



## *Saccharomyces exiguus* utiliza queroseno como fuente de carbono y energía

### *Saccharomyces exiguus* uses kerosene as a source of carbon and energy

Romo-Enríquez Norma Patricia<sup>1</sup>, Ignacio de la Cruz Juan Luis<sup>2</sup> , Villegas-Moreno Javier<sup>2</sup>,  
Sánchez-Yáñez Juan Manuel<sup>2\*</sup> 



#### Datos del Artículo

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Microbiología Industrial y Suelo.  
Av. Pedro de Alba s/n cruz con Ave. Manuel L. Barragán, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

<sup>2</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.  
Laboratorio de Microbiología Ambiental.  
Morelia, Michoacán, México.

\*Dirección de contacto:  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.  
Laboratorio de Microbiología Ambiental.  
Av. Francisco J Mujica S/N.  
Col Felicitas del Río, CP 58.000 Morelia.  
Michoacán, México.  
Tel: +0052, 443322 Ext 4240.

Juan Manuel Sánchez-Yáñez  
E-mail address: [syanez@umich.mx](mailto:syanez@umich.mx)

#### Palabras clave:

Suelo,  
mezcla de hidrocarburos,  
biodegradación,  
hongos no filamentosos,  
 $\beta$  oxidación.

*J. Selva Andina Res. Soc.*  
**2022; 13(1):23-34.**

ID del artículo: 157/JSARS/2021

#### Historial del artículo.

Recibido julio 2021.  
Devuelto octubre 2021.  
Aceptado diciembre 2021.  
Disponible en línea, febrero 2022.

**Editado por:**  
**Selva Andina  
Research Society**

#### Keywords:

Soil,  
hydrocarbon mixtures,  
biodegradation,  
non-filamentous fungi,  
 $\beta$  oxidation.

#### Resumen

El queroseno es un combustible derivado del petróleo, una mezcla hidrocarburos alifáticos y aromáticos, que eventualmente causan contaminación ambiental. En la naturaleza existen géneros y especies de microorganismos heterotróficos aerobios, nativos de todo ambiente, que tienen la capacidad potencial para degradar queroseno como algunos géneros y especies de levadura, para sintetizar proteína de origen unicelular o bien para bioaumentación del impacto negativo ambiental del queroseno, por lo anterior. El objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad de *Saccharomyces exiguus* para utilizar queroseno como fuente de carbono y energía. Para ello, *S. exiguus* se aisló de pozos petroleros, se creció en queroseno al 5 % con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 1.2 % y 50 ppm de extracto de levadura. El crecimiento de *S. exiguus* en queroseno se analizó mediante las variables respuesta: peso seco, cuantificación de proteínas y por cromatografía de gases se demostró la utilización de los componentes del queroseno como fuente de carbono y energía. Los resultados mostraron que *S. exiguus* puede de utilizar los hidrocarburos alifáticos y aromáticos del queroseno como única fuente de carbono y energía, este potencial es aplicable para sintetizar proteína unicelular o en la recuperación de ambientes impactados por queroseno.

2022. *Journal of the Selva Andina Research Society*<sup>®</sup>. Bolivia. Todos los derechos reservados.

#### Abstract

Kerosene is a fuel derived from petroleum, a mixture of aliphatic and aromatic hydrocarbons, which eventually cause environmental pollution. In nature, there are genera and species of aerobic heterotrophic microorganisms, native to all environments, that have the potential capacity to degrade kerosene, such as some genera and species of yeast, to synthesize protein of unicellular origin or to bioaugment the negative environmental impact of kerosene. For the above. The objective of this work was to analyze the ability of *Saccharomyces exiguus* to use kerosene as a carbon and energy source. For this, *S. exiguus* was isolated from oil wells, it was grown in 5% kerosene with 1.2%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 50 ppm yeast extract. The growth of *S. exiguus* in kerosene was analyzed using the response variables: dry weight, protein quantification, and gas chromatography showed the use of kerosene components as a carbon and energy source. The results showed that *S. exiguus* can use the aliphatic and aromatic hydrocarbons of kerosene as the only source of carbon and energy, this potential is applicable to synthesize unicellular protein or in the recovery of environments impacted by kerosene.

2022. *Journal of the Selva Andina Research Society*<sup>®</sup>. Bolivia. All rights reserved.



## Introducción

En México y el mundo, el queroseno, es un derivado del petróleo, una mezcla insoluble de hidrocarburos alifáticos y aromáticos tóxicos ambientales<sup>1</sup>, como el benceno, n-hexano, tolueno, xileno, al igual que otros aromáticos policíclicos como el naftaleno y n-propil-benceno, susceptibles al ataque microbiano de acuerdo con el tipo de metabolismo que poseen, así como de las condiciones ambientales que existen en la naturaleza o en el laboratorio<sup>1-3</sup>. Cuando el queroseno impacta ambientes naturales como el suelo, induce la selección de una amplia diversidad de microorganismos, que pueden ser procariontes con géneros y especies de bacterias comunes en ese ambiente. Además de los eucariotas heterotróficos, aerobios como los hongos filamentosos y algunos géneros de levaduras que tienen la capacidad de biodegradar el queroseno al utilizarlo como única fuente de carbono y energía<sup>4-6</sup>. Según Prince et al.<sup>7</sup> se conocen más de 150 géneros y especies de bacterias que degradan queroseno del tipo: *Rhodococcus aetherivorans* y *R. wratislaviensis*<sup>8</sup>, *Streptomyces* spp.<sup>9</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>10,11</sup>, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Achromobacter*, *Mycobacterium* y *Bacillus* spp.<sup>12-14</sup>. En contraste, una menor diversidad de hongos filamentosos que se han reportado<sup>15,16</sup> cuyos ejemplos más representativos son: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp, y *Trichoderma asperellum* que biodegradan hidrocarburos aromáticos<sup>17-19</sup>. Mientras que existe interesante información relacionada con géneros y especies de levaduras del ambiente que han sido menos investigadas para la eliminación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos cuando los utilizan como única fuente de carbono y energía<sup>20,21</sup>. Así como para la síntesis de proteína de origen unicelular como alimento para humanos y animales<sup>22,23</sup>. Un ejemplo, en la naturaleza es el género *Candida*<sup>24,25</sup> en la naturaleza, al igual que

*Cryptococcus*, *Pichia*, *Yarrowia*<sup>26-28</sup> así como: *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Wickerhamia* y *Rhodosporidium*<sup>6</sup>. Por lo anterior existe la evidencia de que el género de levadura *Saccharomyces* tiene potencial para explotarse en la síntesis de proteína de origen unicelular para la elaboración de alimento de excelente calidad nutricional de bajo costo<sup>22</sup>. Así como para la recuperación de ambientes impactados por mezclas de hidrocarburos, como el queroseno mediante bioaumentación proceso en el cual *Saccharomyces* sería fundamental para lograrlo<sup>27</sup>. Al respecto se ha reportado que especies de *Saccharomyces* tienen la capacidad bioquímica para la utilización de fracciones hidrocarburos de 12 a 16 carbonos análogos al queroseno para mineralizarlos hasta CO<sub>2</sub> y agua<sup>28</sup>. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad de *Saccharomyces exiguus* para usar queroseno como única fuente de carbono y energía.

## Materiales y métodos

*Origen de Saccharomyces exiguus*. En esta investigación partió de la premisa de que *S. exiguus* al igual que otros géneros y especies de levaduras son parte de la microbiota que existe en el suelo de pozos petroleros de PEMEX en Altamira, Tamaulipas, México, y del mundo<sup>26</sup>. El suelo contaminado por derivados del petróleo se analizó en el Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas (FCB), Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) y de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Para ello 1.0 g de suelo se sembró en 50 mL de un medio mineral con la siguiente composición química (g·L<sup>-1</sup>): queroseno

al 5 % (v/v) esterilizado por filtración con una membrana Millipore 0.2  $\mu\text{m}$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2.0,  $\text{NaCl}$  4.0,  $\text{MgSO}_4$  0.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0, a pH ajustado a 5.5, que se incubó a 30 °C/15 días en agitación a 200 rpm, al aparecer la turbidez se sembró en agar queroseno al 5 % que se incubó a 30 °C/15 días con el crecimiento de colonias de *S. exiguus*, que se resembraron en agar Sabouraud (AS) con la siguiente composición química ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ): polipeptona 10.0, glucosa 40.0, agar 18.0, un pH ajustado a 5.6 que se incubó a 30 °C/40 h, entonces estas colonias se suspendieron en solución salina ( $\text{NaCl}$  0.85 %) mezclado con el detergente La Corona<sup>MR</sup> 0.01 % (SSD): la levadura se agitó a 200 ppm/2 h, después se centrifugó, se suspendió en SSD al 0.85 % e inocularon en matraces nefelométricos: en donde como control absoluto (CA) se empleó un matraz solo con SSD al 0.85 % ajustado a 0 en una absorbancia de 440 unidades Klett (UK) en un fotocolorímetro Klett Sumerson con filtro rojo (650 nm): de la suspensión de *S. exiguus* se tomaron 5 mL e inocularon en 50 mL queroseno líquido mineral 5 %, con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 1.2 % y 50 ppm de extracto de levadura a pH de 5.5<sup>6</sup>.

#### *Cinética de crecimiento de S. exiguus en queroseno.*

La levadura *S. exiguus* se reprodujo en queroseno al 5 % con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 1.2 % y líquido de remojo de maíz (LRM) al 0.025 % (producto de Maíz, Guadalajara, Jal. México), o bien con extracto de malta 50 ppm (Merck), y/o extracto de levadura 50 ppm (Merck). Entonces *S. exiguus* se incubó a 30 °C/4 días/200 rpm por triplicado. En esta fase se emplearon diferentes variables para medir el crecimiento de *S. exiguus* en queroseno: i) densidad óptica en un fotocolorímetro Klett Sumerson a 650 nm cada 24 h, como blanco queroseno mineral al 5 % sin *S. exiguus*, ii) peso seco con membrana Millipore de 0.2  $\mu\text{m}$  y 13 mm de diámetro (Millipore Corporation, USA), que se tararon en un horno a 110 °C, para filtrar 0.4 mL de la suspensión celular de *S. exiguus*, nuevamente se tararon,

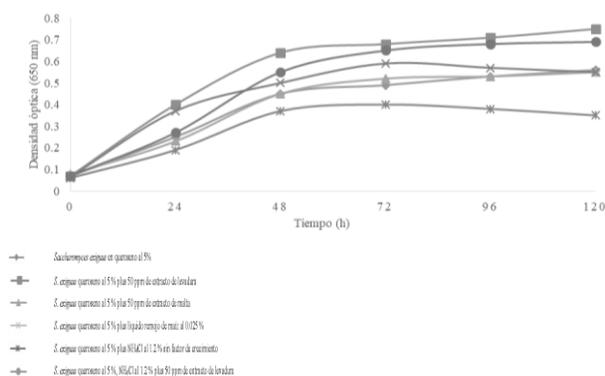
la diferencia en el peso de la membrana con células y peso de la membrana sin células se expresó en g/L para graficar en gramos (g) de *S. exiguus* en relación al tiempo, iii) concentración de proteína: por el método de Lowry como medición indirecta del crecimiento de *S. exiguus* con el reactivo Folin-Ciocalteu, para ello se tomaron 0.4 mL de sobrenadante del queroseno al 5 % líquido mineral a intervalos por 24 h, se centrifugó a 2500 rpm/15 min, se midió en un espectrofotómetro Modelo/620 Coleman Junior II (Beckman Instruments, Inc.). Los datos experimentales se validaron con el programa estadístico ANOVA/Tukey HSD  $P < 0.05$  % con Statgraphics Centurion<sup>29</sup>, iv) la identificación de *S. exiguus* y otras análogas de géneros fue de acuerdo al manual de Lodder<sup>30</sup> y de Phaff et al.<sup>31</sup>, basados en las características morfológicas y fisiológicas indicadas en la Tabla 2 con el empleo de los siguientes medios de cultivo, agar extracto de malta (AEM) (g/L): extracto de malta 3.0, extracto de levadura 3.0, peptona 5.0, glucosa 10.0, agar 18.0, a pH 5.0, caldo malta levadura (CML) (g/L): extracto de malta 3.0, extracto de levadura 3.0, peptona 5.0, glucosa 10.0 y pH a 5.0, caldo Gorodkova (g/L): glucosa 2.5,  $\text{NaCl}$  5.0, extracto de carne 10.0 y pH de 6.5, agar acetato de Fowell (g/L): acetato de sodio 0.5, agar 2.0 a pH 6.5, etanol de Starkey modificado (g/L): etanol 0.05,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.025,  $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  0.025 a pH 6.5, Wickerham\* (g/L): extracto de levadura 4.5, peptona 7.5 y pH a 6.5, y Wickerham\*\* (g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15,  $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{NaCl}$  0.1,  $\text{CaCl}_2$  0.1, dextrosa 10.0,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 y pH de 6.5 como referencia de identificación de las levaduras aisladas se usaron cepas de levaduras obtenidas comercialmente<sup>32</sup>.

*Análisis cromatográfico del crecimiento de S. exiguus en queroseno.* El queroseno remanente que *S. exiguus* no utilizó como fuente de carbono y energía, se separó del medio mineral por centrifugación, el

cual se analizó en un cromatógrafo de gases Beckman GC 72-5. Para demostrar y cuantificar los hidrocarburos alifáticos y aromáticos del queroseno que fueron consumidos por *S. exiguus*. Para ello se utilizó una mezcla de estándares: C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub> (Varían) se analizaron por la elución de los picos de la cromatografía de gases antes y después del crecimiento de *S. exiguus* en el queroseno<sup>33</sup>.

## Resultados

**Figura 1 Medición indirecta de la capacidad de *S. exiguus* para utilizar el queroseno al 5 %, como fuente de carbono y energía NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % con diversos estimuladores o factores de crecimiento**

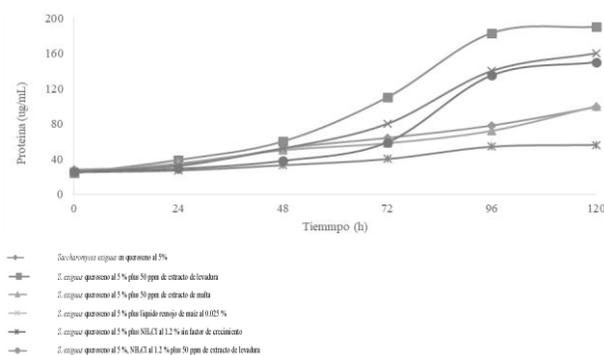


En la Figura 1, se observa el crecimiento de *S. exiguus* en queroseno al 5 % como única fuente de carbono y energía enriquecido con 50 ppm de extracto de levadura: en la que se indica que la fase de adaptación inició antes de las 8 h, mientras que la logarítmica comenzó las primeras 12 h para concluir a las 48 h, de ahí la estacionaria hasta las 120 h. Análogo cuando *S. exiguus* creció en el queroseno al 5 % con el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % como fuente mineral de nitrógeno, enriquecido con 50 ppm de extracto de levadura.

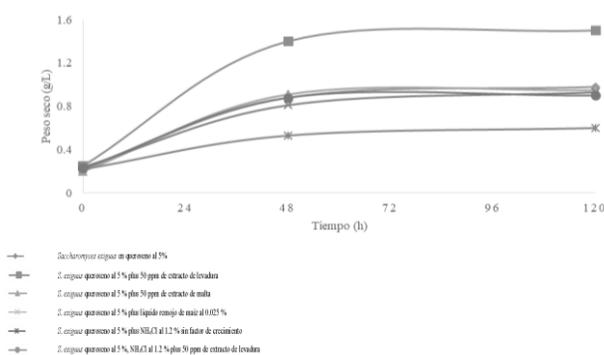
En la Figura 2, se muestra el crecimiento de *S. exiguus* en queroseno al 5 %, sin el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, enriquecido con 50 ppm de extracto de levadura, ahí se registró la mayor cantidad de proteína celular de 39 µg/mL en las primeras 24 h, con un incremento de

hasta 190 µg/mL a las 120 h. Mientras que cuando *S. exiguus* se le dio como fuente de nitrógeno mineral en la forma de NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, que enriquecido con 50 ppm de extracto de levadura se registraron 36 µg/mL de proteína en las 24 h y 153 µg/mL a las 120 h evidencia indirecta de que *S. exiguus* utilizó el queroseno como fuente de carbono y energía.

**Figura 2 Concentración de proteína de *S. exiguus* cuando utilizo del queroseno al 5 %, como fuente de carbono y energía NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % con diferentes factores o estimuladores de crecimiento**



**Figura 3 Peso seco de *S. exiguus* al utilizar el queroseno al 5 %, como fuente de carbono y energía con el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % y diversos factores o estimuladores de crecimiento**



En la Figura 3, se muestra la medición indirecta del crecimiento mediante el peso seco de *S. exiguus* en queroseno al 5 % cuando lo utilizo como fuente de carbono y energía, sin el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % pero enriquecido con 50 ppm de extracto de levadura, ahí se

registraron 1.35 g/L en las primeras 48 h con un aumento de hasta 1.45 g/L a las 120 h, lo que indica que el extracto de levadura también es una fuente de nitrógeno orgánico, limitada en disponibilidad para *S.*

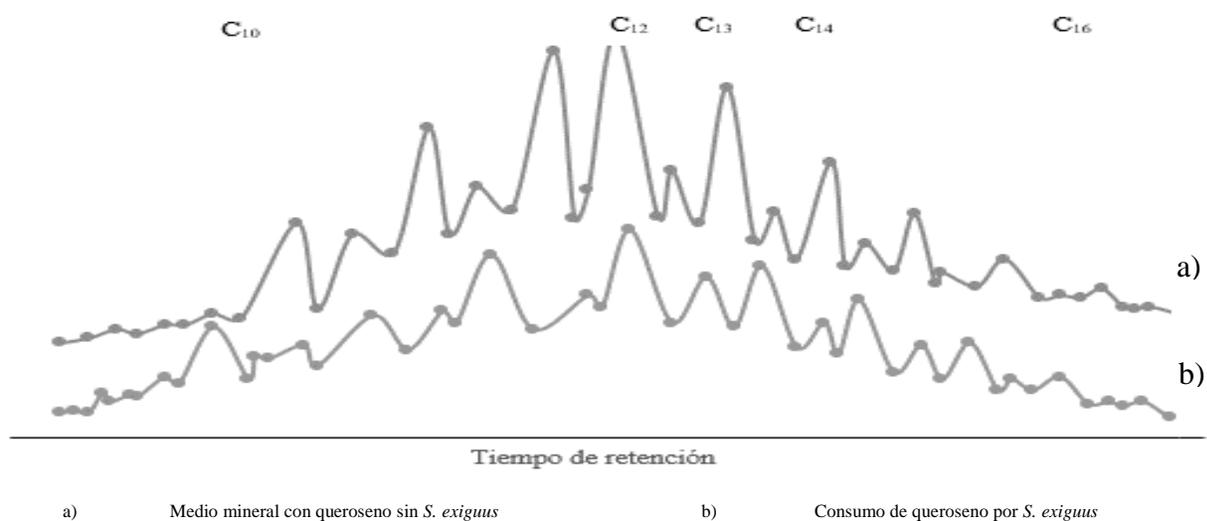
*exiguus*, por la baja concentración que se agregó al medio mineral.

**Tabla 1 Crecimiento de *S. exiguus* al utilizar queroseno al 5%, como fuente de carbono y energía NH<sub>4</sub>Cl con y sin factor o estimulador de crecimiento**

<i>Saccharomyces exiguus</i> en queroseno al 5%.	X (g/L)	$\mu_{exp}$ (h <sup>-1</sup> )	t.d (h)	pH final
NH <sub>4</sub> Cl al 1.2 % sin factor de crecimiento	0.73 <sup>c**</sup>	0.049 <sup>b</sup>	14 <sup>c</sup>	4.3 <sup>a</sup>
NH <sub>4</sub> Cl al 1.2 % + extracto de levadura 50 ppm	1.15 <sup>a</sup>	0.081 <sup>a</sup>	8.5 <sup>d</sup>	3.5 <sup>b</sup>
NH <sub>4</sub> Cl al 1.2 % + extracto de malta 50 ppm	0.87 <sup>b</sup>	0.047 <sup>b</sup>	14.5 <sup>c</sup>	4.0 <sup>a</sup>
NH <sub>4</sub> Cl al 1.2 % + líquido de remojo de maíz al 0.025 %	0.72 <sup>c</sup>	0.031 <sup>c</sup>	22.0 <sup>b</sup>	3.8 <sup>a</sup>
Sin NH <sub>4</sub> Cl al 1.2 %, ni factor de crecimiento	0.28 <sup>c</sup>	0.022 <sup>d</sup>	30 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>
Sin NH <sub>4</sub> Cl al 1.2 % con extracto de levadura 50 ppm	0.63 <sup>d</sup>	0.038 <sup>c</sup>	18 <sup>c</sup>	3.5 <sup>b</sup>

Condiciones: Inoculo 10 % (v/v), agitación 200 rpm, 30 °C, pH inicial 5.5, X = rendimiento celular,  $\mu_{exp}$  = velocidad de crecimiento, t.d. = tiempo de duplicación, \*n= 3. \*\*valores con diferente letra indican diferencia estadística según ANOVA/Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

**Figura 4 Análisis de la utilización por *S. exiguus* de los hidrocarburos del queroseno al 5 %, como fuente de carbono y energía, el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % y el extracto de levadura a 30°C/200 rpm**



En la Tabla 1, se muestra el crecimiento de *S. exiguus* en queroseno al 5 % cuando lo utilizo como fuente de carbono y energía con el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, enriquecido con el extracto de levadura, donde se registró el mayor rendimiento o producción celular de hasta 1.15 g/L con una máxima velocidad de crecimiento de 0.081 h<sup>-1</sup>, con un menor tiempo de duplicación de 8.5 h, que causo una disminución de pH hasta 3.5. Lo anterior que mostro que la composición química del medio mineral con el queroseno al 5 %, el NH<sub>4</sub>Cl, el

extracto de levadura como factor de crecimiento fueron la mejor condición nutricional para la biodegradación del queroseno.

En la Figura 4, se describe el perfil cromatográfico del queroseno al 5 % sin inocular con *S. exiguus* usado como control absoluto, donde se registró el mayor número de picos de elución que indican los hidrocarburos alifáticos del tipo iso-alcenos, según el tiempo de retención similares a los n-alcenos de los estándares empleados como referencia<sup>34,35</sup>.

**Tabla 2 Características morfológicas y bioquímicas de los géneros de las levaduras que utilizan el queroseno como fuente de carbono y energía**

Características morfológicas y fisiológicas	<i>Aureobasidium</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp.	<i>S. exiguus</i>
Tipo de gemación	Polar	Multilateral	Multilateral
Crecimiento en agar extracto de malta-extracto de levadura (AEML)	Abundante	Abundante	Abundante
Formación de ascas	-	-	1 a 4 por asca
Fermentación de glucosa	+	-	-
Asimilación de NO <sub>3</sub> (nitratos)	-	-	-
Síntesis de pigmentos	Verde oliváceo a negro	Naranja	-
Formación de película y/o pellet	+*	+	-

Ausencia de crecimiento (-), crecimiento (+), \*produce una película o pellet.

En la Tabla 2, se muestran las características morfológicas y fisiológicas de los géneros y especies de levaduras aisladas de diferentes pozos petroleros de PEMEX de la ciudad Altamira, Tam., México, que utilizan el queroseno como única fuente de carbono y energía. Las que de acuerdo con las características morfológicas y fisiológicas de los géneros levaduras en los medios de cultivo empleados para la identificación como: AS, caldo malta levadura (CML), Gorodkova, agar acetato de Fowell, Starkey's etanol, Wickerham y las descritas en el Manual de Lodder<sup>30</sup> y de Phaff et al.<sup>31</sup>, en relación al género *Aureobasidium*, con células ovales de gemación polar, sin ascosporas, con micelio septado, blastosporas y clamidiosporas, que forma un tipo de pellet en cultivos líquidos, no fermentó la glucosa, aunque en anaerobiosis redujo los NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

## Discusión

La Figura 1 muestra que *S. exiguus* creció sin problemas a pesar de que la concentración del queroseno fue de un 5 %, sin el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, pero enriquecido con el extracto de levadura que contiene vitaminas del complejo B, en concentración suficiente para que *S. exiguus* haya utilizado los hidrocarburos alifáticos y aromáticos del queroseno como única fuente de carbono y energía por la vía aerobia, dependiente del O<sub>2</sub>, con las enzimas de la cadena respiratoria que

son dependientes de la concentración de vitaminas del complejo B del extracto de levadura<sup>32,36,37</sup>. Al respecto se reporta que diferentes géneros y especies de levaduras. *Candida albicans* tienen la capacidad de metabolizar hidrocarburos aromáticos policíclicos similares a los del queroseno. En tanto que *S. exiguus* tuvo un pobre crecimiento en queroseno al 5 % con el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % como fuente de mineral de nitrógeno, en ausencia de las vitaminas del complejo B, factor de crecimiento, en forma del extracto de levadura, que le impidió a *S. exiguus* activar las enzimas para metabolizar los hidrocarburos alifáticos del queroseno<sup>33</sup>. La Figura 2 muestra el aumento en la concentración de proteína de *S. exiguus* cuando utiliza el queroseno al 5 % como única fuente de carbono y energía en el medio de cultivo, favorecido con la fuente inorgánica de nitrógeno como el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, y enriquecido con el extracto de levadura con las vitaminas del complejo B, activaron las enzimas necesarias para la oxidación de los hidrocarburos alifáticos del queroseno por *S. exiguus* por la vía de beta oxidación ruta de bioquímica de degradación para el queroseno<sup>23,34</sup>. En contraste con el crecimiento de *S. exiguus* en el queroseno al 5 % con el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, sin el factor de crecimiento, ahí se registró una concentración de proteína con valores que fluctuaron entre 25-56 µg/mL al final de la fase estacionaria a las 120 h, lo que indica que la ausencia del extracto

de levadura ralentizo e inhibió capacidad de *S. exiguus* para utilizar los hidrocarburos alifáticos del queroseno como fuente de carbono y energía<sup>33,37</sup>. En la Figura 3 se muestra el peso seco de *S. exiguus* cuando utilizo los hidrocarburos alifáticos y aromáticos del queroseno como única fuente de carbono y energía, donde el extracto de levadura que agregó como factor de crecimiento enriqueció el medio de cultivo mineral con vitaminas del complejo B, que activo las enzimas que se requieren para la oxidación de los hidrocarburos del queroseno, detectado por el aumento en la síntesis de proteína unicelular de *S. exiguus* como medida indirecta de la utilización del queroseno como fuente de carbono y energía. En tanto cuando *S. exiguus* creció en el queroseno al 5 %, pero ahora enriquecido con el extracto de malta, o bien con el LRM, como inductores de factores de crecimiento, se registró un peso de 0.8 g/L a las 24 h, lo que indica que la composición química del extracto de malta o el LRM no contenían los inductores de enzimas, necesarias para que *S. exiguus* pudiese utilizar los hidrocarburos de alifáticos del queroseno como única fuente de carbono y energía, en consecuencia hubo una evidente inhibición del crecimiento de *S. exiguus*, pues el peso seco detectado al final fue similar al registrado en el queroseno al 5 % usado como CA sin inocular con *S. exiguus*<sup>23,35,38</sup>. En la Tabla 1, se muestra la crecimiento de *S. exiguus* en queroseno al 5 %, al usarlo como única fuente de carbono y energía, en donde se demostró que requiere de NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 %, para la síntesis de proteína y de los ácidos nucleicos, mientras que el extracto de levadura proporcionó las vitaminas del complejo B, para la activación de enzimas asociadas con la biodegradación hidrocarburos alifáticos como aromáticos del queroseno<sup>26,39,40</sup>. Los valores numéricos del crecimiento o rendimiento de *S. exiguus* en el queroseno cuando lo metabolizo como única fuente de carbono

y energía, con el NH<sub>4</sub>Cl al 1.2 % plus el extracto de levadura como factor del crecimiento, fueron estadísticamente diferentes comparados con los valores del rendimiento o crecimiento celular de 0.73 g/L, que alcanzó la máxima velocidad de crecimiento con 0.049 h<sup>-1</sup>, en contraste con el prolongado de 14 h del tiempo de duplicación de *S. exiguus* en queroseno al 5 % como fuente de carbono y energía sin NH<sub>4</sub>Cl ni ningún factor de crecimiento, que se usó como CA. Lo anterior demostró la utilización del queroseno como único fuente de carbono y energía por *S. exiguus* con el NH<sub>4</sub>Cl como fuente de nitrógeno mineral, y que fue estimulado con el extracto de levadura, una fuente de vitaminas del complejo B, que facilitaron la reproducción de *S. exiguus*, medido indirectamente por la síntesis de proteína, o bien para el biotratamiento de ambientes impactados por queroseno conocida como bioaumentación una técnica de eliminación biológica dirigida de algún tipo de contaminante (s), mediante un microorganismo específico como *S. exiguus*, que en ambientes impactados por queroseno podría eliminarlo<sup>33,34</sup>. Además, se observó el crecimiento de *Aureobasidium* sp. y *Rhodotorula* sp. en queroseno como única fuente de carbono y energía, pero sin la capacidad para consumirlo tan eficazmente como lo hace *S. exiguus*<sup>23-25</sup>.

La Figura 4 muestra el cromatograma que demuestra que cuando *S. exiguus* utilizo el queroseno al 5 % como fuente de carbono orgánico y energía se probó que tiene la capacidad de oxidar los hidrocarburos alifáticos de esta mezcla que contiene compuestos de entre 12 a 16 carbonos, basado en la desaparición de los picos de elución, de esos hidrocarburos<sup>33-35,38</sup>. Al respecto Okpokwasili & Amanchukwu<sup>39</sup>, reportaron que el género *Candida* posee los genes para utilizar mezclas de hidrocarburos similares al que existen en el queroseno<sup>40,41</sup> por lo que estos géneros y especies de levaduras son una opción biológica adecuada

para: i) la síntesis de proteína unicelular de alto valor nutricional y/o ii) la bioaumentación o eliminación “ex situ” de ambientes impactados por queroseno<sup>42</sup>. Mientras que Zinjarde & Pant<sup>43</sup> reportaron la efectividad de las especies de *Candida* para biodegradarlo como: *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* al igual que *Yarrowia lipolytica* que mostró la mayor capacidad para eliminar la fracción alifática del queroseno hasta en un 78 %.

En la Tabla 2 se presentan las principales características morfológicas y bioquímicas de los géneros de las levaduras que usan los hidrocarburos del queroseno como fuente de carbono y energía, que se observaron en los cultivos jóvenes de levaduras de 24 h que tuvieron colonias brillantes convexas, con pigmentos oliváceos. Al microscopio se observaron células que se dividen por gemación polar, en cultivos de 3-4 días las colonias se oscurecieron al formar un micelio en la periferia<sup>44</sup>. El género *Rhodotorula* se aisló del suelo impactado por queroseno de Altamira, Tam, al microscopio se observaron células ovales con gemación multilateral, sin micelio o pseudomicelio, en caldo no generó ninguna película, en medio de cultivo sólido se observaron colonias cónicas, con un pigmento intracelular blanco de consistencia cremosa, de forma convexa. *Rhodotorula* no fermentó la glucosa, aunque asimiló los  $\text{NO}_3^-$ <sup>45</sup>, mientras que el género *Saccharomyces* especie *exiguus* mostró al microscopio células ovales con gemación multilateral, de 1 a 4 ascosporas, en medio de cultivo líquido no generó ninguna película en la superficie, no asimiló los  $\text{NO}_3^-$ , pero sí fermentó la glucosa y la galactosa<sup>44,45</sup>.

Se concluye en esta investigación que *S. exiguus* es capaz de usar como fuente de carbono y energía hasta el 51 % de los hidrocarburos alifáticos del queroseno. Por lo anterior es posible reproducirla como una forma de proteína de origen unicelular (single cell

protein) y eliminador de hidrocarburos del queroseno por bioaumentación para la recuperación de aguas y suelo impactados por derivados del petróleo similares o diferentes al queroseno.

### Fuente de financiamiento

Proyecto 2.7 (2022) de la CIC-UMSNH, Morelia, Mich, México. Departamento de Investigación de UANL, San Nicolás de los Garza, N.L. México.

### Conflictos de intereses

Los participantes en esta investigación aseguramos que no existe ningún problema de intereses relacionados con la planeación, ejecución y reporte de esta investigación que comprometa el valor de los resultados obtenidos o sus consecuencias en términos científicos, técnicos, o de cualquier otro tipo.

### Agradecimientos

A la Coordinación de la Investigación Científica (CIC), proyecto 2.7 (2021) de la UMSNH, Morelia, Michoacán, México.

### Consideraciones éticas

La aprobación de la investigación por el Comité de Ética, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo - México, siguió las pautas establecidas para este comité.

### Limitaciones en la investigación

Los autores declaran que no hubo limitaciones en la investigación.

## Aporte de los autores en el artículo

Norma Patricia Romo Enríquez, ejecución del trabajo experimental. Juan Luis Ignacio-De la Cruz, revisión de literatura para material métodos y resultados. Javier Villegas-Moreno, discusión de resultados. Juan Manuel Sánchez-Yáñez, planeación y dirección del experimento, análisis estadístico, administrador del fondo investigación, responsable de documento final.

## Literatura citada

1. Bayona JM, Albaigés J, Solanas AM, Pares R, Garrigues P, Ewald M. Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial culture. *Int J Environ Anal Chem* 1986;23(4):289-303. DOI: <https://doi.org/10.1080/03067318608076451>
2. Ritchie G, Still K, Rossi J 3rd, Bekkedal M, Bobb A, Arfsten D. Biological and health effects of exposure to kerosene-based jet fuels and performance additives. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2003;6(4):357-451. DOI: <https://doi.org/10.1080/10937400306473>
3. Dagaut P, Cathonnet M. The ignition, oxidation, and combustion of kerosene: A review of experimental and kinetic modeling. *Prog Energy Combust Sci* 2006;32(1):48-92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2005.10.003>
4. Fan MY, Xie RJ, Qin G. Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with yeast. *Environ Technol* 2014;35(1-4):391-9. DOI: <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.829504>
5. Ghazali FM, Rahman RNZA, Salleh AB, Basri M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int Biodeterior Biodegradation* 2004;54(1):61-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>
6. Goulart GG, Coutinho JOPA, Monteiro AS, Siqueira EP, Santos VL. Isolation and characterization of gasoline-degrading yeasts from refined oil-contaminated residues. *J Bioremed Biodeg* 2014; 5:214. DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-6199100214>
7. Prince RC, Amande TJ, McGenity TJ. Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: McGenity TJ, editor. *Taxonomy, Genomics and Ecophysiology of Hydrocarbon-Degrading Microbes*. Switzerland: Springer Nature; 2019. p. 1-39. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-14796-9_15)
8. Auffret M, Labbé D, Thouand G, Greer CW, Fayolle-Guichard F. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Appl Environ Microbiol* 2009;75(24):7774-82. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01117-09>
9. Saadoun I, Alawawdeh M, Jaradat Z, Ababneh Q. Growth of *Streptomyces* spp. from hydrocarbon-polluted soil on diesel and their analysis for the presence of alkane hydroxylase gene (alkB) by PCR. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24(10): 2191-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9729-z>
10. Emtiazi G, Shakarami H, Nahvi I, Mirdamadian SH. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia coli*. *Afr J Biotechnol* 2005;4(2):172-6.
11. Tang X, Zhu Y, Meng Q. Enhanced crude oil biodegradability of *Pseudomonas aeruginosa* ZJU after preservation in crude oil-containing medium. *World J Microbiol Biotechnol* 2007;23(1):7-14. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9187-4>

12. Johnsen AR, Winding A, Karlson U, Roslev P. Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of (13)C-labeled cell lipids. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(12):6106-13. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6106-6113.2002>
13. Ollivier B, Magot M, Cunningham-Rundles S. *Petroleum microbiology*. Washington, DC: ASM Press. USA; 2005.
14. Kalme S, Parshetti G, Gomare S, Govindwar S. Diesel and kerosene degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. *Curr Microbiol* 2008;56(6):581-6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9128-6>
15. Arriaga S, Revah S. Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnol Bioeng* 2005;90(1):107-15. DOI: <https://doi.org/10.1002/bit.20424>
16. Yemashova NA, Murygina VP, Zhukov DV, Zakharyantz AA, Gladchenko MA, Appanna V, et al. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2007;6(4):315-37. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9118-8>
17. Rivera-Cruz MC, Ferrera. Cerrato R, Volke Haller V, Rodríguez Vázquez R, Fernández Linares L. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoam* 2002;20(4):423-34.
18. Husaini A, Roslan HA, Hii KSY, Ang CH. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24(12):2789-97. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9806-3>
19. Cerniglia CE, Sutherland JB. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. In: Timmis KN, editor. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Heidelberg: Springer Berlin; 2010. p. 2079-110. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_151](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_151)
20. Chrzanowski Ł, Bielicka-Daszkiwicz K, Owsianiak M, Aurich A, Kaczorek E, Olszanowski A. Phenol and n-alkanes (C12 and C16) utilization: influence on yeast cell surface hydrophobicity. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24:1943-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9704-8>
21. Chandran P, Das N. Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. *Biodegradation* 2011;22(6):1181-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9473-1>
22. Ritala A, Häkkinen ST, Toivari M, Wiebe MG. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016. *Front Microbiol* 2017;8:2009. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
23. Ugalde UO, Castrillo JI. Single cell proteins from fungi and yeast. In: Khachatourians GG, Arora DK, editors. *Applied Mycology and Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier BV; 2002. p. 123-49. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1874-5334\(02\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S1874-5334(02)80008-9)
24. Chen K-C, Lin Y-H, Chen W-H, Liu Y-C. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme Microb Technol* 2002;31(4):490-7. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00148-5)
25. Ilori MO, Adebusoye SA, Ojo AC. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing yeast strains obtained from a polluted lagoon water. *World J Microbiol Biotechnol* 2008;24(11):2539-45. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9778-3>

26. Acosta-Rodríguez I, Moctezuma-Zárate MG, To-var-Oviedo J, Cárdenas-González JF. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras resistentes a petróleo. *Inf Tecnol* 2011;22(6):103-10. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600011>
27. Domínguez-Sánchez S, Martínez-Montoya H, Hernández Jiménez MC, Torres-Rodríguez HF, Rodríguez-Castillejos G. The microorganisms as an alternative approach in remediation of hydrocarbon-contaminated. *Mex J Biotechnol* 2018;3(4):70-83. DOI: <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.4.70>
28. Csutak O, Stoica I, Ghindea R, Tanase AM, Vassu T. Insights on yeast bioremediation processes. *Rom Biotechnol Lett* 2010;15(2):5066-71.
29. Walpole ER, Myers R, Myers LS. Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias. Ed. Pearson. México. 2007.
30. Lodder J, editor. The yeast a taxonomy. Ámsterdam, Holand: Publishing-Co; 1970.
31. Phaff HJ, Miller MW, Mark EM. The life of yeast. Massachusetts: Harvard University Press; 1978. USA.
32. Boekhout T, Robert V, Smith M, Stalpers J, Yar-row D, Boer P, et al. Yeasts of the world: morphology, physiology, sequences and identification. *Mycologist* 2002;17(2):70-3. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0269915X03242178>
33. Garrett RM, Rothenburger SJ, Prince RC. Biodegradation of fuel oil under laboratory and arctic marine conditions. *Spi Sci Technol Bull* 2003;8(3): 297-302. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00037-9)
34. Bertrand JC, Rambeloarisoa E, Rontani JF, Giusti G, Mattei G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol Lett* 1983;5(1):567-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01184950>
35. Chaillan F, Le Flèche A, Bury E, Phantavong YH, Grimont P, Saliot A, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* 2004;155(7):587-95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.006>
36. Agarry SE, Owabor CN, Yusuf RO. Studies on biodegradation of kerosene in soil under different bioremediation strategies. *Bioremediat J* 2010;14(3):135-41. DOI: <https://doi.org/10.1080/10889868.2010.495364>
37. Itah AY, Brooks AA, Ogar BO, Okure AB. Biodegradation of international jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. *Bull Environ Contam Toxicol* 2009;83(3):318-27. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9770-0>
38. Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 1981;45(1):180-209. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.45.1.180-209.1981>
39. Okpokwasili GC, Amanchukwu SC. Petroleum hydrocarbon degradation by *Candida* species. *Environ Int* 1988;14(3):243-7. DOI: [https://doi.org/10.1016/0160-4120\(88\)90145-6](https://doi.org/10.1016/0160-4120(88)90145-6)
40. Buddie AG, Bridge PD, Kelley J, Ryan MJ. *Candida keroseneae* sp. nov., a novel contaminant of aviation kerosene. *Lett Appl Microbiol* 2011;52(1):70-5. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02968.x>
41. Rodríguez-Rodríguez CE, Rodríguez E, Blanco R, Cordero I, Segura D. Fungal contamination of stored automobile-fuels in a tropical environment. *J Environ Sci* 2010;22(10):1595-601. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60294-1](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60294-1)
42. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol* 2017;223:277-86. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>

43. Zinjarde SS, Pant AA. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Mar Pollut Bull* 2002;44(2):118-21. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(01\)00185-0](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(01)00185-0)
44. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T., editors. *The yeasts: a taxonomic study*. London: Elsevier; 2010.

45. Kurtzman CP, Piškur J. Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. In: Sunnerhagen P, Piskur J, editors. *Comparative Genomics*. Heidelberg: Springer Berlin; 2006. p. 29-46. DOI: <https://doi.org/10.1007/b106654>

**Nota del Editor:**

*Journal of the Selva Andina Research Society (JSARS)* se mantiene neutral con respecto a los reclamos jurisdiccionales publicados en mapas y afiliaciones institucionales.