



## Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: [www.riit.com.mx](http://www.riit.com.mx)

### Inmunolocalización celular de una enzima participante en la ruta de degradación del Naftaleno

### Cellular immunolocalization of an enzyme involved in the Naphthalene degradation pathway

Camacho-Morales, R.L.<sup>a\*</sup>, Cárabez-Trejo, A.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California; C.P.21705, Mexicali, Baja California.

<sup>b</sup> Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. Boulevard Juriquilla 3001, Juriquilla, Querétaro, México, C.P. 76230, Querétaro, México.

[lucero.camacho@uabc.edu.mx](mailto:lucero.camacho@uabc.edu.mx)\*; [carabez1@servidor.unam.mx](mailto:carabez1@servidor.unam.mx)

**Innovación tecnológica:** Método de inmunolocalización celular de enzimas de la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

**Área de aplicación industrial:** Industria de reciclaje/descontaminación.

Recibido: 28 mayo 2022

Aceptado: 18 octubre 2022

### Abstract

Oil spill contamination is one of the problems that we commonly face today, one of the methods that have been proposed for the reduction of soil contaminants is the use of fungal-mediated bioremediation, *Mucor circinelloides* is a fungus capable of growing and metabolizing petroleum residues such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), specifically naphthalene. As a fundamental part of knowing about the metabolism process of HPAs, in this work the identification of the presence of the second enzyme that participates in the naphthalene degradation route, dihydrodiol dehydrogenase (DD), was carried out, its location by means of labeled antibodies and its distribution by transmission electron microscopy was observed. The results show that the DD enzyme is located in the cell cytoplasm in electron-dense particles that are different from peroxisomes. These findings can help improve the outlook for bioremediation of recalcitrant petroleum derived compounds.

**Keywords:** Biochemistry, bioremediation, immunolocalization, naphthalene.

## Resumen

La contaminación por derrames de petróleo es uno de los problemas a los que comúnmente nos enfrentamos hoy en día, uno de los métodos que se ha planteado para la reducción de los contaminantes del suelo es el uso de biorremediación mediada por hongos, *Mucor circinelloides* es un hongo capaz de crecer y metabolizar residuos de petróleo como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), específicamente el naftaleno. Como una parte fundamental de conocer el proceso de metabolismo de los HPAs, en este trabajo se llevó a cabo la identificación de la presencia de la segunda enzima que participa en la ruta de degradación de naftaleno, la dihidrodiol deshidrogenasa (DD), su localización mediante anticuerpos marcados y su distribución mediante microscopía electrónica de transmisión, obteniendo que la enzima DD se encuentra localizada en el citoplasma celular en partículas electrodensas que son diferentes a los peroxisomas, estos hallazgos pueden ayudar a mejorar el panorama de biorremediación de compuestos recalcitrantes derivados del petróleo.

**Palabras clave:** Bioquímica, biorremediación, Inmunolocalización, naftaleno.

## 1. Introducción

Cuando se habla de la contaminación generada por petróleo, lo primero en lo que se piensa es en los derrames producidos en alta mar, que ocasionan problemas que van desde el daño a pequeña escala hasta la desaparición de todas las especies que viven en una comunidad biológica [1]. Sin embargo, el daño que causa este tipo de contaminación también se extiende al suelo debido a los derrames del crudo mismo y de los residuos generados en su refinamiento, que también pueden afectar al aire. La naturaleza requiere de alrededor de 10 años para recuperarse de un problema de contaminación [2]. Algunos autores consideran que no hay una relación determinada entre el tamaño del derrame y lo grave que son los daños que ocasiona, pero se sabe que otros factores pueden influir en la gravedad del daño y el tiempo de recuperación, así como las condiciones ambientales, y la presencia de flora y fauna de la región [3]–[5].

La descontaminación de un espacio, puede llevarse a cabo por diferentes aproximaciones como son el confinamiento, la limpieza y la estrategia de respuesta, estos métodos varían

en su porcentaje de acción y metodología específica[6]. Estos pueden ser de tipo físicos, químicos o biológicos, y pueden realizarse en el sitio de contaminación o de forma ex situ [7]. Hace ya varios años que se ha estudiado el uso de la biorremediación para procesos que son mediados por organismos vivos: bacterias, algas, hongos y plantas, que son capaces de disminuir la concentración de diversos contaminantes debido a su metabolismo[8], [9].

La mayoría de los estudios de biorremediación se han realizado en bacterias debido a su facilidad de cultivo y a que existe una gran cantidad de herramientas para analizar su metabolismo y genómica que permitan estudiar sus vías metabólicas e identificar los compuestos que pueden degradar [10], [11]. Sin embargo, los hongos poseen también una gran capacidad de degradar y metabolizar compuestos recalcitrantes, lo que los dota de un gran potencial como parte de los procesos de microrremediación [12]. El potencial de los hongos se fundamenta en su sistema enzimático y en su velocidad de crecimiento y capacidad de crecer en una gran cantidad de

sustratos ya que pueden acceder a los diferentes compuestos que contaminan el suelo. Además, se ha encontrado que los hongos pueden acumular metales como el cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc, debido a que se ha analizado la presencia de estos en aislamientos de hongos provenientes del suelo de minas [13].

Otro grupo de interés lo constituyen los hongos de podredumbre blanca (basidiomicetos) que disponen entre otras, de una importante capacidad para la degradación de la lignina, que es un polímero que compone los sustratos lignocelulósicos [14]. Para llevar a cabo esta degradación, se necesita de diversas enzimas que oxidan los anillos aromáticos que constituyen este polímero, algunas de estas son: lignina peroxidasa, lacasa, manganeso peroxidasa y aril alcohol oxidasa [15]. Esta inespecificidad química les proporciona el poder degradativo necesario para transformar xenobióticos como los pesticidas, hidrocarburos aromáticos, compuestos orgánicos clorados, azocolorantes, etc. [16]–[18].

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) representan uno de los principales componentes del petróleo y por tanto una fuente importante de contaminación durante los derrames, específicamente el naftaleno es un compuesto altamente tóxico, que por su naturaleza resulta de difícil manejo y degradación [19], [20]. La primera enzima que participa en la ruta de degradación del naftaleno, la dioxigenasa, ha sido identificada como la responsable de la formación de cis-dihidrodiol, y no sólo es utilizada en la degradación del naftaleno, sino que también interactúa con otros HPAs como es el caso del fenantreno y el pireno [21]. Esta enzima se ha considerado como de gran importancia en los procesos de biorremediación [22].

En cuanto a la segunda enzima, la cis-dihidrodiol deshidrogenasa (DD), ha sido

ampliamente descrita en sistemas bacterianos, pero poco estudiada en hongos. La actividad de esta enzima consiste en la deshidrogenación del cis-1,2 dihidroxi-dihidro naftaleno a 1,2 dihidroxi naftaleno, y esta reacción requiere de NAD<sup>+</sup> o NADP<sup>+</sup> como cofactor [22], [23].

Los cis-dihidrodiol han sido identificados como intermediarios en la oxidación no sólo del naftaleno, sino también en el metabolismo del tolueno, benceno, p-clorotolueno, metilbenceno y piridazinona [21]. Y por tal motivo resulta muy importante su estudio.

Las enzimas cis-naftalendiol deshidrogenasa y cis-toluenediol deshidrogenasa de *Pseudomonas putida*, fueron purificadas y caracterizadas bioquímicamente, permitiendo dilucidar la vía de degradación de hidrocarburos aromáticos que ahora conocemos [24].

Por lo tanto, uno de los puntos clave del proceso de degradación de los HPAs implica la ubicación de la enzima en la célula, para esto en trabajos previos ya se había realizado la purificación y caracterización de la enzima [25], por tal motivo se decidió analizar mediante microscopía electrónica de transmisión, la localización de la enzima y si esta se encuentra dentro de los peroxisomas como una referencia de su posible localización.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Microorganismos

Se empleó un hongo aislado de suelos contaminados con petróleo denominado YR-1 y clasificado taxonómicamente como *Mucor circinelloides* [26].

El medio de cultivo empleado para la propagación del microorganismo fue una variante del medio mínimo de Lee [27] (2.5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g de MgSO<sub>4</sub>, 5 g de

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g de NaCl), suplementado con peptona al 0.1%, al cual se le denominó MMSP y como fuente de carbono se agregó naftaleno al 1%.

## 2.2 Obtención de anticuerpos

Para llevar a cabo la producción de anticuerpos se inmunizaron dos conejos utilizando una preparación que contenía 300 µg de la enzima di hidrodio deshidrogenasa, que previamente había sido purificada [25], para esto la proteína pura se homogeneizó en un ml de regulador de fosfatos pH 8.5 50 mM. En el caso de la primera inmunización se agregaron a la solución 500 µL de adyuvante completo de Freund (para cada dosis). Se realizaron cuatro inmunizaciones (una cada mes) y posteriormente se purificaron parcialmente las inmunoglobulinas. El manejo de los animales para experimentación se realizó basado en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y en los estándares internacionales y sus especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio se adecuó el trato digno y correcto de los animales para los ensayos experimentales.

## 2.3 Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET)

La preparación de la muestra para MET, se realizó siguiendo la metodología planteada por [28], con las siguientes modificaciones. Las células miceliales fueron crecidas en las diferentes fuentes de carbono: glucosa (control) y naftaleno 1% durante 12 y 24 h respectivamente, se filtraron y los paquetes celulares se resuspendieron en agarosa de bajo punto de fusión, una vez gelificados, se cortaron en cubos de 1 mm<sup>3</sup> y se transfirieron a viales de vidrio conteniendo 2.5 ml de gluraldehído (Electron Microscopy Sciences) al 3% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, y se incubaron por 4 h a 4 °C.

Las muestras se fijaron y deshidrataron según el protocolo antes descrito. Inmediatamente después de la fijación y deshidratación, las muestras se resuspendieron en una mezcla etanol-resina (LR-White, Polysciences, Inc.) en relación 2:1 y se dejaron a 4 °C durante 4-6 días hasta que los cubos de la muestra se tornaron transparentes. Las muestras se transfirieron a capsulas de gelatina y se polimerizaron a 60 °C por 12 h.

Los bloques se seccionaron en un ultramicrotomo (Ultracut Reichert-Jung), obteniendo cortes finos con color de interferencia plateados (50 a 70 nm) y se colocaron en rejillas de níquel cubiertas con membranas de FormVAR.

Para los ensayos de inmunohistoquímica, las rejillas con los cortes finos se hidrataron con agua y se bloquearon con 1% de suero de albúmina bovina en regulador de fosfatos (PBS-BSA). Posteriormente se llevaron a cabo las incubaciones con los anticuerpos (anti-DD y anti-Peroxidasa) diluidos 1:100 y 1:50 respectivamente en PBS-BSA. Después, las rejillas se lavaron y se incubaron en gotas con el segundo anticuerpo acoplado a oro coloidal (anti-conejo acoplado a oro de 15 nm o anti-ratón acoplado a oro de 25 nm en una dilución de 1:200 cada uno) durante 2 h, en cámara húmeda, a temperatura ambiente. Al término de este proceso las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Modelo Jeol (JEM-1010 Electron Microscopy). Se analizaron 10 células por corte, en total se contabilizaron 50 células por muestra, cada corte representa un bloque individual.

## 3. Resultados y discusión

Se realizaron ensayos de inmunolocalización por microscopía electrónica de transmisión, para lo cual las muestras del crecimiento del hongo tanto en glucosa (control) como en naftaleno (agente inductor), fueron fijadas

con glutaraldehído al 3% y polimerizadas en resina LRW.

En primera instancia se realizaron ensayos usando solamente anticuerpos contra la DD, tanto en muestras del crecimiento del hongo en glucosa como en muestras del crecimiento en naftaleno (Figuras 1-4).

Las células de *M. circinelloides* que fueron crecidas en glucosa, presentan menor detección de la enzima DD (figura 1), lo que concuerda con los análisis de la actividad realizados anteriormente y en donde se observa que no existe actividad DD cuando se utiliza glucosa [25], lo que sugiere que las enzimas que pudieran estar presentes se encuentran de manera basal en la célula y por lo tanto no están en su forma activa.

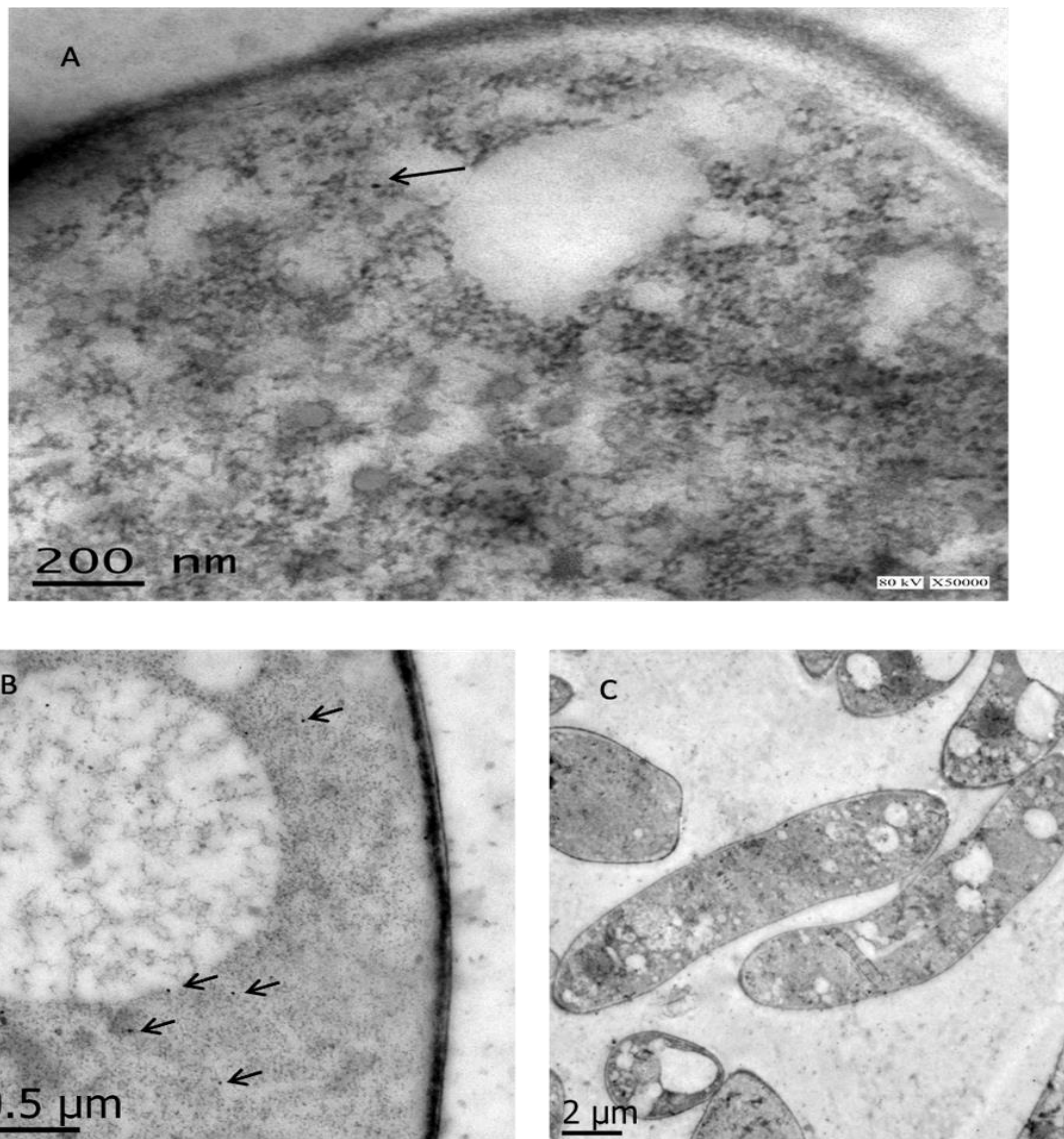


**Figura 1.** Inmunolocalización de la DD en células de *M. circinelloides* en glucosa. Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con glucosa como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a Inmunodetección con un anticuerpo contra la DD, el segundo anticuerpo utilizado estaba acoplado a partículas de oro de 15 nm, las flechas indican la señal de la enzima. Páneos A y B muestran acercamientos de las células a altas ampliificaciones. El panel C muestra un grupo de células.

Para el caso de las células crecidas en naftaleno, se observa una mayor detección DD y por lo tanto una mayor cantidad de partículas de oro. Fue posible observar la detección de la enzima en pequeñas vesículas electrodensas, que contienen una o más señales de oro, estas vesículas están distribuidas a lo largo de todo el citoplasma de la célula, pero en más del 80% de los campos observados, se pudo apreciar la

presencia de la marca muy cerca de la pared celular de *M. circinelloides* (figuras 2-4). La repetición de este fenómeno permite inferir el papel que juegan estas vesículas en el transporte del naftaleno dentro de la célula, sin embargo, al no tener referencias acerca de cómo se lleva a cabo éste transporte, no se puede asegurar que el fenómeno que se observa es totalmente cierto.

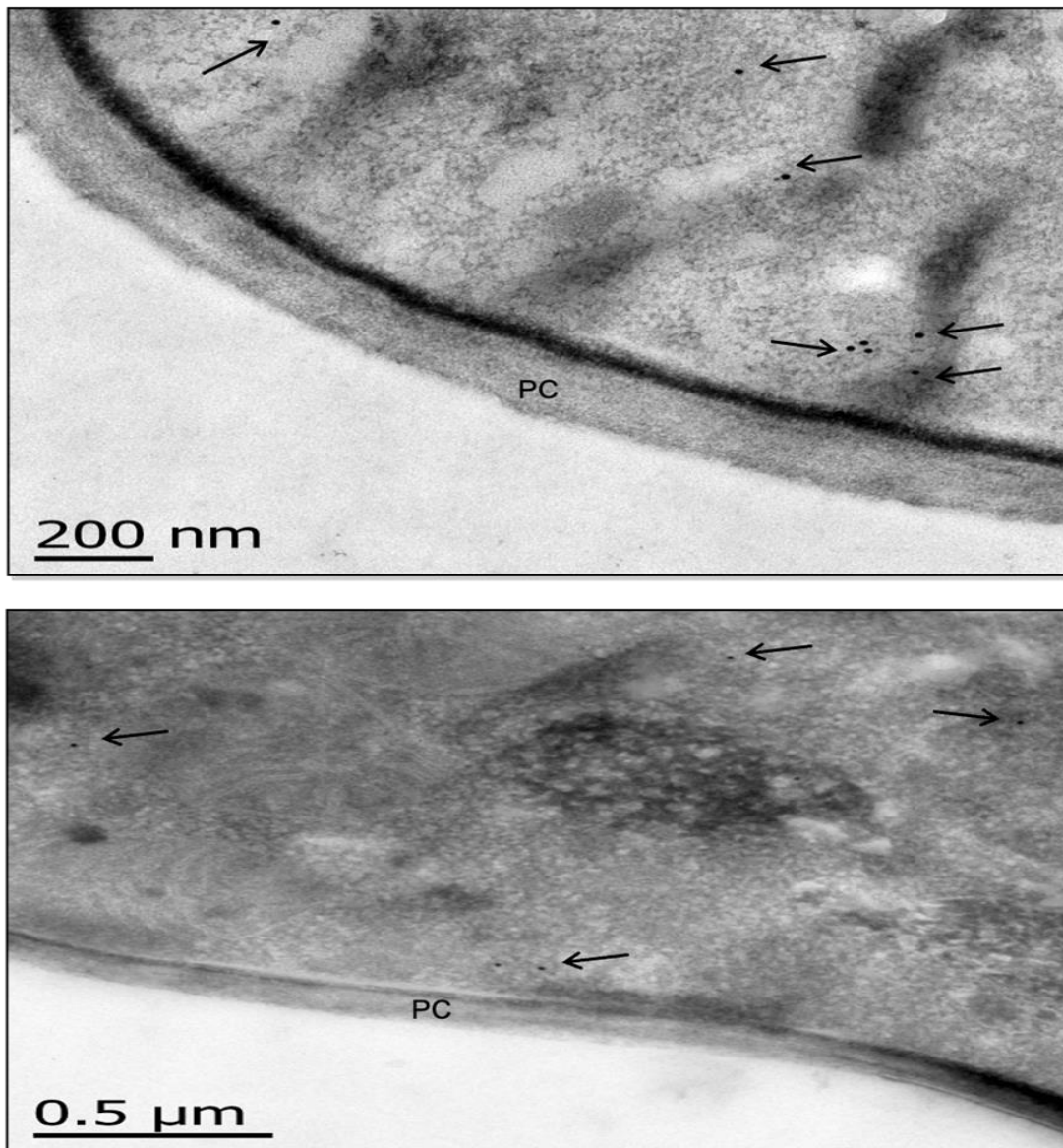


**Figura 2.** Inmunolocalización de la DD en células de *M. circinelloides* crecidas en naftaleno (1). Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con naftaleno como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a Inmunodetección con un anticuerpo contra la DD, el segundo anticuerpo utilizado estaba acoplado a partículas de oro de 15 nm, las flechas indican la señal de la enzima.

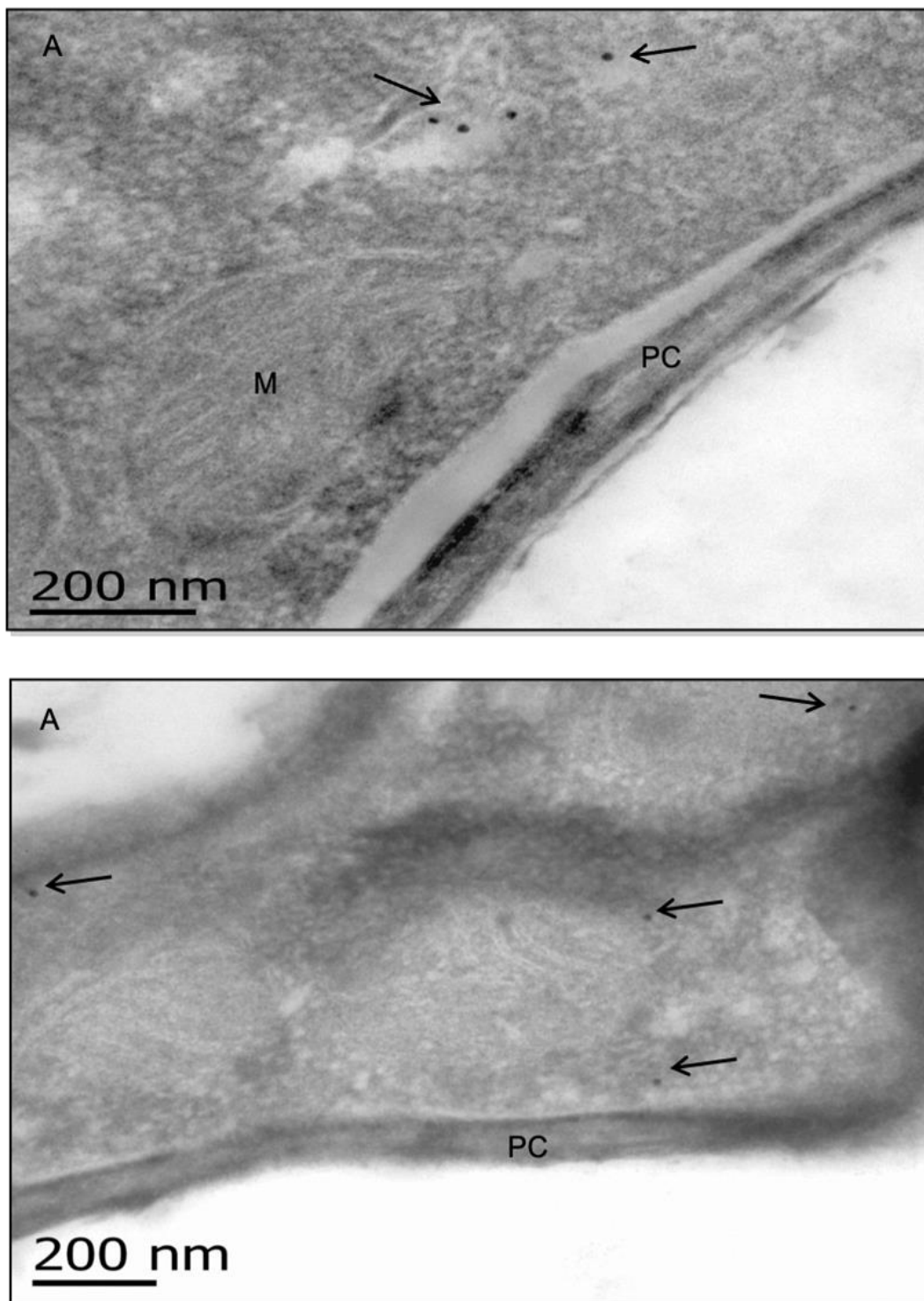


**Figura 3.** Inmunolocalización de la DD en células de *M. circinelloides* en naftaleno (2). Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con naftaleno como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a Inmunodetección con un anticuerpo contra la DD, el segundo anticuerpo utilizado estaba acoplado a partículas de oro de 15 nm, las flechas indican la señal de la enzima.

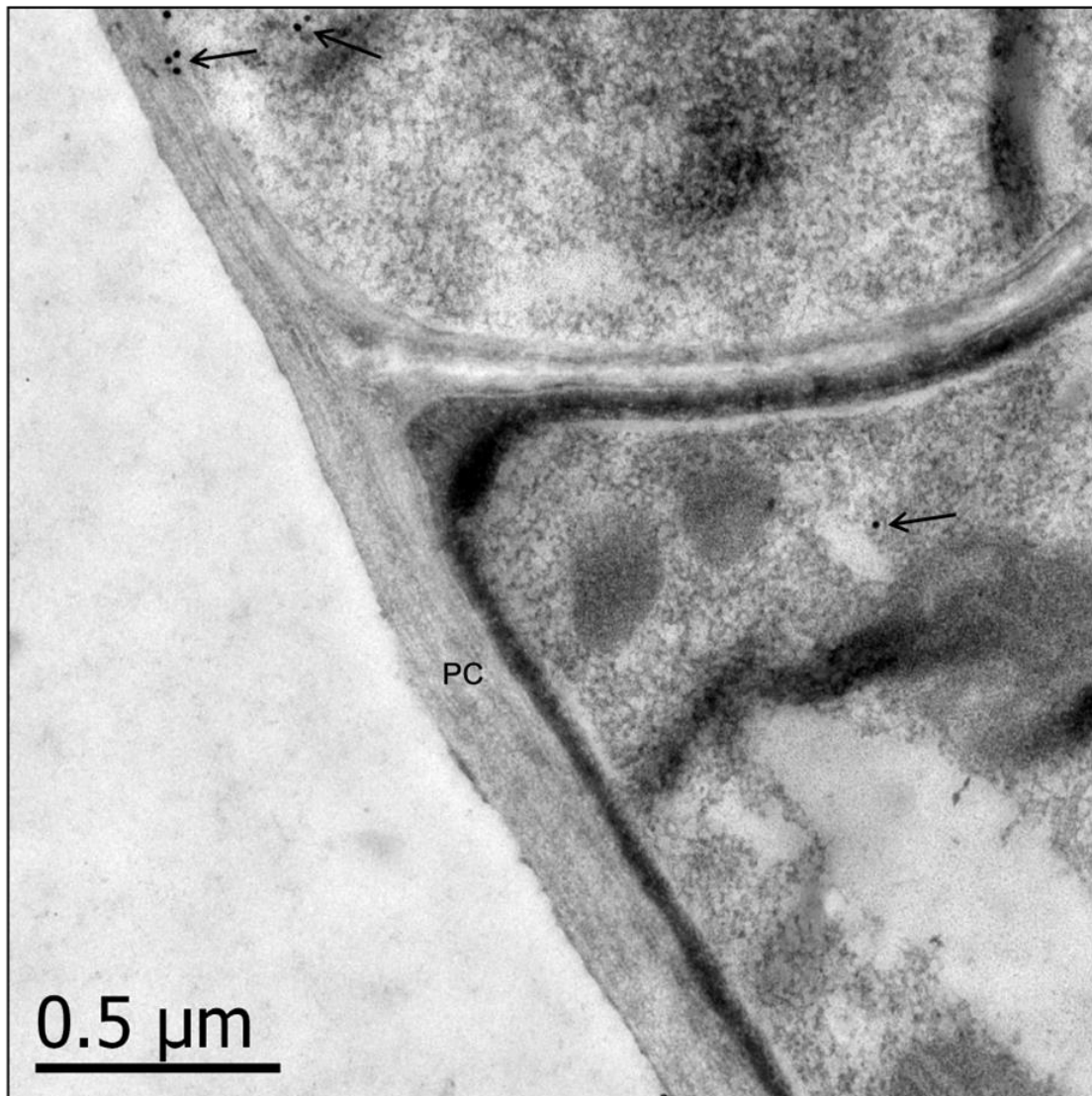


**Figura 4.** Inmunolocalización de la DD en células de *M. circinelloides* crecidas en naftaleno (detalle de la pared). Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con naftaleno como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a Inmunodetección con un ab contra la DD, el segundo ab utilizado estaba acoplado a partículas de oro de 15 nm, las flechas indican la señal de la enzima.

Sin embargo, se puede fácilmente formular la hipótesis de que estas vesículas contienen dentro las primeras enzimas que son las encargadas de metabolizar el naftaleno que está presente en el medio y posteriormente llevarlo al citoplasma en su forma menos tóxica para que pueda ser integrado al metabolismo normal del hongo por medio del cual obtiene energía.

Un análisis más detallado de las microfotografías permitió la observación de diferencias importantes en la pared celular de glucosa y de naftaleno, presentando en el caso del naftaleno una pared más gruesa que la de glucosa (Figuras 1-4).

Posteriormente, se planteó realizar una co-inmunodetección utilizando los anticuerpos contra la DD que ya habían sido probados y anticuerpos contra peroxidasa como

marcador, con la finalidad de determinar si la enzima DD está presente en los peroxisomas.

Por lo tanto, células provenientes tanto del crecimiento en glucosa como del crecimiento en naftaleno, fueron polimerizadas en resina LRW y se sometieron a una inmunodetección

primeramente con el anticuerpo contra la DD, seguido de la detección con anticuerpo contra la peroxidasa. De la misma forma se utilizaron dos anticuerpos secundarios, uno con partículas de 15 nm cabra-anti-conejo y el otro con partículas de 25 nm cabra-anti-ratón (Figuras 5-8).

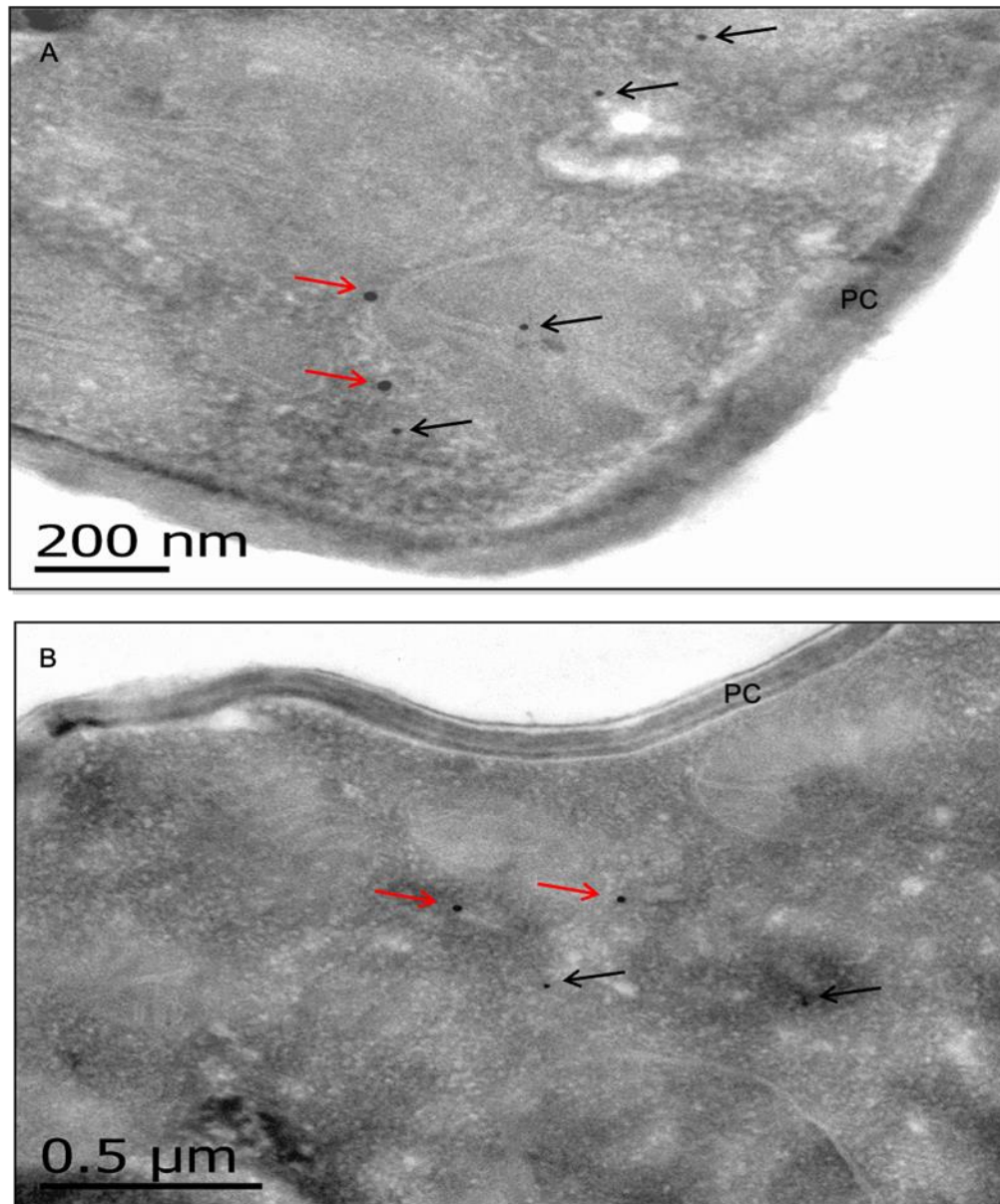


**Figura 5.** Inmunolocalización de DD y peroxidasa en células de *M. circinelloides* crecidas en naftaleno. Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con naftaleno como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a una doble Inmunodetección con dos anticuerpos primarios: el primero  $\alpha$  DD y posteriormente otro  $\alpha$  peroxidasa, los segundos anticuerpos utilizados estaban acoplado a partículas de oro de 15 y 25 nm respectivamente, las flechas negras indican detección de DD y las flechas rojas detección de peroxidasa. Páneles A y B muestran acercamientos de las células.

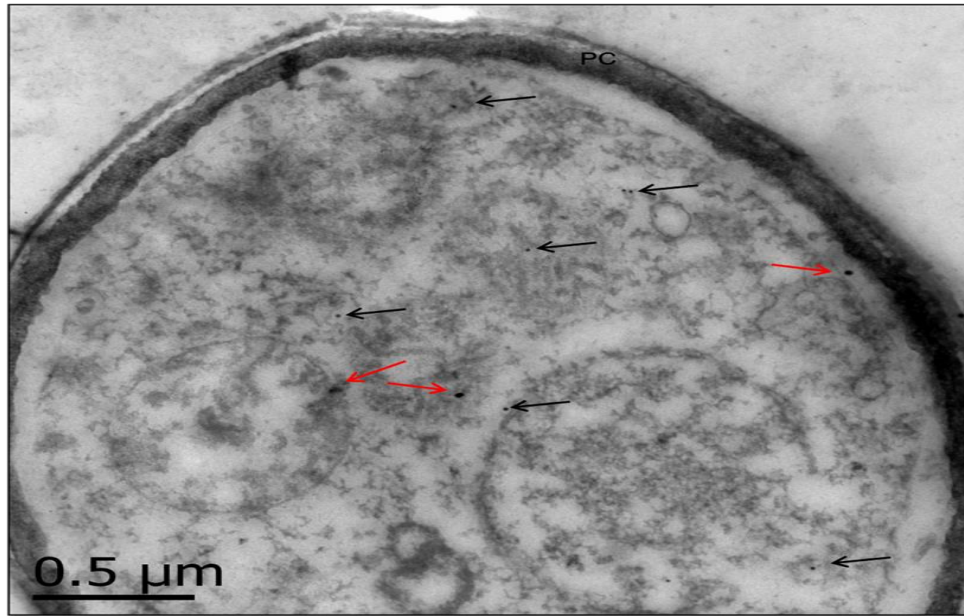


**Figura 6.** Inmunolocalización de DD y peroxidasa en células de *M. circinelloides* crecidas en naftaleno (vista completa de la célula). Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con naftaleno como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a una doble Inmunodetección con dos anticuerpos primarios: el primero  $\alpha$  DD y posteriormente otro  $\alpha$  peroxidasa, los segundos anticuerpos utilizados estaban acoplados a partículas de oro de 15 y 25 nm respectivamente, las flechas negras indican detección de DD y las flechas rojas detección de peroxidasa.

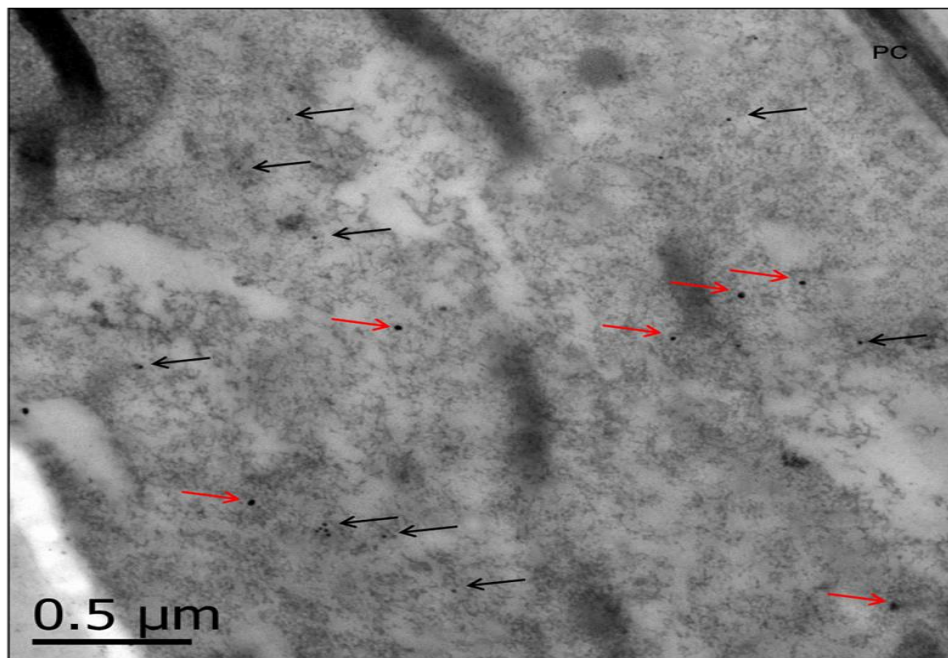


**Figura 7.** Inmunolocalización de DD y peroxidasa en células de *M. circinelloides* crecidas en naftaleno (detalle central de la célula). Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con naftaleno como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a una doble Inmunodetección con dos ab primarios: el primero  $\alpha$  DD y posteriormente otro  $\alpha$  peroxidasa, los segundos ab utilizados estaban acoplado a partículas de oro de 15 y 25 nm respectivamente, las flechas negras indican detección de DD y las flechas rojas detección de peroxidasa.

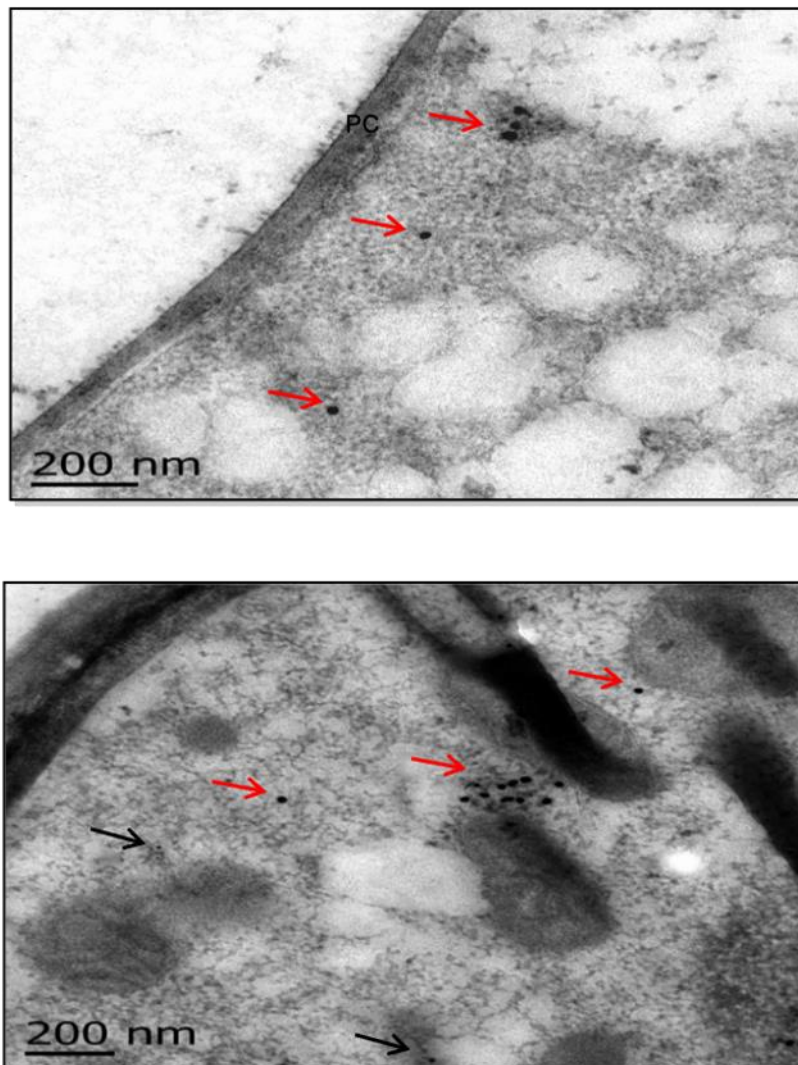


**Figura 8.** Inmunolocalización de DD y peroxidasa en células de *M. circinelloides* crecidas en glucosa. Esporas de YR-1 fueron crecidas en MMSP suplementadas con glucosa como única fuente de carbono; el micelio fue filtrado, lavado, fijado y preparado para realizar cortes para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. Una vez que los cortes se realizaron, se sometieron a una doble Inmunodetección con dos ab primarios: el primero  $\alpha$  DD y posteriormente otro  $\alpha$  peroxidasa, los segundos ab utilizados estaban acoplado a partículas de oro de 15 y 25 nm respectivamente, las flechas negras indican detección de DD y las flechas rojas detección de peroxidasa.

Los resultados obtenidos durante la observación de los diferentes cortes microscópicos, muestran que en el 76% de los campos observados no se detectó una co-localización entre ambos anticuerpos, la señal de DD estaba localizada en vesículas muy específicas, al igual que la señal de la peroxidasa, y en ningún caso las marcas se encontraron juntas en la célula (Tabla 1).

La mayoría de las enzimas oxidorreductasas que son responsables del metabolismo de degradación de hidrocarburos, han sido encontradas en el citoplasma de las células o formando parte del complejo p450 dentro del peroxisoma [29]–[32]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo (Figuras 1,3-8) muestran que la DD de *M. circinelloides*, está localizada en el citoplasma, pero contenida en pequeñas vesículas, que son de un tamaño parecido a

los peroxisomas y que tienen una densidad de flotación muy cercanas a la peroxidasa. Estas vesículas, ya habían sido observadas con anterioridad para YR-1 [33], en donde se encontró la actividad Alcohol oxidasa asociada a pequeñas vesículas que poseían una densidad diferente a los peroxisomas y que al observarse al microscopio electrónico eran electrodensas. En *Aspergillus sydowii*, se realizó un análisis transcriptómico en donde se evaluaron aquellos genes diferencialmente expresados durante la degradación de HPAs en medio hipersalino, encontrando una gran cantidad de genes involucrados en el proceso [34]. Seguramente muchas de las respuestas involucradas en la localización de estas enzimas se encuentran en el ámbito de la metagenómica. Y en el caso de bacterias como *Geobacillus sp.* ya se tiene bien determinada la secuencia del gen que codifica para la naftalendiol deshidrogenasa [35], sin embargo, aún no se conoce su localización y si está también está compartimentalizada en el citoplasma.

Para el caso de *M. circinelloides*, los resultados apuntan a que la presencia de estas enzimas dentro de compartimentos específicos, podría estar relacionado con el

sistema de entrada y transporte del naftaleno dentro de la célula. Cuando se realizó la inmunodetección de las células de YR-1 crecidas en naftaleno, se observó la presencia de la marca de oro de 15 nM correspondiente a la enzima DD, en posiciones muy cercanas a la pared celular, éste fenómeno se observó en el 75% de las células. Por lo tanto, se propone la participación de estas vesículas en la captura y transporte del naftaleno dentro de la célula.

La vía de entrada del naftaleno al interior de la célula sería mediante difusión pasiva [36]–[38] e inmediatamente las vesículas se fusionarían con la membrana para atrapar el naftaleno y encapsularlo al momento de separarse de la membrana; dentro de estas vesículas, las enzimas que participan en el proceso de degradación del naftaleno, como es el caso de la dioxigenasa y la dihidrodiol deshidrogenasa, degradarían el naftaleno hasta la formación del catecol, para posteriormente liberarlo al citoplasma y que a su vez sea transformado en piruvato y acetil coenzima A, que en la mitocondria proporcionará a la célula energía necesaria para su sobrevivencia [30].

**Tabla 1.** Análisis cuantitativo de la distribución intracelular de la enzima DD en *Mucor circinelloides* crecido en naftaleno.

| Muestra 1                                                                                                                            |                            |    |                        |    | Muestra 2                                           |                            |    |                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----|------------------------|----|-----------------------------------------------------|----------------------------|----|------------------------|----|
| Numero de corte                                                                                                                      | Colocaliza con Peroxisomas |    | Está cerca de la pared |    | Numero de corte                                     | Colocaliza con Peroxisomas |    | Está cerca de la pared |    |
|                                                                                                                                      | Si                         | No | Si                     | No |                                                     | Si                         | No | Si                     | No |
| 1                                                                                                                                    | 2                          | 8  | 6                      | 4  | 1                                                   | 4                          | 6  | 7                      | 3  |
| 2                                                                                                                                    | 3                          | 7  | 8                      | 2  | 2                                                   | 1                          | 9  | 7                      | 3  |
| 3                                                                                                                                    | 3                          | 7  | 6                      | 4  | 3                                                   | 1                          | 9  | 6                      | 4  |
| 4                                                                                                                                    | 2                          | 8  | 8                      | 2  | 4                                                   | 4                          | 6  | 8                      | 2  |
| 5                                                                                                                                    | 3                          | 7  | 4                      | 6  | 5                                                   | 1                          | 9  | 7                      | 3  |
| Total                                                                                                                                | 13                         | 37 | 32                     | 18 | Total                                               | 11                         | 39 | 35                     | 15 |
| Colocaliza con el peroxisoma: No en un 76%                                                                                           |                            |    |                        |    | Se localiza cerca de la pared celular: Si en un 67% |                            |    |                        |    |
| Se analizaron 10 células por corte, en total se contabilizaron 50 células por muestra<br>Cada corte representa un bloque individual. |                            |    |                        |    |                                                     |                            |    |                        |    |

En los últimos años, el estudio de los procesos de biorremediación ha aumentado de manera importante, sobre todo por la atención que se da a la protección del ambiente en la actualidad, lo que ha estimulado entre otras posibilidades la búsqueda de nuevos organismos que cumplan esta función [39]–[41]. Debido a esto, se han tenido diversos acercamientos que permiten ahondar en el conocimiento de la forma en la cual los microorganismos son capaces de crecer y asimilar los contaminantes presentes en el medio; este amplio conocimiento ha sido perfectamente elucidado para bacterias, como es el caso de *Pseudomonas putida* [42], [43]. Los reportes en hongos son aún muy limitados, algunos de los trabajos se han centrado en el importante papel de *Cunninghamella elegans*, para el metabolismo de antraceno y fenantreno [44] y de hongos comestibles como es el caso de los trabajos realizados con *Pleurotus ostreatus* [45].

El uso del género *Mucor*, en biodegradación ha sido poco estudiado, y las investigaciones realizadas se centran en la degradación de petróleo crudo y no en sus derivados [46] y de algunos colorantes [47]. El presente trabajo aporta el esclarecimiento del potencial de este hongo como micorremediador de HPAs, específicamente del naftaleno, sin embargo, aún se requiere una mayor investigación en esta área, que logre elucidar por completo la forma en la cual hongos como *Mucor circinelloides* realizan su proceso de degradación de manera intracelular.

#### 4. Conclusiones

Se encontró que la enzima dihidrodiol deshidrogenasa se localiza en compartimentos específicos y bien definidos, de carácter electrodensos que pudieran ser diferentes a los peroxisomas.

En este sentido, se podría proponer a la cepa YR-1 de *M. circinelloides* como un potencial biorremediador de sitios contaminados, sin embargo, todavía hacen falta una mayor cantidad de estudios para establecer el mecanismo por el cual realiza el proceso de biodegradación de hidrocarburos particularmente aromáticos y es indispensable continuar con la investigación de la ruta de biodegradación de hidrocarburos aromáticos.

#### 5. Referencias

- [1] M. D. King, J. E. Elliott, and T. D. Williams, “Effects of petroleum exposure on birds: A review”, *Science of The Total Environment*, vol. 755, p. 142834, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142834.
- [2] L. Mondragón-Camarillo, S. R. Zaragoza, Ma. R. Mendoza-López, N. Cabirol, and M. Macek, “Recovery of Soil Protozoan Community Structure Promoted by *M. sativa* After a Strong Pulse of Hydrocarbon Contamination”, *Water Air Soil Pollut*, vol. 231, no. 6, p. 283, 2020, doi: 10.1007/s11270-020-04618-7.
- [3] D. B. Gleeson *et al.*, “Natural attenuation of legacy hydrocarbon spills in pristine soils is feasible despite difficult environmental conditions in the monsoon tropics”, *Science of The Total Environment*, vol. 799, p. 149335, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2021.149335.
- [4] J.-W. Liu *et al.*, “Surfactant-enhanced remediation of oil-contaminated soil and groundwater: A review”, *Science of The Total Environment*, vol. 756, p. 144142, 2021, doi:

- <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144142>.
- [5] H. Luo, H. Wang, L. Kong, S. Li, and Y. Sun, “Insights into oil recovery, soil rehabilitation and low temperature behaviors of microwave-assisted petroleum-contaminated soil remediation”, *J Hazard Mater*, vol. 377, pp. 341–348, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.092>.
- [6] A. Dhaka and P. Chattopadhyay, “A review on physical remediation techniques for treatment of marine oil spills”, *J Environ Manage*, vol. 288, p. 112428, Jun. 2021, doi: [10.1016/J.JENVMAN.2021.112428](https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2021.112428).
- [7] P. E. Ndimele, A. O. Saba, D. O. Ojo, C. C. Ndimele, M. A. Anetekhai, and E. S. Erundu, “Remediation of Crude Oil Spillage”, *The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem*, pp. 369–384, Jan. 2018, doi: [10.1016/B978-0-12-809399-3.00024-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809399-3.00024-0).
- [8] A. Shah and M. Shah, “Characterisation and bioremediation of wastewater: A review exploring bioremediation as a sustainable technique for pharmaceutical wastewater”, *Groundw Sustain Dev*, vol. 11, p. 100383, Oct. 2020, doi: [10.1016/J.GSD.2020.100383](https://doi.org/10.1016/J.GSD.2020.100383).
- [9] C. M. Quintella, A. M. T. Mata, and L. C. P. Lima, “Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils”, *J Environ Manage*, vol. 241, pp. 156–166, Jul. 2019, doi: [10.1016/J.JENVMAN.2019.04.019](https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2019.04.019).
- [10] I. M. Gillespie and J. C. Philp, “Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy,” *Trends Biotechnol.*, vol. 31, pp. 329–332, 2013.
- [11] N. Akhtar and M. A. Mannan, “Mycoremediation: Expunging environmental pollutants”, *Biotechnology Reports*, vol. 26, p. e00452, 2020, doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>.
- [12] A. Ratnasari, A. Syafiuddin, A. B. H. Kueh, S. Suhartono, and T. Hadibarata, “Opportunities and Challenges for Sustainable Bioremediation of Natural and Synthetic Estrogens as Emerging Water Contaminants Using Bacteria, Fungi, and Algae”, *Water Air Soil Pollut*, vol. 232, no. 6, pp. 1–23, Jun. 2021, doi: [10.1007/S11270-021-05183-3/FIGURES/5](https://doi.org/10.1007/S11270-021-05183-3/FIGURES/5).
- [13] S. Verma and A. Kuila, “Bioremediation of heavy metals by microbial process”, *Environ Technol Innov*, vol. 14, p. 100369, May 2019, doi: [10.1016/J.ETI.2019.100369](https://doi.org/10.1016/J.ETI.2019.100369).
- [14] J. A. Mir-Tutusa, R. Baccar, G. Caminal, and M. Sarra, “Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review”, *Water Res*, vol. 138, pp. 137–151, Jul. 2018, doi: [10.1016/J.WATRES.2018.02.056](https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.02.056).
- [15] Y. Wang, S. Chen, J. Zhou, X. Fan, L. He, and G. Fan, “Enhanced degradation capability of white-rot fungi after short-term pre-exposure to silver ion: Performance and selectively antimicrobial

- mechanisms”, *Science of the Total Environment*, vol. 818, Apr. 2022, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.151672.
- [16] A. C. del Álamo, M. I. Pariente, R. Molina, and F. Martínez, “Advanced bio-oxidation of fungal mixed cultures immobilized on rotating biological contactors for the removal of pharmaceutical micropollutants in a real hospital wastewater”, *J Hazard Mater*, vol. 425, Mar. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.128002.
- [17] L. Palli, A. Gullotto, S. Tilli, D. Caniani, R. Gori, and A. Scozzafava, “Biodegradation of 2-naphthalensulfonic acid polymers by white-rot fungi: Scale-up into non-sterile packed bed bioreactors”, *Chemosphere*, vol. 164, pp. 120–127, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.071.
- [18] Y. Ding, K. Cui, X. Liu, Q. Xie, Z. Guo, and Y. Chen, “Lignin peroxidase-catalyzed direct oxidation of trace organic pollutants through a long-range electron transfer mechanism: Using propranolol as an example”, *J Hazard Mater*, vol. 431, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128544.
- [19] Y. Lee, Y. Lee, and C. O. Jeon, “Biodegradation of naphthalene, BTEX, and aliphatic hydrocarbons by *Paraburkholderia aromaticivorans* BN5 isolated from petroleum-contaminated soil”, *Scientific Reports* 2019 9:1, vol. 9, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41598-018-36165-x.
- [20] S. Kumari, R. K. Regar, and N. Manickam, “Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria”, *Bioresour Technol*, vol. 254, pp. 174–179, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2018.01.075.
- [21] A. Imam, S. Kumar Suman, P. K. Kanaujia, and A. Ray, “Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review”, *Bioresour Technol*, vol. 343, p. 126121, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2021.126121.
- [22] W. Wang, L. Wang, and Z. Shao, “Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation pathways of the obligate marine PAH degrader *Cyclocasticus* sp. strain P1”, *Appl Environ Microbiol*, vol. 84, no. 21, Nov. 2018, doi: 10.1128/AEM.01261-18/SUPPL\_FILE/ZAM021188824S1.PDF.
- [23] K. Nomura *et al.*, “Identification of New Dioxygenases Able to Recognize Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with High Aromaticity”, *Catalysts* 2022, Vol. 12, Page 279, vol. 12, no. 3, p. 279, Mar. 2022, doi: 10.3390/CATAL12030279.
- [24] J. E. Rogers and D. T. Gibson, “Purification and properties of cis-toluene dihydrodiol dehydrogenase from *Pseudomonas putida*”, *J Bacteriol*, vol. 130, no. 3, pp. 1117–1124, 1977, doi: 10.1128/JB.130.3.1117-1124.1977.
- [25] R. L. Camacho-Morales, V. Zazueta-Novoa, J. L. G. Casillas, E. A. Ballesteros, J. A. O. Bote, and R. Zazueta-Sandoval, “Purification and characteristics of an inducible by polycyclic aromatic hydrocarbons NADP+-dependent naphthalenediol

- dehydrogenase (NDD) in *Mucor circinelloides* YR-1”, *Protein Expr Purif*, vol. 97, pp. 1–8, May 2014, doi: 10.1016/J.PEP.2014.02.001.
- [26] Y. Alvarado-Caudillo *et al.*, “Presence and physiologic regulation of alcohol oxidase activity in an indigenous fungus isolated from petroleum-contaminated soils”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2002 98:1, vol. 98, no. 1, pp. 243–255, 2002, doi: 10.1385/ABAB:98-100:1-9:243.
- [27] K. L. Lee, H. R. Buckley, and C. C. Campbell, “An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycellal and yeast forms of *Candida albicans*”, *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, vol. 13, no. 2, pp. 148–153, Jan. 1975, doi: 10.1080/00362177585190271.
- [28] A. Rosas-Arellano *et al.*, “A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays”, *Histochemistry and Cell Biology* 2016 146:4, vol. 146, no. 4, pp. 421–430, May 2016, doi: 10.1007/S00418-016-1447-2.
- [29] P. Sawulski, B. Boots, N. Clipson, and E. Doyle, “Differential degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by indigenous microbial assemblages in soil”, *Lett Appl Microbiol*, vol. 61, no. 2, pp. 199–207, Aug. 2015, doi: 10.1111/lam.12446.
- [30] Sakshi and A. K. Haritash, “A comprehensive review of metabolic and genomic aspects of PAH-degradation”, *Arch Microbiol*, vol. 202, no. 8, pp. 2033–2058, Oct. 2020, doi: 10.1007/s00203-020-01929-5.
- [31] R. H. Peng *et al.*, “Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons”, *FEMS Microbiol Rev*, vol. 32, no. 6, pp. 927–955, Nov. 2008, doi: 10.1111/J.1574-6976.2008.00127.X.
- [32] D. Miyazawa *et al.*, “Isolation and Characterization of Genes Responsible for Naphthalene Degradation from Thermophilic Naphthalene Degradar, *Geobacillus* sp. JF8”, *Microorganisms*, vol. 8, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.3390/MICROORGANISMS8010044.
- [33] H. Silva-Jiménez and R. Zazueta-Sandoval, “Intracellular fate of hydrocarbons: possible existence of specific compartments for their biodegradation”, *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 121–124, no. 1–3, pp. 205–217, 2005, doi: 10.1385/ABAB:121:1-3:0205.
- [34] H. Peidro-Guzmán *et al.*, “Transcriptomic analysis of polyaromatic hydrocarbon degradation by the halophilic fungus *Aspergillus sydowii* at hypersaline conditions”, *Environ Microbiol*, vol. 23, no. 7, pp. 3435–3459, Jul. 2021, doi: 10.1111/1462-2920.15166.
- [35] J. N. Bateman, B. Speer, L. Feduik, and R. A. Hartline, “Naphthalene association and uptake in *Pseudomonas putida*”, *J Bacteriol*, vol. 166, no. 1, pp. 155–161, 1986, doi: 10.1128/JB.166.1.155-161.1986.
- [36] B. Mohapatra and P. S. Phale, “Microbial Degradation of

- Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation”, *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, p. 144, Mar. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2021.602445/BIBTEX.
- [37] A. Choudhary, H. Purohit, and P. S. Phale, “Benzoate transport in *Pseudomonas putida* CSV86”, *FEMS Microbiol Lett*, vol. 364, no. 12, Jul. 2017, doi: 10.1093/FEMSLE/FNX118.
- [38] V. Kumar and S. K. Dwivedi, “Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 28, no. 9, pp. 10375–10412, 2021, doi: 10.1007/s11356-020-11491-8.
- [39] A. K. Rathankumar *et al.*, “Surfactant-aided mycoremediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs): progress, limitation, and countermeasures”, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 97, no. 2, pp. 391–408, Feb. 2022, doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.6721>.
- [40] H. Park and I.-G. Choi, “Genomic and transcriptomic perspectives on mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons,” *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 104, no. 16, pp. 6919–6928, 2020, doi: 10.1007/s00253-020-10746-1.
- [41] F. Song, Y. Shi, S. Jia, Z. Tan, and H. Zhao, “Advances of naphthalene degradation in *Pseudomonas putida* ND6”, *AIP Conf Proc*, vol. 1944, no. 1, p. 020074, Mar. 2018, doi: 10.1063/1.5029792.
- [42] B. Mohapatra and P. S. Phale, “Microbial Degradation of Naphthalene and Substituted Naphthalenes: Metabolic Diversity and Genomic Insight for Bioremediation”, *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 9, p. 144, Mar. 2021, doi: 10.3389/FBIOE.2021.602445/BIBTEX.
- [43] A. K. Shankhwar and R. Paliwal, “Fungi in bioremediation of soil: Mycoremediation of PAHs compounds”, *Fungi Bio-prospects in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology: Volume 2: Extremophilic Fungi and Myco-mediated Environmental Management*, pp. 157–170, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-821925-6.00008-3.
- [44] S. C. Chun, M. Muthu, N. Hasan, S. Tasneem, and J. Gopal, “Mycoremediation of PCBs by *Pleurotus ostreatus*: Possibilities and Prospects”, *Applied Sciences*, vol. 9, no. 19, p. 4185, Oct. 2019, doi: 10.3390/app9194185.
- [45] E. Azin, K. Jenab, and H. Moghimi, “Biodegradation of crude oil by a halotolerant and biosurfactant producing strain of *Mucor circinelloides* in different microcosm conditions,” <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1828385>, 2020, doi: 10.1080/03067319.2020.1828385.
- [46] E. Azin and H. Moghimi, “Efficient mycosorption of anionic azo dyes by *Mucor circinelloides*: Surface

functional groups and removal  
mechanism study”, *J Environ Chem  
Eng*, vol. 6, no. 4, pp. 4114–4123,

Aug. 2018, doi:  
10.1016/J.JECE.2018.06.002.