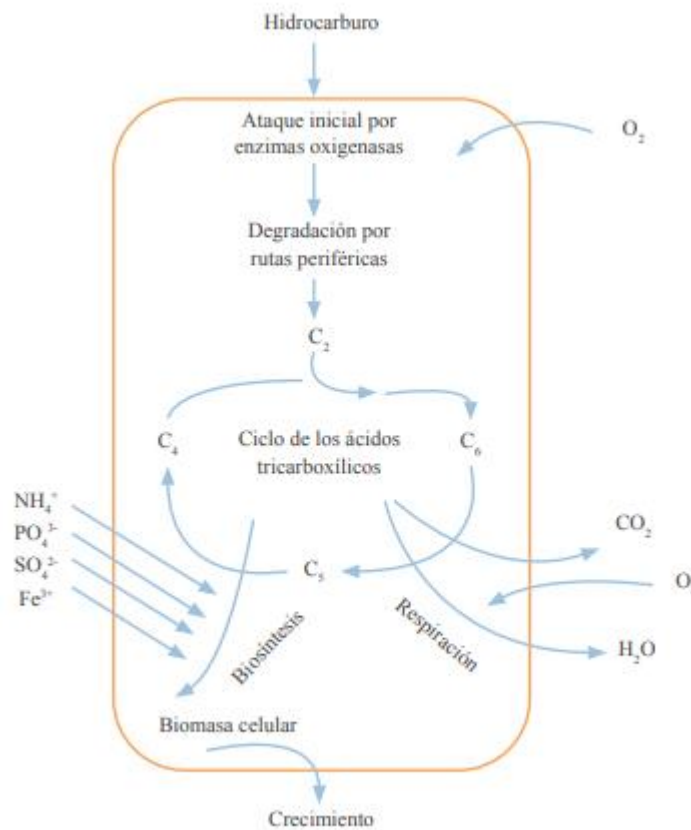
4.3.3. Rol de las enzimas presentes en los hongos en la biorremediación de productos derivados de hidrocarburos poliaromáticos

Debido a la relevancia con la que cuentan los hongos en procesos de biorremediación, se ha estudiado en los últimos años las interacciones enzimáticas con las que cuentan estos organismos para lograr habituarse en medios que poseen por ejemplo HAP. (Kweon et al., 2011) Las relaciones enzimáticas complejas que establecen los hongos con el medio se establecen precisamente con la habilidad que poseen estos organismos para liberar enzimas de tipo extracelular al medio (Márquez, 2014).

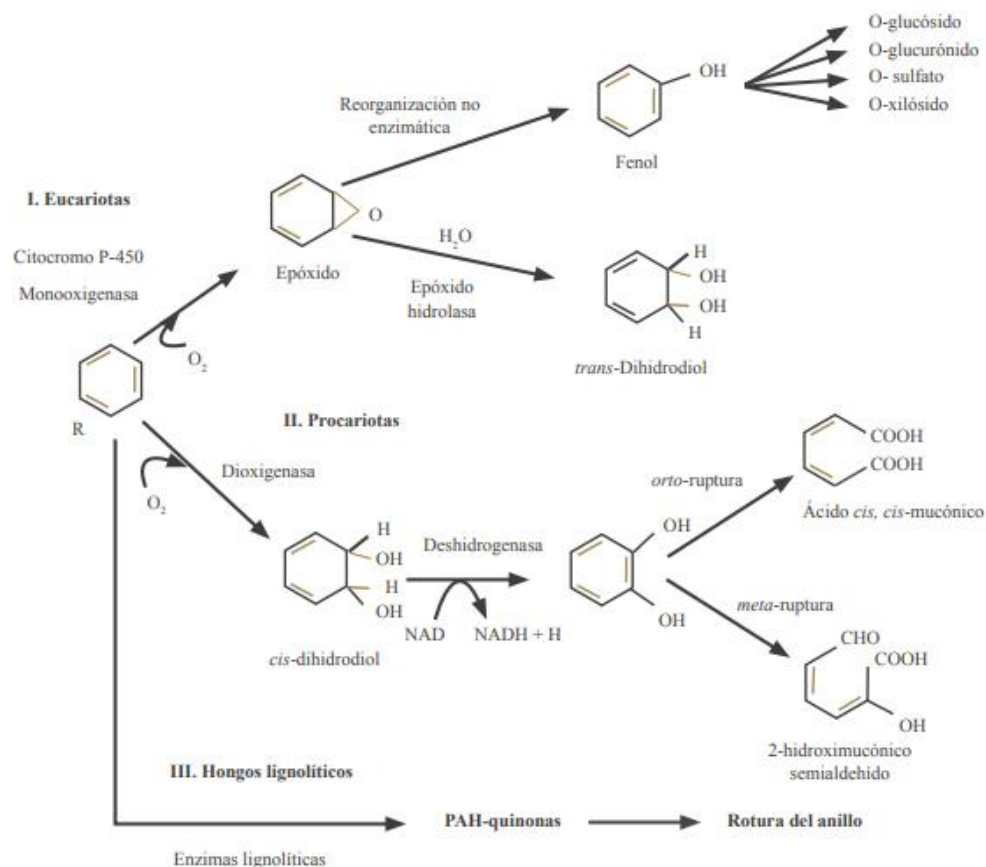
Las reacciones enzimáticas en hongos fueron estudiadas primeramente mediante un complejo enzimático que, se encarga en un primer momento de la degradación de lignina que responde a los medios normalmente asociados habitualmente con este tipo de organismos (Cerniglia y Sutherland, 2010) se ha encontrado que, los hongos emplean enzimas pertenecientes a las peroxidadas, con un peso molecular entre los 150 - 240 KDa y las dioxigenasas con un peso molecular de 90 KDa (Herrera, 2014) que son empleadas habitualmente en procesos de oxidación de lignina pero que, al entrar en contacto con medios ricos en HAP permiten la degradación de las interacciones entre hidrocarburos como el antraceno y la antraquinona (Kadri et al., 2017) mientras que enzimas extracelulares como las proteínas como las hidrolasas con un promedio de peso molecular entre los 35 - 55 KDa (Herrera, 2014) permiten establecer rutas catabólicas que derivan del rompimiento realizado por las las peroxidadas (Kadri et al., 2017) lo que explica entonces, la capacidad que tienen los hongos para co- metabolizar compuestos hidrocarburos.

Además, al contener interacciones de tipo exoenzimático con el medio, los procesos de degradación de contaminantes sea mucho más eficiente debido a la mineralización que se da en contaminantes como los hidrocarburos poliaromáticos ya que las relaciones establecidas por acción de enzimas como las hidrolasas y las peroxidasas no genera residuos tóxicos (Cerniglia y Sutherland, 2010) además de producir pequeños porcentajes de CO₂ que no resultan significativamente contaminantes para el medio en el que se encuentran.

Estos procesos denominados procesos de co-metabolización, son realizados por cascadas enzimáticas que, dependiendo del tipo de sustrato se organizarán con el fin de dar una biotransformación paso a paso de los sustratos contaminantes a compuestos intermedios que podrán ser metabolizados por el hongo, que, como en el caso del aceite de recambio de automóvil, las enzimas se encargan de transformar los compuestos poliaromáticos generando un trans-dihidrodiol, ya partir de esa reacción, se forma un cis-dihidrodiol rompiendo así el anillo aromático. Posteriormente mediante enzimas deshidrogenasas se reconstruye el anillo aromático formando un anillo diol, que mediante la catálisis de enzimas hidroxilasas se generan nuevos compuestos que pueden ser utilizados por los hongos en la síntesis de energía, como se evidencia en las gráficas 1 y 2.



Gráfica 1. Rutas generales para la degradación aerobia de HPA. En la tabla se evidencian las distintas transformaciones que realizan los hongos a la hora de biodegradar hidrocarburos poliaromáticos. Tomado de Agrawal (2018).



Gráfica 2. Reacciones iniciales en la degradación de HPA. En la gráfica se evidencian las distintas transformaciones metabólicas que se realizan de manera inicial por cada uno de los microorganismos que toman HPA como fuente de carbono, el III, evidencia que la transformación en hongos lignolíticos requiere de las enzimas lignolíticas para la transformación de hidrocarburos en PAH-quinonas, encargadas de la ruptura del anillo aromático

4.4. Perfil electroforético proteínico.

El perfil electroforético permite identificar las proteínas de una muestra problema a partir de los pesos moleculares de cada una de las proteínas (que pueden ser enzimas o proteínas dependiendo de su peso y papel dentro de los procesos metabólicos). Para la realización de un perfil electroforético es necesario contar con una máquina de electroforesis vertical que, mediante el paso de corriente de catión a anión, realiza el desplazamiento de cada una de las muestras que, dependiendo de su peso molecular y de la viscosidad del medio se ubicarán en un espacio determinado del gel poliacrilamida, que es empleado para la separación de cada una de las cargas péptidas. Una vez corridas las muestras, estas deben ser teñidas empleando un colorante que posea adhesión a las proteínas, como el caso del azul de Coomassie, con el fin de poder visualizar las cargas que, serán comparadas con marcadores de peso molecular (proteínas cuyo peso molecular ya es conocido) que servirán para realizar una identificación efectiva de cada uno de los pesos presentes en la muestra. (González, 2017)

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Detectar enzimas en los sobrenadantes recuperados de cultivos in vitro de *Cladosporium cladosporioides* asociadas a posibles procesos de biodegradación de aceite de recambio de automóvil con perfiles electroforéticos.

5.2. Objetivos específicos

- Cultivar medios líquidos con condiciones óptimas de crecimiento *Cladosporium cladosporioides* usando como única fuente de carbono aceite de recambio de automóvil, para estimular la producción de enzimas asociadas con la biodegradación del aceite.
- Concentrar las proteínas presentes en los sobrenadantes de los cultivos.
- Realizar corridos electroforéticos a los concentrados de proteínas obtenidas de los sobrenadantes.
- Analizar los patrones electroforéticos obtenidos y determinar si existen proteínas relacionadas con la presencia del aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono con la degradación del sustrato.

6. HIPÓTESIS

H1: En los sobrenadantes obtenidos de los cultivos líquidos de *Cladosporium cladosporioides*, donde se utiliza como única fuente de carbono aceite de recambio de automóvil existen perfiles electroforéticos diferenciados.

H0: En los sobrenadantes obtenidos de los cultivos líquidos de *Cladosporium cladosporioides*, donde se utiliza como única fuente de carbono aceite de recambio de automóvil no existen perfiles electroforéticos diferenciados.

7. METODOLOGÍA

El diseño experimental del siguiente trabajo, fue desarrollado en la Facultad de Medio Ambiente y Recursos Naturales, en los laboratorios de microbiología y biotecnología ambiental, sede Ciudadela Universitaria Bosa Porvenir de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

7.1. Condiciones óptimas de crecimiento de *C. cladosporioides* empleando aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono.

Para la realización de esta investigación se utilizó el hongo incubado en el cepario del laboratorio de microbiología de la Universidad Distrital, mientras que el aceite de recambio de automóvil fue obtenido del cambio de un automóvil a los 10.000 km recorridos y esterilizado en el laboratorio de microbiología. La composición del mismo se expone en la tabla 1 del presente estudio. Por lo que, de un medio cultivo puro sólido se tomó un cuadrado de 1x1 cm de *C. cladosporioides* para realizar la siembra en diferentes concentraciones de aceite de recambio como será expuesto a continuación.

Para evaluar las condiciones óptimas de crecimiento para *C. cladosporioides* se preparó un diseño experimental con matriz 3^3 teniendo en cuenta la metodología de Orozco et al (2015). Se estimó la

concentración de aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono en concentraciones de 1%, 1.5% y 2.0%, que se preparó mediante la emulsificación del aceite con 1.5 mL de tween 40. Adicionalmente, el medio de cultivo contaba con trazas de sales mínimas y peptona al 1%. Durante 5 semanas se evaluó el crecimiento del hongo de acuerdo al diámetro del área micelial que fue medido con el uso de hojas milimetradas.

7.2 Cultivo del hongo para la proliferación de enzimas extracelulares

Una vez identificadas las condiciones óptimas de crecimiento, se preparó un medio líquido de 300 mL con un 2% de concentración de aceite de recambio, 5mL de sales mínimas y 1% de peptona. Posteriormente se sembró el hongo y se incubó en agitación continua a 120 rpm con una temperatura de 25°C, durante los primeros siete días, el cultivo permaneció en oscuridad absoluta, con el fin de permitir la proliferación de enzimas intracelulares relacionadas a los factores de degradación de estos compuestos.

A partir de la primera semana de incubación, siguiendo la metodología de Giraldo y Piragauta (2000) se tomaron 4 mL de medio líquido y se centrifugaron a 2000 rpm durante 2 minutos con el fin de separar el aceite y el componente micelial del sobrenadante, ya que es allí donde se encontraban contenidas las enzimas extracelulares liberadas al medio por *C. cladosporioides*. Dichas recuperaciones se realizaron dos veces, es decir que se tomaron un total de 8mL de muestra por semana durante un mes, para un total de ocho muestras extraídas.

Estas muestras fueron ubicadas en cajas de Petri estériles y fueron incubadas a una temperatura de -4°C hasta su deshidratación completa. Posteriormente, se recuperó en tubos eppendorf que contenían 1mL de buffer BPS-EDTA, con el fin de realizar la separación mediante el peso molecular de cada una de ellas.

7.3 Aislamiento de enzimas obtenidas del medio de cultivo

Una vez recuperadas las ocho muestras, se realizaron los protocolos pertinentes para la detección de enzimas extracelulares que, para esta fase se encuentran en el medio, para ello se empleo el ensayo de Bradford, que consiste en la fijación del colorante azul brillante Coomassie G-250 a las proteínas mediante la unión al ácido fosfórico presente en las mismas y cuya interacción da como resultado una coloración azul, cuya intensidad varía dependiendo de la cantidad de proteína encontrada en la muestra (Bradford, 1976) mediante este ensayo, se evaluó la concentración de las proteínas problema versus la concentración de una proteína conocida, para este caso se empleó Albúmina fracción V (BSA) con el fin de realizar la curva de calibración necesaria para la determinación de la cantidad de proteínas presentes en las muestras.

Para ello se emplearon diferentes concentraciones de BSA que variaban su concentración entre el 5% hasta el 100% contenido en 100 µg/mL, en cuanto a las muestras problema, se emplearon 100 µL de cada una. Posteriormente, se midió la absorbancia empleando el espectrofotómetro Thermo Scientific UV a una longitud de onda 595 nm, posteriormente se realizó la curva de concentración proteica.

7.4 Separación de enzimas mediante peso molecular

Para la separación enzimática mediante peso molecular se empleó la electroforesis bidimensional SDS-PAGE en gel poliacrilamida con SDS al 10% utilizando para ello la máquina de electroforesis vertical Thermo scientific OWL P8DS. Empleando la metodología expuesta por Giraldo y Piragauta (2000) se tomó como marcador de peso molecular Albúmina fracción V (BSA), con una concentración de 0.5 mg/mL, mientras que las muestras problema contaban con una concentración de 10 mg/mL. Se tomaron 20µL de cada una, ocupando un total de 9 carriles verticales. Posteriormente, fueron corridas a 90V durante 1 hora. Una vez terminado el proceso, el gel obtenido fue coloreado empleando solución de azul de Coomassie G-250 durante 12 horas. Finalmente, fue decolorado con concentraciones de metanol 30:10 y ácido acético 10:30 por 5 horas, luego de esto, se tomaron las fotografías pertinentes del gel obtenido para su posterior análisis.

7.5 Evaluación de la posible actividad enzimática de las proteínas aisladas.

Una vez identificadas las proteínas presentes en el sobrenadante del medio de cultivo, se realizó una prueba preliminar de la actividad de las enzimas extracelulares identificadas, para ello se empleó la metodología de Giralgo y Piragauta (2000). Se centrifugaron 900µL de cada una de las muestras proteicas aisladas a 4000 rpm durante 10 minutos, luego, mediante sensidiscos sumergidos previamente en el pellet obtenido, se ubicaron las enzimas presentes en el sobrenadante en cajas de Petri con medio sólido con una concentración de 2.0% de aceite de recambio de automóvil, con el fin de evaluar la aparición de halos alrededor de los sensidiscos empleados.

8. RESULTADOS

8.1. Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *C. cladosporioides* con aceite de recambio de automóvil como único sustrato.

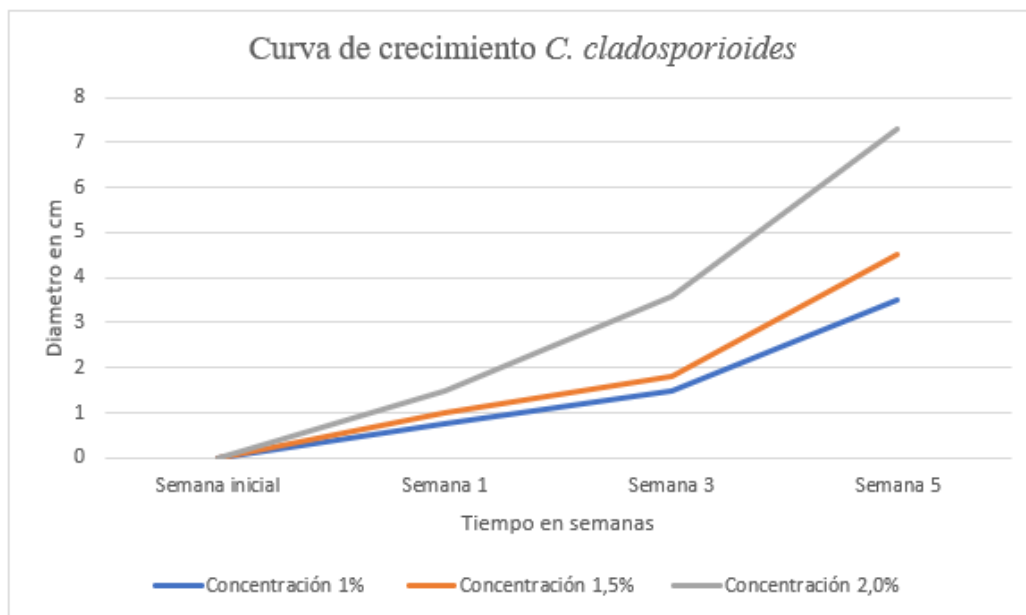
En cuanto a las constantes, en el diseño se empleó un pH inicial de 7.3 y se incubó a una temperatura de 25°C por un tiempo de cinco semanas con el fin de evaluar la fase exponencial de crecimiento ya que como plantean Chandrakant et al., (2011) es en esta fase donde se presenta una mayor proliferación de proteínas extracelulares.

Con el fin de evaluar el crecimiento de *C. cladosporioides* a través del tiempo, se realizaron tres mediciones en un total de cinco semanas, empleando para la medición del diámetro del área micelial una hoja milimetrada.

SEMANA 1	SEMANA 3	SEMANA 5
Concentración 1.0%	Concentración 1.0%	Concentración 1.0%
Diámetro repetición 1 0.8 cm	Diámetro repetición 1 1.5 cm	Diámetro repetición 1 3.5 cm
Diámetro repetición 2 0.6 cm	Diámetro repetición 2 1.7 cm	Diámetro repetición 2 3.3 cm
Diámetro repetición 3 0.8 cm	Diámetro repetición 3 1.3 cm	Diámetro repetición 3 3.7 cm
Concentración 1.5%	Concentración 1.5%	Concentración 1.5%
Diámetro repetición 1: 1.0 cm	Diámetro repetición 1 2.0 cm	Diámetro repetición 1 4.5 cm
Diámetro repetición 2 0.8 cm	Diámetro repetición 2 1.9 cm	Diámetro repetición 2 4.3 cm
Diámetro repetición 3 1.2 cm	Diámetro repetición 3 1.7 cm	Diámetro repetición 3 4.7 cm
Concentración 2.0%	Concentración 2.0%	Concentración 2.0%
Diámetro repetición 1 1.5 cm	Diámetro repetición 1 2.5 cm	Diámetro repetición 1 7.5 cm
Diámetro repetición 2 1.3 cm	Diámetro repetición 2 3.7 cm	Diámetro repetición 2 7 cm
Diámetro repetición 3 1.2 cm	Diámetro repetición 3 3.4 cm	Diámetro repetición 3 7.6 cm

*Tabla 2. Matriz 3.³ Diámetro de crecimiento de *C. cladosporioides* en diferentes concentraciones de aceite de recambio de automóvil. Se evidencian los diámetros de crecimiento de cada una de las repeticiones para cada una de las semanas, allí se evidencia que el mayor crecimiento del organismo se dio con el 2% de concentración.*

Empleando la tabla 2, se determinó la curva de crecimiento del microorganismo mediante el promedio de los diámetros obtenidos en cada repetición (véase gráfica 3), posteriormente, a partir de la pendiente de curva de crecimiento en cada concentración del sustrato, se determinó la velocidad de crecimiento en centímetros por semana (cm/s) para cada una de las repeticiones (Orozco et al., 2015) que, para el caso de la concentración al 1% fue de 0.685 cm/s, para la concentración al 1.5 fue de 0.875 cm/s por último, la velocidad de crecimiento con sustrato al 2% fue de 1.5 cm/s.



Gráfica 3. Curva de crecimiento *C. cladosporioides* en medios con aceite de recambio de automóvil. En la gráfica se evidencia el crecimiento en centímetros a lo largo de cinco semanas de *C. cladosporioides* con aceite de recambio de automóvil al 1%, 1.5%, 2.0%. A partir de la gráfica se determinó la velocidad de crecimiento en centímetros por semana para cada uno de los cultivos en donde se evidencia un crecimiento similar para las concentraciones del 1% y 1.5% mientras que la concentración al 2.0%, con un crecimiento total de 7.2 cm en la semana 5, resulta ser la más adecuada para el crecimiento de *C. cladosporioides* en medio con aceite de recambio de automóvil.

8.2 Concentración de enzimas extracelulares obtenidas del medio de cultivo.

Una vez determinadas las condiciones óptimas para el crecimiento de *C. cladosporioides*, se preparó un cultivo líquido de 300 mL con una traza de sales mínimas, una concentración del 2% de sustrato (aceite de recambio de automóvil) y 1.0% de peptona (véase anexo 1), con un pH de 7.3, dicho medio de cultivo se inoculó con un total de 2.3×10^8 esporas recuperadas de las cajas de Petri empleadas en la matriz 3³, dichas esporas fueron previamente contenidas en 1 mL de buffer BPS.

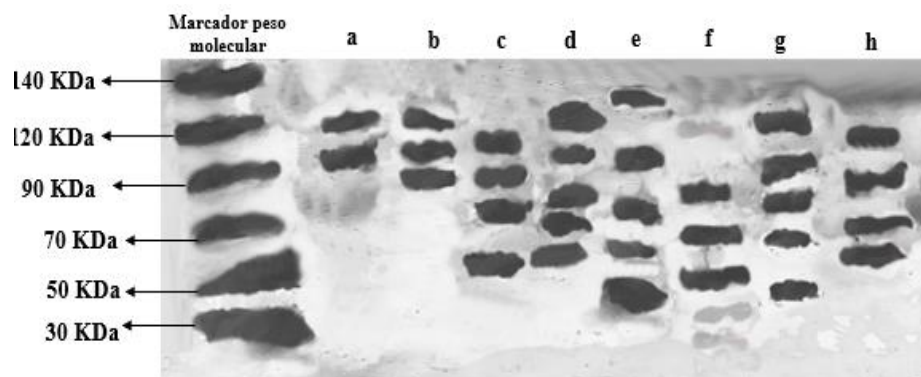
Posteriormente, se realizó un ensayo de Bradford con el fin de determinar la concentración de proteínas presentes en cada una de las ocho muestras, evidenciados en la tabla 3, estos datos permitieron la construcción de la curva de concentración proteica lo cual permitió determinar la cantidad de proteínas expresadas en $\mu\text{g/mL}$ que serían determinadas empleando electroforesis SDS-PAGE al 10% (véase tabla 3).

MEDICIONES	REACTIVOS			RESULTADOS	
	Proteína estándar $\mu\text{g/mL}$ (BSA)	Agua destilada	R de Bradford (mL)	$A_{595\text{ nm}}$	Concentración de proteínas
Blanco	0	100	1	0.000	0%
1	5	95	1	0.087	5%
2	10	90	1	0.125	10%
3	20	80	1	0.190	20%
4	30	70	1	0.208	30%
5	40	60	1	0.220	40%
6	50	50	1	0.226	50%
7	60	40	1	0.231	60%
8	70	30	1	0.240	70%
9	80	20	1	0.248	80%
10	90	10	1	0.250	90%
11	100	0	1	0.256	100%
MUESTRAS					
M1	100	0	1	0.118	10%
M2	100	0	1	0.123	10%
M3	100	0	1	0.150	10%
M4	100	0	1	0.157	10%
M5	100	0	1	0.167	10%
M6	100	0	1	0.170	10%
M7	100	0	1	0.180	10%
M8	100	0	1	0.308 (0.155 después de dilución)	15%

Tabla 3. Ensayo de Bradford. Se evidencian las concentraciones proteicas pertenecientes a 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada una de las ocho muestras obtenidas del sobrenadante del medio de cultivo de *C. cladosporioides* se determinó mediante la curva de calibración que la concentración de las mismas osciló entre el 10-15% de concentración teniendo en cuenta para ello, la absorbancia obtenida en 595 nm de longitud de onda.

8.3 Separación de enzimas extracelulares mediante el peso molecular.

Mediante el método de Bradford fue posible determinar la cantidad de proteínas necesarias para realizar la separación de molecular utilizando electroforesis SDS-PAGE al 10% con el fin de rastrear aquellas enzimas involucradas en la degradación de aceite de recambio de automóvil, evidenciados en la tabla 3.



Gráfica 4. Electroforesis muestras problema. Se evidencian los distintos pesos moleculares, de izquierda a derecha se ubican: el marcador de peso molecular BSA con pesos entre los 30 y los 140 KDa el carril a) la muestra 1 con pesos moleculares entre los 50 y los 70 KDa al igual que el carril b) con la muestra 2; las muestras 3 y 4 ubicadas en los carriles c) y d) evidencian pesos moleculares entre los 50 y 120 KDa; la muestra 5, en el carril e) cuenta con pesos moleculares que oscilan entre los 30 KDa y los 120 KDa; la muestra 6 ubicada en el carril f) evidencia pesos moleculares entre los 50 y 140 KDa; por último, las muestras 7 y 8 ubicadas en los carriles g) y h) respectivamente registran pesos moleculares entre los 50 y 120 KDa.

Una vez evidenciadas las bandas de pesos moleculares, se realizaron los radios de frecuencia (Rf) para cada una de estas, con el fin de calcular el peso molecular (PM) se realizó la regresión lineal a partir de la curva estándar de pesos moleculares del marcador (BSA) para cada una de las bandas evidenciadas en la tabla 3.

MUESTRA 1	Bandas	Rf	PM	Tipo de enzima
	1	32	130,7	Peroxidasa
	2	24	93,8	Dioxigenasa
MUESTRA 2	1	32	130,7	Peroxidasa
	2	24	93,8	Dioxigenasa
	3	21	76,9	Lacasa
MUESTRA 3	1	26	107,1	Dioxigenasa
	2	23	87,8	Lacasa
	3	18	63	Lacasa
	4	12	42,3	Monoxigenasa
MUESTRA 4	1	29	139,4	Peroxidasa
	2	25	100,2	Lacasa
	3	20	71,9	Lipasa
	4	16	55,2	Hidrolasa
	5	13	45,2	Monoxigenasa
MUESTRA 5	1	32	139,4	Peroxidasa
	2	25	100,2	Lacasa
	3	18	63	Lacasa
	4	14	48,3	Lipasa
	5	9	34,7	Hidrolasa
MUESTRA 6	1	24	93,8	Lacasa
	2	20	71,9	Lacasa
	3	15	51,6	Lipasa

	4	11	39,6	Lipasa
	5	9	34,7	Hidrolasa
MUESTRA 7	1	29	139,4	Peroxidasa
	2	23	87,8	Lacasa
	3	20	71,9	Lacasa
	4	15	51,6	Lipasa
	5	9	34,7	Monoxigenasa
MUESTRA 8	1	27	114,4	Lacasa
	2	21	76,9	Lacasa
	3	17	58,9	Lacasa
	4	14	48,3	Hidrolasa

Tabla 4. Pesos moleculares por muestra. Se evidencian los pesos moleculares en KDa obtenidos a través de la regresión lineal construida a partir de la proteína BSA, se observan las bandas pertenecientes a cada muestra con sus respectivos Rf. Las bandas de cada una de las muestras fueron leídas de arriba abajo, es decir, en el orden del peso molecular más grande al más pequeño.

8.4 Evaluación de la posible degradación de aceite de recambio de automóvil a partir de enzimas extracelulares recuperadas

Para la evaluación de la degradación de las enzimas aisladas se incubaron en medio sólido dos cajas de Petri con una concentración de 2.0% , allí se ubicaron 4 sensidiscos por caja que contenían las proteínas evaluadas en el perfil electroforético concentradas con anterioridad. La evaluación se realizó cuatro días después de la inoculación de las proteínas teniendo en cuenta para ello, la aparición de halos alrededor de cada una de las muestras que indicaban la degradación de aceite de recambio de automóvil del medio.

Número de muestra	Presencia de halo	Diámetro del halo en cm
1	No	0
2	No	0
3	No	0
4	Sí	0,3
5	Sí	0,3
6	Sí	0,5
7	Sí	0,6
8	Sí	0,6

Tabla 5. Evaluación de la degradación de aceite de recambio de automóvil en caja de Petri. En la tabla se evidencia la presencia o ausencia del halo de degradación para cada una de las muestras problema luego de cuatro días de incubación a una temperatura de 25°C.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

9.1 Condiciones óptimas de crecimiento de *C. cladosporioides* con aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono.

A partir del diseño experimental fue posible determinar, como se evidencia en la tabla 2 mediante las mediciones del área micelial del hongo semana a semana que las condiciones óptimas, centradas en la concentración de aceite de recambio de automóvil adecuadas para el crecimiento de *C. cladosporioides* se dan bajo una concentración del sustrato problema al 2.0% ya que en esta concentración alcanzó un crecimiento promedio total de 7.2 cm, como se evidencia en la gráfica 1 y una velocidad de crecimiento total de 1.5 cm/s que obtenida mediante el análisis de la pendiente de la curva, resultó ser mucho mayor a la encontrada en las concentraciones del 1% y 1.5%.

La adaptación del hongo a estas concentraciones puede deberse primeramente a las características propias del microorganismo ya que *C. cladosporioides* al ser un hongo de tipo saprófito, es oportunista y si encuentra en el medio las condiciones adecuadas (medidas en la cantidad de carbono presente en el mismo) generará mayor capacidad catabólica debido a que, *C. cladosporioides* es un hongo ligninolítico, una característica importante a la hora de metabolizar hidrocarburos de tipo HPA ya que como estipulan Cerniglia y Sutherland (2010) este tipo de organismos logran sintetizar enzimas involucradas en la oxidación de pequeñas y grandes cadenas de HPAs por lo que generan un rompimiento mucho más eficiente de estas cadenas, generando una mayor cantidad de carbono utilizable

Además, como plantean Agrawal et al., (2018) al exponer a hongos tolerantes a medios con hidrocarburos, estos alcanzarán una mayor síntesis de enzimas extracelulares, ya que esto se traduce en un mejor acople con el medio debido a que estas van a permitir el rompimiento de cadenas poliaromáticas, generando, como aseguran Kadri et al., (2017) una mayor concentración de hidrocarburos de tipo HPA libres en el medio que pueden ser empleadas por el hongo como única fuente de carbono siempre y cuando las concentraciones empleadas se encuentren en el límite aceptado por el hongo. Lo que generará como se evidenció en el caso de *C. cladosporioides* una mayor velocidad de crecimiento a lo largo de las semanas y es allí en donde se encontrará una mayor cantidad de enzimas extracelulares.

9.2 Concentración de enzimas extracelulares.

Como se evidencia en la tabla 3, los porcentajes de concentración si bien no generan una gran variabilidad ya que estos oscilan entre el 10% y el 15% si evidencian mediante la absorbancia que, la mayor cantidad de enzimas extracelulares se produjo en la fase exponencial de crecimiento a partir de la tercera semana, ya que es en esta fase cuando se ha generado un mayor acople con el medio, que para el caso de medios con contaminantes como aceite de recambio de automóvil se manifestará en una mayor proliferación de enzimas extracelulares que permitan la oxidación y rompimiento de las cadenas poliaromáticas que lo componen (Deshmukh et al., 2016).

Además como se observa en la tabla 3 correspondiente al gel obtenido en el proceso de electroforesis, la mayor proliferación de proteínas se da a partir de la semana 2 (evidenciada a partir del cuarto carril) esto es debido a que, una vez que el hongo libera las primeras enzimas extracelulares al medio

(encargadas de realizar los primeros procesos catabólicos) le es posible generar un mayor crecimiento micelial ya que, como plantean Kadri et al., (2016) una mayor cantidad de enzimas extracelulares se traducen en una mejor adaptación de *C. cladosporioides* al medio ya que ocurren procesos catabólicos más eficientes que cuentan con una mayor cantidad de enzimas.

9.3 Caracterización del perfil electroforético de las enzimas extracelulares de *C. cladosporioides*.

La gráfica 4 evidencia las bandas separadas por pesos moleculares contenidas en cada una de las muestras, la fotografía permite evidenciar el grosor de las proteínas. Ahora bien, en cada una de las muestras se evidenciaron enzimas extracelulares con pesos moleculares entre los 34KDa y 139KDa aproximadamente como se evidencia en la tabla 4, que, por sus pesos moleculares y debido a la presencia de aceite de recambio de automóvil como única fuente de carbono, se encontrarán ligadas a su posible degradación. Estas enzimas son: peroxidasas, hidrolasas, dioxigenasas, lipasas, monooxigenasas y lacasas (Kadri et al., 2016; Chandrakant et al., 2011; Cerniglia y Sutherland, 2010) A continuación, serán descritos los pesos moleculares y características del perfil electroforético encontrado.

Peroxidasas

Las catalasas-peroxidasas son conocidas también como peroxidasas versátiles ya que, como plantea Díaz (2003) son enzimas extracelulares cuyo peso molecular oscila entre los 130 y 150 KDa, como se evidencia en la tabla 4, dichos rangos se encontraron en las muestras 1, 2, 4 y 5 con un PM de 139,4 en todas las ocasiones. Dichas proteínas son producidas únicamente por hongos y bacterias puesto que permiten catalizar la oxidación de lignina principalmente, sin embargo, no se encuentran ligadas únicamente a estos sustratos dado que se ha encontrado que pueden oxidar estructuras aromáticas también, como en el caso de los HPA o fenoles aromáticos de grandes radicales (Chandrakant et al., 2011).

Estas enzimas al ser catalizadoras suelen ser las precursoras de algunas enzimas como las lacasas y proteasas, (Kweon et al., 2011) por lo que como se evidencia en la tabla 3, se encontraron presentes en los carriles a y b correspondientes a la primera semana en que fueron tomadas las muestras, ya que, suelen ser las primeras en ser liberadas al medio debido a que son las primeras responsables de la oxidación de antroceno y antroquinona, compuestos encontrados en el aceite de recambio de automóvil en altas concentraciones (Kadri et al., 2016).

La oxidación de este tipo de compuestos aromáticos deriva en la oxigenación del medio de cultivo por lo que, esto será traducido en mayor disponibilidad de oxígeno que permite que los procesos metabólicos ocurran con mayor rapidez, por lo que su oxidación se traduce en un incremento de biomasa y el comienzo de la fase exponencial del crecimiento del hongo. (Wong, 2008)

Dioxigenasas

Las dioxigenasas, con un peso molecular que oscila entre los 90KDa y 110KDa son enzimas, en el perfil electroforético como lo indica la tabla 4 estas se encuentran presentes en las muestras 1, 2 y 3 es decir, en las primeras semanas de crecimiento micelial. Esto es debido a que, como plantean Kadri

et al., (2016) las enzimas dioxigenasas se catalizan para formar dihidrodiol, que resulta ser la segunda o primera biotransformación de los HPA en su camino a la degradación ya que es allí cuando el anillo aromático es oxidado.

Como se evidencia en la tabla 3, para el carril a y b estas enzimas se encuentran asociadas a las primeras reacciones que realiza *C. cladosporioides* en el proceso de degradación en compuestos poliaromáticos, ya que las dioxigenasas, al captar el oxígeno que es liberado por las peroxidases catalizan la oxigenación para que, los compuestos aromáticos sean transformados en productos alifáticos (Chandrakant, 2011). Por lo que tanto peroxidases como dioxigenasas son primordiales en las reacciones que permiten captar carbono de este tipo de hidrocarburos para que sea utilizado en procesos metabólicos que liberan además grandes cantidades de nitrógeno en los procesos catalizadores.

Lacasas

Las lacasas con un peso molecular entre 50KDa y 100KDa se encuentran evidenciadas en todos los carriles presentes en la tabla 3, registrados en la tabla 4; por lo que cada una de las muestras cuenta con estas enzimas extracelulares esto es debido a que, como plantean Deshmukh et al., (2016) son las lacasas quienes cuentan con un mayor porcentaje de degradación de HPAs debido a sus procesos oxidativos y de desmetilación.

Este tipo de enzimas permiten la oxidación de una gran cantidad de compuestos fenólicos y aromáticos ya que utilizan enzimas como la dioxigenasa para la producción de agua, generando un rompimiento de los enlaces, incluyendo aquellos con tres o cuatro anillos aromáticos presentes en compuestos como el antraceno, benzoflouranteno y flouranteno todos presentes en el aceite de recambio de automóvil como lo indica la tabla 1, por lo que su presencia a lo largo de cada una de las fases de crecimiento del hongo con este tipo de medios se hace importante (Kadri et al., 2016)

Para el caso de las lacasas, como se evidencia en la tabla 4, estas poseen diferentes rangos de peso molecular que, si bien son cercanos, no son iguales lo cual implica el involucramiento de varias lacasas en el proceso de rompimiento de HPAs, este consorcio enzimático es conocido como oxidasas multicopper y son producidas principalmente por hongos y bacterias ya que se encargan además de la oxidación al igual que peroxidases y dioxigenasas del rompimiento de metilos, es decir que permite la desmetilización de los compuestos hidrocarbonatados, generando así una liberación de CO₂ componente que es también empleado como fuente de carbono (Chandrakant, 2011). Las lacasas requieren de grandes concentraciones de nitrógeno para ser catalizadas es por ello que, requieren de las dioxigenasas y peroxidases por lo cual, como es evidenciado en la tabla 3 para los carriles a b y c su aparición en el perfil electroforético es conjunta y necesaria para el proceso de adaptación al medio que realiza el hongo.

Lipasas

Estas enzimas presentan pesos moleculares entre los 29 y 50KDa y se encargan, en condiciones normales de la degradación de lípidos presentes en el medio ya que son extracelulares; sin embargo, también son utilizadas por los microorganismos para romper componentes aromáticos mediante procesos de hidrolización de cadenas orgánicas (Deshmukh et al., 2016).

Como se evidencia en la tabla 4, las muestras 4,5,6 y 7 presentan este consorcio enzimático, es decir que estas enzimas fueron liberadas al medio a finales de la segunda semana de incubación, ya que como plantea Chandrakant (2011) estas proteínas catalizan reacciones como hidrolisis, esterificación, alcoholisis y aminolisis por lo que este tipo de enzimas son requeridas una vez que se hayan realizado los primeros procesos de rompimiento mediante oxidación catalizadas por las enzimas extracelulares caracterizadas con anterioridad y que se encuentran presentes en la primera semana de incubación. Por lo cual, como se evidencia en la tabla 3, las lipasas se van a ubicar en el perfil electroforético a partir del carril **d** una vez que *C. cladosporioides* ha generado las primeras reacciones de degradación de HPAs.

Como se evidencia en la tabla 3, las lipasas presentes en el perfil electroforético tienen distintos pesos moleculares, por lo que, se trata de un consorcio de lipasas que se especializan, como se evidencia en medios con aceite de recambio de automóvil en el rompimiento de los alcoholes catalizados por otras enzimas, como es el caso del hidrodíol.

Hidrolasas

Las hidrolasas presentan un rango de peso molecular entre los 35KDa y 55KDa, se encuentran presentes, como se evidencia en la tabla 4 van a estar presentes en las muestras 4, 5, 6 y 8; ya que al igual que las lipasas se van a encargar de catalizar procesos relacionados con el rompimiento de alcoholes y el rompimiento de cadenas de hidrocarburos mediante la producción de moléculas como el agua (Kweon et al., 2011).

Las hidrolasas son enzimas muy importantes en el rompimiento de moléculas hidrocarbonadas de grandes cadenas, además también rompen cadenas como el dihidrodíol una molécula que desata la oxidación de otros componentes aromáticos presentes en el aceite de recambio de automóvil y que es obtenida a partir de procesos realizados por enzimas como las peroxidasas y las dioxigenasas (Kadri et al., 2016). Por lo que la aparición de lipasas dentro del proceso del rompimiento de los HPA estará ligada a las catalizaciones realizadas previamente por otro tipo de enzimas, es por ello que como se evidencia en la tabla 3, se registrarán en el perfil electroforético a partir del carril **d**, correspondiente a la semana 2 de incubación, ya que al igual que las lipasas, se requieren como sugieren Deshmukh et al., (2016) en procesos ligados a un rompimiento secundario de HPA.

Monooxigenasas

Estas enzimas cuentan con un rango de peso molecular entre los 40KDa y 45KDa, poseen un peso molecular pequeño ya que son de síntesis rápida (Kadri et al., 2016) y se encuentran como lo indica la tabla 4 en las muestras 3 y 4 respectivamente. Este tipo de proteína pertenece a una superfamilia enzimática versátil que se encarga de catalizar reacciones oxidativas en sustratos con gran cantidad de alcanos de grandes cadenas y compuestos hidrocarbonados de gran complejidad por lo que, son biocatalizadores altamente empleados por microorganismos tanto eucariotas como procariotas ya que sólo requieren de oxígeno molecular para su activación (Cerniglia, 2010).

Las monooxigenasas son catalizadoras de procesos como la desulfuración, deshalogenación, desnitrificación, hidroxilación y de la degradación de componentes aromáticos y alifáticos Chandrakant (2011) por lo que su presencia se encuentra ligada a procesos de metabolización

secundaria de HPA ya que es el precursor de la activación de la zona del citocromo P450, presente en hongos lignilíticos para la metabolización de hidrocarburos de gran densidad. Es por ello que, como se evidencia en la tabla 3 se registran en el perfil electroforético en los carriles d y e correspondientes a la segunda y tercera semana de incubación ya que las reacciones catalizadas por este tipo de enzimas se encuentran ligadas a los procesos realizados por las dioxigenasas y peroxidadas, ya que requieren del rompimiento primario de HPA para realizar sus procesos catalizadores.

Este consorcio de enzimas desenvuelve además las acciones de enzimas hidrolasas, (Deshmukh et al., 2016) por lo tanto, como se evidencia en la tabla 3 estas enzimas serán las precursoras de enzimas extracelulares como las lipasas e hidrolasas evidenciadas con mayor frecuencia en el perfil electroforético a partir de la 3 semana, pero su aparición requiere de una degradación primaria de los HPAs presentes en el medio.

9.4. Evaluación preliminar de la degradación de aceite de recambio de automóvil mediante las enzimas extracelulares caracterizadas.

La tabla 5 evidencia que para las muestras que evidenciaban las enzimas 4, 5, 6, 7 y 8 con la presencia de halos alrededor de los sensidiscos, estos halos contaban con un diámetro máximo de 0.6 mm que que, como se evidencia en la tabla 3 para los carriles d, e, f, g y h que son aquellos que presentan una mayor cantidad de bandas proteicas.

Se puede evidenciar entonces la degradación de aceite de recambio de automóvil de una forma más eficiente ya que no se requiere de las condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo, para efectuar su degradación (Kadri et al., 2016), el diámetro de los halos evidenciados en la tabla 5, las muestras 4 y 5 cuentan con un halo de menor diámetro, lo cual permite evaluar que, si bien hay presencia de enzimas que permiten degradar HPA estas son a penas las precursoras de las catalizaciones necesarias para el rompimiento y utilización de este tipo de compuestos aromáticos.

Como lo indica la tabla 5, las muestras 5 y 6 presentan el mayor diámetro lo cual puede explicarse ya que, enzimas como las monooxigenasas permiten generar una catálisis de compuestos mayor teniendo en cuenta, ya que como plantean Deshmikh et al., (2016) es este consorcio el encargado de realizar procesos de desnitrificación y que, en consorcio con proteínas como las peroxidadas, lipasas e hidrolasas (todas presentes en las muestras 4 y 5) generarán un proceso más eficiente de degradación empezando por la oxidación de los compuestos aromáticos, realizados por las enzimas peroxidadas y dioxigenasas, para realizar posteriormente un proceso de hidrolisis realizado por las enzimas hidrolasas y lipasas que desembocará en procesos de desnitrificación y desmetilación de estos compuestos realizados principalmente por monooxigenasas.

Si bien las muestras 6, 7 y 8 poseen halos de más de 0,3 mm estas, al no contar con la presencia de las monooxigenasas las proteínas presentes (hidrolasas, peroxidadas, lipasas, dioxigenasas y mayormente lacasas) necesitarán de más tiempo de catalización entre los procesos realizados ya que como estipula Chandrakant (2011) los procesos de degradación de HPAs requieren de un consorcio agrupado de enzimas que funcionen sucesivamente para romper eficazmente sustratos contaminantes, sin embargo debido al amplio rango de lacasas presentes en estas muestras que, como indican Kandri et al, (2016) son las enzimas encargadas de la catalización de los componentes

secundarios y terciarios en la degradación de HPA que se evidenciaron halos cuyos tamaños, como se evidencia en la tabla 5 varían entre los 0,3 y 0,6 cm.

10. CONCLUSIONES

Se evidenció que, *C. cladosporioides* cuenta con unas condiciones óptimas de crecimiento en medios líquidos con aceite de recambio de automóvil al 2,0% con un crecimiento total de 7.2 cm de diámetro y una velocidad de crecimiento de 1,5 cm por semana, esta adaptación fue posible ya que el microorganismo se encontraba en un medio con una concentración de HPA aceptado entre los rangos de tolerancia del mismo y esta, al ser una concentración alta, le permitió sintetizar una mayor cantidad de enzimas extracelulares que fueron liberadas al medio permitiéndole generar una mayor adaptación al medio mediante la degradación de los HPA presentes por medio de los procesos catalizadores realizados por el consorcio enzimático.

Mediante la caracterización del perfil electroforético del sobrenadante obtenido del cultivo de *C. cladosporioides* fue posible determinar la presencia de seis consorcios de enzimas extracelulares involucradas en la degradación de los hidrocarburos poliaromáticos presentes en el aceite de recambio de automóvil, estas fueron las peroxidasas, lipasas, hidrolasas, dioxigenasas, monooxigenasas y lacasas que en medios naturales le permiten a bacterias y hongos, principalmente, realizar la degradación de componentes orgánicos como la lignina, esta agrupación enzimática es conocida también como consorcio lignolítico; sin embargo, se comprueba su eficacia en la degradación de componentes contaminantes como los HPA ya que, la cascada de procesos catalíticos que realizan estas enzimas les permiten a estos microorganismos hidrolizar, oxidar y reorganizar los compuestos aromáticos para su degradación, obteniendo así fuentes de carbono a partir de la desmetilación y oxidación que puedan ser empleadas como fuente de energía por el microorganismo.

La evaluación de la degradación de aceite de recambio de automóvil a partir de las enzimas caracterizadas evidenció una respuesta positiva, ya que alrededor de los sensibilizadores que contenían las distintas concentraciones proteicas presentes en cada una de las muestras del sobrenadante se encontraron halos que comprobaban la degradación de los HPA presentes en el agar. Esto permitió evidenciar que las diferentes reacciones catalíticas realizadas por enzimas caracterizadas en el perfil electroforético sí permiten la degradación de aceite de recambio de automóvil, las muestras que obtuvieron un diámetro mayor en los halos de degradación corresponden a la 4 y la 5, ya que en estas se evidenciaron mayor cantidad de bandas proteicas, lo que se traduce en un consorcio enzimático más grande, que finalmente permitió una degradación más eficiente de los HAP presentes en el medio.

Lo anterior permite concluir que, las enzimas extracelulares actúan en consorcios generando procesos catalíticos que, en sucesión permiten realizar la degradación de cadenas poliaromáticas de hidrocarburos eliminando el factor biológico, lo cual es un avance importante a la hora de realizar procesos de biorremediación de HPA ya que la implementación de consorcios aislados y debidamente caracterizados permite eliminar los factores biológicos que requieren los microorganismos para la degradación de estos y otros tipos de contaminantes y que resultan ser un riesgo para los procedimientos ya que se encuentran ligados a las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos implicados y por ende a las variaciones en los porcentajes de degradación de los sustratos, por lo que su implementación generaría procesos más eficaces.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuras investigaciones emplear un espectrómetro de masas para medir los pesos moleculares en KDa de forma mucho más acertada, además se recomienda utilizar cámara UV digital para la toma de fotografías del gel electroforético con el fin de evaluar a profundizar las bandas obtenidas, por último se sugiere realizar una evaluación más rigurosa de la degradación del sustrato problema empleando para ello la evaluación de la degradación en medios líquidos a través de espectrómetro de masas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal R., Semwal S., Kumar R., Mathur A., Prakash R., Tuli D. & Satlewal A. 2018. Synergistic enzyme cocktail de enhance hydrolysis of steam exploded wheat Straw at pilot scale. *Frontiers energy Research* (19)

Anza, H., Espinoza, E., García, C., González, R., Martínez, R., Orantes, P., Ruíz, A. y Vera, P. (2016) Biorremediación de suelos contaminados con aceites automotriz usados mediante sistema de biopilas. *Espacio I+D Innovación más Desarrollo* 5 (12) 49-77.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* (72): 248-254.

Castañeda T. 2019. *Enzimas de interés biotecnológico*. (documento inédito) Ingeniería química. Universidad Tecnológica Nacional- Facultad Regional La Plata.

Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. 2010. *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 2079–2110.

Deshmukh, R., Khardenavis, A. and Purohit, H., 2016. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), pp.247-264.

Giraldo J., Piragauta M., Castañeda H. & Burgos J. 2000. Valoración de la inmunodominancia de tres fracciones protéicas (64, 53 y 32Kd) obtenidas a partir de un extracto crudo del metacéstodo de *Taenia solium* con sueros porcinos. *Revista científica UNINCCA* 6 (1) 19-34 pp.

Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 52–74.

Chandrakant. Karigar, C. & Rao, S., 2011. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011, pp.1-11.

Diaz A. 2003. La estructura de las catalasas. *Revista de educación bioquímica*. Volumen:22. Número:2. Paginación: 76-84.

González J. 2017. *Técnicas y métodos de laboratorio clínico* 3° edición. Editorial Elsevier.

Kweon, O., Kim, S., Holland, R., Chen, H., Kim, D., Gao, Y., Yu, L., Baek, S., Baek, D., Ahn, H. and Cerniglia, C., 2011. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolic Network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Journal of Bacteriology*, 193(17), pp.4326-4337.

Márquez M., Navas P., Yegres F. & Vivas-Espejo C. 2015. Biodegradación parcial de aceites residuales usados utilizando *Aspergillus niger*, *Rhizopus sp.* y *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Química Viva - Número 1: 90-102 p

Márquez, A., 2014. *Inducción De La Conversión Enzimática Parcial De Crudos Extrapesados Mediada Por Hongos Mitospóricos Y Sus Exoenzimas*. Tesis de maestría. Universidad Estatal a Distancia. España.

Mineki, S., Suzuki, K., Iwata, K., Nakajima, D., & Goto, S. 2014. Degradation of Polyaromatic Hydrocarbons by Fungi Isolated from Soil in Japan. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 35(1), 120–128.

Ministerio de ambiente. 2014. *Manual Técnico Para El Manejo De Aceites De recambio de automóvil Usados De Origen Automotor E Industrial*. Bogotá: Divulgación de conocimiento y cultura ambiental - Centro de documentación, pp.15, 16.

Orozco M., Jimenez A., Acuña O. & Álvarez V. 2015. Determinación del crecimiento de hongos nematófagos en diversas fuentes de carbono. *Revista Agronomía Costarricense*. Vol 39 (2).

Pantoja, J., 2008. *La Gestión De Los Aceites Usados*. Tesis de maestría. Escuela de negocios.

Sambrook, J., & Russel, D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3a ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Secretaria de salud laboral y medio ambiente MCA-UGT., 2010. *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)Acercamiento A Su Problemática Como Riesgo Laboral*. Madrid. España: UGT Comisión Ejecutiva Confederal, pp.9, 10, 11, 12.

Vázquez M., Guerrero T. & Quintero P. 2010. Biorremediación de lodos contaminados con aceites de recambio de automóvil usados. *Revista Colombiana de Biotecnología* Vol XII (1): 141-157 pp.

Vega M. 2011. Selección, caracterización y evaluación de hongos potencialmente utilizables en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos, a nivel de laboratorio, a partir de muestras de suelo de la parroquia San Carlos, perteneciente a cantón Joya de los Sachas, Provincia de Orellana. Tesis para la obtención de título en ingeniería biotecnológica. Universidad Escuela politécnica del ejército, departamento de ciencias de la vida ingeniería en biotecnología.

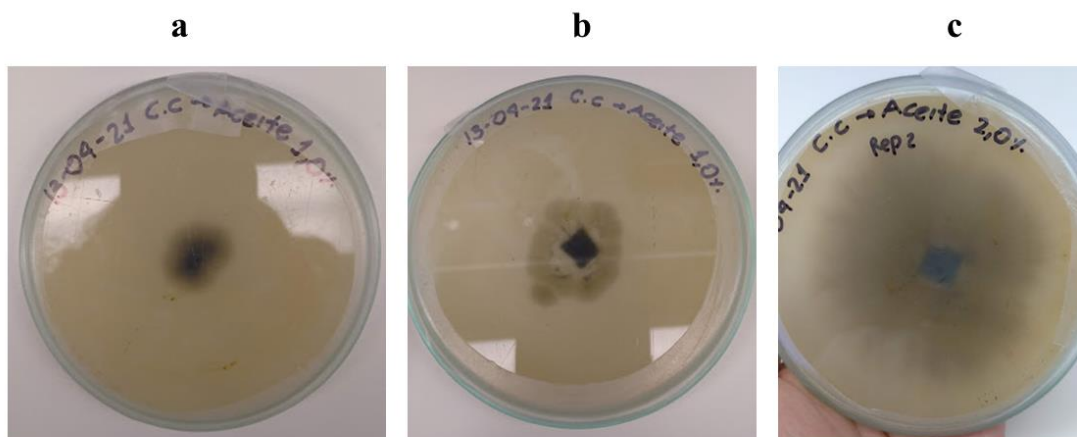
Wong, D. W. S. 2008. *Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 174–209. doi:10.1007/s12010-008-8279-z

Zambrano, M., Casanova, R., Prada, J., Arencibia, G., Vidal, A. and Capetillo, N., 2012. *Bioacumulación De Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos En Anadara Tuberculosa (Sowerby, 1833) (Arcoidea: Arcidae)*.

Ziolo F., Robayo-Gómez. J., Prieto-Gómez S. & Cardona-Gallo A. 2015. Biorremediación de suelos con aceites usados de motor. *Revista CINTEX*. Vol. 20, N° 1, pp. 69-96.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Crecimiento por semanas de *C. cladosporioides*



La imagen a, corresponde al crecimiento de *C. cladosporioides* en la primera semana, la b al crecimiento en la tercera semana y la c, corresponde al crecimiento a la quinta semana.

ANEXO 2. Preparación micronutrientes medio de cultivo.

Composición Macronutrientes, Stock Combinado.

#	Componente	Concentración de solución de stock	USAR de solución de stock
1	Na ₂ HPO ₄	0,9 g/L	5 mL/100 mL dH ₂ O
2	NaNO ₃	2,1 g/L	
3	MgSO ₄	2 g/L	
4	FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,02 g/L	
5	KCl	0,15 g/L	
6	CaCl ₂	2,4 g/L	

Composición Micronutrientes, Stock Combinado.

#	Componente	Concentración de solución de stock	USAR de solución de stock
1	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	0.05 g/L	5 mL/100 mL dH ₂ O
2	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,02 g/L	
3	H ₃ BO ₃	0,05 g/L	
4	MnSO ₄	0,05 g/L	
5	ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,35 g/L	

Preparación en el laboratorio de microbiología de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas