

PROTEOMIC APPROXIMATION OF DIFFERENTIAL EXPRESSION IN *Pleurotus ostreatus* (OSTRA FUNGUS), AS A RESPONSE TO BIO-ACUMULATION OF LEAD (PB)

Huaraya-Chambi, Froilan Rodolfo, Dr. en Ciencias Ambientales¹, Calcina-Rondán, Liliam Elizabeth, Mg. en Gestión y Planificación Ambiental²

^{1,2}Universidad Tecnológica del Perú, Perú, c16955@utp.edu.pe, c18659@utp.edu.pe

*Abstract– In recent years there has been considerable progress in environmental biotechnology, in the use and application of different living organisms for the bioremediation of different compounds, on many occasions it's of toxic nature in contaminated sites or media, these bioremediation processes offer high specificity in the removal in both in situ and ex-situ systems. The use of white rot fungi in heavy metal bioremediation processes is a very promising environmental technology, the studies of it focus on the ability to degrade ubiquitous compounds. The purpose of this research is to try to decipher which are the key elements of the molecular genetics of *Pleurotus ostreatus* that make it tolerant and allow its accumulation of heavy metals such as lead (Pb), from a differential proteomic approach perspective. The methodology is divided into three stages: 1.- purification; obtaining the crude extract: precipitation with 90% ammonium sulfate, and hydrophobic interaction chromatography. Tandem mass spectrometry ESI-CID-MS/MS 3.- Bioinformatic analysis using DNA Star software, in which sequential homology studies were performed to know the structural character of the proteins. Through the results of differential proteomic approach (protein molecular mass of ~34 kDa), we have been able to establish that manganese peroxidase oxidative enzymes are found in their expression levels, showing a high degree of homology and identity of conserved regions in the alignments of the sequenced peptides, so we can suggest that these enzymes are extremely important for the processes of bioaccumulation of heavy metals (Pb). Furthermore, the geographical distribution could probably reveal some mutations in this family of proteins, trying to infer the participation of each amino acid along the polypeptide chain, which couldn't be found in the consensus region of the sequence but in the variable regions. Further studies of site-directed mutagenesis could reveal valuable information about this family, which is crucial in bioremediation processes from a biotechnological perspective.*

*Keywords-- *Pleurotus ostreatus*, bioinformatics, proteomics, bioaccumulation.*

PROTEOMIC APPROXIMATION OF DIFFERENTIAL EXPRESSION IN *Pleurotus ostreatus* (OSTRA FUNGUS), AS A RESPONSE TO BIO-ACUMULATION OF LEAD (PB).

Huaraya-Chambi, Froilan Rodolfo, Dr. en Ciencias Ambientales¹, Calcina-Rondán, Liliam Elizabeth, Mg. en Gestión y Planificación Ambiental²

^{1,2}Universidad Tecnológica del Perú, Perú, c16955@utp.edu.pe, c18659@utp.edu.pe

*Abstract - In recent years there has been considerable progress in environmental biotechnology, in the use and application of different living organisms for the bioremediation of different compounds, on many occasions it's of toxic nature in contaminated sites or media, these bioremediation processes offer high specificity in the removal in both in situ and ex-situ systems. The use of white rot fungi in heavy metal bioremediation processes is a very promising environmental technology, the studies of it focus on the ability to degrade ubiquitous compounds. The purpose of this research is to try to decipher which are the key elements of the molecular genetics of *Pleurotus ostreatus* that make it tolerant and allow its accumulation of heavy metals such as lead (Pb), from a differential proteomic approach perspective. The methodology is divided into three stages: 1.- purification; obtaining the crude extract: precipitation with 90% ammonium sulfate, and hydrophobic interaction chromatography. Tandem mass spectrometry ESI-CID-MS/MS 3.- Bioinformatic analysis using DNA Star software, in which sequential homology studies were performed to know the structural character of the proteins. Through the results of differential proteomic approach (protein molecular mass of ~34 kDa), we have been able to establish that manganese peroxidase oxidative enzymes are found in their expression levels, showing a high degree of homology and identity of conserved regions in the alignments of the sequenced peptides, so we can suggest that these enzymes are extremely important for the processes of bioaccumulation of heavy metals (Pb). Furthermore, the geographical distribution could probably reveal some mutations in this family of proteins, trying to infer the participation of each amino acid along the polypeptide chain, which couldn't be found in the consensus region of the sequence but in the variable regions. Further studies of site-directed mutagenesis could reveal valuable information about this family, which is crucial in bioremediation processes from a biotechnological perspective.*

Key word: *Pleurotus ostreatus*, bioinformatics, proteomics, bioaccumulation, bioremediation.

I. INTRODUCCIÓN

La proteómica se centra en el estudio a gran escala de las proteínas, su estructura, función y diversidad, siendo un proteoma, un conjunto de proteínas expresadas por un

genoma, una célula o un tejido, por lo que su análisis mediante geles implica la electroforesis bidimensional (2-DE) de proteínas, la visualización de estas mezclas de proteínas (por ejemplo, tinción colorimétrica, tintes, etiquetado fluorescente) y la visualización de tipos específicos de proteínas (por ejemplo, tinción de fosfoproteínas y proteínas glicosiladas) [14].

La revisión de la literatura muestra que los tratamientos de biorremediación, que utilizan la actividad biológica natural de los organismos vivos, pueden reducir o eliminar los riesgos ambientales derivados de la acumulación de sustancias químicas peligrosas y otros residuos tóxicos [1]. La actividad biológica natural de organismos como plantas, hongos y bacterias pueden utilizarse para tratar sedimentos y suelos [2], proporcionando una eliminación eficaz de muchos tipos diferentes de contaminantes. Se conoce que distintas comunidades de hongos han colonizado suelos contaminados por metales pesados, acumulando en sus tejidos elevadas concentraciones de estos elementos, provocando en ellas diversas respuestas de orden proteómico diferencial, que se traducen en mecanismos de resistencia expresados en tolerancia y evitamiento dependiente de la especie de hongo, del metal pesado en particular y de las condiciones medioambientales. *Pleurotus ostreatus* es un hongo comestible de gran importancia biotecnológica por ser un organismo degradador de lignina, según Durán, Téllez, Pezzella y Díaz, refieren que, diferentes estudios han demostrado que la actividad y número de isoenzimas de las diferentes fenoloxidasas en hongos, dependen de diferentes factores ambientales entre ellos la temperatura, pH, inductores, condiciones de cultivo y la composición del medio [22; 23; 24; 25]; asimismo Téllez (2005), refiere que estas enzimas pueden ser producidas de forma constitutiva o ser inducidas [26]. Cohen y col. (2002), nos dice que las enzimas versátil peroxidasa (EC. 1.11.1.16), son oxidorreductasas capaces de degradar compuestos fenólicos y diversos tipos de compuestos recalcitrantes entre los que se encuentran los colorantes sintéticos. Por lo anterior estas enzimas pueden ser aplicadas en diversas aplicaciones biotecnológicas y sin duda

representan una alternativa potencial para la biorremediación de contaminantes de diversos orígenes [27].

El tipo de tratamiento de biorremediación empleado y su éxito depende del estado del suelo, el estado de los recursos afectados, la capacidad de la tecnología de saneamiento, el proceso de tratamiento, entre otros [1]; así, el fenómeno de biosorción se caracteriza por la retención del metal mediante la interacción fisicoquímica del metal con los ligandos expuestos extracelularmente pertenecientes a algunas de las moléculas constituyentes de la pared celular, como los grupos carboxilo, amino e hidroxilo [1]. Tenemos varios estudios respecto al uso de hongos para la remediación de suelos contaminados con metales pesados como *Fusarium temperatum* CTLM05 (Pb^{+2}), *Fusarium temperatum* CTLM08 (Zn^{+2}), *Fusarium oxysporum* CTLM18 (Ni^{+2} y Cd^{+2}), *Fusarium oxysporum* CTLM12 (Ag^{+1}), *Fusarium inflexum* CTLM22 (Cu^{+2}) y *Penicillium vanluykii* CTLM11 (Cr^{+6}) [15]. Otros, para la adsorción de metales contenido en aguas residuales haciendo uso de lacasa de *Pleurotus ostreatus* y su biomasa residual [17]. Su uso no sólo se limita a metales pesados sino también a hidrocarburos donde *Pleurotus ostreatus* ha demostrado gran eficiencia [18].

Teniendo en cuenta los antecedentes, consideramos que *Pleurotus ostreatus* va expresar proteínas o enzimas con capacidad de bioacumulación de plomo, por lo que el objetivo de esta investigación es: Identificar las proteínas y/o enzimas de *Pleurotus ostreatus*, por su tolerancia al plomo (Pb), desde una perspectiva de aproximación proteómica diferencial haciendo uso de electroforesis bidimensional (2D), de secuenciación por espectrometría de masa MALDI TOF/TOF y de un análisis bioinformático.

II. METODOLOGIA

Las muestras de *Pleurotus ostreatus* fueron obtenidas de 3 zonas distintas del departamento de Cusco: Huayllay – Cusco, Harin – Calca, San Nicolás de Bari – Anta. La metodología empleada se dividió en tres fases detalladas a continuación:

A. Purificación:

1) *Etapa I, Obtención del extracto bruto:* Las setas obtenidas de *Pleurotus ostreatus*, (500 g) fueron trituradas con la ayuda de un molino manual, en 1500 ml de tampón acetato de sodio 0,1 M pH 5,0 durante 24 horas. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 9000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga marca MLW, Tipo T24, modelo 83-47269. El sobrenadante fue filtrado en estopa a fin de poder retirar las partículas grandes y materiales insolubles remanentes.

2) *Etapa II, Precipitación con sulfato de Amonio al 90%:*

Al sobrenadante de la etapa anterior (850 ml) se le adicionó lentamente, con agitación constante, sulfato de amonio sólido a saturación del 90% (661 g/litro) durante una hora y una hora adicional sobre agitación constante, posteriormente se centrifugo a 9000 rpm durante 30 minutos. El precipitado obtenido fue re-suspendido en el menor volumen de tampón acetato de sodio 0,1M pH 5,0 luego la mezcla es colocada en saco de diálisis contra el mismo tampón con agitación constante, este tampón fue cambiado hasta que la reacción del sulfato de amonio $[(NH_4)_2SO_4]$ frente al cloruro de bario $[BaCl_2]$ fue negativa [39].

3) *Etapa III, Cromatografía de Interacción Hidrofóbica:*

El sistema cromatográfico utilizado fue de cromatografía convencional, usando la mini columna Hit Trap Phenyl FF (High sub) 1 ml. HITrap (H&C USA.). Las fracciones purificadas son colectadas en muestras de 0.5 ml. por tubo, estas son utilizadas para determinar la cantidad de picos de proteínas encontradas en la muestra y/o para la obtención del “pool” y guardadas a 0°C. El flujo fue mantenido constante a 0.5 ml/min y monitoreado a 280 nm.

B. Espectrometría de masas en Tándem: ESI-CID-MS/MS fue realizada usando un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (quadrupole-time of flight; Q-TOF, Micromass Manchester, UK), equipado con una fuente de nano spray operado en modo de ionización positivo. Las condiciones de ionización fueron: Voltaje capilar de 2.3 kV, un cono-voltaje y lentes RF1 de 30 y 100 V. respectivamente; y una energía de colisión de 10 eV. La temperatura de la fuente es de 70°C y el cono de gas fue N_2 a un flujo de 80 l/h, no se usó gas nebulizador para obtener el spray. El gas argonio, fue utilizado para la fragmentación de los iones. Se realizó una calibración externa con yoduro sódico (NaI) en una faja de masas a partir de 50 a 800 m/z. Todos los espectros fueron adquiridos con el analizador TOF en modo Vmode (TOF kV=9.1) y voltaje MCP a 2150 V [44].

C. Estudio y análisis bioinformático: A partir de los resultados obtenidos se realizó los estudios de homología secuencial en consulta con bases de datos. Posteriormente haciendo uso del software DNA Star, se procedió al estudio bioinformático de proteínas, el cual reveló información de carácter estructural de las proteínas; así es posible comparar las regiones y/o dominios específicos que revelan a que familia de proteínas pertenece y la importancia de estas. Las bases de datos utilizadas fueron:

EMBL Nucleotide Sequence Database:
http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/embl_db/ebi/topembl.html.

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).

ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).

DO NOT REMOVE

SWISS-2DPAGE: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database <http://www.expasy.ch/ch2d/>
 SWISS-PROT: Annotated protein sequence database. <http://www.expasy.ch/sprot/>
 WORLD-2DPAGE: Index to 2-D PAGE databases and services. <http://www.expasy.ch/ch2d/2d-index.html>
<http://www.proteome.com/comments.html>

III. RESULTADOS

A. Purificación de proteínas a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus*

Los resultados de la purificación de proteínas a través de la cromatografía de interacción hidrofóbica usando una mini columna Hit Trap Phenyl FF, muestra un nivel de homogeneidad en la separación de proteínas para las 3 muestras analizadas, donde se destaca la presencia fundamental de 5 picos protéicos, enumerados del 1 al 5 respectivamente (Figura 1).

La elución de las muestras fue realizada usando una gradiente lineal discontinua (0-100%) de concentración del tampón B. El flujo fue mantenido constante a 1ml/min y monitoreado a 280 nm. Los tiempos de retención se mantuvieron casi uniformes, (± 25.12 min.) para algunas proteínas. Ese criterio fue empleado para escoger el pico 2 de las 3 muestras de *Pleurotus ostreatus* para su análisis por espectrometría de masa, los cuales presentaron tiempos de retención también semejantes (± 37.17 min.). La identificación de las muestras es la siguiente:

- 1. *P. ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco
- 2. *P. ostreatus* procedente de Harin – Calca
- 3. *P. ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta

B. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus*.

El perfil de masa molecular en SDS-PAGE, de las muestras estudiadas, evidencian un rango de masas variables que se podrían agrupar en 3 bloques: Uno en torno a: de ± 25 a ± 30 kDa; de ± 30 a ± 40 kDa y de ± 60 a 110 kDa, respectivamente (Figura 2). Padrones de masa molecular: β -galactosidasa (116kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (36 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (25 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa). La proteína seleccionada aparentemente correspondería a aquella que posee una masa molecular de ~ 34 kDa aproximadamente y se ubicaría en el segundo bloque de proteínas presentes en el gel de poliacrilamida.

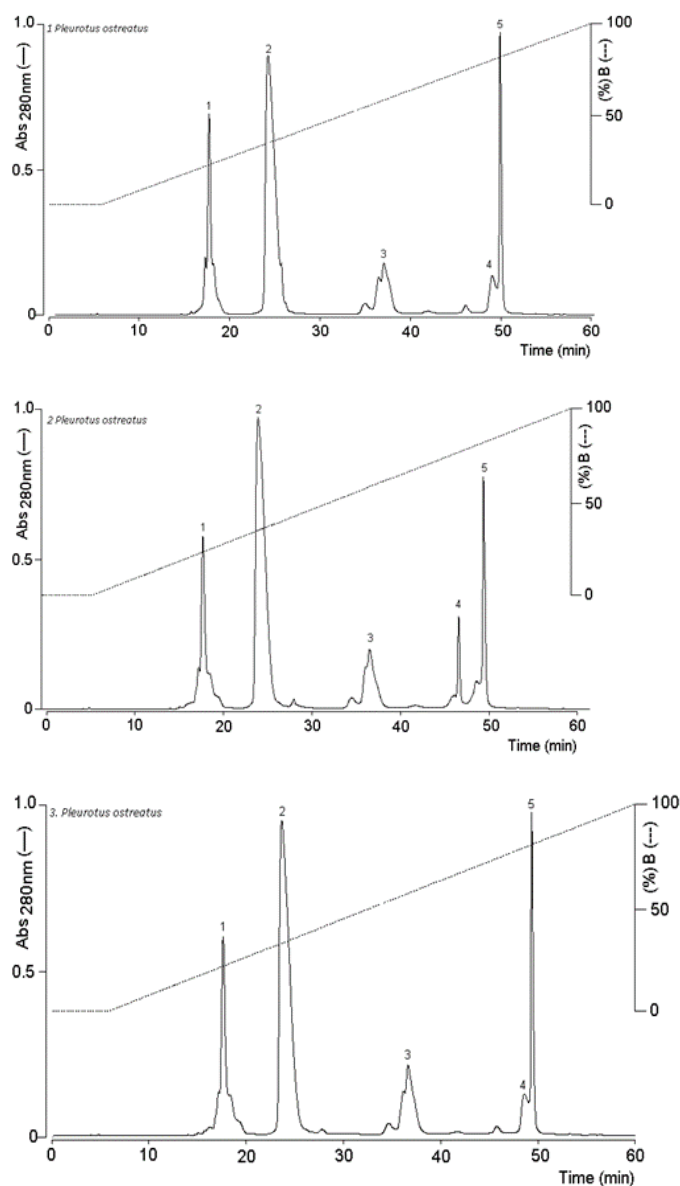


Fig. 1 Perfil cromatográfico de las muestras *P. ostreatus* (1) [superior], *P. ostreatus*, (2) [centro] y *P. ostreatus*, (3) [inferior], por cromatografía de interacción hidrofóbica usando una mini columna Hit Trap Phenyl FF.

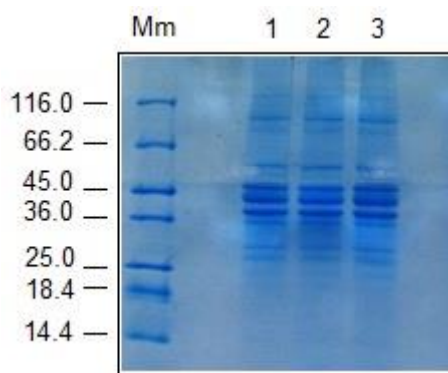


Fig. 2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (12.5 %). Mm marcadores de masa molecular (kDa).

C. Identificación de secuencias mediante espectrometría de masas de proteínas a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus*.

La masa molecular del pico seleccionado (2) de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1), evidencia una masa de 4076.50 m/z; de la muestra procedente de Harin – Calca (2), evidencia una masa de 4240.82 m/z y de San Nicolás de Bari – Anta (3), una masa de 3781.12 m/z (Figura 3). La secuencia del péptido generado por hidrólisis triptica confirma la masa y secuencia:

TABLA I
MASA MOLECULAR DEL PICO SELECCIONADO DE *Pleurotus ostreatus*

Nro	Pico	Secuencia	Masa (kDa)
1	2	...HSIAAADKVDPSIPGTPFDSTPGVFD SQFFIETQLKGR...	4076.50
2	2	...LVPEPFDSVDSILARMSDAGFSPVEVVWLLASHSIAAA DK...	4240.82
3	2	...FSPTLGGGGADGSIIAFDTIETNFPANAGIDEIVSAQK...	3781.12

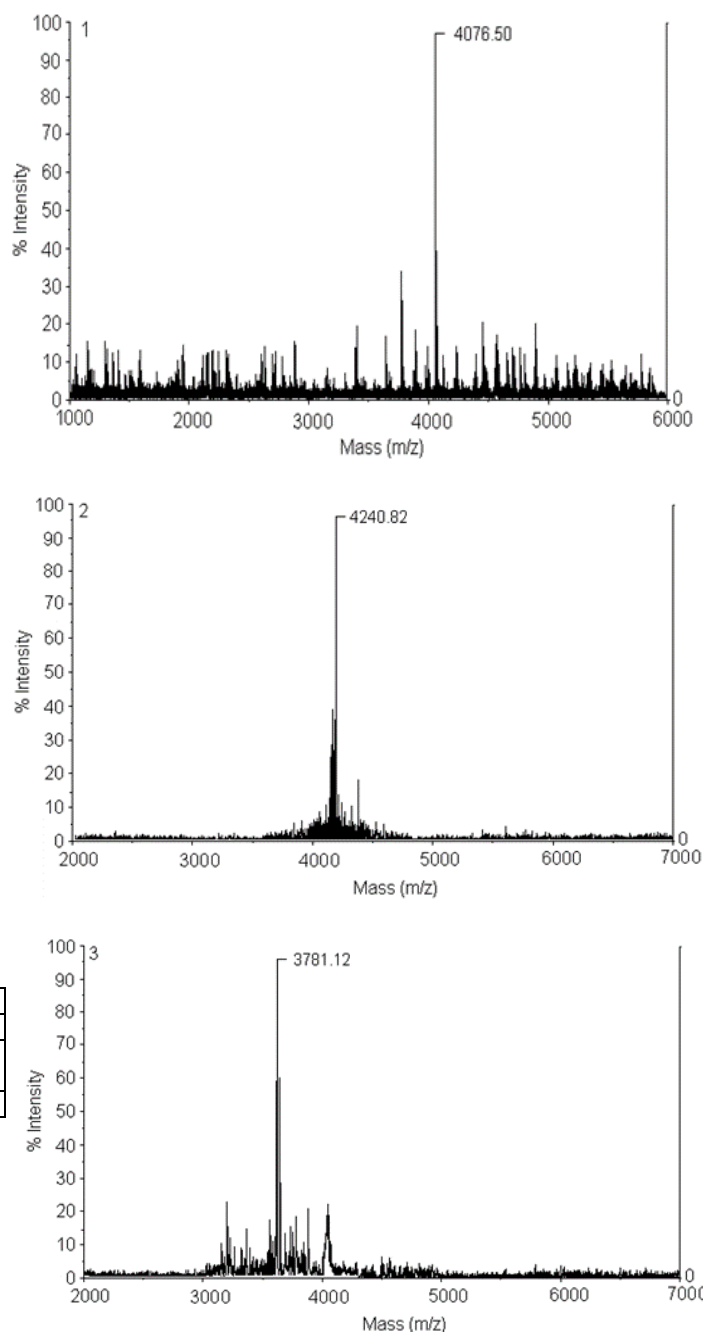


Fig. 3 Espectro ESI-QTOF-MS/MS, del pico 2 seleccionado (numerado) del cromatograma por HPLC de fase reversa de la muestra *P. ostreatus* (1) [superior], *P. ostreatus*, (2) [centro] y *P. ostreatus*, (3) [inferior].

D. Estudio de homología secuencial (Bioinformática), a partir de muestras de *Pleurotus ostreatus*.

La Figura 4, 5 y 6 muestran los estudios de homología secuencial, por análisis bioinformático usando el software DNASTar (Ver 6.0) de la proteína correspondiente al pico 2 del cromatograma de HPLC de fase reversa de *Pleurotus ostreatus* (1), (2) y (3). La secuencia de un péptido tríptico generado del pico en mención, sometido a un análisis de homología secuencial, con otras enzimas oxidativas procedentes del banco de datos

SWISS-PROT (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/): Annotated protein sequence database: *Pleurotus eryngii* (Accession O94753 y Q9UR19, Ruiz-Duenas,F.J., et al., 1999), *Phlebia radiata* (Accession Q96TS6, Moilanen,A.-M., et al., 1996) revela que se trata de una enzima oxidativa perteneciente a la familia del manganeso peroxidasa.

Dentro de las peroxidasa extracelulares producidas por este tipo de hongos se encuentra la manganeso peroxidasa (MnP;EC.1.11.1.13); esta enzima tiene un alto potencial de uso en aplicaciones biotecnológicas, como degradación de biomasa Baldrian *et al.* (2005); Kong *et al.* (2016); Liu, *et al.* (2019); Morales Fonseca (2014), tratamiento de aguas [32; 35; 36; 37]. Bilal y Asgher (2015), decoloración de tintes para textiles, bioblanqueamiento de pulpa de papel [38]; Sasaki Kajino, Sugiyama y Takahashi (2001), bioremediación [39]; Morales-Fonseca y Ruiz-Tovar (2008), biotransformación y desintoxicación de compuestos aromáticos ambientales persistentes [40]; Baborová (2006); Ergun y Urek (2017); Karigar y Rao (2011); Numir *et al.* (2015); Quevedo-Hidalgo, Narvaez-Rincón, Pedrosa-Rodriguez y Velásquez-Lozano (2012), química verde: producción de compuestos químicos de alto valor a partir de lignina [41; 42; 43].

La parte en recuadro representa la secuencia consenso entre las diferentes enzimas oxidativas manganeso peroxidasa disponibles en la base de datos, la cual guarda un alto grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado vía espectrometría de masa.

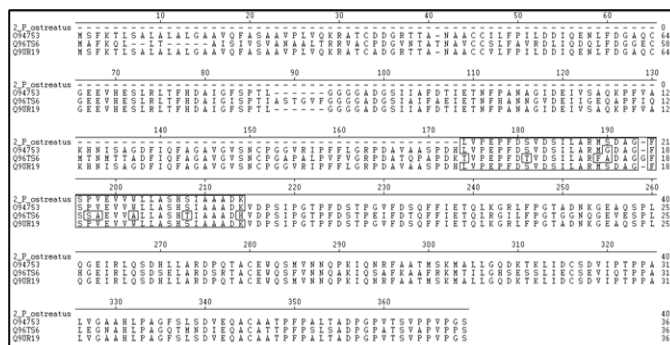


Fig. 4 Alineamiento de un péptido tríptico secuenciado por espectrometría de masas (ESI-QTOF-MS/MS), correspondiente al pico 2 de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Huayllay – Cusco (1).

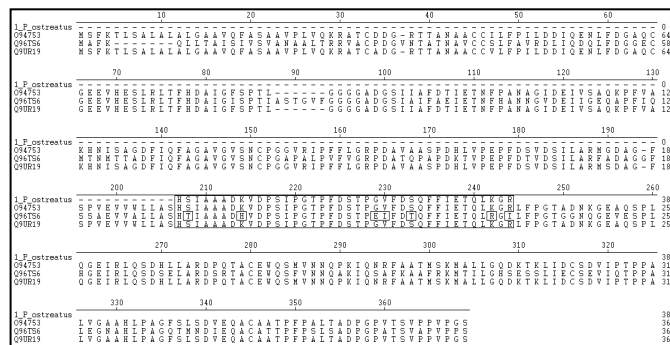


Fig. 5 Alineamiento un péptido tríptico secuenciado por espectrometría de masas (ESI-QTOF-MS/MS), correspondiente al pico 2 de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de Harin – Calca (2).

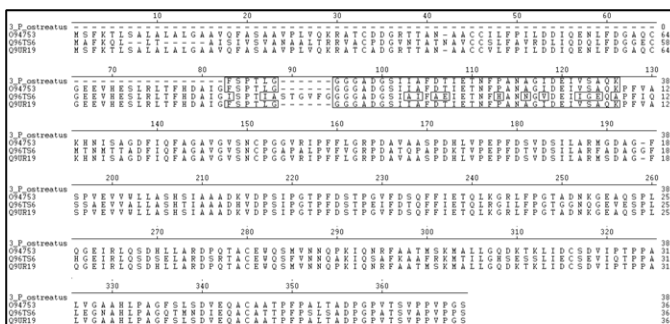


Fig. 6 Alineamiento de un péptido tríptico secuenciado por espectrometría de masas (ESI-QTOF-MS/MS), correspondiente al pico 2 de la muestra de *Pleurotus ostreatus* procedente de San Nicolás de Bari – Anta (3).

IV. CONCLUSIONES

En el presente estudio de aproximación proteómica se ha podido evidenciar que *Pleurotus ostreatus* de diferentes zonas del departamento de Cusco, revelan niveles de expresión proteica semejante, en relación a la presencia de enzimas oxidativas como manganeso peroxidasa, al mostrar un alto grado de homología e identidad de regiones conservadas en los alineamientos de los péptidos secuenciados, por lo que

podemos sugerir que estas enzimas son extremadamente importantes debido a su capacidad de responder a un proceso de bioacumulación de plomo (Pb) gracias a su tolerancia. La distribución geográfica probablemente podría revelar algunas mutaciones en esta familia de proteínas, lo cual torna más interesante el estudio, en el sentido de tratar de inferir la participación de cada aminoácido a lo largo de la cadena polipeptídica, los cuales no se podrían encontrar en la región consenso de la secuencia sino en las regiones variables. Estudios ulteriores de mutagénesis sito-dirigida podrían revelarnos estas valiosas informaciones respecto de esta familia de proteínas que son cruciales en los procesos de biorremediación desde el punto de vista biotecnológico.

AGRADECIMIENTO

Al Ph.D Luis Alberto Ponce Soto, coordinador del Laboratorio F-401, de Química de Proteínas de la Universidad Católica de Santa María- Arequipa; por permitirnos llevar a cabo parte del desarrollo experimental.

REFERENCIAS

1. Manuscript Templates for Conference Proceedings, IEEE. http://www.ieee.org/conferences_events/conferences/publishing/templates.html. Rekondo, J. El reino Fungi y la importancia de los hongos. Deia.eus. [citado el 5 de agosto de 2021]. [En línea] Disponible en: <https://blogs.deia.eus/ser-natural/2019/09/25/el-reino-fungi-y-la-importancia-de-los-hongos/>.
2. Jiménez-Santos, J. Amanitacesarea.com. [En línea] 2020. [citado el 5 de agosto de 2021] Disponible en: <http://www.amanitacesarea.com/>.
3. De la minería aurífera en Colombia B en ARCCC y. MG en el P, De una revisión de la minería aurífera en Colombia B en ARCCC y. MG en el P, De una revisión bibliográfica entre los años a. P. Mónica Isabel Cartagena David. Edu.co. [En línea] 2019. [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/13927/1/Cartagenam%20C3%B3nica_2019_Biorremediacion%20C3%B3n%20CianuroMiner%C3%ADa.pdf.
4. De Ingeniería Ambiental EAP. Universidad Nacional de Cajamarca. Edu.pe. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/3392/TESIS%20B IOSORCI%20C3%93N%20-%20UNIVERSIDAD%20NACIONAL%20DE%20CAJAMARCA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
11. Hurtado, E. Diez aplicaciones de la proteómica para empresas de alimentación. Ainia.es. 2020. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ainia.es/tecnologia/tecnologia/aplicaciones-proteomica-empresas-alimentacion/>.
12. García, PD. Caracterización Proteómica de la Célula B Tumoral de la Leucemia Linfocítica Crónica y su Contrapartida Celular Normal. Usal.es. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/137441/CIC_D%20C3%AD ezGarciaP.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
13. UCM-Genómica y Proteómica. Ucm.es. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ucm.es/gyp/proteomica>.
14. Juárez, C. Proteómica: sus beneficios en la alimentación, salud y nutrición. Thefoodtech.com. [En línea] 2020. [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://thefoodtech.com/nutricion-y-salud/proteomica-su-utilidad-en-la-ciencia-alimentaria>.

15. Muñoz-Silva L, Olivera-Gonzales P, Santillán-Torres M, Tamariz-Angeles C. Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa. Jangas (Perú) : Rev Peru Biol. 2019;26(1):109–18.
16. El Perú” “Uso D. E. Hongos Para L. A. Remediación D. E. Suelos Contaminados Por Residuos Sólidos Domésticos E. N. Facultad de Ciencias Ambientales Carrera Profesional de Ingeniería Ambiental. Edu.pe. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://repositorio.cientifica.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12805/1382/TB-Cuenca%20R.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
17. Buap.mx. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/12695/20210317190412-6878-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
18. De Ingeniería Ambiental C. Universidad Agraria del Ecuador. Edu.ec. [En línea] [citado el 6 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/JIMENEZ%20VELEZ%20VILMA%20CECIBEL.pdf>.
19. De Biotecnología Ambiental. Universidad Nacional de Tumbes. [En línea] 2019. <http://repositorio.untumbes.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12874/409/TESIS%20DE%20MAESTRIA%20-%20CUBAS%20ZU%20c3%91IGA%20-%20Acceso%20Restringido.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
20. H., Hu. Life Support: The Environment and Human Health. Human Health and Heavy Metals Exposure. 2002. págs. 65-81.
21. J., Ton. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance in Arabidopsis: molecular-genetic basis of induced resistance in relation to basal resistance. GEWASBESCHERMING. 2001. págs. 32(6):158-9.
22. Durán, N. R. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports. Enzyme and Microbial Technology, 907-931. 2002.
23. Téllez, T. M. Growth and laccase production by Pleurotus ostreatus in submerged. Applied Microbiology and Biotechnology, 675-679. 2008.
24. Pezzella, C. L. Transcriptional analysis of Pleurotus ostreatus laccase genes. Applied Microbiology and Biotechnology, 705-717. 2012.
25. Díaz, G. Patrones de la casasa de Pleurotus ostreatus desarrollado en fermentación sumergida a diferentes pH del medio de cultivo. Tesis Doctoral UAM, 123. 2013.
26. Téllez, A. A. Expression of a heterologous laccase by Aspergillus niger cultured by solid-state and submerged fermentations. Enzyme Microb Technol. 2005.
27. Cohen, R., Persky y Hadar, Y. Biotechnological applications and potential of Word-degrading mushrooms of the genus Pleurotus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58(5):582-594. 2002a.
28. Fernández-Fueyo, E., F., Ruiz-Dueñas, J. y Martínez, A. T. Engineering and acidic pH stable versatile peroxidase from an extralong manganese peroxidase. Biochem. J. (submitted). 2014.
29. Salame, T. y otros. Redundancy among manganese peroxidases in Pleurotus ostreatus. Appl Environ Microbiol. 2013. págs. 79:2405–2415.
30. Salame, T., y otros. Release of Pleurotus ostreatus versatile-peroxidase from Mn2+ repression enhances anthropogenic and natural substrate degradation. PLoS ONE 7, 12. 2012. págs. 7, 12.
31. Ruiz-Dueñas, F. J. & Martínez, A. T. Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. Microbial Biotechnol. 2:164-177. 2009.
32. Baldrian P, Valaskova V, Merhautova V, Gabriel J. Degradation of lignocellulose by Pleurotus ostreatus in the presence of copper, manganese, lead and zinc. Research in microbiology. 2005. págs. 156(5-6):670-6.
33. Karigar CS, Rao SS. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. Enzyme Research. 2011.
34. PM., Kirk. Agaric Flora of Sri Lanka, DN Pegler, in: Kew Bulletin Additional Series, XII, HMSO, London (1986), p. 519, 104 figs. Price £ 27.00. Transactions of the British Mycological Society, Sep 1;89(2):281. 1987.
35. Kong W, Chen H, Lyu S, Ma F, Yu H, Zhang X. Characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus Echinodontium

- taxodii 2538, and its use for the degradation of lignin-related compounds. *Process Biochemistry*. 2016 Nov. págs. 1;51(11):1776-83.
36. Liu J, Zhang S, Shi Q, Wang L, Kong W, Yu H, Ma F. Highly efficient oxidation of synthetic and natural lignin-related compounds by *Physisporinus vitreus* versatile peroxidase. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2019 Jan. págs. 1;136:41-8.
37. DM., Morales Fonseca. Producción de enzimas ligninolíticas a partir de biomasa de *Panicum maximum* por *Pleurotus ostreatus*. Ingeniería Química. 2015.
38. Bilal M, Asgher M. Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. *Chemistry Central Journal*. 2015 Dec.; págs. 9(1):1-4.
39. Sasaki T, Kajino T, Li B, Sugiyama H, Takahashi H. New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001 May. págs. 1;67(5):2208-12.
40. DM, Morales Fonseca. Determinación de la capacidad de remoción de cadmio, plomo y níquel por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados. Pontificia Universidad javeriana. Julio 2008 10.13140/RG.2.2.35853.56803.
41. Baborová P, Möder M, Baldrian P, Cajthamlová K, Cajthaml T. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Research in Microbiology*. 2006 Apr 1;157(3):24.
42. Kharas GB, Kray LJ, Mitchell SL, Muhammad J, Numir F, Plass EA, Reens JR, Skariah JM, Sosnoski ER, Svienty CJ. Novel Copolymers of Styrene. 6. Halogen Ring-Substituted 2-Cyano-3-phenyl-2-propenamides. *Journal of Macromolecular Science, Part A*. . 2015 Feb 1.
43. Quevedo-Hidalgo, Balkys, y otros. Producción de enzimas lignocelulolíticas a partir de residuos de floricultura empleando *Pleurotus ostreatus* *Universitas Scientiarum* vol. 20 no.1 . enero 2015.
44. Ponce-Soto LA, Leiva L, Landucci EC. Understanding the molecular mechanism and structure-function relationship of the toxicity of PLA2 and K49 homologs in snake venom. *Biomed Res Int*. 2013;2013:243047. doi: 10.1155/2013/243047. 2013.