



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“CARACTERIZACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE LEVADURAS  
EXTREMÓFILAS PARA LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS  
XENOBIÓTICOS EN CONDICIONES EXTREMAS”**

**TESIS PROFESIONAL**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**LICENCIADO EN CIENCIAS CON AREA TERMINAL EN  
BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

PRESENTA:

**KEVIN YAIR MÉNDEZ DOMÍNGUEZ**

**DR. RAMON ALBERTO BATISTA GARCÍA**

**DRA. NILDA DEL CARMEN SÁNCHEZ CASTELLANOS**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**DICIEMBRE, 2021**

## **DEDICATORIA**

*Esta tesis está dedicada a mis padres Cosme y Lilian. quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un logro más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, siempre han sido y seguirán siendo mi más grande inspiración para seguir creciendo, los amo mucho.*

*A mi hermano Maikel quien gracias a su motivación me encuentro ahora en este momento, quien además me enseñó a nunca darme por vencido y seguir adelante a pesar de todas las adversidades.*

*Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigos de la Licenciatura por todo el apoyo que me brindaron y por estar hi cuando los necesitaba.*

## INDICE

|                                    |           |
|------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>                | <b>1</b>  |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>           | <b>2</b>  |
| <b>ANTECEDENTES.....</b>           | <b>22</b> |
| <b>HIPOTESIS.....</b>              | <b>31</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>              | <b>31</b> |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>     | <b>31</b> |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b> | <b>35</b> |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>           | <b>40</b> |
| <b>PERSPECTIVAS.....</b>           | <b>40</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>        | <b>41</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>           | <b>41</b> |

## 1. RESUMEN

Los microorganismos extremófilos se definen como agentes promisorios para la biodegradación de compuestos xenobióticos en condiciones extremas. En particular, las levaduras extremófilas, han sido poco caracterizadas de acuerdo con su potencial biodegradativo y por tanto pocas aplicaciones en biorremediación se han implementado a partir de ellas. Durante este proyecto se evaluó el potencial de biodegradación de una colección de levaduras extremófilas aisladas de glaciares mexicanos y del Ártico frente a compuestos xenobióticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos). Se utilizó una aproximación de cultorómica para identificar los aislados más promisorios y se implementó una estrategia de co-cultivos con el objetivo de identificar sinergias o consorcios microbianos con capacidades extraordinarias para la degradación de estos compuestos. Logramos seleccionar 5 cepas de levaduras y 2 condiciones de cultivos a partir de la colección de las 14 cepas de levaduras por medio de análisis estadístico multivariado, siendo *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 3, *Leucosporidium* sp. y *Z. obscura* las cepas que presentaban un mayor crecimiento, mientras que las condiciones que beneficiaban a las cepas siendo medio mínimo + YPD 0.5% y medio mínimo + Glucosa 0.5% + NaCl 0.5M.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 1.1 ORIGEN DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs)

Los HAPs que existen en el ambiente (atmósfera, suelo y ecosistemas acuáticos) pueden proceder tanto de la naturaleza como de la actividad humana (Tabla 1). Básicamente las fuentes de HAPs provienen de tres opciones: el petróleo u origen petrogénico, la combustión u origen pirolítico (a partir de combustibles fósiles, madera, erupciones, etc.) y por la síntesis por seres vivos (Borneff et al. 1968; Haritash and Kaushik 2009; Suess 1976).

Estos compuestos se forman por la exposición de moléculas orgánicas a elevadas temperaturas (pirólisis), así como también por exposiciones a menor temperatura (100-150 °C) y a elevadas presiones durante millones de años en sedimentos, durante la formación de petróleo (Dai et al. 2014).

**TABLA 1. Combustión incompleta de madera y combustibles fósiles.**

| ANTROPOGÉNICAS                                  | NATURALES                          |
|---|------------------------------------|
| Combustión de madera y combustibles fósiles     | Fuegos forestales                  |
| Emisiones de vehículos, aviones y embarcaciones |                                    |
| Industria del petróleo                          |                                    |
| Prospecciones y extracción                      |                                    |
| Accidentes de transporte                        |                                    |
| Almacenamiento                                  | Producción por seres vivos         |
| Refinado  |                                    |
| Agua de lastre                                  |                                    |
| Residuos  |                                    |
| Creosota  | Filtraciones naturales de petróleo |
| Utilización de petróleo y derivados             |                                    |
| Procesos industriales                           |                                    |
| Agua residual urbana e industrial               |                                    |
| Agua de escorrentía urbana y de carreteras      | Erupciones volcánicas              |
| Humo de tabaco                                  |                                    |
| Incineración de residuos                        |                                    |

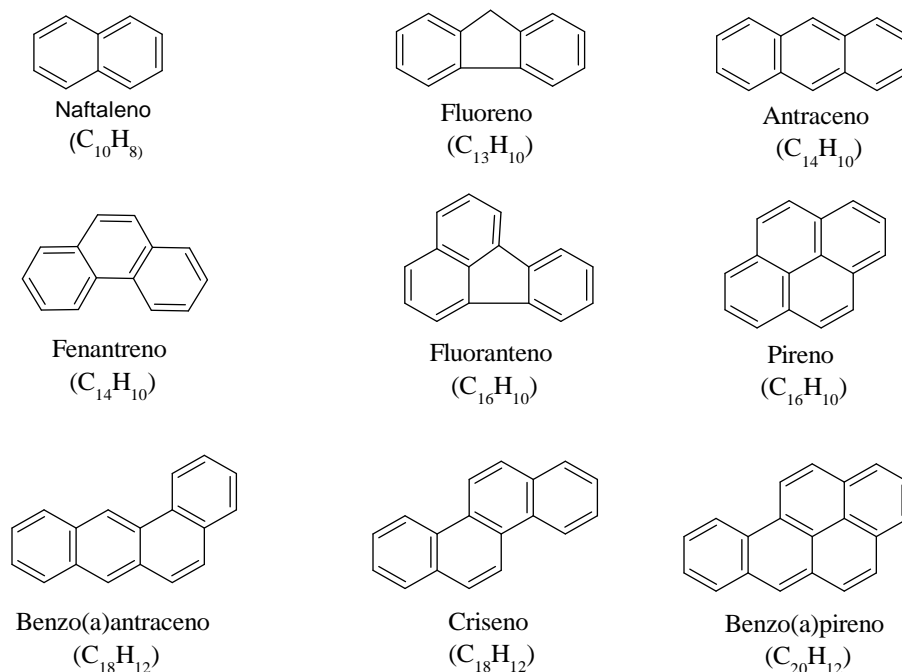
*Datos obtenidos de (Borneff et al. 1968; Suess 1976)*

### 1.1.1 HAPs

Los HAPs se definen por ser estructuras formadas por dos o más moléculas de benceno fusionadas. Se conocen unos 100 tipos de HAPs diferentes ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La especial distribución de electrones en los anillos aromáticos (resonancia) les proporciona una alta estabilidad, característica que los hace resistentes a la oxidación tanto química como biológica. Debido a su amplia distribución, toxicidad y persistencia han sido considerados agentes contaminantes de gran interés (Kim et al. 2013).

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAPs en el ambiente van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAP. La hidrofobicidad es de gran importancia ya que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos. Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAPs muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica (Clements, Otis, and Wissing 1994; Sims and Overcash 1983).

El HAP más simple es el naftaleno ya que sólo posee dos anillos y por lo tanto no es policíclico en sentido estricto, como se observa en la figura 1. Con el aumento del número de anillos en la molécula aumenta su hidrofobicidad y recalcitrancia, siendo menos biodisponibles para su biodegradación (Sims and Overcash 1983).



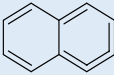
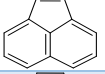
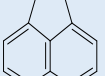
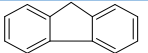
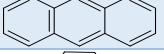
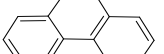
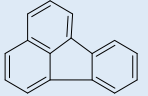
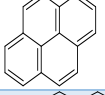
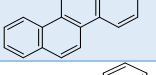
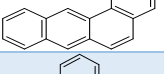
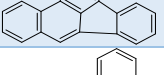
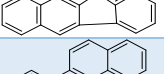
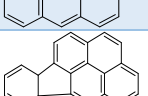
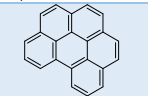
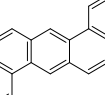
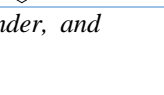
**FIGURA 1. Estructura química de hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor presencia e importancia ambiental.**

En espacios contaminados, los HAPs se encuentran habitualmente formando parte de NAPLs (Non Aqueous Phase Liquids) como consecuencia de vertidos de combustibles de origen petrogénico o de productos derivados del carbón (origen pirolítico) (Blumer 1976).

En 1979 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) incluyó los 16 HAPs de 2 a 6 anillos más frecuentes en su lista de contaminantes de investigación prioritaria, porque suponen un riesgo para la salud pública ver FIGURA 2 (Keith and Telliard 1979; Wise, Sander, and Schantz 2015).

El efecto ambiental de los HAPs está determinado por sus propiedades fisicoquímicas, como su peso molecular, su configuración estructural, el grado de solubilidad, número de anillos aromáticos y su volatilidad (Tabla 2). Los HAPs de bajo peso molecular (2 y 3 anillos) son más fáciles de degradar debido a su naturaleza semivolátil y mayor solubilidad, por lo tanto, los de elevado peso molecular (4 o más anillos) presenta una baja solubilidad en agua y se encuentran en suelos asociados principalmente a la materia orgánica, lo que limita notablemente su biodegradación (Harmsen 2004; Howsam and Jones 1998; Wild and Jones 1995).

**TABLA 2. Estructuras y Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs pertenecientes a la lista de contaminantes prioritarios de la US-EPA.**

| COMPUESTO              | PM <sup>1</sup> | PUNTO DE FUSIÓN (°C) | PUNTO DE EBULLICIÓN (°C) | SOLUBILIDAD AGUA (mg l <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup> | Estructuras químicas  |
|------------------------|-----------------|----------------------|--------------------------|---|---|
| Naftaleno              | 128             | 80                   | 218                      | 30.0  |    |
| Acenaftileno           | 152             | 92                   | 265                      | 16.1  |    |
| Acenafteno             | 154             | 96                   | 279                      | 3.47  |    |
| Fluoreno               | 166             | 116                  | 298                      | 1.8   |    |
| Antraceno              | 178             | 218                  | 342                      | 0.073   |    |
| Fenantreno             | 178             | 101                  | 340                      | 1.29  |    |
| Fluoranteno            | 202             | 110                  | 375                      | 0.260   |   |
| Pireno                 | 202             | 150                  | 404                      | 0.135   |  |
| Criseno                | 228             | 256                  | 448                      | 0.0006  |  |
| Benzo(a)antraceno      | 228             | 159                  | 435                      | 0.014   |  |
| Benzo(b)fluoranteno    | 252             | 168                  | ND                       | 0.0012  |  |
| Benzo(k)fluoranteno    | 252             | 217                  | 480                      | 0.00055   |  |
| Benzo(a)pireno         | 252             | 179                  | 495                      | 0.0038  |  |
| Indeno(1,2,3-cd)pireno | 276             | 162                  | ND                       | 0.062   |  |
| Benzo(g,h,i)perileno   | 276             | 278                  | ND                       | 0.00026   |  |
| Dibenzo(a,h)antraceno  | 278             | 267                  | 524                      | 0.0005  |  |

<sup>1</sup>PM: Peso molecular. <sup>2</sup>20° C. Datos obtenidos de (Kästner 2000; Nisbet and LaGoy 1992; Wise, Sander, and Schantz 2015)



### 1.1.3 TOXICIDAD DE LOS HAPs

Los HAPs pueden persistir en el medio durante largos periodos sin modificar sus propiedades tóxicas, con el consecuente riesgo para la salud humana y el ecosistema; éstos presentan toxicidad por inhalación, contacto o ingestión, por lo que su eliminación o contención es esencial para reducir la exposición (Engraff et al. 2011; Guo et al. 2011; Tongo, Ogbeide, and Ezemonye 2017).

La baja hidrosolubilidad de los HAPs los convierte en compuestos altamente liposolubles que se absorben con facilidad a través del tracto gastrointestinal de mamíferos distribuyéndose rápidamente en los tejidos, preferentemente en el tejido adiposo (Twiss et al. 1999).

Lo antes mencionado aplica para compuestos con un elevado peso molecular como lo son el benzo[a]pireno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno y dibenzo[a, h]antraceno, los cuales poseen un potencial carcinogénico y mutagénico, ya que forman aductos con el DNA tras su activación biológica (Goldman et al. 2001).

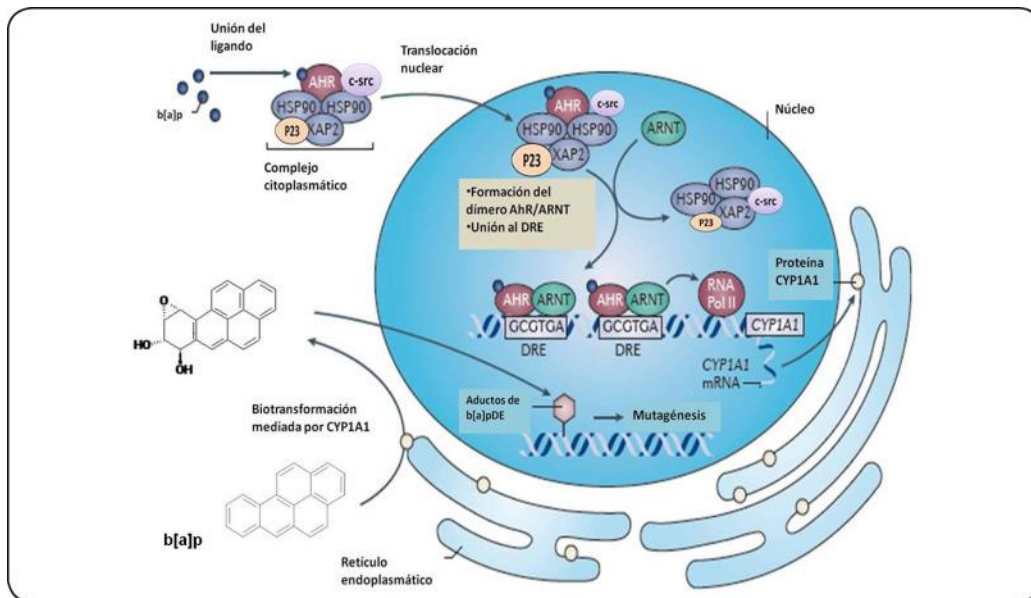
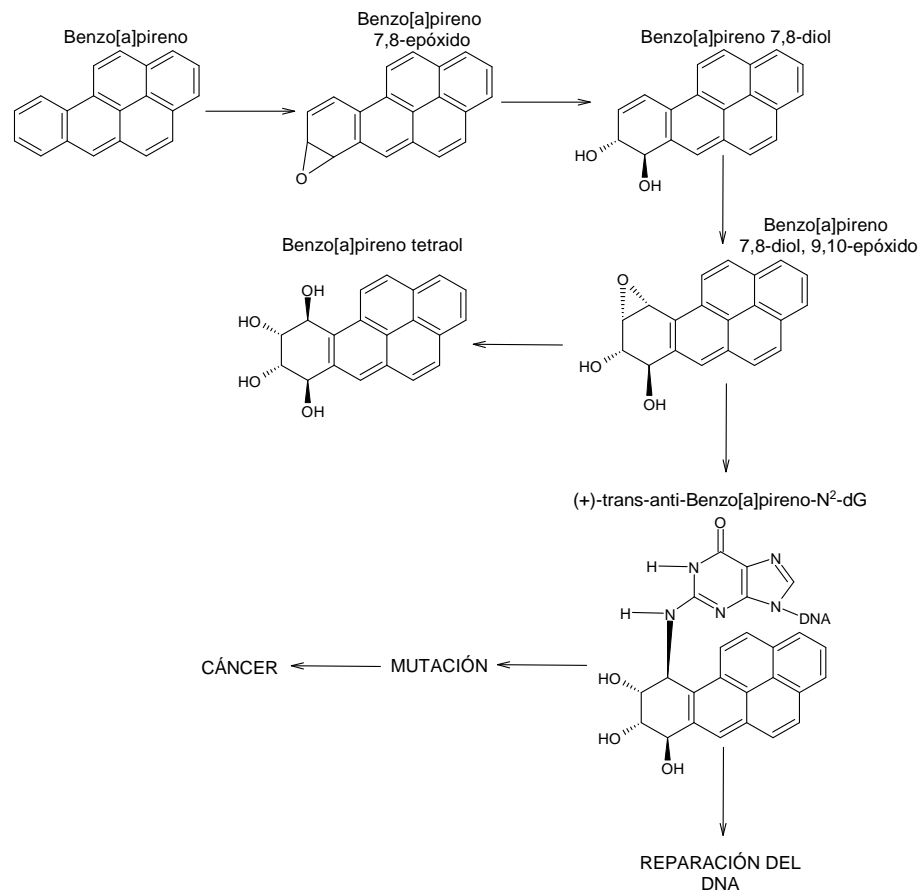


FIGURA 2. Vía de señalización para la activación del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en presencia de benzo[a]pireno. Figura obtenida de (Vázquez-Gómez, Rubio-Lightbourn, and Espinosa-Aguirre 2016)

Entre los 16 HAPs incluidos en la lista de contaminantes de estudio prioritario de la US-EPA, el benzo(a)pireno se encuentra descrito como uno de lo más potentes carcinógenos debido a que los metabolitos derivados de su biotransformación como el benzo[a]pireno diol epóxido tiene propiedades mutagénicas y carcinogénicas (Figura 3 y 4).

De hecho, el potencial carcinogénico de los otros HAPs se representa en relación con el del benzo(a)pireno. Como efecto de una exposición prolongada a estos compuestos se ha descrito un incremento en la incidencia de cánceres de piel, pulmón y vejiga, al igual que se han presentado lesiones en riñones e hígado (George 1996; Juhasz and Naidu 2000; Ramesh et al. 2011; Tfouni and Camargo 2012; Weis et al. 1998).

Esto debido a que el benzo(a)pireno que se encuentra en el humo de cigarro así como en el alquitrán de hulla, sufre una activación metabólica en el pulmón transformándose en un potente mutágeno que causa principalmente la conversión de las bases de guanina (G) a timina (T), provocando así una mutación de transversión (Lodish et al. 2016).



**FIGURA 3. Procesamiento enzimático de benzo[a]pireno a un mutágeno y carcinógeno más potentes. *Figura modificada de (Lodish et al. 2016).***

También se ha encontrado que la exposición de HAPs como el Fenantreno pueden afectar la salud, especialmente en relación con el hígado, ya que este compuesto activa eficazmente el receptor de androstano constitutivo (CAR) en humanos y ratón, causando así hepatotoxicidad en ratones, esto debido al consumo dietético de alimentos contaminados con HAPs la cual es una ruta de exposición importante (Yang et al. 2019).

De igual manera se ha encontrado que *p*-Benzoquinona inhibe a la DNA topoisomerasa II causando así la formación de translocaciones perjudiciales en el DNA las cuales pueden estar implicadas en el inicio de leucemogénesis (Hutt and Kalf 1996).

## **1.2 HIDROCARBUROS EN EL AMBIENTE**

Cuando los hidrocarburos son introducidos en el ambiente, pueden sufrir diferentes procesos físicos, químicos y biológicos, como lo son su transformación, eliminación o transporte a otros compartimentos ambientales. Estos procesos incluyen la evaporación, dilución, precipitación, reacciones abióticas (hidrólisis, fotooxidación, oxidaciones químicas, etc.) biodegradación microbiana, bioacumulación y secuestro (Semple, Morriss, and Paton 2003).

En la mayoría de los casos, estos procesos tienen como resultado una redistribución de los contaminantes en el ambiente causando su acumulación y afectando directamente al ambiente.

Sin embargo, la degradación microbiana, catalizada por bacterias, algas, hongos y levaduras, es el proceso más importante para evitar esta acumulación, ya que interviene en la eliminación total o parcial de los contaminantes mediante su mineralización o transformación (Saeed and Al-Mutairi 2000; Telli-Karakoç et al. 2002; ZHANG et al. 2006).

## **1.3 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EL AMBIENTE MARINO**

La presencia de HAPs en el ambiente marino pueden ser distribuidos por el movimiento del agua la cual contiene estos compuestos disueltos, debido al escurrimiento urbano, los efluentes de aguas residuales, desechos industriales, la deposición atmosférica, los derrames y fugas durante el transporte y producción de combustibles fósiles. Se ha encontrado una mayor concentración de estos compuestos en los entornos costeros cercanos a los centros urbanos en donde los aportes de las cuencas hidrográficas están más localizados (Peter E. T. Douben 2003).

### **1.3.1 ESCURRIMIENTO URBANO Y HAPs**

El agua que se lava de las superficies urbanas durante las tormentas, no se ha estudiado ampliamente para los HAPs, sin embargo, se han reportado concentraciones <0.05-560 ug/L. Algunos de los estudios más extensos se realizaron en Narragansett Bay, donde la contribución total de HAPs proveniente del escurrimiento urbano se estimó en 681 kg/año. Esto comprendió

casi el 40% del total estimado de insumos de HAPs a la bahía de Narragansett Bay en ese momento (Hoffman et al. 1984).

Debido a estos escurrimientos urbanos, la calidad del agua de los ríos, lagos y arroyos cercanos a áreas urbanas está disminuyendo. Así lo demuestra Brown and Peake en un estudio realizado en el año 2006 donde comparaban la presencia de contaminantes provenientes del escurrimiento de aguas pluviales en escombros de las carreteras que se acumulan en las zonas urbanas y en componentes de sedimentos en suspensión de una cuenca de captación mayoritariamente rural y otra cuenca de captación urbana en Dunedin, Nueva Zelanda. Observaron que los niveles en los escombros de las carreteras variaron de 119-527  $\mu\text{g/g}$  para el plomo, 50-464  $\mu\text{g/g}$  para el cobre, 241-1,325  $\mu\text{g/g}$  para el zinc y 1.20-11.6  $\mu\text{g/g}$  para los 16 HAPs. Encontraron que el sedimento suspendido de la cuenca de captación mayoritariamente rural tenía concentraciones similares a los escombros de la carretera, por lo tanto, el material urbano es la principal fuente de contaminantes presentes en aguas pluviales, sin embargo, la cuenca de captación urbana contenía concentraciones de metales de 2 a 6 veces más altas y 10 veces más altos para los 16 HAPs (Brown and Peake 2006).

### **1.3.2 ATMOSFERA**

Los HAPs están presentes en la atmósfera, esto debido a la combustión de combustibles fósiles, gasolina, madera y desechos. Además, la volatilización de ciertos componentes de HAPs de los productos del petróleo a la atmósfera también pueden ser una fuente. Estos contribuyen a los escurrimientos que finalizan en el medio marino costero a través de la deposición seca y húmeda en las cuencas hidrográficas costeras. Las concentraciones de los HAPs totales en el aire varían notablemente en todo el mundo debido a las emisiones locales en los entornos urbanos. Las concentraciones en las áreas de América del Norte están en el rango de 3.7-450  $\text{ng/m}^3$ , con los valores más altos observados en entornos urbanos. Las concentraciones europeas son similares, con valores que van desde 0.2  $\text{ng/m}^3$  (Alemania) a 137  $\text{ng/m}^3$  (Londres). Las concentraciones asiáticas tienden a inclinarse hacia niveles más altos, con valores de 25-500  $\text{ng/m}^3$  en China e India; sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas (Zhu T, Sun R 1998).

También N. Mishra, Ayoko, y Morawska que realizaron un estudio en el año 2016, identificaron y cuantificaron 16 HAPs en muestras de aire urbano tomadas de sitios de muestreo seleccionados de Brisbane, Australia. Las concentraciones variaron entre 1.17 y 38 ng/m<sup>3</sup> para los 16 HAPs, reportando un aumento de estas concentraciones a lo ultimo reportado en Brisbane. Realizando el análisis, se identificaron cuatro fuentes de emisión de HAPs las cuales fueron emisiones vehiculares, combustión de gas natural, emisiones de gasolina y evaporación de petróleo sin quemar, siendo la emisión vehicular la mayor fuente con un 56% de las emisiones totales de HAPs en el área de estudio (Mishra, Ayoko, and Morawska 2016).

#### **1.4 BIORREMEDIACIÓN**

La biorremediación es una tecnología basada en la biodegradación o transformación de contaminantes para eliminarlos o transformarlos en otros productos menos peligrosos para el ambiente y la salud humana. En su mayoría, son transformado en CO<sub>2</sub>, agua, sales inorgánicas y/o biomasa, pero a menudo una parte del contaminante se puede acumular como productos de transformación parcial (Vidali 2001).

Esta tecnología incluye el uso de productos biológicos como enzimas, estimulantes del crecimiento, bacterias, hongos, levaduras, arqueas, plantas, entre otros organismos para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos, o metales en el suelo, agua o aire (Karigar and Rao 2011).

El uso de esta técnica disminuye los altos costos ya que en ocasiones es necesario el uso de maquinaria pesada, mano de obra especializada y transporte del sitio al que recibe y confina además del trámite para determinar el tipo de combinación y el volumen por confinar lo cual no es muy accesible a la economía. En la mayoría de los casos, el sitio se abandona quedando en estado de pasivo ambiental por un tiempo indeterminado hasta que la autoridad consiga un acuerdo para su tratamiento (Tyagi, da Fonseca, and de Carvalho 2011).

Los tratamientos biológicos se han utilizado a lo largo de los años y cada vez reciben una mayor relevancia en el tratamiento de aguas residuales, tanto industriales como urbanas, pero ha sido en

los últimos tiempos cuando han empezado a implementarse de forma habitual en tratamiento de aguas subterráneas y suelos (Tyagi, da Fonseca, and de Carvalho 2011).

## **1.5 ESTRATEGIAS DE BIORREMEDIACIÓN**

### **1.5.1 BIOAUMENTO**

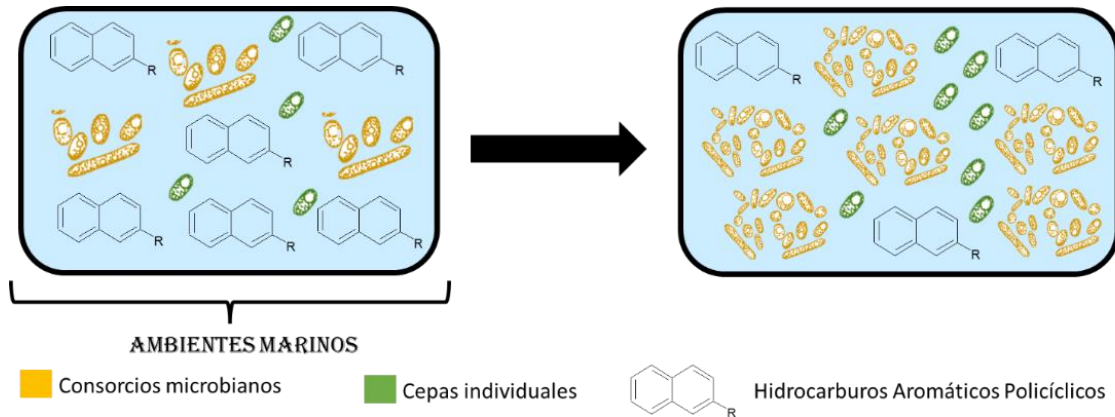
El bioaumentación o biorefuerzo consiste en la adición de poblaciones microbianas especializadas (cepas individuales o consorcios), que generalmente se cultivan por separado en condiciones definidas, para realizar una tarea específica de remediación en un ambiente dado. Esta técnica es la más adecuada para emplazamientos que no posea las rutas metabólicas necesarias para metabolizar los contaminantes (Tyagi, da Fonseca, and de Carvalho 2011).

Los inóculos utilizados para el bioaumentación pueden ser de diferentes tipos de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, levaduras e incluso consorcios microbianos. Los inóculos más utilizados para bioaumentación incluyen:

1. Cultivos mixtos: Cultivos de microorganismos nativos que han sido altamente enriquecidos utilizando el contaminante o los contaminantes de interés. El inóculo se obtiene normalmente del propio suelo o de plantas de tratamiento de aguas residuales contaminadas (Ulrich and Edwards 2003).
2. Cultivos puros: Inoculación con una única cepa capaz de degradar el contaminante (Hatzinger et al. 2001).
3. Elementos genéticos: Introducción de genes mediante la utilización de vectores (por ejemplo, plásmidos) que serán incorporados por las bacterias nativas. Esta estrategia permite introducir nuevas funciones catabólicas minimizando las dificultades asociadas con la inyección, distribución y supervivencia de células bacterianas exógenas.

El bioaumentación es una técnica prometedora para resolver problemas prácticos en sitios contaminados con HAPs y así, mejorar la eficiencia de eliminación. Shi y colaboradores realizaron un estudio en el año 2020 sobre el comportamiento de degradación de una comunidad microbiana por bioaumentación en agua de mar contaminado por petróleo, encontrando que la tasa de degradación del diesel por bioaumentación fue de 71.86% en 45 días, superando en un

38% a la comunidad microbiana sin bioaumentación, también observaron que durante un largo periodo de bioaumentación, hubo una tendencia a la recuperación de la diversidad de la comunidad en el agua del mar contaminada por petróleo (Herrero and Stuckey 2015; Shi et al. 2020).

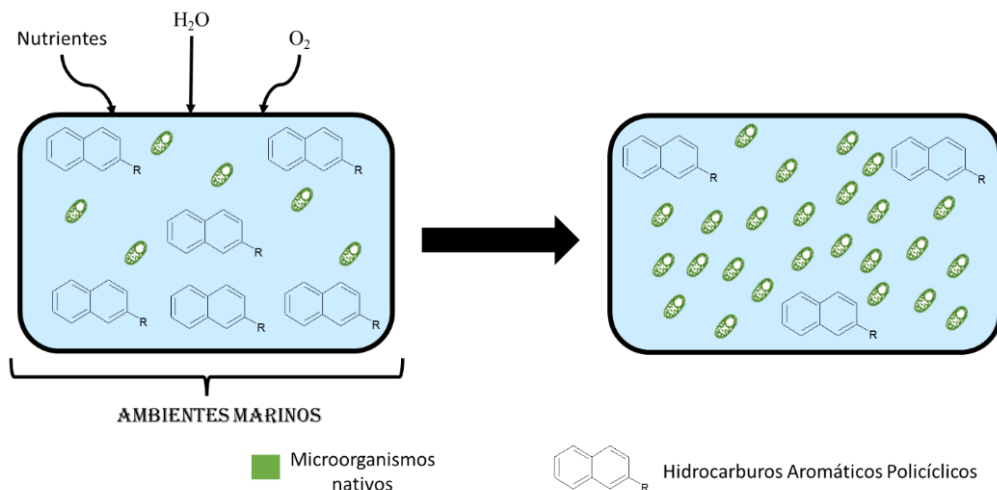


**FIGURA 4. Diagrama de bioaumentación de consorcios microbianos y cepas individuales de microorganismos en ambientes marinos con presencia de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs).**

### 1.5.2 BIOESTIMULACIÓN

La bioestimulación consiste en incrementar la actividad de los microorganismos nativos de un ambiente natural por medio de la adición de nutrientes, humedad, aire u otros agentes destinados a aumentar la velocidad de biodegradación de los contaminantes en un emplazamiento contaminado. Identificar las condiciones limitantes para que los microorganismos nativos puedan llevar a cabo una remediación es un paso crítico (Swannell, Lee, and Mcdonagh 1996).





**FIGURA 5. Diagrama de bioestimulación de microorganismos nativos en ambientes marinos con presencia de Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAPs).**

## 1.6 BIODEGRADACIÓN

La biodegradación es un proceso que se produce de forma natural en el ambiente y que puede usarse para una biorremediación de ambientes contaminados, puesto que los microorganismos empleados usan los compuestos como una estrategia de supervivencia, disminuyendo las concentraciones de los contaminantes, siendo además uno de los métodos más empleados por su bajo costo (Singh 2008).

Se han descrito diferentes estrategias para la biodegradación de HAPs en las cuales se busca romper los anillos aromáticos. Una estrategia que es utilizada por bacterias es el uso de mono y dioxigenasas para la hidroxilación de los anillos aromáticos, facilitando así la ruptura para formar compuestos intermediarios del metabolismo del ciclo de ácido tricarbóxico. Los hongos utilizan mono-oxigenasas, lignina peroxidadas (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), versátil peroxidasa (VP) y diferentes tipos de lacasas que son producidas por hongos de podredumbre de madera.

Los microorganismos tienen una función importante la cual es la eliminación de los compuestos xenobióticos, tales como pesticidas, plásticos, alifáticos, aromáticos, aromáticos policíclicos, los cuales están presentes en ecosistemas terrestres y acuáticos, trayendo así efectos beneficiosos como desintoxicación, descontaminación, conversión de los compuestos a otros menos tóxicos, formación de productos de valor agregado como combustibles, fibras o plásticos y la degradación

microbiana la cual es el principal proceso de descontaminación natural (Haritash and Kaushik 2009).

### **1.6.1 BIODegradación DE HIDROCARBUROS**

La biodegradación de los compuestos orgánicos en el ambiente está condicionado por distintos factores que incluyen la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la disponibilidad de nutrientes (N y P principalmente) y aceptores de electrones para llevar a cabo esta actividad, factores intrínsecos del contaminante, como son la estructura molecular, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, la temperatura, que afectan la actividad metabólica en general (Juhasz and Naidu 2000).

La estructura química del contaminante condiciona su biodegradabilidad, de modo que cuanto mayor es el peso molecular de un compuesto y menor su solubilidad en agua más lentamente será degradado. De las distintas familias de hidrocarburos, los *n*-alcanos y los alcanos ramificados de cadena intermedia (C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>) son los sustratos más fácilmente degradables, mientras que los compuestos de cadena larga son más difíciles de degradar. Los cicloalcanos a su vez se degradan más lentamente que las moléculas lineales. Entre los compuestos aromáticos la biodegradabilidad disminuye a medida que aumenta el número de anillos.

La biodisponibilidad es un factor crítico para la biodegradación ambiental de los hidrocarburos, es un proceso dinámico, determinado por la tasa de transferencia de masa del sustrato a las células microbianas en relación con su actividad catabólica intrínseca.

La biodisponibilidad de un contaminante depende, además de sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad en agua, densidad), de las propiedades fisicoquímicas de lugar contaminado, como el pH, textura y materia orgánica (Bamforth and Singleton 2005).

Microorganismos como bacterias, hongos y levaduras tienen la capacidad de degradar HAPs mediante el uso de enzimas, transformando los compuestos a moléculas más sencillas y amigables con el ambiente, incluso si éstos son combinados podrían tener una mayor eficacia en

la eliminación de estos contaminantes (Bezalel and Hadar 1997; Davies and Evans 1964; Ghosal et al. 2016).

## **1.6.2 ELEMENTOS IMPORTANTES EN LA BIODEGRADACIÓN**

El éxito de una biorremediación microbiana de sitios contaminados depende mucho de factores como: características de los hidrocarburos presentes en estos sitios, la elección del consorcio microbiano, así como los factores que afectan a los mecanismos de biodegradación (temperatura, pH y humedad). Para hidrocarburos de bajo peso molecular (4-anillos o menos), la remoción por evaporación es la primera línea de eliminación. A medida que los tamaños moleculares aumentan, las tasas de biodegradación se vuelven más lentas (Bamforth and Singleton 2005).

### **1.6.2.1 TEMPERATURA**

La temperatura es otra variable importante que influye en la biodegradación debido a que la tasa del metabolismo de los microorganismos y el patrón de la comunidad microbiana en presencia de HAPs ocurre a una temperatura óptima (Brakstad and Bonaunet 2006; Eriksson, Jong-Ok, and Mohn 2001; Leahy and Colwell 1990; R. Margesin, Zacke, and Schinner 2002; Wu and Gschwend 1986).

### **1.6.2.2 pH**

Los rangos de pH óptimos para el proceso de metabolización pueden ser muy variables, ya que depende de las características del medio contaminado y de la población microbiana que alberga (Dibble and Bartha 1979).

También se puede generar variaciones de pH durante el proceso, como consecuencia de los metabolitos intermedios derivados de los HAP (Fernando Bautista et al. 2009; Habe and Omori 2003; Puntus et al. 2008).

### **1.6.2.3 OXIGENO**

La biodegradación aeróbica es la más eficaz para la biorremediación esto debido a la presencia y concentración del oxígeno ya que es un factor importante para la velocidad en la que ocurre la biodegradación y el catabolismo de los hidrocarburos cíclicos y aromáticos realizado por los

microorganismos. Esto debido a que son necesarias las oxigenasas para realizar el proceso de degradación de los HAPs (Van Hamme, Singh, and Ward 2003).

#### **1.6.2.4 NUTRIENTES**

El contenido de nitrógeno y fósforo afectan en gran medida la degradación microbiana de hidrocarburos. Se ha establecido que el ajuste de las proporciones de estos dos elementos en forma de fertilizantes estimula la biodegradación de los HAPs (Van Hamme, Singh, and Ward 2003).

### **1.7 MICROORGANISMOS MODELOS DE BIORREMEDIACIÓN**

En el ambiente se encuentran presentes bacterias, hongos, levaduras, algas unicelulares, plantas vasculares. Existe una gran variedad de capacidades metabólicas y debido a esto es que los microorganismos logran asegurar la permanencia (continuidad) de los ciclos de los elementos en la naturaleza. El efecto de sus actividades no solo es la mineralización de los compuestos orgánicos, sino también los cambios de los compuestos minerales, los cuales tienen un gran impacto sobre el desarrollo de la flora (Horvath 1972).

Para su uso en la biorremediación, los microorganismos degradadores, idealmente deben mineralizar y crecer sobre los HAPs, utilizándolos como única fuente de carbono y energía. Esto es importante para reducir al mínimo la producción de degradación solubles en agua subproductos tóxicos y reducir el riesgo de los aislados no poder sobrevivir en sitios contaminados, debido a la falta de sustratos de crecimiento adecuados (Belviso et al. 2005; Boonchan, Britz, and Stanley 2000; Mao et al. 2012; Zucchi et al. 2003) .

Los mecanismos en los que los microorganismos degradadores de petróleo se benefician de interacciones sinérgicas, pueden ser complejas; es posible que una especie remueva los metabolitos tóxicos de la otra especie. Así también es posible que la segunda especie sea capaz de degradar compuestos que la primera especie fue capaz de hacerlo parcialmente (Salleh et al. 2003).

La literatura existente, dada a la probada capacidad degradadora de los microorganismos, recomienda el uso de los siguientes microorganismos, cuando se trata de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs):

**TABLA 3. Microorganismos con capacidad degradadora de HAPs.**

|                    |                                    |
|--------------------|------------------------------------|
| <b>Naftaleno</b>   | <i>Mycobacter calcoaceticus</i>    |
|                    | <i>Pseudomonas paucimobilis</i>    |
|                    | <i>P. putida</i>                   |
|                    | <i>Rhodococcus</i> sp.             |
|                    | <i>Bacillus thermoleovorans</i>    |
| <b>Antraceno</b>   | <i>P. paucimobilis</i>             |
|                    | <i>Rhodococcus</i> sp.             |
|                    | <i>Mycobacterium</i> sp.           |
|                    | <i>Cycloclasticus pugetii</i>      |
|                    | <i>Strotharia rugosoannulata</i>   |
| <b>Fenantreno</b>  | <i>Alcaligenes faecalis</i>        |
|                    | <i>Arthrobacter olychromogenes</i> |
|                    | <i>Pseudomonas</i> sp.             |
|                    | <i>B. cereus</i>                   |
|                    | <i>Rhodococcus</i> sp.             |
| <b>Fluoranteno</b> | <i>Mycobacterium</i> sp.           |
|                    | <i>P. paucinobilis</i>             |
|                    | <i>Rhodococcus</i> sp.             |
| <b>Pireno</b>      | <i>Rhodococcus</i> sp.             |
|                    | <i>Sphingomonas</i> sp.            |
|                    | <i>Mycobacterium</i> sp.           |
| <b>Criseno</b>     | <i>Rhodococcus</i> sp.             |
|                    | <i>Pseudomonas</i> sp.             |
|                    | <i>Sphingomonas</i> sp.            |

*Datos obtenidos de (Cerniglia 1997)*

### 1.7.1 BACTERIAS

Diferentes bacterias se han adaptado a toda clase de climas y microambientes de la tierra. Microorganismos halófilos crecen en los estanques de salmuera con incrustaciones de sal, microorganismos termófilos crecen en las humeantes pilas de carbón o en aguas termales volcánicas, y los microorganismos barófilos viven bajo una enorme presión en las profundidades de los mares (Glazer and Nikaido 2007; Haritash and Kaushik 2009).

Bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, son modelos de degradación de HAP's ya que estos exhiben altos niveles de tolerancia a la exposición de HAPs así como a la mezcla de estos y alcanzando hasta un 95% de eliminación de los compuestos presentes de forma individual así como en mezclas de estos (Rabodonirina et al. 2019).

### **1.7.2 HONGOS FILAMENTOSOS**

Los hongos son particularmente eficaces en la colonización de la madera seca y son responsables de la mayor parte de la descomposición de materiales vegetales mediante la secreción de potentes enzimas extracelulares para degradar biopolímeros (Cerniglia 1997).

Los hongos son incapaces de utilizar compuestos inorgánicos distintos de oxígeno como aceptores terminales de electrones en la respiración. También son menos versátiles que las bacterias en la gama de compuestos orgánicos que si pueden utilizar como única fuente de carbono (Glazer and Nikaido 2007; Haritash and Kaushik 2009).

Hongos del género *Aspergillus* y *Cladosporium*, son buenos modelos de degradación de HAP's ya que estos son capaces de degradar en gran medida los HAP's alcanzando hasta un 70% de eliminación de estos mismos, inclusive se ha demostrado que hongos del género *Aspergillus* como *Aspergillus sydowii* tiene la capacidad para degradar a estos compuestos en altas concentraciones de salinidad (Giraud et al. 2001; Peidro-Guzmán et al. 2021).

### **1.7.3 LEVADURAS EXTREMOFILAS**

Las levaduras son un grupo de microorganismos de hongos microscópicos que presentan una gran diversidad de taxonomía, fisiología y ecología, por esto mismo es que no se pueden definir como organismos “normales” ya que tienen la capacidad de proliferar y sobrevivir en una extensa variedad de ecosistemas y están adaptadas a diferentes temperaturas, sustratos, ubicaciones geográficas y altitudes, de esta forma, es posible encontrar levaduras en glaciares, lagos salinos, aguas ácidas, suelo, aire y profundidades marinas (Satyanarayana and Kunze 2009; Starmer and Lachance 2011).

En los últimos años las levaduras han sido microorganismos de estudio importante en el área de biotecnología debido a su diversidad metabólica, presentando amplias posibilidades de aplicaciones biotecnológicas como las que se pueden observar en la Tabla 4.

**TABLA 4. Aplicaciones de levaduras extremofilas en distintas áreas.**

| ÁREA DE APLICACIÓN                          | PRODUCTOS Y/O APLICACIONES   |
|---|--|
| Ambiental                                   | Biorremediación, degradación de contaminantes  |
| Investigación básica en Ciencias Biológicas | Biología Celular y Molecular, Genómica Funcional, Ingeniería de Vías Metabólicas, Biología de Sistemas.              |
| Investigación en Ciencias Biomédicas        | Descubrimiento de medicamentos, metabolismo y resistencia a medicamentos, elucidación de mecanismos de enfermedades. |
| Biocontrol                                  | Protección de cultivos, seguridad agropecuaria, probióticos.   |
| Fermentación tradicional                    | Cerveza, vino, sake, salsa de soya y otros alimentos fermentados.  |

*Datos obtenidos de (Borneff et al. 1968; Suess 1976)*

Una levadura puede considerarse como extremófila si ha sido aislada en repetidas ocasiones de un hábitat extremo, si muestra capacidades fisiológicas que permiten superar el estrés ambiental del que fueron aisladas, y si tiene un crecimiento óptimo en el intervalo correspondiente a las condiciones encontradas en el hábitat extremo (Buzzini, Turchetti, and Yurkov 2018; Raspor and Zupan 2001).

Las levaduras son capaces de habitar y proliferar en ambientes con condiciones extremas como los pueden ser de temperatura, salinidad, pH, presión, oxigenación, disponibilidad de agua, nutrientes y en presencia de sustancias tóxicas; por esto mismo se han vuelto buenos modelos para estudiar los mecanismos fisiológicos y moleculares al interactuar con compuestos

xenobióticos ya que se ha demostrado que son mejores biosorbentes y degradan a estos compuestos con mayor eficacia en comparación con bacterias, hongos y microalgas, esto en aguas residuales debido a su alta tasa de crecimiento y estructura de la pared celular (Bahafid et al. 2017; Bajgai, Georgieva, and Lazarova 2012).

Levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula* y *Saccharomyces* son modelos utilizados en el estudio los cuales son considerados como degradadores potenciales de contaminantes orgánicos nocivos, como alifáticos y HAP's (Boz et al. 2015; Hesham et al. 2012).

#### **1.7.4 CONSORCIOS MICROBIANOS**

Con frecuencia, los hongos y las bacterias complementan las capacidades de cada uno en la degradación de materiales complejos. Un consorcio es un sistema de varios organismos (generalmente son de 2 organismos) en los que cada organismo aporta algo necesario para los demás. Muchos de los procesos fundamentales de la naturaleza son el resultado de esas interacciones entre los microorganismos que influyen en la biosfera a escala mundial. Por ejemplo, consorcios de bacterias y hongos juegan un papel indispensable en el ciclo de la materia orgánica (Belviso et al. 2005).

Al descomponer los subproductos orgánicos y los restos de plantas y animales, liberan nutrientes que sustentan el crecimiento de todos los seres vivos.

Como aplicación tecnológica, se emplean en la preparación de bebidas, alimentos y en la fermentación de productos lácteos, así como en los procesos de biotratamiento de las aguas residuales. Últimamente, los retos que plantea la necesidad de limpiar los derrames masivos de petróleo y para descontaminar los sitios de desechos tóxicos con el mínimo daño permanente en el medio ambiente, han dirigido la atención a las poderosas capacidades de degradación de los consorcios de microorganismos (Mao et al. 2012).



En suelos contaminados, las comunidades microbianas tienden a estar dominadas por las cepas que son capaces de sobrevivir a la toxicidad y a su vez, son capaces de utilizar la sustancia contaminante en sí, para su crecimiento. Como respuesta al tratamiento de biorremediación, estas poblaciones pueden comenzar a degradar activamente los contaminantes y desintoxicar el suelo, permitiendo que otras poblaciones en reposo/inanición, pueden aumentar su número, lo que conduce a un aumento de la comunidad microbiana en el suelo (Zucchi et al. 2003).

De acuerdo con la información antes presentada, sabemos que el uso de la biorremediación como estrategia presenta numerosas ventajas respecto a las estrategias de remediación de índole químicas o físicas. Estas ventajas son las siguientes: es una herramienta con poca demanda de energía, es más económica en comparación con las otras estrategias posibles, puede funcionar como complemento de otras técnicas, causa una perturbación mínima en el sitio de operación, resulta en operaciones sencillas y de bajos requerimientos.

## 2. ANTECEDENTES

Anteriormente se han utilizado microorganismos como bacterias y hongos filamentosos para la degradación de compuestos orgánicos tanto en suelos como en aguas subterráneas, sin embargo, las levaduras se han usado menos o se han olvidado en su mayoría para experimentos de biodegradación. A continuación, se mencionan ejemplos donde se demuestra la razón de porque utilizar a las levaduras como modelos para la biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs):

En el año 1998 M. C. Romero et al. aislaron cepas autóctonas de levaduras y bacterias de una corriente cotaminada y se estudió el potencial que estas tenían para degradar el fenantreno utilizandolo como única fuente de carbono y energía. *Rhodotorula glutinis* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron los microorganismos predominantes que utilizaron al fenantreno. Estos microorganismos fueron inoculadas en medio basal mineral líquido a 25, 50, 100 y 200 ppm de fenantreno en solución etanólica. Observaron una degradación casi completa del fenantreno durante el período de incubación de 1 mes. *R. glutinis* creció exponencialmente hasta un máximo de  $9,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{ml}^{-1}$ , con un breve lapso de tiempo en una

concentración de 200 ppm. La mayor densidad ( $1,4 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup>) sin tiempo de retardo se obtuvo con 50 ppm; se observaron números de células más bajos a 25 y 100 ppm. Observaron una reducción a una décima parte del número de células de levadura en los niveles más bajos de PAH en el día 28 de incubación y se observó una disminución de 100 veces con 200 ppm. Concluyeron que *R. glutinis* fue tan activa como *P. aeruginosa* al crecer en fenantreno y que la degradación de hidrocarburos aromáticos se correlacionó directamente con la densidad microbiana y el aumento de la biomasa (M. C. Romero et al. 1998).

En el año 2002 Romero et al. realizaron un estudio con hongos saprotróficos del suelo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Cylindrocarpon didymum* (Hartig) Wollenw, *Penicillium variable* Sopp. y las levaduras *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison y *Rhodotorula minuta* (Saito) Harrison cultivándolas en medio mineral con pireno. Las concentraciones de pireno restantes fueron determinadas periódicamente durante 20 días de incubación mediante HPLC. Descubrieron que *F. solani* y *R. glutinis* metabolizaban el pireno como única fuente de carbono. Las diferencias en sus actividades al inicio de los cultivos desaparecían al final del experimento, cuando detectaron 32 y 37% de la concentración original de pireno, para los hongos y levaduras del suelo, respectivamente. Entre los hongos filamentosos, *F. solani* fue pireno altamente activo y oxidado; además, observaron tasas de degradación pequeñas pero significativas en cultivos de *C. didymum* y *P. variable*. Mencionaban que los cultivos de *R. glutinis* y *R. minuta* mostraban una capacidad similar para biotransformar el pireno, y el 35 % de la concentración inicial se consumía al final del ensayo. Y también mencionaban que se obtenían los mismos resultados en los experimentos con o sin glucosa como cosustrato (M. Cristina Romero et al. 2002).

En el año 2003 Rosa Margesin et al. evaluaron el potencial de 61 cepas bacterianas y 28 de levaduras adaptadas al frío, para utilizar fracciones representativas de hidrocarburos de petróleo (n-alcanos, hidrocarburos aromáticos monoaromáticos y policíclicos) para el crecimiento y para producir varias enzimas a 10 °C. Compararon la eficiencia de las cepas bacterianas y de las levaduras, encontrando que el rango de temperatura de crecimiento de las cepas de levadura fue significativamente menor que el de las cepas bacterianas. Encontraron que solo el 6% de las cepas bacterianas pero el 79% de las cepas de levadura utilizaban al n-hexadecano para el crecimiento, mientras que el 13% de las cepas bacterianas y el 21-32% de las cepas de levadura

utilizaron fenol, fenantreno o antraceno para su crecimiento y solo cuatro cepas de levadura, pero ninguna de las cepas bacterianas, pudieron crecer con todos los hidrocarburos analizados. La biodegradación del fenol se investigó en cultivos discontinuos alimentados a 10°C. Tres cepas de levadura degradaron concentraciones de fenol tan altas como 10 mM (una cepa) o 12,5 mM (dos cepas). De ocho cepas bacterianas, dos degradaron hasta 10 mM de fenol. La temperatura óptima para la degradación del fenol fue de 20°C para las ocho cepas bacterianas y para dos cepas de levadura. La biodegradación de cinco cepas de levadura fue óptima a 10 °C y más rápida a 1 °C que a 20 °C. Teniendo como conclusión que las cepas de levaduras pueden llegar a ser mejores modelos para la biodegradación de HAPs (Rosa Margesin et al. 2003).

En el año 2004 Pan et al. aislaron a la levadura *Pichia anomala* 2.2540 de suelo contaminado por petróleo crudo, esta levadura utiliza naftaleno y fenantreno como únicas fuentes de carbono, pero también degrada el dibenzotiofeno y el criseno a través del co-metabolismo. Encontraron que *Pichia anomala* 2.2540 degradó cuatro HAPs, degradó a naftaleno y fenantreno por metabolismo directo, mientras que degradó a dibenzotiofeno y criseno por co-metabolismo. También se encontró que la levadura toleró 65 ppm de naftaleno y que degradó el criseno en presencia de naftaleno, sin embargo, no se observó degradación del criseno en soluciones que contenían los cuatro PAHs antes mencionados en un lapso de tiempo de 96 horas (Pan et al. 2004).

En el año 2004 Potin, Veignie, and Rafin investigaron la capacidad de un hongo Deuteromiceto, *Cladosporium sphaerospermum*, previamente aislado del suelo de una planta de fabricación de gas envejecido, para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos. Encontrando que esta cepa fue capaz de degradar los PAH en suelos no estériles (promedio del 23 %), incluidos los PAH de alto peso molecular, después de 4 semanas de incubación. En un experimento de microcosmos, el agotamiento de PAH se correlacionó claramente con el establecimiento de hongos. En cultivo líquido, esta cepa degradó rápidamente el benzo(a)pireno durante su primera fase exponencial de crecimiento (18% después de 4 días de incubación). Entre las actividades de enzimas ligninolíticas extracelulares que analizaron, detectaron solo actividad de lacasa en cultivo líquido en ausencia o en presencia de benzo(a)pireno. Por lo tanto sugiere que *C. sphaerospermum* podría ser un candidato potencial para una biorremediación efectiva de suelos antiguos contaminados con PAH (Potin, Veignie, and Rafin 2004).

En el año 2010 Sood, Patle, y Lal aislaron una nueva cepa de levadura la cual llamaron *Candida digboiensis* TERI ASN6 con capacidad de degradar a los hidrocarburos el petróleo a un pH = 3 en condiciones de laboratorio. Por lo tanto, probaron a TERI ASN6 con varios tratamientos para la remediación de lodos aceitosos ácidos, siendo el tratamiento con nutrientes el que mostró mayor degradación de los hidrocarburos en el lodo aceitoso. Encontraron que la nueva cepa de levadura TERI ASN6 pudo degradar 40 mg de eicosano en 50 ml de medio mínimo de sales en 10 días y 72 % de heneicosano en 192 horas a un pH = 3. En el estudio que realizaron de factibilidad, la aplicación de TERI ASN6 con nutrientes mostró una reducción de hidrocarburos de petróleo totales extraíbles con solvente (TPH) de 160 a 28,81 g kg<sup>-1</sup> de suelo en comparación con una reducción de TPH de 183,85 a 151,10 g kg<sup>-1</sup> de suelo en el control no tratado en 135 días. Con estos datos concluyeron que la cepa *C. digboiensis* es capaz de degradar eficientemente los hidrocarburos presentes en el lodo aceitoso ácido en el sitio contaminado esto debido a la exposición prolongada a los contaminantes a la que ha estado expuesta la levadura (Sood, Patle, and Lal 2010).

En el año 2012 Hesham et al. realizaron experimentos de bioaumentación para la eliminación de Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos (HAPs) de las aguas residuales utilizando bacterias y levaduras. Construyeron tres sistemas, uno donde se inoculaba el consorcio en lodo activado (AS), la mezcla de cinco cepas de levaduras (MY) las cuales son AH1 *Candida maltosa* (CGMCC No. 2.4173), AH2 *Pichia anomala* (CGMCC No. 2.4177), AH3 *Sporidiobolus salmonicolor* (CGMCC No. 2.4175), AH4 *Pichia guilliermondii* (CGMCC No. 2.4174), y AH5 *Rhodotorula dairenensis* (CGMCC No. 2.4176), y la mezcla de AS y las cinco cepas de levadura (SY), respectivamente, y su desempeño para la remoción de HAPs de alto peso molecular en un lapso de tiempo de 10 semanas. Lograron establecer con éxito dos sistemas de bioaumentación estables, MY y SY, mediante la inoculación de las cinco cepas no autóctonas y demostraron un alto rendimiento en la eliminación de HAPs de alto peso molecular (Hesham et al. 2012).

En el año 2014 Behnood, Nasernejad, y Nikazar realizaron un estudio utilizando al hongo de podredumbre blanca *Phanerochaete chrysosporium* en donde evaluaban la capacidad degradativa en petróleo crudo presente en aguas residuales salinas, encontraron que *P. chrysosporium* tiene

una alta capacidad de degradación en sitios con alta salinidad debido a la síntesis de la enzima manganeso peroxidasa (MnP) la cual presenta una baja actividad en concentraciones de salinidad arriba de 30 y 40 g/L en comparación con la enzima lignina peroxidasa (LiP) que presenta una total inhibición en concentraciones de salinidad arriba de 40 g/L. De igual forma reportan que la adición de los tensioactivos Tween80 y NAR-111-2 tiene un efecto positivo en la degradación del petróleo crudo, siendo NAR-111-2 el más eficiente. Behnood, Nasernejad, y Nikazar reportan que la máxima eficiencia de degradación al lapso de 12 días para la contaminación con una concentración de 600 ppm en presencia de Tween80 en concentraciones de salinidad de 0, 20 y 40 g/L, equivale a 63.3%, 64.8% y 38.7%, respectivamente. Mientras que para NAR-111-2 equivale a 82.8%, 75.5% y 40.3%, respectivamente. Por lo tanto, Behnood, Nasernejad, y Nikazar consideran a *P. chrysosporium* como un potente hongo para la degradación una amplia gama de contaminantes ambientales en petróleo en ambientes salinos además de poder crecer en estas condiciones (Behnood, Nasernejad, and Nikazar 2014).

En el año 2014 Fan, Xie, y Qin demostraron la eficiencia de biorremediación por medio de bioaumentación con la cepa de levadura *Candida tropicalis SK21* aislada de suelo contaminado con petróleo, usandola en suelo arcilloso contaminado con 16.300 mg/kg de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), que comprendía un 51% de hidrocarburos saturados y un 31% de hidrocarburos aromáticos. Encontraron que *Candida tropicalis SK21* podía crecer en un rango de pH de 3 a 9 en cultivo líquido, y se encontró que el pH óptimo era 6 tanto para el crecimiento como para la producción de biosurfactantes. A pH 6, el 96 % y el 42 % de HTP fueron degradados por la cepa a las concentraciones iniciales de gasóleo de 0,5 % y 5 % (v/v), respectivamente. La remediación a través de la inoculación de la levadura eliminó el 83 % de TPH en 180 días, mientras que el experimento con los microorganismos autóctonos solo eliminó el 61 % (Fan, Xie, and Qin 2014).

En el año 2014 Cong et al. utilizaron tres cepas de levadura formadoras de biofilms, las cuales fueron *Candida viswanathii TH1*, *Candida tropicalis TH4* y *Trichosporon asahii B1*, estas fueron aisladas de muestras de agua y sedimentos contaminados con aceite recolectadas en las zonas costeras de Vietnam. El biofilm formado por una mezcla de estos organismos degradó 90, 85, 82 y 67% de fenol, naftaleno, antraceno y pireno, respectivamente, en un tiempo de incubación de 7

días usando una concentración inicial de 600 ppm de fenol y 200 ppm de cada uno de los Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos. Además, este biofilm degradó por completo a los HAPs que se encontraban en las aguas residuales recolectadas de los tanques de petróleo en Do Xa, Hanoi, después de 14 días de incubación según el análisis de espectrometría de masas por cromatografía de gases (Cong et al. 2014).

En el año 2014 Leelaruji et al. estudiaron la biodegradación de cuatro tipos de HAPs (naftaleno, antraceno, pireno y benzo[a]pireno) por lacasa producida a partir de la levadura *Aureobasidium pullulans var. melanogenum*, sacado de un screening de la isla de Sichang (Tailandia). La condición óptima para el cultivo de *A. pullulans var. melanogenum* y su producción de lacasa fue evaluada por primera vez revelando que la producción de lacasa se podía inducir con guayacol 2 mM y CuSO<sub>4</sub> 0,5 M en el medio de crecimiento de malta de levadura (YM). Después de esto liofilizaron la lacasa y se almacenó en forma de cápsula a +4 °C para mantener la actividad enzimática. La capacidad posterior para degradar naftaleno, antraceno, pireno y benzo[a]pireno fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados revelaron que la actividad lacasa de una cápsula (0,16 g) de lacasa liofilizada era de 711 U mL<sup>-1</sup> (4,4 U mg<sup>-1</sup>) y podía degradar una mezcla de benzo[a]pireno (37 µg mL<sup>-1</sup>), antraceno (7.5 µg mL<sup>-1</sup>), pireno (99 µg mL<sup>-1</sup>) y naftaleno (90 µg mL<sup>-1</sup>) en 45.33, 38.16, 25.38 y 24.35 % después de 48 horas de incubación respectivamente. Además, el resultado también reveló que la lacasa (5 g) de *A. pullulans* puede degradar el naftaleno y el antraceno en muestras de suelo en un 51,34 y un 85,06 % respectivamente, después de una incubación de 9 días (Leelaruji et al. 2014).

En el año 2015 Boz et al. obtuvieron 100 aislados de levadura de cuatro muestras diferentes. Tras la incubación que realizaron en medios que contenían diferentes compuestos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (naftaleno, fenantreno, pireno a 10 ppm) y petróleo crudo, se detectaron 12 aislados de levadura que degradaban más de un hidrocarburo poliaromático. Los análisis de secuencias de las regiones de ARNr revelaron que las levaduras identificadas representaban 10 especies pertenecientes a 6 géneros. Los aislados fueron identificados como *Candida parasilopsis*, *Candida sinolaborantium*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus diffluens*, *Cryptococcus uzbekistanensis*, *Pichia kudriavzevii*, *Rhodospiridium diobovatum*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula muciliginosa* y *Saccharomyces cerevisiae*. (Boz et al. 2015)

En el año 2015 Gargouri et al. aislaron dos cepas de levaduras (*Candida tropicalis* y *Trichosporon asahii*) de aguas residuales de refinerías industriales, fueron seleccionadas en función de su capacidad para utilizar varias clases de sustratos de hidrocarburos de petróleo, como n-alcános e hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono. Midieron diariamente durante doce días la capacidad de biodegradación y la cantidad de biomasa mediante análisis gravimétrico y cromatografía de gases junto con técnicas de espectrometría de masas. Las dos cepas crecieron en n-alcános de cadena larga, petróleo diesel y petróleo crudo, pero no lograron crecer en n-alcános de cadena corta e hidrocarburos aromáticos. Los atributos de medición del crecimiento de los aislamientos, utilizando n-hexadecano, aceite diesel y petróleo crudo como sustratos, mostraron que la cepa *Candida tropicalis* tuvo una mejor degradación de los sustratos de hidrocarburos que la cepa *Trichosporon asahii*. Concluyendo que estas cepas de levaduras pueden ser útiles para el proceso de biorremediación y disminuir la contaminación por petróleo en aguas residuales contaminadas con hidrocarburos de petróleo (Gargouri et al. 2015).

En el año 2016 Romero et al. aislaron levaduras de muestras contaminadas con hidrocarburos, los aislamientos se crecieron en placas con presencia de antraceno. Realizaron la caracterización molecular mediante un análisis de secuencias de las regiones ITS1-5.8S rRNA-ITS4 y 26S rRNA. Encontrando cepas de *Candida parasilopsis*, *Pichia anomala* y *Rhodothorula mucilaginosa* siendo las levaduras prevalentes. La degradación de antraceno se evaluó en sistemas de suelo con 0, 50, 100, 150, 200 y 250 µg An/l, 3 tipos diferentes de sorbentes, carbono orgánico, nitrógeno orgánico, PAHs, arena:limo:arcilla, pH y capacidad de intercambio catiónico. Encontraron que la transformación de antraceno fue mayor en la fase líquida orgánica que en las absorbidas por el suelo. Al final concluyen que *C. parasilopsis* y *R. mucilaginosa* presentan una mayor desorción de antraceno (Romero et al. 2016).

En el año 2016 Mao y Guan descubrieron que una cepa fúngica *PZ-4* aislada de un suelo contaminado con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) tenía la capacidad de degradarlos. Esta cepa fúngica fue identificada como *Scopulariopsis brevicaulis* según la secuencia del gen 18S rRNA. Encontraron que *PZ-4* pudo eliminar fenantreno (60 %), fluoranteno (62 %), pireno (64 %) y benzo[a]pireno (82 %) en medio líquido después de 30 días

de incubación. Ellos establecieron microcosmos para evaluar el potencial de biorremediación de PZ-4 en un suelo contaminado con PAHs. Después de la incubación durante 28 días, el 77 % del total de PAHs se eliminaba del suelo con la adición de la suspensión de *PZ-4*, la mayor eliminación de PAHs se produjo en fenantreno (89 %) y benzo[a]pireno (75 %). Concluyendo que esta cepa fúngica podría ser un candidato prometedor para la biorremediación de suelos contaminados con PAHs (Mao and Guan 2016).

En el año 2017 Hadibarata y colaboradores recolectaron y seleccionaron a *Candida sp. SI* del bosque tropical de Malasia para degradar pireno, esto en función de la capacidad de decolorar RB5 (Reactive Black 5) el cual es un colorante reactivo utilizado para industrias, principalmente en las productoras del papel, por lo tanto, si son capaces de decolorar estos reactivos son capaces de degradar hidrocarburos. Colocaron a *Candida sp. SI* en distintas condiciones las cuales incluyeron temperatura, agitación, pH, concentración de glucosa, salinidad y concentración inicial de pireno. Encontraron que *Candida sp. SI* tiende a tener una alta capacidad de degradación sobre el pireno y crecimiento en una temperatura óptima de 28°C en una agitación de 80 RPM, sin embargo, reportan que hubo un beneficio de estos efectos en condiciones ácidas y que *Candida sp. SI* no puede utilizar al pireno como única fuente de carbono y energía, por lo tanto, la adición de glucosa mejora la tasa de crecimiento y degradación. También mencionan que el crecimiento de *Candida* se ve favorecida por el aumento de la salinidad mientras que la degradación máxima de pireno alcanzó los 24 g L<sup>-1</sup>. Por lo tanto, Hadibarata y colaboradores consideran a *Candida sp. SI* como un potente hongo para la degradación de pireno en un ambiente ácido y salino (Hadibarata et al. 2017).

En el año 2018 Kamyabi, Nouri, y Moghimi realizaron un estudio con la levadura *Basidiascus persicus EBL-C16* para degradar al pireno en presencia de sales al igual que se analizaba la vía de degradación del pireno. Encontraron que esta levadura tiene una alta capacidad para degradar al pireno en altas concentraciones y en presencia de sales. También hicieron un co-cultivo de *B. persicus* con *Pseudomonas* y ramnolípido arrojando un buen rendimiento de degradación de HAPs. Por lo tanto, Kamyabi, Nouri, y Moghimi consideran a *B. persicus EBL-C16* como una potente levadura halotolerante en la degradación de pireno y otros HAPs presentes en medios salinos y naturales contaminados (Kamyabi, Nouri, and Moghimi 2018).



En el año 2018 Mandal y Das estudiaron la degradación de Hidrocarburos Aromaticos Policiclicos de alto peso molecular (Benzo(a)pireno, perileno y benzo[ghi]perileno en el suelo utilizando consorcios de levaduras conformado por *Rhodotorula* sp. NS01, *Hanseniaspora opuntiae* NS02, *Debaryomyces hansenii* NS03 y *Hanseniaspora valbyensis* NS04 en diversas matrices convencionales y materiales de desecho biológico. Encontraron que había una biodegradación mejorada cuando utilizaban consorcios de levaduras inmovilizadas en polvo de aserrín (SDP) que fue químicamente modificadó (M-SDP), esta modificación provocó la destrucción de los anillos de benceno en la celulosa y mejoró la porosidad del polvo de aserrín al disminuir la cristanilidad de la biomasa. La aplicación del M-SDP mostró una mayor degradación de benzo[a]pireno (82,5 %), seguida de perileno (75,1 %) y benzo[ghi]perileno (63,4 %) después de 40 días de incubación (Mandal and Das 2018).

En el año 2018 Hashem et al. probaron 67 cepas de levaduras para determinar su potencial de crecimiento en hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Las seis cepas más eficaces se identificaron mediante el análisis de secuencias del dominio variable D1/D2 de la subunidad grande 26S del ADN ribosomal. La identidad de estas cepas se confirmó como *Yamadazyma mexicana* KKUY-0160, *Rhodotorula taiwanensis* KKUY-0162, *Pichia kluyveri* KKUY-0163, *Rhodotorula ingeniosa* KKUY-0170, *Candida pseudointermedia* KKUY-0192 y *Meyerozyma guilliermondii* KKUY-0214. Todas las cepas mencionadas fueron capaces de utilizar y crecer en ambos hidrocarburos, sin embargo, *Rhodotorula taiwanensis* KKUY-0162 surgió como el mejor degradador de octanaje, y *Rhodotorula ingeniosa* KKUY-170 fue el mejor degradador de pireno. Realizaron un análisis cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas el cual aprobó la presencia de muchos compuestos químicos que podrían ser metabolitos de transición o secundarios durante la utilización de los hidrocarburos (Hashem et al. 2018).

En el año 2021 Martínez Ávila y colaboradores realizaron un estudio con la levadura poliextremotolerante *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 para degradar fenantreno y benzo(a)pireno en condiciones salinas, encontraron que *R. mucilaginosa* EXF-1630 utiliza a estos hidrocarburos como única fuente de carbono, inclusive lo comparan con la glucosa como fuente de carbono y mencionan que tiene la misma eficacia en cuanto al crecimiento del hidrocarburo.

Además realizaron estudios toxicológicos en bacteria, planta y 2 tipos de células humanas para saber si aún se tenía presente alguno de estos 2 hidrocarburos, sin embargo, no se encontró algún efecto citotóxico en alguno de estos organismos (Martínez-Ávila et al. 2021).

Teniendo en cuenta la evidencia antes presentada en distintos estudios científicos de biorremediación con levaduras es que nos planteamos la siguiente hipótesis:

### 3. HIPOTESIS

Las levaduras extremófilas/extremotolerantes tienen la capacidad de utilizar a los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) como única fuente de carbono para aumentar la biomasa en condiciones salinas.

### 4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de una colección de levaduras extremófilas/extremotolerantes para la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el crecimiento de levaduras extremófilas en medio mínimo con Fenantreno y *p*-Benzoquinona como única fuente de carbono.
- 2.- Evaluar el crecimiento de levaduras extremófilas Fenantreno y *p*-Benzoquinona en medio mínimo suplementado con variaciones de nutrientes y salinidad conocida.

### 6. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Microorganismos y reactivos

Las cepas de levaduras a utilizar durante este trabajo se muestran en la siguiente tabla:

**TABLA 5. Colección de levaduras extremófilas.**

| Origen  | Cepa                         |
|---|------------------------------|
| Repositorio de la Universidad de Querétaro. Donadas por la Dra. Rosa Paulina Calvillo Medina. | <i>Mrakia sp.</i>            |
|   | <i>Cystofilobasidium sp.</i> |
|   | <i>Protomyces sp.</i>        |

|   |   |
|---|---|
|   | <i>Phenoliferra sp.</i>                     |
|   | <i>Leucos poridium sp.</i>                  |
|   | <i>Basidiomycota sp.</i>                    |
|   | <i>Tausonia sp.</i>                         |
|   | <i>Aureobasidium sp.</i>                    |
| Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) Donado por el Dra. Irán Tapia Vázquez | <i>Rhodotorula sp. 1</i>                    |
|   | <i>Rhodotorula sp. 2</i>                    |
|   | <i>Rhodotorula sp. 3</i>                    |
|   | <i>Rhodotorula sp. 4</i>                    |
|   | <i>Naganishia sp.</i>                       |
| Universidad de Liubliana, Eslovenia. Donadas por la Dra. Nina Gunde-Cimerman          | <i>Naganishia liquefaciens EXF. 3435</i>    |
|   | <i>Naganishia diffluens EXF. 150</i>        |
|   | <i>Naganishia friedmani EXF. 14968</i>      |
|   | <i>Naganishia albida EXF. 1599</i>          |
|   | <i>Naganishia albidosimilis EXF. 1563</i>   |
|   | <i>Sporobolomyces ruberrimus EXF. 8989</i>  |
|   | <i>Sporobolomyces roseus EXF. 3791</i>      |
|   | <i>Hortaeae werneckii EXF. 2000</i>         |
|   | <i>Aureobasidium subglaciale EXF. 2481</i>  |
|   | <i>Exophiala dermatitidis EXF. 5573</i>     |
|   | <i>Zalaria obscura EXF. 1936</i>            |
|   | <i>Sporobolomyces salmonicolor EXF. 300</i> |
|   | <i>Sporobolomyces sp. EXF. 12342</i>        |
|   | <i>Sporobolomyces lactosus EXF. 10135</i>   |
| <i>Aureobasidium pullulans EXF. 150</i>   |   |

Estas cepas se conservaron en placas Petri a 4°C. Adicionalmente, se conservaron colonias de estas cepas en una solución de glicerol 20% a -80°C.

Todos los reactivos por utilizar en este trabajo fueron adquiridos de las firmas: Sigma-Aldrich (Fenantreno y p-benzoquinona).

### **Medios de cultivo y soluciones**

**Medio salino:** Para la preparación de medio salino se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 400 mL de agua destilada: 3.12 mg de CuSO<sub>4</sub>, 7.2 mg de FeSO<sub>4</sub>, 200 mg de MgSO<sub>4</sub>, 4 mg de ZnSO<sub>4</sub>, 20 mg de KCl, 400 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 800 mg de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

**Medio extracto de levadura (YPD):** Para la preparación del medio YPD se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 100 mL de agua destilada: 1 gramo de extracto de levadura, 2 gramos de peptona, 2 gramos de agar y dextrosa al 20%.

**Medio agar de dextrosa y papa (PDA):** Para la preparación del medio PDA se disolvieron 11.7 gramos del reactivo en un volumen de 300 mL de agua destilada.

**Medio agar extracto de malta (MEA):** Para la preparación del medio MEA se utilizaron los siguientes reactivos a las concentraciones indicadas para 300 mL de agua destilada: 6 gramos de malta, 6 gramos de dextrosa, 0.3 gramos de peptona y 6 gramos de agar.

**Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs):** En acetona se realizaron las diluciones del fenantreno y p-benzoquinona a una concentración de 10,000 ppm.

### **Crecimiento de levaduras en presencia de fenantreno y p-benzoquinona**

Se obtuvo un cultivo fresco (4 días) de cada cepa sobre medio YPD. El preinóculo se incubó a 28°C. Se recolectaron las células y se centrifugaron a 6,000 RPM por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante en hipoclorito de sodio (NaClO). Se realizó un lavado con solución salina (NaCl al 1%) para eliminar el medio YPD. Centrifugación de nuevo a 6,000 RPM por 5 minutos. Se desechó de nuevo el sobrenadante en NaClO. Una vez hecho el lavado se resuspendieron las células en MM. Se adicionó fenantreno y p-benzoquinona en concentraciones de 100 ppm y 25 ppm, a partir de una solución stock de 10,000 ppm de los HAPs en acetona. Se dejaron incubando en tubos de ensayo en el lapso de 0, 7 y 14 días a 28°C, se hicieron lecturas en los días antes mencionados.

## **Tolerancia al NaCl y utilización de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la colección de levaduras**

Se obtuvo un cultivo fresco (4 días) de cada cepa sobre medio YPD. El preinóculo se incubó a 28°C. Se recolectaron las células y se centrifugaron a 6,000 RPM por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante en hipoclorito de sodio (NaClO). Se realizó un lavado con solución salina (NaCl al 1%) para eliminar el medio YPD. Centrifugación de nuevo a 6,000 RPM por 5 minutos. Se desecha de nuevo el sobrenadante en NaClO. Una vez hecho el lavado se resuspenden las células en MM.

Se prepararon 8 condiciones para el cultivo de las levaduras, siendo medio mínimo el que se encontraba presente en todas las condiciones. Agregando los diferentes nutrientes a las condiciones como se muestra a continuación:

Condición 1: Fentreno/p-benzoquinona

Condición 2: Glucosa al 0.5% + Fentreno/p-benzoquinona

Condición 3: YPD 0.5% + Fentreno/p-benzoquinona

Condición 4: Extracto de levadura 0.5% + Fentreno/p-benzoquinona

Condición 5: NaCl 0.5 M + Fentreno/p-benzoquinona

Condición 6: Glucosa al 0.5% + NaCl 0.5 M + Fentreno/p-benzoquinona

Condición 7: YPD 0.5% + NaCl 0.5 M + Fentreno/p-benzoquinona

Condición 8: Extracto de levadura 0.5% + NaCl 0.5 M + Fentreno/p-benzoquinona

Se adiciono fenantreno y p-benzoquinona en concentración de 100 ppm, a partir de una solución stock de 10,000 ppm de los HAPs en acetona. Se dejaron incubando en tubos de ensayo en el lapso de 0, 7 y 14 días a 28°C, se hicieron lecturas en los días antes mencionados.

### **Análisis estadístico multivariado**

Los análisis estadísticos multivariados (U de Mann-Whitney y Kurskal wallis) fueron realizados con el software IBM SPSS statistics 22 y el gráfico fue hecho en Rstudio.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

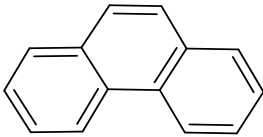
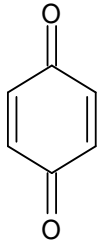
### **Crecimiento de 14 cepas de levadura en presencia de fenantreno y p-benzoquinona en medio mínimo en tubos de vidrio de ensayo.**

Las células preinoculadas en medio YPD se recolectaron, se realizaron lavados con solución salina para después ser resuspendidas en medio mínimo para así ser incubadas en tubos de vidrio de ensayo por 14 días a 150 rpm a 28°C.

Se evaluó el crecimiento de la colección de las 14 cepas levaduras extremófilas para crecer en medio mínimo en presencia de *p*-Benzoquinona o Fenantreno como única fuente de carbono. La tabla 6 muestra la eficiencia de crecimiento durante el ensayo, en la cual se puede observar que hay un mayor crecimiento para *Rhodotorula* sp. 2 y *Rhodotorula* sp. 4 en presencia de Fenantreno, mientras que *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 4, *Z. obscura*, *Naganishia albida* y *Naganishia* sp tuvieron un mayor crecimiento en presencia de *p*-Benzoquinona.

Los resultados de otros grupos de investigación han demostrado que las levaduras del género *Rhodotorula* como *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula muciliginosa* (Boz et al. 2015), *Rhodotorula taiwanensis* KKUY-0162 y *Rhodotorula ingeniosa* KKUY-0170 (Hashem et al. 2018), son consideradas como uno de los géneros con mayor capacidad para crecer en presencia de contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Hesham et al. 2012; Mandal and Das 2018).

**TABLA 6: Evaluación del crecimiento de 14 cepas de levadura en presencia de fenantreno y p-benzoquinona en medio mínimo en tubos de vidrio de ensayo.**

| Levaduras   | Fenantreno  |        | <i>p</i> -Benzoquinona  |        |
|---|---|--------|---|--------|
|   |  |        |  |        |
|   | Day 7   | Day 14 | Day 7   | Day 14 |
| <i>Rhodotorula sp. 1</i>                            | +   | +      | +   | ++     |
| <i>Rhodotorula sp. 2</i>                            | +   | ++     | ++  | +++    |
| <i>Rhodotorula sp. 3</i>                            | +   | +      | +   | ++     |
| <i>Rhodotorula sp. 4</i>                            | +   | ++     | +   | +++    |
| <i>Hortaea werneckii</i><br><i>EXF-2000</i>         | +   | +      | +   | +      |
| <i>Zalaria obscura</i><br><i>EXF-1936</i>           | +   | +      | +   | +++    |
| <i>Leucosporidium sp.</i>                           | +   | +      | +   | +      |
| <i>Cystofilobasidium sp.</i>                        | +   | +      | +   | +      |
| <i>Protomyces sp.</i>                               | +   | +      | +   | +      |
| <i>Aureobasidium sp.</i>                            | +   | +      | +   | +      |
| <i>Naganishia albida</i><br><i>EXF-1599</i>         | +   | +      | +   | ++     |
| <i>Aureobasidium pullulans</i><br><i>EXF-150</i>    | +   | +      | ++  | +      |
| <i>Naganishia sp.</i>                               | +   | +      | +   | ++     |
| <i>Sporobolomyces ruberrimus</i><br><i>EXF-8989</i> | +   | +      | +   | +      |

+++; Yeast Growth = 8.1 - 12 (D.O. 600 nm day 7 or 14 / D.O. 600 nm day 0)

++: YG = 4.1 - 8

+: YG = 0 - 4

## **Tolerancia al NaCl y utilización de hidrocarburos aromáticos policíclicos por la colección de levaduras**

Las células preinoculadas en medio YPD se recolectaron, se realizaron lavados con solución salina para después ser resuspendidas en medio mínimo suplementado con cada una de las condiciones y colocar 200 uL en placa de 96 pozos para así ser incubadas por 14 días a 150 rpm a 28°C.

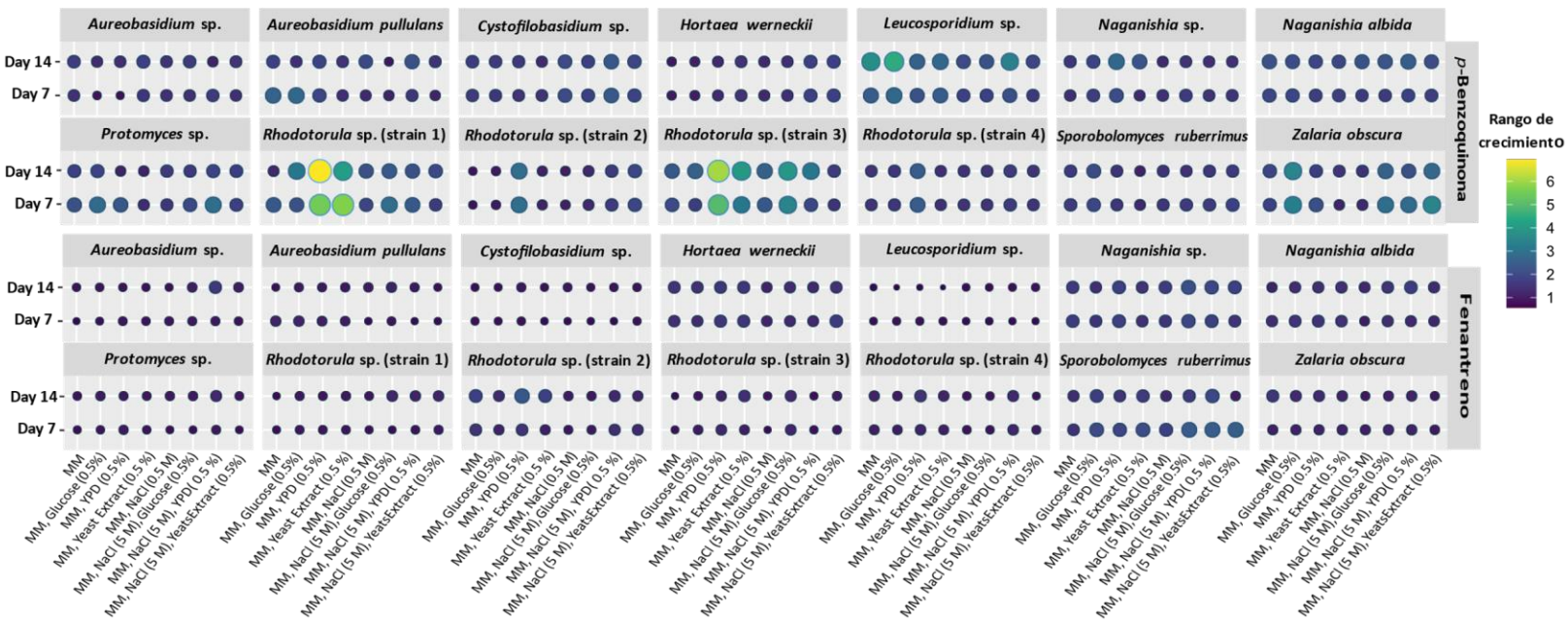
Se analizó el crecimiento de la colección de las 14 cepas levaduras extremófilas para crecer en 8 condiciones distintas en presencia de *p*-Benzoquinona o Fenantreno como única fuente de carbono. La figura 6A y 6B muestran el aumento de biomasa durante el ensayo, en la cual se puede observar que para *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 3 y *Naganishia* sp. presentan alta tasa de crecimiento celular en la condición de medio mínimo + YPD 0.5% y medio mínimo + extracto de levadura al 0.5% en presencia de *p*-Benzoquinona, mientras que *Sporobolomyces ruberrimus*, *Hortae werneckii*, *Naganishia* sp. y *Rhodotorula* sp. 2 presentan alta tasa de crecimiento celular en las condiciones salinas (NaCl) en presencia de fenantreno.

Los experimentos se realizaron por triplicado para después promediarlos y hacer una relación (división de promedios) de Día 7 y 14 entre el Día 0, obteniendo así un rango de D.O. mínimo de 1 representado por el color cyan y un máximo de 6 representado por el color amarillo en el heatmap (ver Figura 6B).

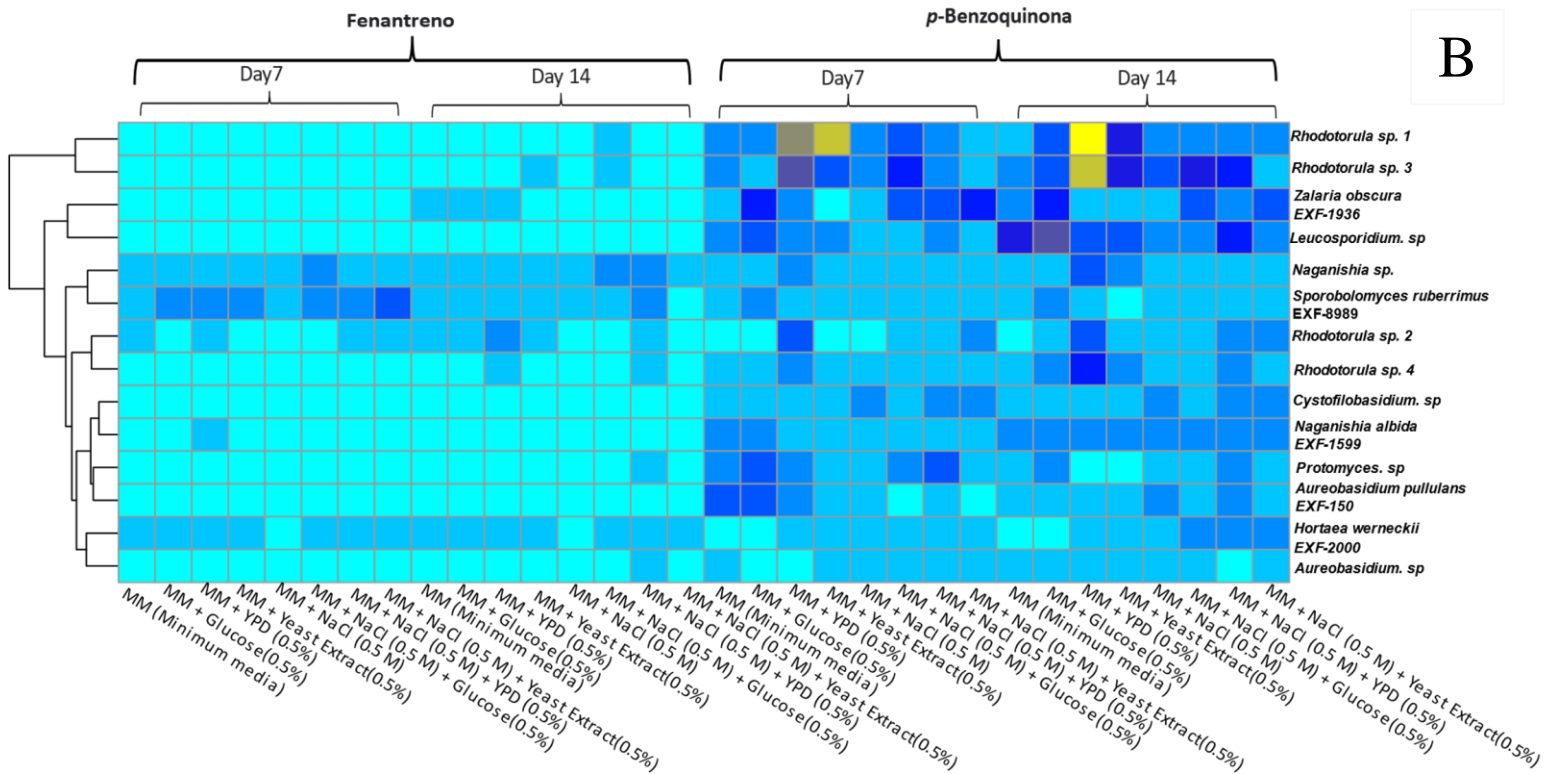
Mientras que en la Figura 6A se representan los mismos datos, pero en un gráfico de esferas donde la D.O. mínima se representa de color azul con esferas pequeñas hasta la D.O. máxima que es representada con el color amarillo y esferas grandes.



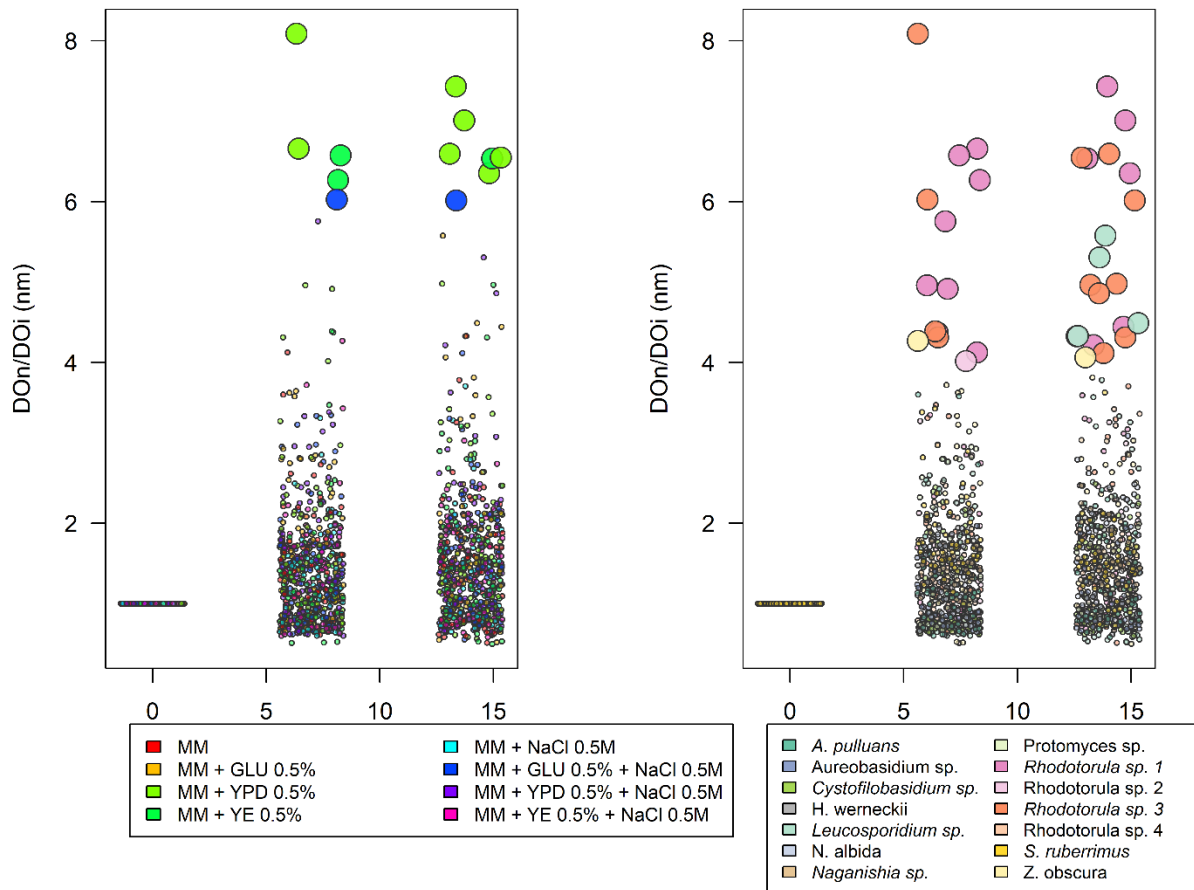
A



B



**FIGURA 6.** Se prepararon inoculos de las 14 cepas de levadura y se colocaron en 8 condiciones en presencia de fenantreno y en presencia de *p*-benzoquinona a una concentración de 100 ppm. A: Representación en gráfico de esfera, B: Mismos resultados presentados en mapa de calor



**FIGURA 7.** Análisis estadístico multivariado realizado con la prueba de Kruskal-wallis y de U de Mann-Whitney por medio del programa IBM SPSS statistics 22 y representado en scatterplot. A. Se observan condiciones de crecimiento celular de menor a mayor de acuerdo a la D.O. 600<sub>nm</sub>. B. Se observan las cepas de levaduras de acuerdo a las que presentaron mayor D.O. 600<sub>nm</sub>.

Por medio de análisis estadístico multivariado con el programa IBM SPSS Statistics haciendo la prueba de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney logramos seleccionar 5 cepas de levaduras y 2 condiciones de cultivos a partir de la colección de las 14 cepas de levaduras, siendo *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 3, *Leucosporidium* sp. y *Z. obscura* las cepas que presentaban un mayor crecimiento en presencia de Fenantreno y *p*-Benzoquinona, mientras que las condiciones que beneficiaban a las cepas fueron medio mínimo + YPD 0.5% y medio mínimo + Glucosa 0.5% + NaCl 0.5M.

Los resultados anteriores (figura 6 y 7) son similares a los que han obtenido en otros grupos de investigación como los resultados de Martínez-Ávila et al. quienes estudiaron la respuesta que tiene *Rhodotorula mucilagenosa* EXF-1630 (Martínez-Ávila et al. 2021) a condiciones hipersalinas y encontrando que el crecimiento de esta levadura no se vio afectado por el aumento de la salinidad debido a su tolerancia. Por lo tanto, estos resultados indican que *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 3, *Leucosporidium* sp. y *Z. obscura* pueden ser levaduras con la capacidad de biodegradar compuestos aromaticos y de esta forma utilizarlas para la biorremediación de HAPS en aguas y suelos con salinidad (Hadibarata et al. 2017; Kamyabi, Nouri, and Moghimi 2018).

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ Determinamos que las levaduras extremófilas *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 3, *Rhodotorula* sp. 4, *Z. obscura*, *N. albida* y *Naganishia* sp. crecieron en medio mínimo con Fenantreno y *p*-Benzoquinona como única fuente de carbono.
- ❖ Determinamos que las levaduras *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 3, *Leucosporidium* sp. y *Z. obscura* crecen en presencia de Fenantreno y *p*-Benzoquinona en medio mínimo suplementado con variaciones de nutrientes y salinidad.

## 9. PERSPECTIVAS

Los siguientes pasos por seguir en la investigación serán:

- ❖ Evaluar el crecimiento de las levaduras *Rhodotorula* sp. 1, *Rhodotorula* sp. 2, *Rhodotorula* sp. 3, *Rhodotorula* sp. 4, *Naganishia* sp, *S. ruberrimus*, *H. werneckii*, *Leucosporidium* sp. y *A. pullulans* a distintas temperaturas, pH, condiciones de salinidad y en combinación con los compuestos aromáticos.
- ❖ Evaluar el crecimiento de consorcios de levaduras en presencia de Fenantreno y *p*-Benzoquinona.

- ❖ Evaluar la degradación de los compuestos aromáticos Fenantreno y *p*-Benzoquinona mediante la técnica de HPLC.

## 10. AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar dando gracias a mis padres Cosme y Lilian por apoyarme en todo momento y darme esta oportunidad de terminar mis estudios de Licenciatura.

En especial al Dr. Ramón Alberto Batista García y a la Dra. Nilda del Carmen Sánchez Castellanos por confiar en mí, abrirme las puertas y quienes, con su dirección, conocimiento, enseñanza y ayuda permitieron el desarrollo de este trabajo.

Finalmente quiero agradecer el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) cuyos proyectos 285816, 1004 y 1559, permitieron el desarrollo de este proyecto.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Bahafid, Wifak et al. 2017. ‘Yeast Biomass: An Alternative for Bioremediation of Heavy Metals’. *Yeast - Industrial Applications*.
- Bajgai, Ram, Nelly Georgieva, and Nevena Lazarova. 2012. ‘Bioremediation of Chromium Ions with Filamentous Yeast *Trichosporon Cutaneum* R57’. *Journal of Biology and Earth Sciences* 2(2): 70–75.
- Bamforth, Selina M., and Ian Singleton. 2005. ‘Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Current Knowledge and Future Directions’. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80(7): 723–36.
- Behnood, M., B. Nasernejad, and M. Nikazar. 2014. ‘Biodegradation of Crude Oil from Saline Waste Water Using White Rot Fungus *Phanerochaete Chrysosporium*’. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20(4): 1879–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2013.09.007>.
- Belviso, Simona, Laura Bardi, Raffaella Fabbian, and Mario Marzona. 2005. ‘Bioremediation of Phenanthrene Polluted Soils’. *Revista CENIC : Ciencias Biológicas* 36.

- Bezalel, L E A, and Yitzhak Hadar. 1997. 'Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus Ostreatus*.' 63(7): 2495–2501.
- Blumer, M. 1976. 'Polycyclic Aromatic Compounds in Nature.' *Scientific American* 234(3): 35–45.
- Boonchan, Sudarat, Margaret L. Britz, and Grant A. Stanley. 2000. 'Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures'. *Applied and Environmental Microbiology* 66(3): 1007–19.
- Borneff, J., F. Selenka, H. Kunte, and A. Maximos. 1968. 'Experimental Studies on the Formation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Plants'. *Environmental Research* 2(1): 22–29.
- Boz, Diğdem Tunalı, Hüsniye Tansel Yalçın, Cengiz Çorbacı, and Füsün Bahriye Uçar. 2015. 'Polisiklik Aromatik Hidrokarbonları Parçalayan Mayaların Taranması ve Moleküler Karakterizasyonu'. *Turkish Journal of Biochemistry* 40(2): 105–10.
- Brakstad, Odd G., and Kristin Bonaunet. 2006. 'Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Seawater at Low Temperatures (0-5°C) and Bacterial Communities Associated with Degradation'. *Biodegradation* 17(1): 71–82.
- Brown, Jeffrey N., and Barrie M. Peake. 2006. 'Sources of Heavy Metals and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Stormwater Runoff'. *Science of the Total Environment* 359(1–3): 145–55.
- Buzzini, Pietro, Benedetta Turchetti, and Andrey Yurkov. 2018. 'Extremophilic Yeasts: The Toughest Yeasts Around?' *Yeast* 35(8): 487–97.
- Cerniglia, C. E. 1997. 'Fungal Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Past, Present and Future Applications in Bioremediation'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19(5–6): 324–33.
- Clements, W H, J T Otis, and T E Wissing. 1994. 'Environmental Contamination and Toxicology Accumulation and Food Chain Transfer of Fluoranthene and Benzo[a]Pyrene in *Chironomus Riparius* and *Lepomis Macrochirus*'. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 26: 261–66.  
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F00203550.pdf>.
- Cong, Le Thi Nhi et al. 2014. 'Application of a Biofilm Formed by a Mixture of Yeasts Isolated in Vietnam to Degrade Aromatic Hydrocarbon Polluted Wastewater Collected from

- Petroleum Storage'. *Water Science and Technology* 70(2): 329–36.
- Contreras, M L. 2003. 'Informes Técnicos Ciemat Estudio de Adsorción de Fenantreno En Diferentes Tipos de Arcillas'.
- Dai, Qianjin et al. 2014. 'Formation of PAHs during the Pyrolysis of Dry Sewage Sludge'. *Fuel* 130: 92–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2014.04.017>.
- Davies, J. I., and W. C. Evans. 1964. 'Oxidative Metabolism of Naphthalene by Soil Pseudomonads. The Ring-Fission Mechanism.' *The Biochemical journal* 91(2): 251–61.
- Dibble, J T, and R Bartha. 1979. 'Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge.' 41(August): 157–65.
- Engraff, Maria et al. 2011. 'Aquatic Toxicity of PAHs and PAH Mixtures at Saturation to Benthic Amphipods: Linking Toxic Effects to Chemical Activity'. *Aquatic Toxicology* 102(3–4): 142–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.009>.
- Eriksson, Mikael, K. A. Jong-Ok, and William W. Mohn. 2001. 'Effects of Low Temperature and Freeze-Thaw Cycles on Hydrocarbon Biodegradation in Arctic Tundra Soil'. *Applied and Environmental Microbiology* 67(3–12): 5107–12.
- Fan, Mei Ying, Rui Jie Xie, and Gang Qin. 2014. 'Bioremediation of Petroleum-Contaminated Soil by a Combined System of Biostimulation-Bioaugmentation with Yeast'. *Environmental Technology (United Kingdom)* 35(4): 391–99.
- Fernando Bautista, L. et al. 2009. 'Effect of Different Non-Ionic Surfactants on the Biodegradation of PAHs by Diverse Aerobic Bacteria'. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63(7): 913–22.
- Gargouri, Boutheina et al. 2015. 'Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater'. *BioMed Research International* 2015.
- George, J D. 1996. 'GEORGE,&dagger'; *Toxicology and Industrial Health* 12.
- Ghosal, Debajyoti, Shreya Ghosh, Tapan K. Dutta, and Youngho Ahn. 2016. 'Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review'. *Frontiers in Microbiology* 7(AUG).
- Giraud, F et al. 2001. 'BIODEGRADATION OF ANTHRACENE AND FLUORANTHENE BY FUNGI ISOLATED FROM AN EXPERIMENTAL CONSTRUCTED WETLAND FOR'. 35(17): 4126–36.

- Glazer, Alexander N., and Hiroshi Nikaido. 2007. *Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology*.
- Goldman, Radoslav et al. 2001. 'Smoking Increases Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Lung Tissue'. *Cancer Research* 61(17): 6367–71.
- Guo, Yongyong, Kusheng Wu, Xia Huo, and Xijin Xu. 2011. 'Sources, Distribution, and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons'. *Journal of Environmental Health* 73(9): 22–25.
- Habe, Hiroshi, and Toshio Omori. 2003. 'Genetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism in Diverse Aerobic Bacteria'. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 67(2): 225–43.
- Hadibarata, Tony, Ameer Badr Khudhair, Risky Ayu Kristanti, and Hesam Kamyab. 2017. 'Biodegradation of Pyrene by Candida Sp. S1 under High Salinity Conditions'. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 40(9): 1411–18.
- Van Hamme, Jonathan D., Ajay Singh, and Owen P. Ward. 2003. 'Recent Advances in Petroleum Microbiology'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 503–49.
- Haritash, A. K., and C. P. Kaushik. 2009. 'Biodegradation Aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review'. *Journal of Hazardous Materials* 169(1–3): 1–15.
- Harmsen, Joop. 2004. Wageningen University *Landfarming of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Mineral Oil Contaminated Sediments*.
- Hashem, Mohamed, Saad A. Alamri, Sharefah S.A.A. Al-Zomyh, and Sulaiman A. Alrumman. 2018. 'Biodegradation and Detoxification of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by New Yeast Strains'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 151(December 2017): 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.064>.
- Hatzinger, Paul B. et al. 2001. 'Biodegradation of Methyl Tert-Butyl Ether by a Pure Bacterial Culture'. *Applied and Environmental Microbiology* 67(12): 5601–7.
- Herrero, M., and D. C. Stuckey. 2015. 'Bioaugmentation and Its Application in Wastewater Treatment: A Review'. *Chemosphere* 140: 119–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.033>.
- Hesham, Abd El Latif et al. 2012. 'Biodegradation of High Molecular Weight PAHs Using Isolated Yeast Mixtures: Application of Meta-Genomic Methods for Community Structure Analyses'. *Environmental Science and Pollution Research* 19(8): 3568–78.

- Hoffman, Eva J., Gary L. Mills, James S. Latimer, and James G. Quinn. 1984. 'Urban Runoff as a Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Coastal Waters'. *Environmental Science and Technology* 18(8): 580–87.
- Horvath, R. S. 1972. 'Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature.' *Bacteriological reviews* 36(2): 146–55.
- Howsam, Mike, and Kevin C. Jones. 1998. 'Sources of PAHs in the Environment'. 3: 137–74.
- Hutt, Anna M., and George F. Kalf. 1996. 'Inhibition of Human DNA Topoisomerase II by Hydroquinone and P-Benzoquinone, Reactive Metabolites of Benzene'. *Environmental Health Perspectives* 104(SUPPL. 6): 1265–69.
- Juhasz, Albert L., and Ravendra Naidu. 2000. 'Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review of the Microbial Degradation of Benzo[a]Pyrene'. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45(1–2): 57–88.
- Kamyabi, A., H. Nouri, and H. Moghimi. 2018. 'Characterization of Pyrene Degradation and Metabolite Identification by *Basidioascus Persicus* and Mineralization Enhancement with Bacterial-Yeast Co-Culture'. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163(July): 471–77. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.098>.
- Karigar, Chandrakant S., and Shwetha S. Rao. 2011. 'Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review'. *Enzyme Research* 2011(1).
- Keith, L. H., and W. A. Telliard. 1979. 'Priority Pollutants. I. A Perspective View'. *Environmental Science and Technology* 13(4): 416–23.
- Kim, Ki Hyun, Shamin Ara Jahan, Ehsanul Kabir, and Richard J.C. Brown. 2013. 'A Review of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Human Health Effects'. *Environment International* 60: 71–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>.
- Leahy, J G, and R R Colwell. 1990. 'Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment'. *Microbiological Reviews* 54(3): 305–15.
- Leelaruji, Wannisa et al. 2014. 'Potential of Laccase Produced from Microfungus *Aureobasidium Pullulans* Var. *Melanogenum* to Degrade Polycyclic Aromatic Hydrocarbons'. *Chem. Bull* 3(3): 269–72.
- Lodish, Harvey et al. 2016. 'Carcinógenos y Genes Cuidadores En Cáncer'. In *Biología Celular y Molecular*, Editorial Medica Panamericana, 1140–49.
- Mandal, Sanjeeb Kumar, and Nilanjana Das. 2018. 'Enhanced Biodegradation of High Molecular



- Weight PAHs Using Yeast Consortia Immobilized on Modified Biowaste Material'. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 7(6): 594–601.
- Mao, Jian, and Wenwen Guan. 2016. 'Fungal Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by *Scopulariopsis brevicaulis* and Its Application in Bioremediation of PAH-Contaminated Soil'. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 66(5): 399–405. <http://dx.doi.org/10.1080/09064710.2015.1137629>.
- Mao, Jian, Yongming Luo, Ying Teng, and Zhengao Li. 2012. 'Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Soil by a Bacterial Consortium and Associated Microbial Community Changes'. *International Biodeterioration and Biodegradation* 70: 141–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.03.002>.
- Margesin, R., G. Zacke, and F. Schinner. 2002. 'Characterization of Heterotrophic Microorganisms in Alpine Glacier Cryoconite'. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 34(1): 88–93.
- Margesin, Rosa et al. 2003. 'Hydrocarbon Degradation and Enzyme Activities of Cold-Adapted Bacteria and Yeasts'. *Extremophiles* 7(6): 451–58.
- Martínez-Ávila, Liliana et al. 2021. 'Tracking Gene Expression, Metabolic Profiles, and Biochemical Analysis in the Halotolerant Basidiomycetous Yeast *Rhodotorula mucilaginosa* EXF-1630 during Benzo[a]Pyrene and Phenanthrene Biodegradation under Hypersaline Conditions'. *Environmental Pollution* 271: 116358. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116358>.
- Mishra, Nitika, Godwin A. Ayoko, and Lidia Morawska. 2016. 'Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Urban Environment: Occurrence, Toxicity and Source Apportionment'. *Environmental Pollution* 208: 110–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.015>.
- Pan, Feng et al. 2004. 'Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pichia Anomala*'. *Biotechnology Letters* 26(10): 803–6.
- Peidro-Guzmán, Heidy et al. 2021. 'Transcriptomic Analysis of Polyaromatic Hydrocarbon Degradation by the Halophilic Fungus *Aspergillus Sydowii* at Hypersaline Conditions'. *Environmental Microbiology* 23(7): 3435–59.
- Peter E. T. Douben. 2003. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470867132>.

- Potin, Olivier, Etienne Veignie, and Catherine Rafin. 2004. 'Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium Sphaerospermum* Isolated from an Aged PAH Contaminated Soil'. *FEMS Microbiology Ecology* 51(1): 71–78.
- Poyer, Rincones, Marfrfisi Valladares, Danglad Flores, and José Ángel. 2015. 'Adsorción de Hidrocarburos de Petróleo En Agua Mediante Una Columna Empacada Con Bagazo de Caña de Azúcar'. *SABER. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente* 27(3): 441–53.
- Puntus, I. F. et al. 2008. 'Phenanthrene Degradation by Bacteria of the Genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in Model Soil Systems'. *Mikrobiologiia* 77(1): 11–20.
- Rabodonirina, S et al. 2019. 'Degradation of Fluorene and Phenanthrene in PAHs-Contaminated Soil Using *Pseudomonas* and *Bacillus* Strains Isolated from Oil Spill Sites'. *Journal of Environmental Management* 232(September 2018): 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.005>.
- Ramesh, Aramandla et al. 2011. 'Global Environmental Distribution and Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons'. *Global Contamination Trends of Persistent Organic Chemicals*: 97–126.
- Raspor, Peter, and Jure Zupan. 2001. 'Chapter 15: Yeasts in Extreme Environments'. *Environments*: 1–47.
- Romero, M. C., M. C. Cazau, S. Giorgieri, and A. M. Arambarri. 1998. 'Phenanthrene Degradation by Microorganisms Isolated from a Contaminated Stream'. *Environmental Pollution* 101(3): 355–59.
- Romero, M., Juan Chiaravalli, and Enso Reinoso. 2016. 'Sorbed Anthracene Degradation by Sophorolipid Producing Yeasts'. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries* 5(1): 25–31.
- Romero, M. Cristina, Mónica L. Salvioli, M. Cecilia Cazau, and A. M. Arambarri. 2002. 'Pyrene Degradation by Yeasts and Filamentous Fungi'. *Environmental Pollution* 117(1): 159–63.
- Saeed, Talat, and Maha Al-Mutairi. 2000. 'Comparative Composition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Sea Water-Soluble Fractions of Different Kuwaiti Crude Oils'. *Advances in Environmental Research* 4(2): 141–45.
- Salleh, Abu Bakar, Farinazleen Mohamad Ghazali, Raja Noor Zaliha Abd Rahman, and Mahiran Basri. 2003. 'Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Pollution'. *Indian Journal of*

*Biotechnology* 2(3): 411–25.

- Satyanarayana, T., and Gotthard Kunze. 2009. 'Yeast Biotechnology: Diversity and Applications'. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*: 1–744.
- Semple, K. T., A. W.J. Morriss, and G. I. Paton. 2003. 'Bioavailability of Hydrophobic Organic Contaminants in Soils: Fundamental Concepts and Techniques for Analysis'. *European Journal of Soil Science* 54(4): 809–18.
- Shi, Ke et al. 2020. 'Study on the Degradation Performance and Bacterial Community of Bioaugmentation in Petroleum-Pollution Seawater'. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8(4): 103900. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103900>.
- Sims, R. C., and M. R. Overcash. 1983. 'Fate of Polynuclear Aromatic Compounds (PNAs) in Soil-Plant Systems'. *Residue Reviews* Vol. 88: 1–68.
- Singh, Dileep K. 2008. 'Biodegradation and Bioremediation of Pesticide in Soil: Concept, Method and Recent Developments'. *Indian Journal of Microbiology* 48(1): 35–40.
- Sood, Nitu, Sonali Patle, and Banwari Lal. 2010. 'Bioremediation of Acidic Oily Sludge-Contaminated Soil by the Novel Yeast Strain *Candida Digboiensis* TERI ASN6'. *Environmental Science and Pollution Research* 17(3): 603–10.
- Starmer, William T., and Marc André Lachance. 2011. 'Yeast Ecology'. *The Yeasts* 1(1987): 65–83.
- Suess, Michael J. 1976. 'The Environmental Load and Cycle of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons'. *Science of the Total Environment, The* 6(3): 239–50.
- Swannell, Richard P.J., Kenneth Lee, and Madeleine Mcdonagh. 1996. 'Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation'. *Microbiological Reviews* 60(2): 342–65.
- Telli-Karakoç, Fatma et al. 2002. 'Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Distributions in the Bay of Marmara Sea: İzmit Bay'. *Environmental Pollution* 119(3): 383–97.
- Tfouni, Silvia Amelia Verdiani, and Mônica Cristiane Rojo Camargo. 2012. 'Polycyclic Aromatic Hydrocarbons'. *Food Analysis by HPLC, Third Edition*: 1003–21.
- Tongo, Isioma, Ozekeke Ogbeide, and Lawrence Ezemonye. 2017. 'Human Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Smoked Fish Species from Markets in Southern Nigeria'. *Toxicology Reports* 4: 55–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2016.12.006>.

- Twiss, Michael R., Laurent Granier, Pierre Lafrance, and Peter G.C. Campbell. 1999. 'Bioaccumulation of 2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl and Pyrene by Picoplankton (Synechococcus Leopoliensis, Cyanophyceae): Influence of Variable Humic Acid Concentrations and PH'. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(9): 2063–69.
- Tyagi, Meenu, M. Manuela R. da Fonseca, and Carla C.C.R. de Carvalho. 2011. 'Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improve the Effectiveness of Bioremediation Processes'. *Biodegradation* 22(2): 231–41.
- Ulrich, Ania C., and Elizabeth A. Edwards. 2003. 'Physiological and Molecular Characterization of Anaerobic Benzene-Degrading Mixed Cultures'. *Environmental Microbiology* 5(2): 92–102.
- Vázquez-Gómez, Gerardo, Julieta Rubio-Lightbourn, and Jesús Javier Espinosa-Aguirre. 2016. 'Mecanismos De Acción Del Receptor De Hidrocarburos De Arilos En El Metabolismo Del Benzo[a]Pireno Y El Desarrollo De Tumores'. *Tip* 19(1): 54–67.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.recqb.2016.02.006>.
- Vidali, M. 2001. 'Bioremediation - An Overview'. *Journal of Industrial Pollution Control* 27(2): 161–68.
- Weis, Liliane M. et al. 1998. 'Bay or Baylike Regions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Were Potent Inhibitors of Gap Junctional Intercellular Communication'. *Environmental Health Perspectives* 106(1): 17–22.
- Wild, Simon R., and Kevin C. Jones. 1995. 'Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in the United Kingdom Environment: A Preliminary Source Inventory and Budget'. *Environmental Pollution* 88(1): 91–108.
- Wise, Stephen A., Lane C. Sander, and Michele M. Schantz. 2015. 'Analytical Methods for Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) — A Historical Perspective on the 16 U.S. EPA Priority Pollutant PAHs'. *Polycyclic Aromatic Compounds* 35(2–4): 187–247.
- Wu, Shlan chee, and Philip M. Gschwend. 1986. 'Sorption Kinetics of Hydrophobic Organic Compounds to Natural Sediments and Soils'. *Environmental Science and Technology* 20(7): 717–25.
- Yang, Han et al. 2019. 'Phenanthrene, but Not Its Isomer Anthracene, Effectively Activates Both Human and Mouse Nuclear Receptor Constitutive Androstane Receptor (CAR) and Induces

Hepatotoxicity in Mice'. *Toxicology and Applied Pharmacology* 378(June): 114618.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114618>.

ZHANG, Xu Xiang, Shu Pei CHENG, Cheng Jun ZHU, and Shi Lei SUN. 2006. 'Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors' 1 1 Project Supported by the National High Technology Research and Development Program (863 Program) of China (No. 2001AA214191).' *Pedosphere* 16(5): 555–65.

Zhu T, Sun R, Zhang L and Jiang L. 1998. 'Study on Identifying the Distribution and Pollution Sources of PAHs in Airborne Particulates in Dagang, Tianjin China'. *China Environmental Science*: 289–292.

Zucchi, M. et al. 2003. 'Response of Bacterial Community during Bioremediation of an Oil-Polluted Soil'. *Journal of Applied Microbiology* 94(2): 248–57.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó el C. **MENDEZ DOMINGUEZ KEVIN YAIR** con número de matrícula **10002826** cuyo título es:

**“Caracterización de una colección de levaduras extremófilas para la degradación de compuestos xenobióticos en condiciones de extremofilia”**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 18 de agosto del 2022

Atentamente  
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

|   |                      |
|---|----------------------|
| <b>DRA. MARÍA DEL RAYO SÁNCHEZ CARBENTE</b> | <b>(PRESIDENTE).</b> |
| <b>DRA. SONIA DÁVILA RAMOS</b>              | <b>(SECRETARIO).</b> |
| <b>DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA</b>     | <b>(VOCAL).</b>      |
| <b>DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO</b>    | <b>(SUPLENTE).</b>   |
| <b>DRA. HORTENCIA SILVA JIMÉNEZ</b>         | <b>(SUPLENTE).</b>   |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO | Fecha:2022-08-18 08:17:00 | Firmante**

ed7vSDhaw/VJgLGPrYoc4ovCMuGQW3fyDpbWwE3fgDIONyHwG41C59UsN9TB43pG9kQeVm/SjaBeD/6VLdNtiNT7RofmWjbrWi0SHM20GA5vybXGwyYYu5UkkkN32omL6Q1+kzSGb+d6pgZ1y30yP8MMBvGw480VVvIXS0116oE6wRnYpvtLir/VWZ9D5kKa71nflXQY4CsET1cml/bQoVGe9pAhD61pf1JyByZ0FDNDV5uR7UWb38c4EaHo2CLjgVwqCqJcv9daY6ttQOFAfBd1VNx996K4Fs1ajlyvJXzgdhn2z2d92wJOe2xMIFXaQBKomRrTwSBcTqZQvG67LA==

**SONIA DAVILA RAMOS | Fecha:2022-08-18 10:14:26 | Firmante**

mj1UmkJrpA2PcVLA2+HiP/aq+jadvW9o/TPLvQcHogllily0MbiAeWpDKwVQXws0EVz2ZDQk/4sz4viQPktXG0JN6V5eR4LTSOsR5MhdDZo0/v19WR11fP//+xxdjXUkpZO7q2s3AEGuGaqKj4PuHVz30QtZIGJYrcruQxqlRzJDRy4df5gbJR432KuzFynKPbewYqCYb9iCQ+n30CYQWAWZmOzT/bdmw5/dlShCicQB9MMtr/HpHEUcVxpZKpeJdpM/dMDExNzHZihLFvc4ziYF7BjygoDqEnAV5+FPWcNKxOJVEd/Ayw4agG99y+fiUJwn6RDeola+NTkw/sdJTQ==

**MARIA DEL RAYO SANCHEZ CARBENTE | Fecha:2022-08-18 18:20:24 | Firmante**

als76wNdwFvbrkXlqvaGv9S8j42NueHBzBV2r/XbkX0c3oj8RX3iHRmlu+aVsGDQhDeCDfPFguocyup7tsaJInfbwroLeO/sAKaawnihopeV1dNqqrw/1C97ZsMND04CZGVfnF7d5i3C+OX/SLJ+GjYFmxGlo3SgimQsrBzF5n6lT0VUtzg7X2CfG87v6dtJhF50mmrh8q6DC7Cjc4uPRUN7+vwjQ+Bn+dE9QolQKHfFax6YdUzhreQYf0mttMitrPNqvbvPvCtiU6R/zq+r4DQyxQsIMOKk1b1gzc/w5HnTaMMeLUTM6hYsMiSiKqzCscDeDbNla3fEK0dMEwk6g==

**RAMON ALBERTO BATISTA GARCIA | Fecha:2022-08-19 13:07:23 | Firmante**

NolmV5HruqMhGL1d1o8fo5/ZWTBK7csHHUpNByxOK4CCTAJVshp+3rJeO3MVIKRBd528Fv4nhqs6OOnPtcnfPZ2wvmJULRHfsgBHPZruOVGXQQuov63J96FDhBksOyytvomQgOQJnAGkgD7mOjVLDsXu9fqj5t+fwd5YU4Mmir8TcRvuWcuYucAVdml2JON7HGELAcH8OCfQDuBLHrJCBGfnIV7X/fZ8+XS3/zvo46yQSVpeZl2x9MphLTmsGQHj9kb9y77WxcAV9W2m7v+b22mlb3vA60ifJU7L9mZHhoEE8hB5xdwBBOIYI2tpUDU38exW5f8Y/HHHuXraBg==

**HORTENCIA SILVA JIMÉNEZ | Fecha:2022-08-26 11:25:01 | Firmante**

TalX9QkuopA0eHbVQZSfAZdp5FJkwofv3ANUnmCbBaygVEMsHRQc5oXUfrBduX1kqAdPDVmAi+M8rND6rBDN/Gj2eLZ+O31iFbed+hpedh+eNlgTAWVXjmEYfl33pyWh+Mo5k7p4GzIU7cRAvXzNXuEnyZufeXc+vyeauOYXFpAx8/ocBBIf/Reh6Oy3quVQGiyL3udXpG7SrhkhKRt/43e3Fgb+KHctpA9x8K28ijCYUv3A71legLoQ4ZqFwN5QAKiDj9ecHWu/wRd4LcCCd9oWs0x4W14m+WCOiWnRijDzw54BMDkksUdrjVvX2gLTlqHag52QlWWCWDwiaOoeKA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



vSsLIFhgc

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zvAdZ453otEflM9UDY3HGEXIMGKtuc>

