

Aislamiento e identificación de levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos, presentes en tanques de gasolina de vehículos urbanos

Isolation and identification of aromatic hydrocarbon degrading yeasts present in gasoline tanks of urban vehicles

*Nathalia Catalina Delgadillo-Ordoñez**, *Leonardo Posada-Suárez***, *Elkin Marcelo****,
*Martha Lucia Cepeda-Hernández*****, *Sánchez Nieves, Jimena******

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70278

RESUMEN

Se obtuvieron aislamientos de levaduras a partir de muestreos en tanques de combustible de vehículos urbanos, con el objeto de evaluar su potencial actividad de degradación de hidrocarburos aromáticos derivados del petróleo. Se realizaron ensayos de crecimiento en medio mínimo mineral sólido utilizando distintos hidrocarburos (benceno, tolueno, naftaleno, fenantreno, y pireno). Los aislamientos que presentaron crecimiento notorio en alguno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos fueron identificados mediante secuenciación Sanger de los marcadores moleculares ITS1 e ITS2 del ARNr. Se obtuvieron 16 aislados de levaduras, de las cuales tres presentaron crecimiento conspicuo con hidrocarburos aromáticos como única fuente de carbono. Las cepas identificadas pertenecen al género *Rhodotorula* y corresponden a las especies *Rhodotorula calyptogenae* (99,8% de identidad) y *Rhodotorula dairenensis* (99,8% de identidad). Dichas cepas presentaron crecimiento en benceno, tolueno, naftaleno, fenantreno. En este estudio se reporta por primera vez la presencia de levaduras del género *Rhodotorula* que habitan

* Bióloga. Grupo de Ecología Microbiana. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. ncdelgadillo@unal.edu.co

** Microbiólogo industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Grupo de genética molecular. Corporación CorpoGen. Universidad Javeriana. leonardoposada@gmail.com

*** Tecnólogo en Química Industrial. Corporación Tecnológica de Bogotá. Laboratorista. Laboratorio de Microbiología del Suelo. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. emruiz@unal.edu.co

**** Bióloga Universidad Nacional MSc. Microbiología del suelo. Texas A&M. Grupo de biotecnología molecular. Corporación CorpoGen. martha.cepeda@corpogen.org

***** Bacterióloga. MSc Microbiología. Candidata PhD ciencias agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Profesora asociada. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia sede



los ductos y tanques de gasolina de vehículos urbanos, así como su capacidad para utilizar distintos hidrocarburos aromáticos que son contaminantes para el medio ambiente. Estos resultados sugieren que dichas levaduras constituyen potenciales candidatos para la degradación de éstos compuestos, como parte de estrategias de biorremediación.

Palabras clave: *Rhodotorula*, *Pichia anomala*, naftaleno, fenantreno, pireno, tanques de combustible.

ABSTRACT

Yeast isolates were obtained from fuel tanks of vehicles in order to assess their potential use in the degradation of aromatic hydrocarbons. Growth assays were performed in minimum mineral medium using different aromatic hydrocarbons (benzene, toluene, naphthalene, phenanthrene, and pyrene) as the sole carbon source. Isolates that showed growth in any of the tested polycyclic aromatic hydrocarbons were identified by Sanger sequencing of the ITS1 and ITS2 rDNA molecular markers. A total of 16 yeasts strains were isolated, and three showed remarkable growth in media with aromatic hydrocarbons as the sole carbon source. These strains belong to the genus *Rhodotorula*, and correspond to the species *Rhodotorula calyptogenae* (99,8% identity) and *Rhodotorula dairenensis* (99,8% identity). These strains grew in benzene, toluene, naphthalene, phenanthrene and pyrene. This study demonstrates for the first time that yeasts of the genus *Rhodotorula* inhabit pipelines and fuel tanks of vehicles and that remove aromatic hydrocarbons that are environmental pollutants. Our results suggest that these yeasts are potential candidates for aromatic hydrocarbon degradation as part of bioremediation strategies.

Key words: *Rhodotorula*, *Pichia anomala*, naphthalene, phenanthrene, pyrene, fuel tanks.

Recibido: mayo 18 de 2017

Aprobado: noviembre 27 de 2017

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental por hidrocarburos derivados del petróleo se ha incrementado debido a su uso como combustible para vehículos, petroquímicos, plaguicidas y herbicidas, entre otros, dada la creciente demanda de la población mundial, la industrialización y la urbanización (Daverey & Pakshirajan, 2011). Algunos de estos hidrocarburos resultan ser contaminantes ya que se acumulan en los organismos vivos y pueden tener efectos carcinogénicos, además de permanecer en el agua y el suelo (Maliyekkal *et al.*, 2004), aumentando el riesgo de contaminación ambiental (Goulart *et al.*, 2014). En este sentido, es necesaria la búsqueda de alternativas para degradar estos compuestos mediante el desarrollo de estrategias como la biodegradación microbiana, mediante la cual se aprovecha la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos contaminantes en otros menos tóxicos (Daverey & Pakshirajan, 2011), como dióxido de carbono y agua, a través de procesos de oxidación bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Goulart *et al.*, 2014). En este sentido, se han identificado y caracterizado bacterias, hongos filamentosos y levaduras, para

su uso en ambientes contaminados por hidrocarburos a niveles acuático y terrestre (Priya *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2014; Aydin *et al.*, 2017; Ghazali *et al.*, 2004; dell'Abate *et al.*, 2006). Estos microorganismos tienen la capacidad de transformar mediante complejas estrategias metabólicas sustancias contaminantes como hidrocarburos, cuya presencia, en un ambiente con disponibilidad de agua y minerales, les provee un entorno que permite su desarrollo y crecimiento. Según Prince (2010), más de 150 géneros de bacterias contienen especies capaces de crecer con hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, pero sólo unos pocos hongos y algas han sido estudiados (Markovetz *et al.*, 1968; Walker *et al.*, 1975; Prenafeta-Boldú *et al.*, 2001; Arriaga & Revah, 2005; Yemashova *et al.*, 2007; Cerniglia y Sutherland, 2010). Sin embargo, se ha descubierto que ciertos hongos filamentosos poseen mecanismos para biodegradar estos compuestos, particularmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH por sus siglas en inglés) (Cerniglia & Sutherland, 2010). En cuanto a las levaduras, hay pocos estudios al respecto, por lo cual, existe un interés reciente en profundizar sobre su capacidad para degradar componentes derivados del petróleo (Chen *et al.*, 2002; Awe *et al.*, 2008; Chrzanowski

et al., 2008; Segura et al., 2008). Se ha probado que las levaduras pueden facilitar la degradación de hidrocarburos por parte de otros grupos microbianos, jugando así un rol importante en estos procesos (Hughes & Bridge, 2010), y así mismo, los hongos filamentosos y las levaduras poseen mejor capacidad de degradación en condiciones que favorecen su crecimiento, en comparación con las bacterias (Singh, 2006). Autores como Ahearn et al. (1971), han destacado la importancia de las levaduras en procesos de degradación *in situ* en ambientes marinos, por las ventajas que este grupo posee, tal como una mayor resistencia de las células vegetativas en condiciones de estrés, luz UV y salinidad, pH bajos y menor humedad o actividad de agua (Prenafeta-Boldu et al., 2001). En este sentido, se han caracterizado levaduras cuya capacidad degradadora de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, así como mezclas complejas de éstos como el diesel (Chandran & Das, 2011), llama la atención. Éstas en su mayoría constituyen parte de la microbiota autóctona de ambientes contaminados por crudo u otros hidrocarburos (suelos, tanques de almacenamiento de diésel, cuerpos de agua), donde se han identificado géneros como *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Yarrowia* (Hassanshahian et al., 2012), *Meyerozyma*, *Rhodotorula*, *Wickerhamia* y *Rhodospiridium* (Goulart et al., 2014). Por otra parte, en cuanto a la presencia de microorganismos en tanques de combustible, se han reportado comúnmente casos de contaminación microbiológica en la industria aeronáutica y naval (Swift, 1988; Neihof, 1988; Yemashova et al., 2007). Los tanques resultan ser espacios que propician el crecimiento y reproducción de las células, al proveer una fuente constante de carbono (combustible), así como cierta humedad, lo que permite el desarrollo de biopelículas (Onuorah et al., 2015) que se acumulan en las paredes, fondo y ductos de entrada al tanque (Shennan, 1988). Algunos de los microorganismos más comúnmente encontrados en tanques de combustible de aviones pertenecen a bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, al igual que reductoras de sulfatos. En cuanto a los hongos, comúnmente se reportan a los géneros *Penicilium*, *Cephalosporium* y en particular, *Hormoconis resiniae* y *Aspergillus fumigatus* (Itah et al., 2009). Adicionalmente, a pesar de que en su mayoría los aislamientos corresponden a hongos filamentosos, también se han reportado levaduras como *Candida tropicalis* (Onuorah et al., 2015), *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevi-*

siae (Itah et al., 2009) y *Rhodotorula* sp. (Rauch et al., 2006) entre otros. En tanques de gasolina de vehículos urbanos, los reportes de contaminación microbiana se concentran en el estudio realizado por Isola et al. (2013) en el cual reportan la presencia de hongos del género *Exophiala*, pertenecientes al grupo llamado "Black fungi" o "Black yeast", conocidos por su alta resistencia a condiciones hostiles (Onofri et al., 2007) y por habitar ambientes inusuales (Zalar et al., 1999; Zhdanova et al., 2000; Sterflinger, 2005; Selbmann et al., 2008). En este estudio, se encontró que la aparición de estos microorganismos se daba principalmente en la parte exterior del ducto de ingreso del combustible hacia el tanque. Sin embargo, no existen otros reportes sobre la presencia de levaduras en dicho ambiente, por lo cual, el objetivo de este estudio fue aislar e identificar levaduras que habitan tanques de gasolina de vehículos urbanos, evaluando su potencial actividad de degradación de algunos hidrocarburos aromáticos derivados del petróleo, como parte de estrategias de biodegradación de estos compuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras y obtención de aislamientos

Se escogieron tres automóviles de antigüedad igual o mayor a 8 años, dado que el asentamiento de esporas en condiciones de baja humedad del tanque puede tomar un tiempo considerable, y teniendo en cuenta que ocurre únicamente durante los procesos de reabastecimiento de combustible (Isola et al., 2013). Para la toma de muestras del ducto y tanque de gasolina, se realizó un frotis de las paredes y/o del tubo de ingreso de la gasolina con hisopos de algodón estéril (uno por cada tanque), los cuales se introdujeron en tubos de ensayo con caldo nutritivo como medio de transporte. Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta ser procesadas en el laboratorio. Para el cultivo de las levaduras, se tomó directamente una alícuota de 100 µL del caldo nutritivo que contenía el hisopo con la muestra, y se realizó una dilución seriada en solución salina de 10^{-1} a 10^{-3} , sembrando alícuotas de 100 µL de la dilución de 10^{-3} en agar Sabouraud (SDA) (Oxoid, Inglaterra), suplementado con gasolina corriente al 1%. Ésta se adicionó al medio después de que fue esterilizado, homogenizándola con éste en un vaso de precipitado con la ayuda de un agitador magnético, antes de servirlo en las cajas Petri, sin observar separación de la gasolina una vez se

solidificó el agar. Para evitar el crecimiento de bacterias, se adicionó cloranfenicol al medio, en concentración de 0,2 g/ L. Las cajas Petri fueron puestas en incubación a 25 °C durante 10 días. Los cultivos que presentaron crecimiento de colonias de levaduras fueron sembrados en SDA, suplementado con gasolina corriente al 1% y cloranfenicol en la misma concentración. Se realizaron repiques de cada morfotipo obtenido, mediante la técnica de siembra por agotamiento en medio agar papa dextrosa (PDA) (Difco, EUA). Todos los aislamientos fueron nombrados con la letra del vehículo de donde fueron aislados, y otros caracteres alfanuméricos para su distinción. Se realizó observación microscópica de cada aislamiento mediante tinción con cristal violeta (Albor, Colombia).

Medio de cultivo y estandarización del inóculo.

Para evaluar el crecimiento de las levaduras en medios con hidrocarburos aromáticos, se empleó medio mínimo sólido con la siguiente composición: 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,8 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0,2 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0,2 g L⁻¹ MgSO₄·7H₂O. El medio se ajustó a pH 5.0, adicionando 250 µL de HCl 1N y como agente solidificante se utilizó agarosa al 1%. Para estandarizar el inóculo a una densidad óptica (DO) determinada, se agregó una pequeña cantidad del aislamiento (equivalente a la punta de un asa microbiológica) en un tubo Eppendorf, adicionando 500 µL de buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés). Esto se colocó en pozos de microtitulación, con el fin de realizar la medición de la densidad óptica, utilizando el espectrofotómetro TECAN Genios (TECAN US, Durham, NC). Con las primeras mediciones, se realizó el ajuste haciendo una dilución del inóculo previamente medido, hasta que la densidad óptica se ajustara a 0.6 aproximadamente. Posteriormente, se realizaron tres lavados consecutivos de los inóculos con 500 µL de PBS en tubos Eppendorf, centrifugando a 8000 g durante 6 min, con el fin de eliminar cualquier traza de carbono del medio PDA en el que estaban las levaduras. El sobrenadante fue descartado, y el inóculo fue re suspendido en 500 µL de PBS para posterior siembra en el medio mínimo mineral.

Ensayos de crecimiento con hidrocarburos aromáticos.

Se realizaron ensayos de crecimiento de los aislamientos utilizando benceno y tolueno (Sigma, EUA), al ser éstos los hidrocarburos aromáticos más simples. Para ello, se siguió la metodología para ensayos con única fuente de carbono de Jun-

ca & Pieper, 2004, para lo cual se colocaron 50 µL del hidrocarburo en una punta de pipeteador estéril de 100 µL sellada, de tal manera que la fase de vapor pudiera ser aprovechada por las levaduras (figura 1). En cada caja de Petri, se sembraron tres micro gotas del inóculo estandarizado, e inmediatamente, se sellaron con papel Parafilm® y una película plástica para evitar al máximo la pérdida del vapor del hidrocarburo. Para evaluar el crecimiento de los aislamientos con hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, fenantreno y pireno. Sigma, EUA), se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero agregando 0,1 g del hidrocarburo en la tapa de la caja Petri. Los ensayos se dejaron en incubación de 10 a 15 días a 27°C. Simultáneamente, se sembraron inóculos estandarizados de los aislamientos en medio PDA con gasolina al 1%, con las mismas condiciones de incubación, con el fin de comparar el crecimiento en un medio rico en carbono. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Como control negativo del crecimiento con los hidrocarburos, se seleccionó la cepa *Pichia pastoris* CG512, proveniente del cepario de la Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia). Esta cepa se escogió debido a su incapacidad para crecer en los hidrocarburos estudiados. La cepa *Pichia anomala* CG649, proveniente del cepario de la Corporación CorpoGen (Bogotá, Colombia), fue utilizada como control positivo, por ser reportada previamente como degradadora de naftaleno y fenantreno (Pan *et al.*, 2004). Para la reactivación de estas cepas, se tomaron viales que estaban almacenados a -80° C, se sembraron por estriado en medio PDA con gasolina al 1% y se incubaron a 27°C de 24 a 48 horas. Todos los controles fueron sembrados simultáneamente en medio mínimo mineral con los distintos hidrocarburos a probar.

El crecimiento de los aislamientos con los hidrocarburos se evaluó cualitativamente, de acuerdo con los siguientes criterios:

-	Sin crecimiento
-/+	Muy poco crecimiento
+	Poco crecimiento
++	Crecimiento notorio pero menor que en medio rico en carbono
+++.	Crecimiento igual que en medio rico en carbono

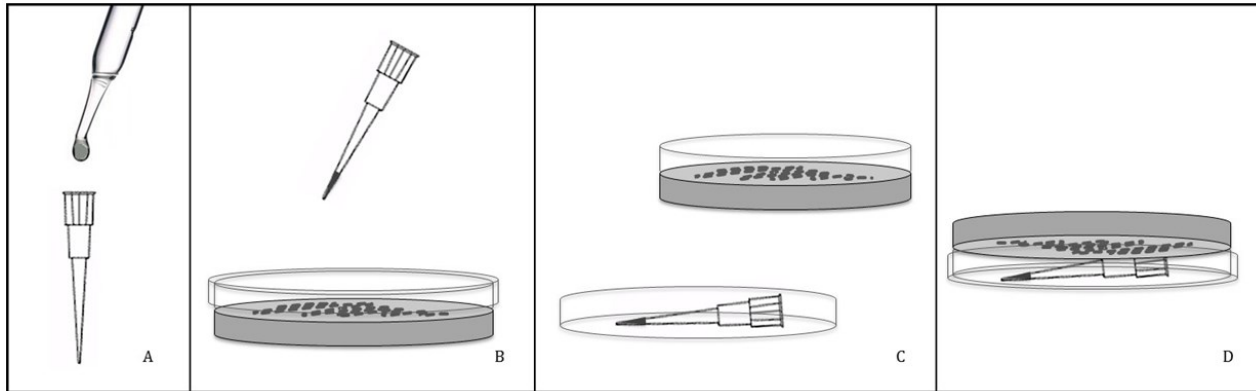


Figura 1. Procedimiento para los ensayos de crecimiento con hidrocarburos aromáticos. **A)** Forma en que se agrega el hidrocarburo en la punta sellada. **B)** Caja Petri con el aislamiento. **C)** Disposición de la punta con el hidrocarburo en la tapa de la

Identificación molecular de los aislamientos obtenidos

La extracción del ADN de cada aislamiento se realizó mediante inoculación de una colonia de la levadura en 50 μ L de PBS, centrifugada a 13000 g por 5 min, y re-suspendiendo el pellet en PBS. Posteriormente, se realizó lisis térmica mediante incubación a 95°C por 15 min. La suspensión fue centrifugada a 13000 g por 15 min, y se tomaron 2 μ L del sobrenadante para amplificación directa por PCR de las regiones ITS1 e ITS2 del ARNr utilizando los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), reportados por (White *et al.*, 1990) bajo las siguientes condiciones para 25 μ L de reacción: Taq DNA polimerasa Tucan Taq® 1 U/reacción (CorpoGen, Bogotá), dNTPs 100 μ L (VBLABS ref ABMG050, Canadá), cloruro de magnesio 1,5 mM, tampón de reacción 1X. Los parámetros de PCR fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 3 min, alineación a 55°C por un min, y un ciclo de extensión final a 72°C por 2 min. Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5 %, en cámara de electroforesis a 100 mV durante 45 min, y enviados a secuenciar mediante la técnica de Sanger (MacroGen, Corea) utilizando los mismos iniciadores para obtener secuencias directas y reversas de la región ITS1 a ITS2.

Identificación taxonómica

Las secuencias obtenidas fueron revisadas por calidad, removiendo ambigüedades. Las secuencias reversa y directa correspondiente a cada

aislamiento fueron ensambladas empleando el software Geneious (4.8.5), obteniendo una secuencia consenso. Éstas fueron comparadas contra la base de datos del GenBank, utilizando el programa BLAST, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la base de datos UNITE (<https://unite.ut.ee/analysis.php>) para su identificación.

RESULTADOS

Obtención de aislamientos presentes en los tanques de combustible de vehículos automotores

Dos de los tanques tuvieron presencia de levaduras. Se obtuvieron un total de 16 aislamientos, los cuales fueron tolerantes a crecer en medio PDA suplementado con gasolina al 1%. Los aislamientos presentaron pigmentos naranjas rojizos, blancos y rosados, aspecto cremoso y brillante con los bordes de las colonias lisos, redondos, y elevación convexa. La observación microscópica de cada aislamiento permitió observar tamaño y forma de células levaduriformes (figura 2).

Ensayos de crecimiento con hidrocarburos aromáticos

En los ensayos con hidrocarburos aromáticos, todos los aislamientos presentaron crecimiento notorio pero menor que en PDA, con benceno y tolueno. Tres de los aislamientos (C1C; C1NR; C3RCS) fueron escogidos para su identificación molecular por presentar crecimiento notorio o igual a su crecimiento en PDA (tabla 1) en al menos uno de los hidrocarburos policíclicos analizados. El aislamiento C1C presentó crecimiento notorio en pireno, y poco crecimiento en naftaleno y fenantreno. El aislamiento C1NR, presentó

crecimiento notorio en fenantreno y pireno, y poco crecimiento en naftaleno. Una de las réplicas del aislamiento C3RCS presentó crecimiento notorio en pireno. Los demás aislamientos presentaron muy poco crecimiento o no presentaron crecimiento en absoluto en ninguno de los hidrocarburos policíclicos analizados.

La cepa *P. anomala* utilizada como control presentó el crecimiento más notorio en todos los hidrocarburos aromáticos analizados. Se reporta su crecimiento en pireno.

Identificación molecular de los aislamientos

Para los aislamientos seleccionados se obtuvieron productos de PCR del tamaño esperado para la región amplificada (600 pb aproximadamente) (Figura 3). De acuerdo con el análisis de BLAST y la base de datos UNITE, los aislamientos C1C, C1NR y C3RCS pertenecen al género *Rhodotorula*, con un porcentaje de identidad > 99%. En la Tabla 2 se observan los aislamientos con su respectiva identidad, al igual que el número de pares de bases con las cuales fue comparada, y el número de acceso de UNITE.

DISCUSIÓN

En este estudio se obtuvieron 16 aislados de levaduras provenientes de tanques de gasolina de vehículos urbanos. Se reporta por primera vez la presencia de levaduras del género *Rhodotorula* en este ambiente. Las levaduras pueden vivir en depósitos de gasolina y biodiesel, aprovechando estos compuestos como su fuente de alimento y energía (Goulart *et al.*, 2014). Su presencia en este ambiente sugiere adaptaciones para sobrevivir en condiciones hostiles, con baja disponibilidad de agua, donde los microorganismos estarían en contacto directo con el combustible, aprovechando los hidrocarburos aromáticos y alifáticos que se encuentran presentes en la gasolina, como lo sugiere Isola *et al.* (2013), quienes encontraron microorganismos levaduriformes del género *Exophiala*, cuya aparición en tanques de gasolina de carros estaría justificada gracias a las adaptaciones extremo tolerantes que presenta este género en particular, a condiciones ambientales limitantes (Onofri *et al.*, 2007). Sin embargo, no es claro el mecanismo de consumo de los hidrocarburos en este ambiente inusual. Para degradar los contaminantes, los microorganismos deben tener procesos metabólicos para optimizar el contacto entre las células microbianas y las sustancias orgánicas,

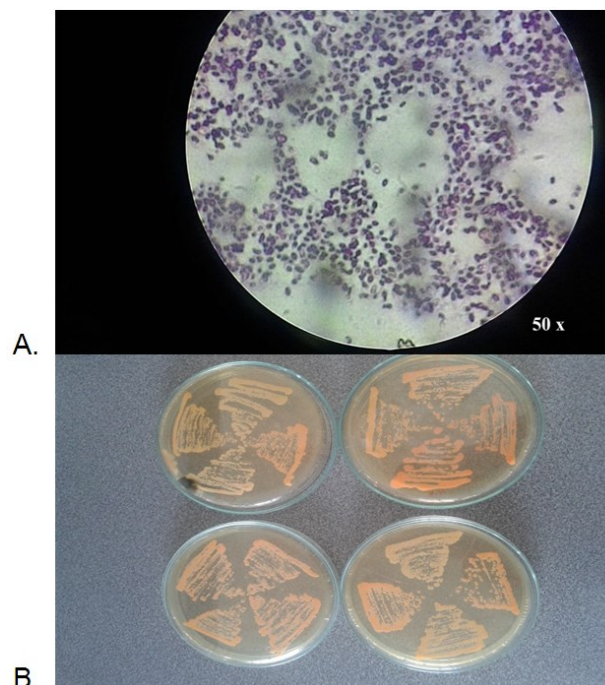


Figura 2. A). Tinción de Gram del aislamiento C1NR, identificado como *R. dairenensis*. Acercamiento de 50x por Microscopía óptica convencional. **B).** Aspecto de los aislamientos en medio PDA con gasolina al 1%.

como la producción de biosurfactantes, además de la producción de oxigenasas y peroxidasas, que se encargan de mediar la conversión de los contaminantes orgánicos paso a paso en productos intermedios del metabolismo (Atlas, 1981), como ácidos, cetonas, aldehídos, alcoholes, entre otros (Itah *et al.*, 2009). Aunque tradicionalmente se ha documentado el consumo mediado por la producción de biosurfactantes, cuya utilidad resulta en un mayor aprovechamiento del hidrocarburo al aumentarse la disponibilidad de éste por medio de la emulsificación (Thavasi *et al.*, 2009), se ha destacado recientemente (Ángeles *et al.* (2017), que el modelo predominante de aprovechamiento de hidrocarburos en tanques de biorreactores sería por contacto directo, al observarse que en ausencia de biosurfactantes, se presenta el mayor consumo de diésel por parte del consorcio bacteriano. En condiciones de baja humedad dentro del tanque, la incorporación de los hidrocarburos en las células por contacto directo sería más eficiente, al no haber una interfase predominante de agua-combustible, en donde pudiera llevarse a cabo el proceso de emulsificación. Por otro lado, se ha encontrado (Goulart *et al.*, 2014) que *R. mucilaginosa* y *R. diobovatum* no producen biosurfactantes en un medio con gasolina como única

Tabla 1. Resultados de los ensayos de crecimiento en medios mínimos minerales con distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

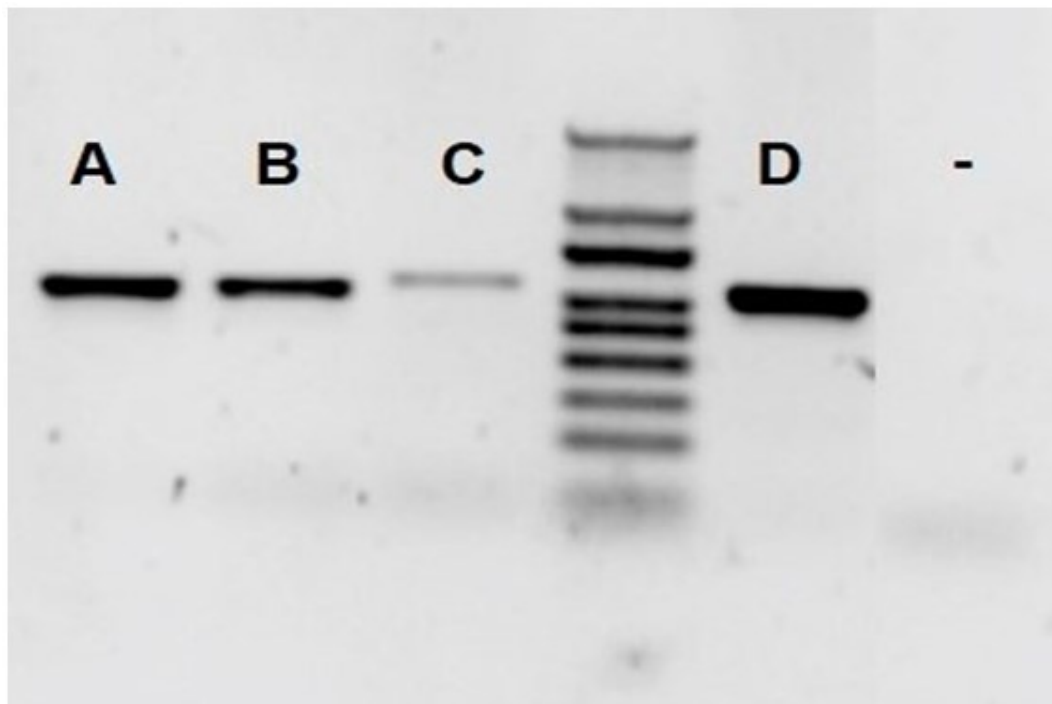
Aislamiento\ Fuente de carbono	Naftaleno			Fenantreno			Pireno		
	Réplica								
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C2C2	-	-	-	-/+	-	-/+	-	-	-/+
*C1C	+	+	+	+	+	+	++	++	++
*C1NR	+	+	+	++	++	++	++	++	++
C2RF	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C1RTC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B2RF	-	-	-/+	-	-	-	-	-	-
C2R1	-/+	-/+	-/+	+	+	+	+	+	+
B2R	-/+	-/+	+	-	-	-	-/+	-/+	-/+
C1RC	-	-	-/+	+	-	-/+	+	+	+
C2C	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+	-
C2RI	-	-/+	+	-/+	-	+	-/+	-/+	-/+
B1NR	-	-/+	-	-	-	-/+	-/+	-/+	-
C2R2	+	+	-/+	+	+	-/+	+	+	+
*C3RCS	+	+	+	+	+	+	+	++	+
C1RL	-	-/+	-/+	-	-	-	-	+	+
<i>P. anomala</i>	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

fuelle de carbono, lo cual podría dar indicios que, en los tanques, las levaduras identificadas no producirían estos compuestos, al estar permanentemente expuestas a este combustible. En cuanto a la presencia del género *Rhodotorula* en los tanques de gasolina, se han reportado en tanques de combustible de aviones (Rauch *et al.*, 2006), así como en depósitos de almacenamiento con residuos de lubricantes aceitosos y suelos contaminados por hidrocarburos (Goulart *et al.*, 2014). Sin embargo, la diversidad de levaduras degradadoras de PAH reportadas para tanques de almacenamiento de hidrocarburos es aún muy limitada, conociéndose algunos géneros como *Candida*, *Meyerozyma*, *Wickerhamia*, *Saccharomyces* (Itah *et al.*, 2009), *Yarrowia* (Mauersberger *et al.*, 2001), *Cryptococcus*, *Torulopsis* y *Trichosporon* (Thurston *et al.*, 1994). En el presente estudio se identificaron tres cepas del género *Rhodotorula*. Los aislamientos C1C y C3RCS corresponden a la especie *R. calyptogenae*, (99.8 % de identidad) y el aislamiento C1NR, corresponde a *R. dairenensis*

(99.8% de identidad). Otras especies de este género como *R. mucilaginosa* (Goulart *et al.*, 2014) y *R. aurantiaca* (Miranda *et al.*, 2007), poseen la capacidad de degradar queroseno, gasolina y aceite diésel, así como algunos hidrocarburos alifáticos como decano, nonano y dodecano. En el presente estudio, los aislamientos crecieron en un medio con gasolina, lo cual indicaría su adaptación a habitar tanques en donde constantemente están en contacto con dicho combustible. Según los ensayos de crecimiento en medio mínimo mineral, *R. calyptogenae* y *R. dairenensis* fueron capaces de crecer en un medio con benceno, tolueno, naftaleno, fenantreno y pireno. El mayor crecimiento se observó con los dos primeros hidrocarburos (crecimiento notorio pero menor que en PDA y gasolina), sugiriendo que éstos microorganismos los utilizan como fuente de carbono en los tanques, al estar presentes en la gasolina. El crecimiento observado en los hidrocarburos policíclicos sugiere que estas levaduras pueden degradar PAH de 5 anillos bencénicos, lo

Tabla 2. Resultado del análisis de BLAST para los aislamientos C1C, C1NR, C3RCS y *P. anomala*.

Aislamiento	Pares de bases	% Identidad	% de Cobertura	Identificación	Numero de acceso de UNITE.
C1C	567	99,8	99,8	<i>Rhodotorula calyptogenae</i> / <i>Cystobasidium calyptogenae</i>	EU669878
C1NR	571	99,8	99,8	<i>R. dairenensis</i>	KY104735
C3RCS	568	99,8	99,8	<i>Rhodotorula calyptogenae</i> / <i>Cystobasidium calyptogenae</i>	EU669878
<i>P. anomala</i>	593	100	100	<i>P. anomala</i> / <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	AB469881

**Figura 3.** Visualización de los productos de PCR obtenidos, correspondientes a los aislamientos C1C, C1NR, C3RCS y *P. anomala*, mediante gel de agarosa al 1%. A: C1C; B: C3RCS; C: C1NR; D: *Pichia anomala*; -: control negativo.

cual resulta ser ideal para procesos de biorremediación de contaminantes de mayor complejidad, cuya toxicidad y efectos carcinogénicos son de mayor peligro para el ambiente y los seres vivos. La cepa *P. anomala*, empleada como control positivo en los ensayos con única fuente de carbono, presentó el crecimiento más notorio en todos los hidrocarburos aromáticos analizados, lo cual es concordante con otros estudios que constatan su actividad degradadora de PAH como el dibenzofurano (Romero *et al.*, 2002), así como naftaleno, fenantreno, crizeno y dibenzotiofeno (Pan *et al.*, 2004). Se reporta su crecimiento en pireno.

CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvieron 16 aislados de levaduras provenientes de tanques de gasolina de vehículos urbanos. Se reporta por primera vez la presencia de levaduras del género *Rhodotorula* en este ambiente. Tres aislamientos identificados como *R. calyptogenae* y *R. dairenensis* crecieron en medios con benceno, tolueno, naftaleno, fenantreno y pireno, indicando su potencialidad para degradar éstos compuestos derivados del petróleo. Este estudio también reporta el crecimiento de *P. anomala* en pireno.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia por brindar los laboratorios y materiales para las primeras fases del proyecto, a la Corporación CorpoGen, por brindar parte de la financiación y las instalaciones y equipos para los análisis de crecimiento e identificación molecular de los aislamientos obtenidos. Finalmente, a las personas que se ofrecieron para disponer de sus vehículos para los muestreos. Este estudio obtuvo el reconocimiento como mejor trabajo de grado de pregrado a nivel Nacional y Regional en el año 2016, en el concurso anual de Innovación y Emprendimiento de Ecopetrol (Bogotá-Colombia), en la categoría de "Procesos de refinación y petroquímica".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahearn, D. G., Meyers, S. P., & Standard, P. G. (1971). The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. *Dev. Ind. Microbiol*, 12, 126-134.
- Arriaga, S., & Revah, S. (2005). Improving hexane removal by enhancing fungal development in a microbial consortium biofilter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 107-115. <https://doi.org/10.1002/bit.20424>.
- Awe, S., Mikolasch, A., Hammer, E., & Schauer, F. (2008). Degradation of phenylalkanes and characterization of aromatic intermediates acting as growth inhibiting substances in hydrocarbon utilizing yeast *Candida maltosa*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62(4), 408-414. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.03.007>.
- Aydin, S., Karaçay, H. A., Shahi, A., Gökçe, S., Ince, B., & Ince, O. (2017). Aerobic and anaerobic fungal metabolism and Omics insights for increasing polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Fungal Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.12.001>.
- Cerniglia, C. E., & Sutherland, J. B. (2010). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 2079-2110). https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_151.
- Chandran, P., & Das, N. (2011). Degradation of diesel oil by immobilized *Candida tropicalis* and biofilm formed on gravels. *Biodegradation*, 22(6), 1181-1189. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9473-1>.
- Chen, K. C., Lin, Y. H., Chen, W. H., & Liu, Y. C. (2002). Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 490-497. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00148-5).
- Chranowski, Ł., Bielicka-Daszkiwicz, K., Owsianiak, M., Aurich, A., Kaczorek, E., & Olszanowski, A. (2008). Phenol and n-alkanes (C12 and C16) utilization: Influence on yeast cell surface hydrophobicity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1943-1949. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9704-8>.
- Clonetech Laboratories Inc. (2009). Clonetech - Yeast Protocols Handbook. Protocol No. PT3024-1. Retrieved from www.clonetech.com.
- Daverey, A., & Pakshirajan, K. (2011). Recent advances in bioremediation of contaminated soil and water using microbial surfactants. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7931-5_9.
- Dell'Abate, M. T., Benedetti, A., Poletti, P., Pompili, L., Mocali, S., Dentice, A., & De Angelis, M. (2006). Microbial monitoring of a petroleum bioremediation process in soil. In *Geophysical Research Abstracts* (Vol. 8).
- Edmonds, P., & Cooney, J. J. (1967). Identification of microorganisms isolated from jet fuel systems. *Applied Microbiology*, 15(2), 411-6. Retrieved from

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=546914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Fan, M. Y., Xie, R. J., & Qin, G. (2014). Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with yeast. *Environmental Technology* (United Kingdom), 35(4), 391–399. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.829504>.
- Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B., & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.02.002>.
- Goulart, G. G., Coutinho, J. O. P. A., Monteiro, A. S., Siqueira, E. P., & Santos, V. L. (2014). Isolation and Characterization of Gasoline-Degrading Yeasts from Refined Oil-Contaminated Residues. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 5(2), 1.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., & Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 64(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.11.006>.
- Hesham, A. E. L., Wang, Z., Zhang, Y., Zhang, J., Lv, W., & Yang, M. (2006). Isolation and identification of a yeast strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. *Annals of Microbiology*, 56(2), 109–112. <https://doi.org/10.1007/BF03174990>.
- Hughes, K. A., Bridge, P., & Clark, M. S. (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 372(2–3), 539–548. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.09.016>.
- Isola, D., Selbmann, L., de Hoog, G. S., Fenice, M., Onofri, S., Prenafeta-Boldú, F. X., & Zucconi, L. (2013). Isolation and Screening of Black Fungi as Degradors of Volatile Aromatic Hydrocarbons. *Mycopathologia*, 175(5–6), 369–379. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9635-2>.
- Itah, A. Y., Brooks, A. A., Ogar, B. O., & Okure, A. B. (2009). Biodegradation of International Jet A-1 aviation fuel by microorganisms isolated from aircraft tank and joint hydrant storage systems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(3), 318–327. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9770-0>.
- Junca, H., & Pieper, D. H. (2004). Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: Comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries. *Environmental Microbiology*, 6(2), 95–110. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00541.x>.
- Maliyekkal, S. M., Rene, E. R., Philip, L., & Swaminathan, T. (2004). Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *Journal of hazardous materials*, 109(1), 201–211.
- Markovetz, A. J., Cazin, J., & Allen, J. E. (1968). Assimilation of alkanes and alkenes by fungi. *Applied microbiology*, 16(3), 487–489.
- Mauersberger, S., Wang, H., Gaillardin, C., Barth, G. G., & Nicaud, J. (2001). Insertional Mutagenesis in the n -Alkane-Assimilating Yeast *Yarrowia lipolytica*: Generation of Tagged Mutations in Genes Involved in Hydrophobic Substrate Utilization. *Journal of Bacteriology*, 183(17), 5102–5109. <https://doi.org/10.1128/JB.183.17.5102>.
- Millar, B. C., Jiru, X., Moore, J. E., & Earle, J. A. P. (2000). A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*, 42(2), 139–147. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00174-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00174-3).
- Miranda, R. D. C., De Souza, C. S., Gomes, E. D. B., Lovaglio, R. B., Lopes, C. E., & Sousa, M. D. F. V. D. Q. (2007). Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco-Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(1), 147–152. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000100018>.
- Neihof, R. A. (1988). Microbes in fuel: An overview with a naval perspective. In Distillate fuel: contamination, storage, and handling. *ASTM International*.
- Onofri, S., Selbmann, L., de Hoog, G. S., Grube, M., Barreca, D., Ruisi, S., & Zucconi, L. (2007). Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. *Advances in Space Research*, 40(11), 1657–1664. <https://doi.org/10.1016/j.asr.2007.06.004>.
- Pan, F., Yang, Q., Zhang, Y., Zhang, S., & Yang, M. (2004). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pichia anomala*. *Biotechnology Letters*, 26(10), 803–806. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000025882.33234.91>.
- Prenafeta-Boldú, F. X., Kuhn, A., Luykx, D. M. a. M., Anke, H., van Groenestijn, J. W., & de Bont, J. a. M. (2001). Isolation and characterization of fungi growing on volatile aromatic

- hydrocarbons as their sole carbon and energy source. *Mycological Research*, 105(4), 477–484. <https://doi.org/10.1017/S0953756201003719>.
- Prince, R. C., Gramain, A., & Mcgenity, T. J. (2010). Prokaryotic hydrocarbon degraders. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, 1672–1692. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_118.
- Priya, A., Manab Sarma, P., & Lal, B. (2016). Isolation and characterization of *Candida vishwanathii* strain TERI MS1 for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. *Desalination and Water Treatment*, 57(46), 22099-22106.
- Rauch, M. E., Graef, H. W., Rozenzhak, S. M., Jones, S. E., Bleckmann, C. A., Kruger, R. L., ... & Stone, M. O. (2006). Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 29–36. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0023-x>.
- Romero, M. C., Hammer, E., Cazau, M. C., & Arambarri, A. M. (2002). Isolation and characterization of biaryllic structure-degrading yeasts: Hydroxylation potential of dibenzofuran. *Environmental Pollution*, 118(3), 379–382. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00290-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00290-1).
- Samuel, O., Ifeanyi, O., Michael, O., & Frederick, O. (2015). Microbial Contaminants in the Commercial aviation fuel obtained from Benin City airport, Nigeria. *Universal Journal of Microbiology Research*, 3(3), 31-35.
- Segura, A., Hurtado, A., Rivera, B., & Lazaroaie, M. M. (2008). Isolation of new toluene-tolerant marine strains of bacteria and characterization of their solvent-tolerance properties. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1408–1416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03666.x>
- Selbmann, L., de Hoog, G. S., Zucconi, L., Isola, D., Ruisi, S., Gerrits van den Ende, A. H. G., Onofri, S. (2008). Drought meets acid: three new genera in a dothidealean clade of extremotolerant fungi. *Studies in Mycology*, 61, 1–20. <https://doi.org/10.3114/sim.2008.61.01>.
- Shennan, J. L. (1988). Control of microbial contamination of fuels in storage. In *Biodeterioration 7* (pp. 248-255). Springer Netherlands.
- Sicilia, M. H. L., & Cuesta, F. S. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, 11, 1–20.
- Singh, H. (2006). Mycoremediation. Mycoremediation: Fungal Bioremediation. <https://doi.org/10.1002/0470050594>.
- Sterflinger, K. (2006). Black yeasts and meristematic fungi: ecology, diversity and identification. In *Biodiversity and ecophysiology of yeasts* (pp. 501-514). Springer Berlin Heidelberg.
- Swift, S. T. (1988). Identification and control of microbial growth in fuel handling systems. In *Distillate Fuel: Contamination, Storage, and Handling*. ASTM International.
- Thavasi, R., Subramanyam Nambaru, V. R. M., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2009). Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Marine Biotechnology*, 11(5), 551–556. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9162-1>.
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/13500872-140-1-19>.
- Walker, J. D., Colwell, R. R., & Petrakis, L. (1975). Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology*, 30(1), 79–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=187118&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *PCR Protocols* (pp. 315–322). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>.
- Yemashova, N. A., Murygina, V. P., Zhukov, D. V., Zakharyantz, A. A., Gladchenko, M. A., Appanna, V., & Kalyuzhnyi, S. V. (2007). Biodegradation of crude oil and oil derived products: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11157-006-9118-8>.
- Zalar, P., De Hoog, G. S., & Gunde-Cimerman, N. (1999). *Trimmatostroma salinum*, a new species from hypersaline water. *Studies in Mycology*, 43, 57–62.
- Zhdanova, N. N., Zakharchenko, V. A., Vember, V. V., & Nakonechnaya, L. T. (2000). Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. *Mycological Research*, 104(12), 1421–1426. <https://doi.org/10.1017/S0953756200002756>.